Vinicius Adriano Vieira

**Avaliação da ativação de linfócitos T em indivíduos com
infecção anorretal assintomática por *Chlamydia trachomatis*
e/ou *Neisseria gonorrhoeae* em uma população de homens que
fazem sexo com homens**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

**SÃO PAULO
2017**

Vinicius Adriano Vieira

**Avaliação da ativação de linfócitos T em indivíduos com
infecção anorretal assintomática por *Chlamydia trachomatis*
e/ou *Neisseria gonorrhoeae* em uma população de homens que
fazem sexo com homens**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

**SÃO PAULO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Vinicius Adriano

Avaliação da ativação de linfócitos T em indivíduos com infecção anorretal assintomática por *Chlamydia trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoeae* em uma população de homens que fazem sexo com homens / Vinicius Adriano Vieira. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.*Chlamydia trachomatis* 2.*Neisseria gonorrhoeae* 3.HIV 4.Profilaxia pré-exposição 5.Linfócitos T 6.Imunidade celular 7.Ativação linfocitária 8.Homossexualidade masculina

USP/FM/DBD-357/17

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

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

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

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

Dedicatória

Aos meus pais e à minha irmã pela presença e suporte constantes.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Esper Georges Kallás, pelo apoio desde a graduação, confiança, incentivo e inspiração como médico e cientista.

A minhas amigas e colaboradoras, Vivian Avelino-Silva, Priscilla Ramos Costa e Dayane Costa, que participaram intensamente na elaboração e desenvolvimento deste projeto.

A toda equipe do PrEP Brasil, do Centro de Pesquisa Clínica da Universidade de São Paulo, do Laboratório de Investigação Médica 60, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ, e do CRT-DST/AIDS de São Paulo.

Aos voluntários do PrEP Brasil que genuinamente contribuíram com esse estudo.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	8
2.1. Objetivo Geral.....	9
2.2. Objetivos Específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Casuística	11
3.2. Critérios de inclusão	13
3.3. Organograma de procedimentos do PrEP Brasil.....	14
3.4. Dados clínicos e epidemiológicos	14
3.5. Cálculo amostral	15
3.6. Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> anorretal	15
3.7. Coleta, processamento e armazenamento das amostras.....	16
3.8. Descongelamento das células criopreservadas	16
3.9. Imunofenotipagem de superfície de células mononucleares	17
3.10. Análise de Citometria	20
3.11. Dosagem de CD14 solúvel no plasma	23
3.12. Dados gerados e análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1. População do estudo	27
4.2. Avaliação da frequência de linfócitos T e suas subpopulações	30
4.3. Avaliação do perfil de ativação celular em linfócitos T	32
4.4. Avaliação da expressão de marcadores de exaustão e senescência celular	36
4.5. Mensuração dos níveis de CD14 solúvel no plasma	39
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	51

Apêndice

Listas

SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APC	<i>Fluorocromo Allophycocyanin</i>
APC-H7	<i>Fluorocromo Allophycocyanin H7</i>
BD	<i>Becton, Dickinson and Company</i>
BV 421	<i>Fluorocromo Brilliant Violet 421</i>
BV 510	<i>Fluorocromo Brilliant Violet 510</i>
BV 605	<i>Fluorocromo Brilliant Violet 605</i>
CAPPesq	<i>Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa</i>
CCR5	<i>C-C Chemokine Receptor Type 5</i>
CCR7	<i>C-C Chemokine Receptor Type 7</i>
CD3	<i>Cluster of Differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD27	<i>Cluster of Differentiation 27</i>
CD28	<i>Cluster of Differentiation 28</i>
CD38	<i>Cluster of Differentiation 38</i>
CD45RA	<i>Cluster of Differentiation 45 Isoform RA</i>
CD57	<i>Cluster of Differentiation 57</i>
CD69	<i>Cluster of Differentiation 69</i>
CD70	<i>Cluster of Differentiation 70</i>
CD80	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of Differentiation 86</i>
CD95	<i>Cluster of Differentiation 95</i>
CD197	<i>Cluster of Differentiation 197</i>
CD279	<i>Cluster of Differentiation 279</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEACAM	<i>Antígeno carcinoembriogênico</i>
CRT DST/AIDS	<i>Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>

DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DV	Desvio-padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FT-ABS	<i>Fluorescent Treponemal Antibody Absortion Test</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluorocromo <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter – Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter- Height</i>
FTC	Emtricitabina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen D Related</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HSV-2	<i>Herpes simplex virus Type 2</i>
IIQ	Intervalo interquartil
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 p70
IPERGAY	<i>Intervention Préventive de l'Exposition aux Risques avec et pour les Gays</i>
iPrEx	<i>Pre-exposure Prophylaxis Initiative</i>
IST	Infecção sexualmente transmissível
LIM-60	Laboratório de Investigação Médica 60
LPS	Endotoxina lipopolissacarídea bacteriana
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-3β	<i>Macrophage Inflammatory Protein 3 beta</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	Não significativa
Opa	Proteína de opacidade de colônia
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PD	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Fluorocromo <i>Phycoerythrin</i>
PE CF594	Fluorocromo <i>Phycoerythrin Cyanine Based Fluorescent Dye 594</i>
PE Cy5	Fluorocromo <i>Phycoerythrin Cychrome-5</i>
PE Cy7	Fluorocromo <i>Phycoerythrin Cychrome-7</i>
PerCP Cy5.5	<i>Peridin-chlorophyll Proteins Cychrome-5.5</i>
PrEP	<i>Pre-exposure prophylaxis / Profilaxia pré-exposição</i>
PROUD	<i>PRe-exposure Option for reducing HIV in the UK</i>
R10	Meio RPMI1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino
R&D	<i>Research & Development</i>
RPMI1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
sCD14	<i>Soluble Cluster of Differentiation 14</i>
SPICE	<i>Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations</i>
SSC-A	<i>Side Scatter Area</i>
STIs	<i>Sexually Transmitted Infections</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Tenofovir
Tregs	Linfócitos T reguladores
Th1	Linfócitos T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócitos T <i>helper 2</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
vs.	<i>versus</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	<i>Ultraviolet</i>

SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
pg	picograma
µL	microlitro
µM	micromolar
%	porcentagem

TABELAS

Tabela 1 - Procedimentos programados no PrEP Brasil

Tabela 2 - Descrição das moléculas utilizadas na marcação celular

Tabela 3 - Fluorocromos e títulos dos anticorpos utilizados no painel proposto

Tabela 4 - Dados demográficos da população do estudo

Tabela 5 - Linfócitos T ativados nos grupos com *swab* positivo e com *swab* negativo

Tabela 6 - Linfócitos T expressando marcadores de ativação, exaustão e senescência

FIGURAS

- Figura 1 -** Estratégia de análise
- Figura 2 -** Curvas-padrão obtidas para as placas 1 e 2 após a leitura do ensaio de ELISA
- Figura 3 -** Fluxograma de inclusão dos voluntários com *swab* positivo
- Figura 4 -** Frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+ e suas subpopulações em indivíduos com e sem infecção anorretal por CT e/ou NG
- Figura 5 -** Ativação de linfócitos T CD8+
- Figura 6 -** Ativação de linfócitos T CD4+
- Figura 7 -** Expressão e co-expressão de marcadores de ativação, exaustão e senescência em linfócitos T CD8+ e suas subpopulações
- Figura 8 -** Comparação dos níveis de CD14 solúvel no plasma nos indivíduos com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG.

Resumo

Vieira VA. Avaliação da ativação de linfócitos T em indivíduos com infecção anorretal assintomática por *Chlamydia trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoeae* em uma população de homens que fazem sexo com homens [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A profilaxia pré-exposição (PrEP) ao HIV se consolidou como uma importante estratégia de combate ao avanço da epidemia. Ainda assim, a incidência de casos da infecção vem aumentando na população jovem, assim como a de outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), que atuam como importante fator de risco para transmissão do HIV-1. Entre as infecções mais frequentemente diagnosticadas estão *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Neisseria gonorrhoeae* (NG). A presença de lesões na mucosa genital e anal são fatores de risco estabelecidos para a transmissão do HIV-1, porém o impacto das infecções assintomáticas ainda é pouco conhecido. Dados recentes mostram que a ativação sistêmica de linfócitos T é um fator de risco para a aquisição da infecção pelo HIV-1. Nesse estudo, estudamos a ativação de linfócitos T na presença de infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG. Células mononucleares do sangue periférico de voluntários do PrEP Brasil, um estudo clínico demonstrativo de PrEP ao HIV em homens que fazem sexo com homens, foram descongeladas para análise da ativação de linfócitos T. Trinta e quatro participantes com *swab* anorretal positivo para CT e/ou NG foram selecionados, enquanto assintomáticos e negativos para outras ISTs. Trinta e cinco controles foram selecionados randomicamente. Encontramos uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ (1,5 vs. 0,9% $p < 0,005$) no grupo com infecção assintomática. Os linfócitos T CD8⁺ de memória também apresentaram uma maior expressão dos marcadores de ativação. Os marcadores de exaustão e senescência foram significativamente mais expressos no grupo com a infecção. Não foi observado aumento ou diferença nos níveis de CD14 solúvel no plasma. Nossos achados demonstram que as infecções anorretais assintomáticas por CT e NG induzem a ativação sistêmica de linfócitos T CD8⁺. Considerando a alta prevalência dessas infecções e o risco associado de aquisição da infecção pelo HIV-1, o rastreamento periódico e o tratamento sistemático devem ser explorados em conjunto com as estratégias de prevenção ao HIV.

Descritores: *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; HIV; profilaxia pré-exposição; linfócitos T; imunidade celular; ativação celular; ativação linfocitária; homossexualidade masculina

Summary

Vieira VA. Evaluation of T cell activation in individuals with asymptomatic anorectal *Chlamydia trachomatis* and/or *Neisseria gonorrhoeae* in a cohort of men who have sex with men [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Oral antiretroviral pre-exposure prophylaxis (PrEP) has been established as a pivotal strategy in the prevention against HIV epidemic. However, the incidence of HIV-1 infections has been rising among the youth, as well as other sexually transmitted infections (STIs), acting as an important risk factor for HIV-1 acquisition. Infection by *Chlamydia trachomatis* (CT) and *Neisseria gonorrhoeae* (NG) are among the most diagnosed. Although the presence of mucosal lesions is a known risk factor for HIV-1 acquisition, the potential increase in risk associated with asymptomatic STIs is not completely understood. Recent data defined higher T cell activation as a single risk factor for sexually acquired HIV-1 infection. We examined the effect of asymptomatic CT and/or NG anorectal infection on immune activation. Peripheral blood mononuclear cells from participants of PrEP Brasil, a study of daily oral PrEP among healthy men who have sex with men, were analyzed for T cell activation by flow cytometry. Thirty-four participants with positive anorectal swab for CT and/or NG were selected, while negative for other STIs and without any reported symptoms. Thirty-five controls were randomly selected. We found a higher frequency of CD8⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ T cells (1.5 vs. 0.9% $p<0.005$) in the group with CT and/or NG infection and a greater median proportions of activation markers expression in CD8⁺ T cells with memory phenotype. Exhaustion and senescence markers were also significant higher in the infected group. No difference was observed in the soluble CD14 levels. Our findings suggest that asymptomatic CT and NG anorectal infection lead to a systemic activation of the T cell compartment. Considering the high prevalence of asymptomatic infection and the risk of HIV-1 acquisition associated, regular screening and treatment should be explored as an adjuvant tool for HIV prevention.

Descriptors: *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; HIV; pre-exposure prophylaxis; T-lymphocyte; immunity, cellular; lymphocyte activation; homosexuality, male.

1. Introdução

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) têm ganhado importância crescente na saúde pública nas últimas décadas(1). Apesar da alta prevalência global, os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento apresentam um maior número de casos e o impacto econômico constitui perdas crescentes e significantes(2).

Apesar do otimismo com a redução global do número de novos casos diagnosticados de infecção pelo HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus 1*), a epidemia ainda atinge 2,1 milhões de novos indivíduos anualmente e 1,1 milhão morrem a cada ano por consequência da AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)(3). Entre as diversas faces da epidemia de HIV/AIDS, homens que fazem sexo com homens (HSH) são desproporcionalmente afetados, com risco 19 vezes maior de contrair a infecção do que o restante da população(4). A incidência mundial da infecção pelo HIV-1 em HSH abaixo de 25 anos está ao redor de 4,5% e vem aumentando anualmente em diversas regiões(4). Dados epidemiológicos de 2016 no Brasil mostram uma tendência semelhante a descrita, com a diminuição de novos casos na população geral, porém um aumento considerável de novas infecções em adolescentes e adultos jovens(5).

A segurança e eficácia da profilaxia pré-exposição (PrEP) em prevenir a transmissão sexual do HIV-1, especialmente na população de HSH, viabilizaram o uso de uma nova e importante ferramenta para o controle da epidemia de HIV/AIDS(6-9). Apesar de uma tendência na redução da incidência de sífilis nos participantes do primeiro ensaio clínico de PrEP(10), a

implementação dessa estratégia tem como principal barreira a preocupação com o aumento do comportamento de risco e a multiplicação de novos casos de outras ISTs, entre elas aquelas consideradas curáveis, como *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT) e *Treponema pallidum*(11-13).

Em uma revisão sistemática, Newman et al. (2015) estimaram uma prevalência de 357 milhões de ISTs curáveis com 64 milhões de casos atribuídos as Américas(1). A incidência dessas ISTs vem aumentando progressivamente. Nos Estados Unidos são reportados anualmente cerca de 1,4 milhão de ISTs, sendo as infecções por CT e NG as mais prevalentes(14). A população HSH é novamente o grupo com a maior taxa de prevalência: CT de 14,9% e NG de 19,2%(14). A distribuição etária dessa epidemia também se comporta diferente nessa população, mantendo uma prevalência acima de 10% em todas as faixas de idade para ambos os agentes etiológicos(14). A incidência elevada de ISTs também foi observada em coortes de ensaios clínicos de PrEP em HSH. Ao longo do seguimento, 50% e um terço dos voluntários do estudo PROUD (*PRe-exposure Option for reducing HIV in the UK: an open-label randomisation to immediate or Deferred daily Truvada for HIV negative gay*) e IPERGAY (*Intervention Préventive de l'Exposition aux Risques avec et pour les Gays*), respectivamente, foram diagnosticados com alguma IST(8, 9).

Essas infecções são frequentemente diagnosticadas em sítios extragenital. A prevalência descrita na literatura de CT em *swab* anorretal e de orofaringe na população HSH varia de 1-18% e 1-3%, respectivamente. Da mesma maneira, a prevalência de NG varia de 6-21% e 4-12%(15). Em um recente estudo de corte transversal em uma coorte de HSH infectados e não-

infectados pelo HIV-1 no Rio de Janeiro, a prevalência de infecção anorretal por CT foi de 10,0% e por NG de 9,9%, com alta proporção de infecções assintomáticas em sítios extragenital(17,1%)(16). Em um estudo de prevalência de ISTs conduzido na cidade de São Francisco, 85% das infecções retais eram assintomáticas(17).

Devido a alta prevalência de curso clínico assintomático em sítios extragenital em homens, os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomendam o rastreio anual por *swab* uretral, retal e de orofaringe na população HSH ou conforme o tipo de exposição(18). Na população de alto risco, esse rastreamento deve ser feito a cada seis meses. Estima-se que 53% das infecções por CT e 64% das infecções por NG não seriam diagnosticadas se apenas o rastreamento uretral fosse preconizado(17).

Desde o início da epidemia do HIV-1, essas e outras ISTs são consideradas fator de risco importante para a aquisição sexual da infecção(19, 20). Contudo, a força de associação entre essas duas variáveis é difícil de ser estabelecida. A associação frequentemente se confunde com outra variável relevante e inerente que é o comportamento sexual, especialmente devido a complexidade de definir uma relação de causalidade em consequência da dificuldade de associação temporal, de fatores biológicos comuns e fatores não mensuráveis associados a ambas variáveis (HIV e outras ISTs)(19).

No entanto, algumas coortes conseguiram associar a infecção por NG e outras ISTs ulcerativas e não-ulcerativas como fatores de risco isolados para aquisição sexual do HIV-1, especialmente nas infecções anorretais(17, 21-24). Em um estudo conduzido pelos CDC em Nova York, um em cada 15 HSH com diagnóstico de infecção anorretal foi diagnosticado com HIV-1 em um intervalo

de até um ano(21). Em uma coorte retrospectiva, a infecção anorretal por CT e NG foi um fator de risco independente para aquisição da infecção pelo HIV-1 em HSH, aumentando em oito vezes a chance de transmissão do vírus(25).

A presença de infecção genital e anorretal com frequência induzem um processo inflamatório local com recrutamento de células alvo do HIV-1 e ativação celular(26). A presença de CT e NG no epitélio genital leva a uma perda da integridade e da proteção da mucosa em razão do aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (27-29). Infecções no trato genital não ulcerativas também se correlacionam a maior migração de linfócitos T CD4+ no tecido local e aumento da expressão de CCR5 na superfície celular(30). Esses dados reforçam o papel dessas ISTs como agentes ativos no risco de transmissão do HIV-1.

Por outro lado, considerando a alta prevalência de infecções assintomáticas, com baixa ou ausência de inflamação local, os mecanismos que poderiam atuar no aumento do risco de transmissão do HIV-1 ainda são pouco compreendidos. Em uma análise de *swab* anorretal em indivíduos HSH com e sem infecção por CT, não foi observado uma diferença na mensuração de mieloperoxidase na mucosa, indicando ausência de ativação neutrofílica, tanto em voluntários HIV negativos e positivos(31). Além disso, a relação de concentração de α -2-microglobulina e albumina entre a mucosa e o plasma foi igual entre os dois grupos, indiretamente mostrando que a mucosa permanece íntegra independente da presença de CT(31). A concentração retal de citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e IL-10 também foi semelhante entre os dois grupos(31).

Em relação ao HIV-1, os marcadores sistêmicos de inflamação e ativação celular estão associados com o aumento do risco de aquisição sexual

do vírus(32, 33). Indivíduos que adquiriram o HIV-1 apresentavam previamente níveis séricos mais elevados de TNF- α , IL-2, IL-7, e IL-12p70 séricos(32). Em estudos posteriores, a concentração desses marcadores não estava associada obrigatoriamente com a concentração encontrada no trato genital, sugerindo que o aumento dessas citocinas como fator de risco não se correlaciona entre o sangue o trato genital e vice-versa(34).

A ativação sistêmica de linfócitos T também parece aumentar o risco de aquisição do vírus. A menor expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4⁺ diminui a susceptibilidade ao HIV-1 *in vitro* no sangue de indivíduos expostos(35). Cord et al. (2009) encontraram uma menor expressão de CD69 em linfócitos T de trabalhadoras do sexo consideradas resistentes a aquisição ao HIV-1 (voluntárias que permaneceram negativas por mais de 7 anos desde o início seguimento) em comparação a mulheres que adquiriram o HIV-1(36). Estudos crescentes também correlacionam uma maior ativação celular de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ como fator de risco para a aquisição do HIV-1 em casais sorodiscordantes(37, 38). Paralelamente, linfócitos T reguladores (Tregs) estão inversamente relacionado ao risco de aquisição da infecção(39).

A ativação celular observada previamente a aquisição do HIV-1 vem sendo implicada a diversos mecanismos. Alguns estudos mostraram uma correlação entre a ativação de linfócitos T e a exposição baixa e persistente ao vírus em indivíduos soronegativos de parceiros com a infecção pelo HIV-1(33, 40). A ativação do sistema imunológico e a presença de ISTs também já foi extensamente estudada, especialmente correlacionando com processo inflamatório na mucosa genital em quadros sintomáticos, como a presença de

úlceras ou inflamação do epitélio local (endocervical, uretral e anorretal)(34, 41, 42).

O impacto das ISTs assintomáticas na ativação celular sistêmica e, consequentemente, no risco de aquisição sexual do HIV-1 é pouco compreendido. Kuebler et al. (2016) não encontraram diferença em relação à exposição ao vírus, ao tipo de coito e ao diagnóstico de IST prévia entre o grupo com maior ativação de linfócitos T CD8+ e que adquiriu o HIV-1 em comparação com o grupo com menor ativação celular e que não adquiriu a infecção(37). Nesse estudo de corte transversal em uma coorte de HSH em uso de PrEP ao HIV, investigamos se existe correlação entre as infecções anorretais por CT e NG assintomáticas com a ativação sistêmica de linfócitos T.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente a expressão de marcadores de ativação celular em linfócitos T de sangue periférico de indivíduos com e sem infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Avaliar a prevalência da infecção por CT e NG, com diagnóstico em *swab* anorretal, na população HSH que foi admitida no estudo PrEP Brasil.

(ii) Analisar comparativamente a expressão de marcadores de ativação, exaustão e senescência em linfócitos T e suas subpopulações no sangue periférico dos dois grupos propostos.

3. *Materiais e Métodos*

O trabalho realizado foi um estudo de corte transversal que envolveu a coorte de voluntários do PrEP Brasil (estudo registrado na Plataforma Brasil CAAE08405912.9.2002.0068; CAPPesq 9987) que está em andamento no Centro de Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-FIOCRUZ e no CRT-DST/AIDS de São Paulo.

PrEP Brasil é um ensaio clínico aberto demonstrativo de implementação de profilaxia pré-exposição ao HIV com o uso diário de Emtricitabina (FTC) e Tenofovir (TDF) co-formulados em apresentação oral. O estudo iniciou recrutamento em setembro de 2013 com duração de seguimento inicial prevista de 2 anos e posteriormente adicionados mais 3 anos. Os voluntários do PrEP Brasil incluídos neste estudo não foram submetidos a nenhum questionário, avaliação clínica ou coleta de amostras além das previstas no protocolo inicial do estudo clínico principal.

3.1. CASUÍSTICA

Todos os voluntários do estudo foram participantes do PrEP Brasil. Dessa maneira, a população do estudo contempla as características daquela recrutada no estudo base:

- (1) Homens que fazem sexo com homens.
- (2) Sexo masculino ao nascimento.
- (3) Idade ≥ 18 anos.

- (4) Não infectados pelo HIV.
- (5) Evidência de comportamento de risco para aquisição sexual da infecção pelo HIV, incluindo qualquer das situações abaixo:
- a. sexo anal sem preservativo com dois ou mais homens ou mulheres transexuais nos últimos 12 meses; ou
 - b. dois ou mais episódios de sexo anal com ao menos um parceiro HIV positivo nos últimos 12 meses; ou
 - c. sexo com homem ou mulher transexual e diagnóstico de qualquer das seguintes ISTs nos últimos 12 meses: sífilis, gonorréia retal ou infecção por clamídia no reto.
- (6) Ausência de sinais e sintomas de infecção viral aguda pelo HIV, que fosse confirmada com exame laboratorial em amostras subsequentes.
- (7) Ausência de infecções ativas e graves previamente diagnosticadas, de problemas médicos ativos clinicamente significativos ou malignidade previamente diagnosticada.

Durante o processo de inclusão, todos os voluntários leram e assinaram duas cópias do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e iniciaram seguimento clínico e laboratorial conforme estabelecidos no protocolo do Projeto PrEP Brasil, além do fornecimento a todos os participantes da co-formulação oral FTC/TDF de uso diário. Foi solicitado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa a dispensa de um novo TCLE para o presente estudo.

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os voluntários selecionados preencheram os critérios abaixo para a inclusão neste estudo:

- (1) Ter realizado coleta de *swab* anorretal para pesquisa de CT e NG na visita de inclusão do PrEP Brasil.
- (2) Ter realizado coleta de amostra de sangue periférico para separação de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) previamente ao uso de qualquer antimicrobiano que sabidamente interfira no curso da infecção por CT e NG.
- (3) Estar assintomático e sem sinais de ISTs em curso ao exame clínico na visita de coleta do *swab* e de amostra de sangue conforme prontuário médico.
- (4) Ausência de critérios clínicos e laboratoriais de sífilis não tratada:
 - a. Sífilis primária por diagnóstico clínico.
 - b. VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) em ascensão.VDRL e FT-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*) positivos sem história prévia de sífilis tratada adequadamente.
- (5) Sorologias negativas para os vírus da Hepatite B e C.
- (6) Sorologia e carga viral negativos para HIV na visita em que foi realizada a coleta de amostra para PBMC e nas subsequentes que respeitem a janela de detecção.

3.3. ORGANOGRAMA DE PROCEDIMENTOS DO PrEP BRASIL

Os procedimentos realizados nas visitas do PrEP Brasil que foram utilizados neste estudo estão descritos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 - Procedimentos programados no PrEP Brasil.

	Triagem	Inclusão	Semana 4	Semana 24	Semana 48
Questionário de comportamento sexual					
Questionário sócio-demográfico					
História médica e exame físico					
Questionário de Sindemia					
Sinais vitais e medidas antropométricas					
Teste rápido de HIV					
Carga viral de HIV					
Sorologia para Hepatite B					
Sorologia para Hepatite C					
FTA-ABS e VDRL					
Swab anal					
Armazenamento de PBMC					
Armazenamento de soro e plasma					

3.4. DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As informações foram obtidas a partir da revisão do prontuário médico e da base de dados desenvolvida a partir dos questionários do PrEP Brasil preenchidos ao longo do estudo pela equipe e pelos próprios voluntários conforme o protocolo de cada visita.

3.5. CÁLCULO AMOSTRAL

O número de voluntários em cada grupo foi calculado a partir dos resultados obtidos de experimento inicial (estudo piloto) de análise de ativação celular realizados em nove amostras de voluntários com *swab* anorretal positivo para CT e/ou NG e nove amostras de voluntários com *swab* negativo que preenchiam os mesmos critérios de elegibilidade. A partir desses dados, calculamos um número de 40 voluntários no grupo com *swab* positivo para CT e/ou NG e 40 voluntários no grupo com *swab* negativo, para um nível de significância de 5% e um poder de teste de 80%.

3.6. DETECÇÃO DE CLAMÍDIA E GONOCOCO ANORRETAL

A detecção de CT e NG estava vinculada aos procedimentos programados no protocolo do PrEP Brasil e foi realizada a partir do *swab* da região anorretal coletado pelos próprios voluntários do estudo na visita de inclusão e no término do seguimento de dois anos. As amostras foram encaminhadas e analisadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em DST/AIDS do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-FIOCRUZ.

O método utilizado foi o RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) com o kit comercialmente disponível *Abbott Real Time CT/NG assay* (Abbot, Chicago, Illinois, EUA), que permite uma detecção qualitativa do DNA plasmidial de CT e do gene Opa do DNA genômico de NG.

3.7. COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Nas visitas em que houveram armazenamento de amostras de sangue, foram coletados 10 mL adicionais por técnica de punção venosa periférica de membro superior, conforme previsto no protocolo do PrEP Brasil. O processamento e armazenamento em biorrepositório são responsabilidades de cada centro de pesquisa envolvido no PrEP Brasil.

A separação das células mononucleares foi realizada em cabine de segurança biológica nível 2 pela equipe responsável. O sangue coletado foi diluído em solução salina tampão, transferido para uma solução de gradiente de densidade e centrifugado. Após a centrifugação, as células foram separadas por densidade de gradiente e as células mononucleares coletadas. As hemácias presentes nessa solução foram lisadas e as células lavadas e ressuspensas em meio de cultura. A contagem das células foi realizada considerando a viabilidade celular. Após os cálculos, a suspensão foi então centrifugada e as células ressuspensas em meio de congelamento, composto por 90% de soro fetal bovino e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), sendo então transferidas para criotubos e armazenadas em freezer a -80°C. Após 24 horas, transferidas para o tanque de nitrogênio líquido.

3.8. DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS CRIOPRESERVADAS

O descongelamento das amostras foi realizado individualmente em cabine de segurança biológica nível 2. Os criotubos foram parcialmente descongelados em banho-maria a 37°C e diluídos em 1 mL de R10 (10% de

Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de Piruvato de sódio, 1 mM de Penicilina/Estreptomicina, 55 µM de 2-Mercaptoetanol, e 10 mM da solução de HEPES). O conteúdo total do criotubo foi transferido para um tubo cônico previamente identificado contendo também 1 mL R10. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e as células ressuspensas em 2 mL de R10 para a contagem celular em um contador automatizado (*Invitrogen, Countess Automated Cell Counter, Modelo C10281*, Carlsbad, Califórnia, EUA) com a utilização do corante Azul de Tripán 4%. Após a contagem, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em R10 no volume de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

3.9. IMUNOFENOTIPAGEM DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Sendo o objetivo do estudo avaliar a ativação, exaustão e senescência celular nas diferentes subpopulações de linfócitos T, foi proposto o painel de anticorpos para moléculas de superfície celular descritas abaixo e detalhadas na Tabela 2.

- (1) Identificação de linfócitos T: CD3, CD4 e CD8.
- (2) Marcadores de ontogenia de linfócitos T: CD27, CD45RA e CD198 (CCR7).
- (3) Marcadores de ativação celular: CD28, CD38 e HLA-DR.
- (4) Marcadores de senescência e exaustão celular: CD57, CD95 e CD279 (PD-1).

A titulação dos anticorpos e seus respectivos fluorocromos foram definidos a partir da padronização já realizada em amostras de PBMC no LIM-60 (Tabela 3).

A reação de marcação celular com o coquetel de anticorpos foi feita em placa de 96 poços. Após ressuspender as células, $1,0 \times 10^6$ células foram transferidas para cada poço. As células foram então centrifugadas e lavadas duas vezes em solução tampão MACS (tampão fosfato-salino 1x contendo albumina do soro bovina 0,5% e EDTA 2mM). Em seguida, elas foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28, anti-CD27, anti-CD38, anti-CD45RA, anti-HLA-DR, anti-CD197, anti-CD57, anti-CD279 e anti-CD95, além do marcador de viabilidade, e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse período, a placa foi lavada com tampão MACS e centrifugada duas vezes. As células foram então fixadas em paraformaldeído 1% e transferidas para tubos de citometria.

Tabela 2 - Descrição das moléculas utilizadas na marcação celular(43)

Antígeno (CD) / Nome	Expressão celular	Funções
CD3	Timócitos, linfócitos T	Papel especializado na apresentação de antígenos lipídicos.
CD4	Subgrupos de timócitos, linfócitos T Th1 e Th2, monócitos, macrófagos	Co-receptor para moléculas do MHC (<i>Major Histocompatibility Complex</i>) de classe II.
CD8	Subgrupo de timócitos, linfócitos T citotóxicos	Co-receptor para moléculas de MHC de classe I.
CD27	Timócitos medulares, linfócitos T, células NK (<i>Natural Killer Cells</i>), alguns linfócitos B	Liga-se ao CD70 e atua como coestimulador de linfócitos B e T; membro da superfamília de receptores TNF.
CD28	Subgrupo de linfócitos T; linfócitos B ativados	Ativação de células T virgens; receptor para sinal coestimulador – liga CD80 e CD86.
CD38	Linfócitos T e B precoces; linfócitos T ativados; plasmócitos	Regula a ativação das células, proliferação e a aderência.
CD45RA	Linfócitos B, subgrupos de linfócitos T (células T virgens); monócitos	Tirosina fosfatase, aumenta a sinalização pelo receptor de antígeno de linfócitos B e T.
CD57	Linfócitos NK, subgrupos de linfócitos T, linfócitos B, monócitos	Oligossacarídeo presente na superfície celular para adesão celular.
CD95	Grande variedade de linhagens celulares	Indução de apoptose.
CD279/PD-1	Linfócitos T e B ativados	Receptor da superfície celular envolvido na tolerância inibitória da célula T.
CD197/CCR7	Linfócitos T e B ativados	Receptor para quimiocina MIP-3 β e provável mediador dos efeitos do <i>Epstein-Barr virus</i> nos linfócitos B.
HLA-DR	Molécula do MHC de classe II.	Molécula do complexo de MHC de classe II.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro BD LSRII Fortessa (Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems, San Jose, California, EUA) disponível no LIM-60.

Tabela 3 - Fluorocromos e títulos dos anticorpos utilizados no painel proposto

Anticorpos	Fluorocromo	Titulação (µL)
CD3	PE CF594	1
CD4	APC H7	1
CD8	BV 510	0,5
CD27	PE	3
CD45RA	FITC	10
CC197	PE Cy7	4
CD28	APC	7
CD38	PerCP Cy 5.5	5
HLA-DR	Alexa fluor 700	5
CD57	BV 605	3
CD95	PE Cy5	10
CD279	BV 421	5
Viabilidade celular	UV	0,4

3.10. ANÁLISE DE CITOMETRIA

Os dados gerados foram analisados no programa FlowJo versão 9.8.3 (TreeStar, San Carlos, Califórnia, EUA). A estratégia de análise foi direcionada a partir da definição das subpopulações de linfócitos T e da expressão dos marcadores de ativação, de exaustão e de senescência celular. A fim de tornar a análise mais confiável para os marcadores que não permitem uma separação clara das populações com ou sem a expressão dos marcados (CD45RA, CCR7, HLA-DR, CD38, CD57, CD28, CD279 e CD95), foram utilizados tubos

de FMO (*Fluorescence minus one*). A Figura 1 mostra a estratégia de análise utilizada.

B Linfócitos T CD4+

Ontogenia de linfócitos

Ativação celular

C Linfócitos T CD8+

Figura 1 - Estratégia de análise. **A.** Estratégia de análise para definição da população de linfócitos T. **B e C.** Estratégia de análise para definição de células *naïve*, de memória central, de memória transitória, de memória efetora e efetora terminal para linfócitos T CD4+ e CD8+, respectivamente. A expressão da dupla marcação de CD38 e HLA-DR também é demonstrada em gráfico e a posição de separação foi definida a partir dos tubos de FMO.

3.11. DOSAGEM DE CD14 SOLÚVEL NO PLASMA

Devido a impossibilidade de identificar diretamente a presença de processo inflamatório na mucosa anorretal, optamos por avaliar a concentração de CD14 solúvel (sCD14) no plasma. O CD14 é uma glicoproteína que media a interação celular com a endotoxina lipopolissacarídea bacteriana (LPS). O aumento de CD14 solúvel no plasma sinaliza a presença de bactérias gram-negativas e, indiretamente, ocorrência de translocação bacteriana e de quebra da integridade da mucosa intestinal(44).

A dosagem de sCD14 foi realizada em amostras de plasma dos voluntários armazenadas em freezer a -80°C através de um ensaio de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) com o kit comercialmente disponível *Human sCD14 DuoSet* (R&D Systems, Mineapolis, EUA) e de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As amostras de plasma foram descongeladas em banho-maria a 37°C e diluídas na proporção 1:200 em solução *Calibrator Diluent RD5P*. Um total de 100 µL desta solução foi transferida individualmente e em duplicata para cada poço da placa, permanecendo incubada protegida da luz por 3 horas em temperatura ambiente. Após lavagem com *Wash Buffer* foi adicionado o anticorpo *Human CD14 Conjugate* e a placa incubada por mais 1 hora em temperatura ambiente protegida da luz. Foi realizada nova sequência de lavagem com *Wash buffer*, adição do *Substrate Solution* e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a *Stop Solution* e observada mudança da cor da solução de azul para amarelo em todos os poços.

Em cada placa foi realizado sete diluições progressivas e controle negativo para determinação da curva padrão conforme orientação do fabricante. A leitura foi realizada no leitor *Epoch Microplate Spectrophotometer* (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA) em 450 nm e correção automática ajustada para 540 nm. Os resultados foram obtidos a partir da equação linear definida pela curva-padrão de cada placa (Figura 2).

Figura 2 - Curvas-padrão obtidas para as placas 1 e 2 após a leitura do ensaio ELISA. R^2 se refere ao coeficiente de correlação e $y = ax + b$ se refere equação obtida pela linha de regressão linear. A equação de linha reta nos permite obter a concentração de sCD14 no plasma para cada indivíduo conforme os valores de densidade óptica obtidos.

3.12. DADOS GERADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados gerados em variáveis numéricas foram transferidos para uma planilha e analisados pelos programas estatísticos Graphpad *Prism* versão 6.01 (GraphPad Software, Califórnia, EUA), Stata, versão 13.1 (StataCorp. College Station, Texas, EUA) e SPICE (*Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations*) versão 5.1 (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, Bethesda, Maryland, EUA).

Os dados clínicos e demográficos dos participantes de cada grupo foram descritos usando frequências absolutas e relativas, mediana e intervalo interquartil. As variáveis contínuas foram analisadas usando comparação de médias para distribuição não-normal (Wilcoxon-Mann-Whitney) e as variáveis categóricas por teste de homogeneidade (qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado). Em todas as análises foi realizado teste bicaudal com nível de significância de 0,05.

4. *Resultados*

4.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO

Quinhentos e quarenta e seis voluntários foram incluídos no PrEP Brasil. O número de voluntários com *swab* positivo na inclusão para CT e NG foi de 37 e 21, respectivamente. A prevalência de infecção anorretal assintomática por CT foi de 6,8% na coorte do PrEP Brasil. A prevalência por NG foi de 3,8% nessa população.

Seis voluntários apresentaram *swab* positivo para ambos os agentes. Devido ao diagnóstico de coinfeção por sífilis conforme o critério de exclusão, seis voluntários foram excluídos do grupo com *swab* positivo. Doze amostras da inclusão não estavam disponíveis ou foram descartadas devido a baixa recuperação de células viáveis (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma de inclusão dos voluntários com *swab* positivo.

Conforme a disponibilidade de amostras e o preenchimento dos critérios de elegibilidade, um total de 34 amostras foi utilizado. Trinta e cinco voluntários com *swab* negativo para CT e NG, com sorologia negativa para sífilis e ausência de dados clínicos sugestivos de doença sexualmente transmissível foram randomicamente selecionados (Tabela 4).

Os dois grupos eram homogêneos em relação a dados demográficos, tabagismo e etilismo (Tabela 4). Em relação ao comportamento sexual, o grupo com *swab* positivo apresentou maior número de parceiros sexuais nos últimos 3 meses (7, intervalo interquartil (IIQ) 2-15) em relação ao grupo controle (2, IIQ 1-7; $p=0,01$). Entretanto, os dois grupos não foram diferentes em relação ao número de parceiros sexuais sabidamente com infecção pelo HIV-1 e à prática de sexo anal receptivo nos últimos 3 meses.

Tabela 4 - Dados demográficos da população do estudo

	Swab positivo N=34	Swab negativo N=35	Valor de p
Swab positivo			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	22 (65%)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	9 (26%)		
Ambos	3 (9%)		
Idade na inclusão (DV¹)²	29 (25-34)	29 (24-36)	0,93
Etnia³			
Branco	21 (64%)	23 (70%)	0,60
Não-Branco	12 (36%)	10 (30%)	
Parceiro sexual sabidamente HIV-positivo nos últimos 3 meses^{3,4}	14 (44%)	18 (58%)	0,26
Número de parceiros sexuais nos últimos 3 meses^{2, 4}	7 (2-15)	2 (1-7)	0,01
Relação sexual anal receptivo nos últimos 3 meses^{3,5}	14 (42%)	17 (52%)	0,26
Ingestão de bebida alcoólica^{3,5}	19 (58%)	23 (70%)	0,31
Tabagismo^{3, 6}	15 (50%)	15 (48%)	0,90

NOTA: ¹ DV = desvio-padrão.

² Variáveis contínuas estão descritas como mediana e intervalo interquartil

³ Variáveis categóricas estão descritas como frequências absoluta e relativa

⁴ Dado disponível para 63 participantes

⁵ Dado disponível para 66 participantes

⁶ Dado disponível para 61 participantes

4.2. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T E SUAS SUBPOPULAÇÕES

A comparação com o grupo sem infecção demonstrou que os voluntários com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG apresentaram uma menor porcentagem de linfócitos T CD4+ total (58,0% vs. 65,75%; $p = 0,0186$) e uma maior porcentagem de linfócitos T CD8+ total (37,4% vs. 30,2%; $p = 0,0080$), alterando a razão esperada entre linfócitos T CD4+ e CD8+ (1,55 vs. 2,19; $p = 0,0099$) (Figura 4A). Os valores absolutos não puderam ser obtidos porque o leucograma não era um exame programado nas visitas de rotina do PrEP Brasil.

A análise das subpopulações de linfócitos T CD8+ evidenciou uma menor porcentagem de linfócitos T CD8+ *naïve* (CD45RA+CD27+CCR7+) e uma maior porcentagem de células de memória efetora (CD45RA-CD27-CCR7-) no grupo com *swab* positivo. Não foram observadas diferenças entre as frequências das subpopulações de células de memória central (CD45RA-CD27+CCR7+), de memória transitória (CD45RA-CD27+CCR7-) e efetora terminal (CD45RA+CD27-CCR7-) entre os dois grupos (Figura 4B).

A ontogenia das subpopulações de linfócitos T CD4+ não mostrou diferença na frequência entre o grupo com *swab* positivo e *swab* negativo (Figura 4C).

Figura 4 - Frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+ e suas subpopulações em indivíduos com e sem infecção anorretal por CT e/ou NG. **A.** Porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a razão de linfócitos T CD4+ por CD8+ em indivíduos com e sem infecção anorretal. **B** e **C.** Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD8+ e CD4+, respectivamente, em indivíduos com e sem infecção anorretal e conforme a expressão dos marcadores CD45RA, CCR7 e CD27. NS = estatisticamente não significante. Dados expressos em mediana e interquartil.

4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO CELULAR EM LINFÓCITOS T

Os voluntários com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG apresentaram uma frequência 1,67 vezes maior de linfócitos T CD8+ co-expressando os marcadores de ativação CD38 e HLA-DR em comparação ao sem infecção anorretal (1,5% vs. 0,9%, respectivamente, $p=0,003$; Figura 5A). Não observamos essa diferença na expressão de marcadores de ativação nos linfócitos T CD4+ (0,7% vs. 0,6%, $p=0,2$; Figura 5A). Também não houve diferença quando avaliados os marcadores HLA e CD38 separadamente na população de linfócitos T CD4+ (Tabela 5).

A análise das subpopulações de linfócitos T CD8+ expressando os marcadores de ativação CD38 e HLA-DR mostrou uma diferença estatisticamente significativa na frequência da subpopulação de memória transitória (2,4% no grupo com *swab* positivo vs. 1,2% no grupo com *swab* negativo, $p=0,018$). Uma tendência a maior ativação também foi observada nas subpopulações de memória central (2,9% vs. 1,9%, $p=0,068$) e de memória efetora (2,0% vs. 1,4%, $p=0,062$), porém não estatisticamente significantes (Figura 5A). Os resultados para as subpopulações de linfócitos T CD4+ apresentaram tendência semelhante sem atingir a significância estatística (Figura 6A).

A análise da proporção de distribuição desses marcadores nas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ não foi diferente entre os dois grupos (Figura 5B e 6B).

Figura 5 - Ativação de linfócitos T CD8+. **A.** Frequência de linfócitos T CD8+ total e das subpopulações coexpressando os marcadores de ativação. A ativação celular é fenotipicamente definida pela expressão de HLA-DR e CD38. **B.** Comparação da distribuição das subpopulações de linfócitos T CD8+ expressando os marcadores de ativação. NS = estatisticamente não significante. Dados expressos em mediana e interquartil.

Figura 6 - Ativação de linfócitos T CD4+. **A.** Frequência de linfócitos T CD4+ total e das subpopulações coexpressando os marcadores de ativação. A ativação celular é fenotipicamente definida pela expressão de HLA-DR e CD38. **B.** Comparação da distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ expressando os marcadores de ativação. NS = estatisticamente não significativo. Dados expressos em mediana e interquartil.

Tabela 5 - Linfócitos T ativados nos grupos com swab positivo e com swab negativo

		Swab positivo (N=33)	Swab negativo (N=34)	Valor de p			Swab positivo (N=33)	Swab negativo (N=34)	Valor de p
CD8+					CD4+				
	HLA-DR+CD38+	1,5 (1,2-2,8)	0,9 (0,7-1,6)	0,0034		HLA-DR+CD38+	0,7 (0,3-1,5)	0,6 (0,3-0,8)	0,1991
	CD38+	3,4 (2,2-4,8)	2,3 (1,9-3,5)	0,0215		CD38+	5,0 (3,2-7,0)	5,4 (3,6-7,1)	0,7733
	HLA-DR+	12,4 (7,1-17,6)	9,0 (5,9-15,0)	0,175		HLA-DR+	3,4 (2,1-6,1)	3,5 (2,6-4,6)	0,8666
Naïve	HLA-DR+CD38+	0,2 (0,1-0,4)	0,1 (0,1-0,3)	0,0872	Naïve	HLA-DR+CD38+	0,1 (0,1-0,3)	0,1 (0,1-0,2)	0,6832
	CD38+	1,4 (0,9-2,6)	1,7 (1,2-2,1)	0,7459		CD38+	5,7 (3,7-9,8)	7,6 (5,0-10,9)	0,34
	HLA-DR+	0,8 (0,5-1,2)	0,6 (0,4-1,1)	0,3105		HLA-DR+	0,5 (0,3-0,8)	0,5 (0,4-0,7)	0,9904
Memória central	HLA-DR+CD38+	2,9 (1,5-5,2)	1,9 (1,2-3,3)	0,0681	Memória central	HLA-DR+CD38+	0,7 (0,3-1,2)	0,5 (0,4-0,9)	0,302
	CD38+	7,4 (3,7-10,3)	6,4 (3,7-9,9)	0,4641		CD38+	5,5 (3,8-8,3)	6,2 (3,9-8,1)	0,9283
	HLA-DR+	9,2 (6,0-14,4)	8,6 (6,3-12,3)	0,4714		HLA-DR+	2,5 (1,5-3,7)	2,5 (1,9-3,0)	0,7098
Memória transitória	HLA-DR+CD38+	2,4 (1,3-5,7)	1,2 (0,8-2,6)	0,0186	Memória transitória	HLA-DR+CD38+	0,9 (0,4-1,5)	0,8 (0,4-0,9)	0,2909
	CD38+	3,0 (1,8-6,4)	1,8 (1,3-3,5)	0,045		CD38+	4,0 (2,7-6,0)	3,8 (2,4-4,9)	0,4076
	HLA-DR+	13,9 (10,0-21,4)	10,9 (7,8-20,5)	0,2747		HLA-DR+	4,0 (2,4-7,5)	4,6 (3,4-6,3)	0,5247
Memória efetora	HLA-DR+CD38+	2,0 (1,3-3,7)	1,4 (0,9-2,4)	0,0628	Memória efetora	HLA-DR+CD38+	1,0 (0,2-1,9)	0,8 (0,4-1,4)	0,4977
	CD38+	2,6 (1,9-5,1)	2,0 (1,4-3,2)	0,123		CD38+	2,3 (1,1-3,6)	1,6 (1,0-2,2)	0,1638
	HLA-DR+	16,8 (11,6-24,7)	16,0 (8,8-27,8)	0,8855		HLA-DR+	10,3 (6,9-15,4)	11,1 (7,3-14,9)	0,9617
Efetora terminal	HLA-DR+CD38+	1,9 (1,0-3,6)	1,9 (1,0-2,4)	0,3744	Efetora terminal	HLA-DR+CD38+	1,8 (0,0-4,4)	0,8 (0,3-2,0)	0,5508
	CD38+	5,5 (3,1-9,4)	3,9 (3,0-6,9)	0,1259		CD38+	3,1 (0,4-8,7)	2,2 (0,9-3,5)	0,2627
	HLA-DR+	16,5 (8,7-27,3)	22,1 (8,5-30,7)	0,5605		HLA-DR+	10,6 (5,4-16,1)	8,8 (5,1-16,8)	0,9808

NOTA: Dados estão expressos em mediana e interquartil

4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO E SENESCÊNCIA CELULAR

A proporção de linfócitos T CD8⁺ expressando marcadores de exaustão e senescência foi maior no grupo com *swab* positivo (Figura 7). A porcentagem de linfócitos T CD8⁺ ativados (CD38+HLA-DR⁺) expressando em sua superfície PD-1 (0,9% vs. 0,5%, $p=0,009$), CD95 (1,5% vs. 0,8%, $p=0,002$) e coexpressando os dois marcadores (0,9% vs. 0,5%, $p=0,009$) foram significativamente maiores no grupo com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG. Também observamos maior frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD57 e não expressando CD28, padrão que caracteriza células senescentes. Esses achados também foram encontrados nas subpopulações, especialmente nos linfócitos de memória central, memória transitória e memória efetora. Não foi encontrada diferença nas subpopulações de linfócitos *naïve* e efetora terminal (Tabela 6).

Figura 7 - Expressão e coexpressão de marcadores de ativação, exaustão e senescência em linfócitos T CD8+ e suas subpopulações. Diferença na expressão de marcadores de ativação celular (CD95, CD38 e HLA-DR), exaustão (PD-1) e senescência (CD57 e ausência de expressão de CD28) em linfócitos T CD8+ e suas subpopulações. Os valores de significância se refere a maior expressão desses marcadores no grupo com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG em comparação ao grupo sem infecção anorretal.

Tabela 6 - Linfócitos T expressando marcadores de ativação, exaustão e senescência

		Swab positivo (N=33)	Swab negativo (N=34)	Valor de p			Swab positivo (N=33)	Swab negativo (N=34)	Valor de p
CD8+					CD4+				
	PD-1+	31,5 (22,2-63,9)	24,3 (13,3-66,1)	0,0872		PD-1+	32,0 (26,5-39,6)	29,4 (22,5-39,9)	0,2964
	HLA-DR+CD38+CD95+	1,5 (1,1-2,7)	0,8 (0,6-1,5)	0,0025		HLA-DR+CD38+CD95+	0,6 (0,3-1,2)	0,5 (0,3-0,7)	0,1602
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,9 (0,5-1,7)	0,5 (0,3-0,9)	0,0092		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,5 (0,2-0,9)	0,4 (0,2-0,6)	0,0977
	CD28-CD57+	32,0 (24,0-47,5)	25,5 (16,9-35,7)	0,0069		CD28-CD57+	3,9 (0,5-6,7)	2,4 (0,7-5,2)	0,2695
	PD-1+CD57+CD95+	11,3 (7,1-21,0)	6,9 (3,5-19,9)	0,0212		PD-1+CD57+CD95+	2,7 (1,3-4,2)	1,8 (1,0-2,8)	0,1274
Naïve	PD-1+	1,6 (1,3-27,7)	1,2 (0,8-54,7)	0,0395	Naïve	PD-1+	1,5 (1,2-1,9)	1,2 (1,0-2,4)	0,135
	HLA-DR+CD38+CD95+	0,1 (0,1-0,4)	0,1 (0,0-0,2)	0,0237		HLA-DR+CD38+CD95+	0,1 (0,0-0,1)	0,1 (0,1-0,1)	0,5974
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,0 (0,0-0,1)	0,0 (0,0-0,1)	0,1114		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,0 (0,0-0,1)	0,0 (0,0-0,1)	0,5762
	CD28-CD57+	0,8 (0,5-1,2)	0,6 (0,3-1,0)	0,0906		CD28-CD57+	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,1)	0,214
	PD-1+CD57+CD95+	0,2 (0,1-0,6)	0,1 (0,0-0,6)	0,2592		PD-1+CD57+CD95+	0,0 (0,0-0,1)	0,0 (0,0-0,1)	0,4056
Memória central	PD-1+	24,8 (18,0-66,7)	21,7 (12,2-77,3)	0,2254	Memória central	PD-1+	21,4 (18,3-27,3)	21,6 (16,1-27,4)	0,8289
	HLA-DR+CD38+CD95+	2,9 (1,1-5,2)	1,7 (0,8-3,0)	0,0518		HLA-DR+CD38+CD95+	0,7 (0,3-0,9)	0,5 (0,4-0,8)	0,2076
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	1,5 (0,8-4,5)	1,1 (0,4-2,4)	0,0276		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,6 (0,2-0,7)	0,3 (0,2-0,6)	0,1769
	CD28-CD57+	2,6 (1,2-4,9)	1,5 (0,7-3,0)	0,1104		CD28-CD57+	0,0 (0,0-0,1)	0,0 (0,0-0,1)	0,9903
	PD-1+CD57+CD95+	3,2 (1,8-5,4)	1,8 (0,8-3,2)	0,0272		PD-1+CD57+CD95+	0,4 (0,3-0,6)	0,3 (0,2-0,6)	0,2164
Memória transitória	PD-1+	46,8 (40,7-79,1)	43,1 (26,3-82,9)	0,3875	Memória transitória	PD-1+	56,1 (49,0-62,6)	59,1 (43,3-63,4)	10,000
	HLA-DR+CD38+CD95+	2,3 (1,2-4,7)	1,1 (0,7-2,5)	0,0186		HLA-DR+CD38+CD95+	0,9 (0,4-1,5)	0,8 (0,4-0,9)	0,2695
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	1,5 (0,8-4,2)	1,0 (0,5-2,0)	0,0401		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,8 (0,3-1,3)	0,6 (0,3-0,8)	0,2695
	CD28-CD57+	19,3 (13,5-28,0)	13,3 (8,2-23,5)	0,0134		CD28-CD57+	2,6 (0,7-7,6)	2,2 (0,4-3,9)	0,2542
	PD-1+CD57+CD95+	12,7 (8,6-18,0)	8,5 (5,6-14,4)	0,0357		PD-1+CD57+CD95+	0,1 (0,0-0,2)	0,1 (0,0-0,1)	0,0829
Memória efetora	PD-1+	22,1 (13,2-72,3)	18,5 (7,3-81,7)	0,4641	Memória efetora	PD-1+	63,5 (56,2-70,9)	62,1 (49,5-73,5)	0,7009
	HLA-DR+CD38+CD95+	1,8 (0,9-3,2)	1,6 (0,9-2,0)	0,2119		HLA-DR+CD38+CD95+	1,0 (0,2-1,8)	0,8 (0,4-1,3)	0,5053
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,6 (0,1-1,3)	0,5 (0,2-1,0)	0,3489		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,8 (0,2-1,6)	0,6 (0,3-1,1)	0,5247
	CD28-CD57+	79,4 (70,4-85,0)	72,9 (65,0-78,7)	0,0158		CD28-CD57+	16,7 (3,2-31,2)	9,6 (3,5-22,1)	0,1215
	PD-1+CD57+CD95+	12,9 (5,5-35,6)	9,7 (3,9-36,6)	0,4863		PD-1+CD57+CD95+	12,3 (4,2-17,1)	6,8 (2,8-13,7)	0,1828
Efetora terminal	PD-1+	56,1 (43,8-82,6)	45,7 (27,9-88,7)	0,1244	Efetora terminal	PD-1+	53,1 (38,8-67,7)	58,5 (29,4-81,6)	0,9283
	HLA-DR+CD38+CD95+	1,9 (1,3-3,2)	1,4 (0,8-2,4)	0,0645		HLA-DR+CD38+CD95+	0,7 (0,0-3,4)	0,6 (0,0-1,5)	0,3359
	HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	1,1 (0,6-2,0)	0,7 (0,3-1,8)	0,1186		HLA-DR+CD38+CD95+PD-1+	0,1 (0,0-2,5)	0,2 (0,0-0,8)	0,3056
	CD28-CD57+	61,4 (42,7-67,5)	38,9 (27,3-56,0)	0,0008		CD28-CD57+	51,8 (9,5-82,7)	61,9 (10,0-73,8)	0,6613
	PD-1+CD57+CD95+	1,1 (0,6-1,8)	0,7 (0,3-1,8)	0,1398		PD-1+CD57+CD95+	10,1 (3,2-22,0)	11,3 (4,6-21,5)	0,5052

4.5. MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CD14 SOLÚVEL NO PLASMA

Os níveis de sCD14 foi semelhante entre os grupos com e sem infecção assintomática anorretal por CT e/ou NG (2208 ± 308 vs. 2286 ± 307 pg/mL, respectivamente; $p=0,96$). Os valores encontrados estão dentro do intervalo de normalidade no plasma (1200 – 2600 pg/mL) (Figura 8).

Figura 8 - Comparação dos níveis de sCD14 no plasma nos indivíduos com e sem infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG. Barras representam a média e o desvio padrão de cada grupo. NS = estatisticamente não significativo.

5. *Discussão*

Em nosso estudo, avaliamos a ativação celular de linfócitos T no sangue periférico em uma coorte de HSH em PrEP com e sem infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG. Conforme nossa hipótese inicial, encontramos uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando simultaneamente os marcadores de ativação celular HLA-DR e CD38 no grupo com *swab* positivo para CT e/ou NG. Esses indivíduos também apresentaram uma maior expressão de marcadores de exaustão e senescência celular. Não encontramos esse mesmo padrão na população de linfócitos T CD4⁺.

A prevalência no PrEP Brasil de infecção anorretal assintomática por CT e NG de 6,8% e 3,8%, respectivamente, são semelhantes a encontradas na literatura e sumarizados na revisão conduzida por Dukers-Muijers et al. (2015)(15). Em um estudo epidemiológico de corte transversal realizado no Rio de Janeiro em uma população semelhante a do nosso estudo, a prevalência de CT anorretal foi de 10% e de NG de 2,5%(16).

Os dois grupos avaliados foram semelhantes em relação a fatores que poderiam influenciar a ativação celular, entre os quais a idade, o tabagismo e o consumo de bebida alcoólica. Apesar dos indivíduos com infecção anorretal assintomática ter relatado um maior número de parceiros nos últimos 3 meses, o comportamento sexual de ambos os grupos se assemelham em relação ao relato de relações com sexo anal receptivo e de parceiros com a infecção pelo HIV-1. O comportamento sexual da população do estudo é semelhante a de outras populações HSH em estudos de PrEP. Os voluntários do estudo

IPERGAY relataram um média 8 parceiros sexuais nos 2 meses anteriores e 10 relações sexuais no mês prévio à inclusão(8). No IPrEX (*Pre-exposure Prophylaxis Initiative*), os voluntários relataram uma média de 13 relações sexuais nos 3 meses anteriores ao início da participação no estudo(10). Esses dados são representativos de uma população altamente vulnerável à aquisição sexual do HIV-1 e outras ISTs, devendo ser a população alvo para a implementação de programas de prevenção, entre eles a PrEP.

Conforme nossa hipótese primária, os indivíduos com infecção assintomática anorretal pelos patógenos estudados apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD8+ expressando os marcadores de ativação celular. Esses dados não foram observados na população de linfócitos T CD4+. Por consequência, observamos uma menor frequência de linfócitos T CD4+ total e a inversão da razão de linfócitos T CD4+ e CD8+. A ativação celular é uma resposta natural do sistema imunológico em virtude da presença antigênica, levando a um estímulo para proliferação celular e para produção de citocinas pró-inflamatórias(43). Apesar de nosso estudo ser um corte transversal e a temporalidade entre a aquisição da infecção e ativação celular não poder ser comprovada, é biologicamente mais plausível que a presença desses patógenos na mucosa anorretal levou a ativação celular sistêmica dos linfócitos T CD8+ do que o contrário.

A ausência de sintomas reportados ou de sinais ao exame físico deve estar diretamente relacionados a ausência ou mínimo processo inflamatório local. A existência de uma atividade inflamatória na mucosa anorretal levaria a um maior influxo celular, a secreção de citocinas e a quebra da integridade da

mucosa. Esse mecanismo está bem documentado na literatura(26-29) e prontamente justificaria nossos achados. No entanto, o não aumento dos níveis plasmáticos de sCD14 observado no grupo com infecção assintomática indiretamente se correlaciona com a ausência de processo inflamatório retal e com a manutenção da integridade da mucosa local(44). Esse dado reforça nossa hipótese de que a presença dessas bactérias é capaz de perturbar o estado de quiescência do sistema imunológico mesmo na ausência evidente de processo inflamatório local.

A ativação celular sistêmica já foi diversas vezes associada ao aumento do risco de aquisição da infecção pelo HIV-1(35, 45, 46). Diversos estudos relacionaram essa ativação celular à presença de ISTs(33, 40, 42), entre elas sífilis(21, 47, 48) e infecções anorretais por CT e NG(21, 22). Essas infecções com frequência induzem um processo inflamatório na mucosa genital com aumento de citocinas inflamatórias e de infiltrado celular, levando a ativação imune (34, 41). No entanto, nosso estudo é o primeiro a demonstrar uma ativação celular correlacionada à infecção assintomática. Nossos dados sugerem que a presença desses agentes atua estimulando a ativação imunológica sistêmica sem provocar um processo inflamatório evidente na mucosa retal. A partir dessa conclusão, podemos gerar uma hipótese secundária de que essas infecções silenciosas também atuariam indiretamente como fator de risco para aquisição do HIV-1.

A ativação celular de linfócitos T CD4⁺ substanciaria nossa argumentação em relação a presença de CT e/ou NG anorretal e a maior susceptibilidade a aquisição sexual do HIV-1. Os linfócitos T CD4⁺ são as

células primariamente alvo da infecção pelo vírus HIV-1 e sua ativação leva a maior expressão de correceptores utilizados no processo de adesão celular pelo vírus(26). No entanto, nossos achados são consistentes com o padrão de resposta imunológica induzida por esses patógenos e bem descrita na literatura.

CT é uma bactéria intracelular obrigatória e, de modo geral, os linfócitos T CD8+ são reconhecidamente as células inicialmente recrutadas e essenciais na resposta imunológica adaptativa nesses processos. Além disso, baseados em modelos animais, a resolução espontânea da infecção genital pelo CT está relacionada ao influxo de células Th1, levando a processo inflamatório local e eliminação do patógeno (30, 49-51). Poderíamos admitir a hipótese de que a ausência de sinais de inflamação na mucosa anorretal sugerida pelo quadro clínico assintomático da infecção nesses indivíduos e pela ausência de alteração dos níveis de sCD14 seja consequência de uma indução deficiente de resposta Th1, justificando não ter sido observado ativação celular dos linfócitos T CD4+ e a incapacidade desses indivíduos em eliminar naturalmente o patógeno no curso subagudo e persistentes desses quadros. No entanto, o desenho de nosso estudo impede estimar em que momento a aquisição da infecção aconteceu e reforçar essa hipótese.

Diversos estudos também mostram que a NG possui mecanismos intrínsecos que suprimem a ativação e proliferação de linfócitos T CD4+ (52, 53). Essa inibição parece estar relacionada a interação entre a proteína Opa (proteína de opacidade de colônia), expressa pela NG, e a molécula de adesão CEACAM (antígeno carcinoembriogênico) presente na superfície de linfócitos

T(53). Esse efeito inibitório diminui a capacidade de ativação (expressão de CD69) e proliferação de linfócitos T CD4+, independente do estímulo antigênico presente. A ausência de sintomas e da presença de um processo inflamatório consistente na mucosa anorretal pode ser consequência desse mecanismo inibitório sobre a população de linfócitos T CD4+(53).

Nesse estudo, também encontramos uma maior ativação celular na subpopulação de memória transitória de linfócitos T CD8+. Evidenciamos também um padrão consistente de maior ativação celular nas populações de memória central e memória efetora, apesar da diferença entre os dois grupos nessas subpopulações não serem estatisticamente significativos. Esses dados sugerem uma tendência de diferenciação para subpopulações mais maduras, provavelmente secundária a estimulação antigênica. Durante o desenvolvimento inicial da resposta imunológica após o contato com antígeno, as células *naïve* são ativadas, se proliferam e se diferenciam em células de memória efetora, que irão cumprir seu papel na eliminação do patógeno(54, 55). Reforçando a hipótese primária, nossos dados mostram uma maior ativação das células de memória e um estado quiescente das células *naïve*.

Conforme discutido, a aparente ausência de sinais inflamatórios locais nas infecções assintomáticas pode estar relacionada a incapacidade do sistema imunológico em desenvolver uma resposta adequada capaz de eliminar o patógeno. No entanto, a sua presença na mucosa local seria capaz de estímulos sutis e contínuos, levando a uma ativação celular sistêmica no padrão observado. Apesar desses agentes não poderem ser classificados como agentes etiológicos causadores de infecção crônica, a incapacidade do

sistema imunológico em completamente eliminar esses agentes e a ausência de sintomas que levem a procura de assistência médica resultam em infecções subagudas e persistentes.

Essa contínua e perene estimulação do sistema imunológico pode também explicar nossos achados de maior expressão de marcadores de exaustão e senescência nos linfócitos T CD8+ e nas subpopulações no grupo com infecção anorretal assintomática, especialmente na população de memória efetora. Nesse processo, os linfócitos perdem sua capacidade efetora diminuindo a síntese de citocinas e a habilidade de proliferação celular(56), o que prejudica ainda mais a capacidade do sistema imunológico em montar uma resposta eficiente para eliminação desses patógenos.

Os resultados desse estudo ganha maior importância com dados recentes na literatura que correlacionam ativação celular de linfócitos T e o aumento do risco de transmissão do HIV-1. Pattacini et al. (2016) identificaram uma maior frequência de células Treg em indivíduos que não adquiriram o HIV-1 em amostras do estudo *Partners PrEP Study*(39). As células Treg desempenham papel importante no controle da ativação celular e na supressão da função efetora das células do sistema imunológico, limitando a lesão tecidual por consequência da resposta inflamatória(57). Esses achados são corroborados por outro estudo que identificou a ativação de linfócitos T CD8+ como fator de risco independente para a aquisição sexual do vírus HIV-1, comparando amostras temporalmente anteriores, porém próximas, ao momento da aquisição do vírus de indivíduos previamente HIV negativos, com amostras de indivíduos que não adquiriram a infecção(45). Estratégias que

visem inibir a ativação celular podem atuar como importante método de prevenção da infecção pelo HIV-1 em populações altamente vulneráveis, entre elas o potencial rastreamento e tratamento das infecções anorretais por CT e NG.

Limitações do estudo

Nosso estudo apresenta algumas limitações, sendo a principal delas a incapacidade de demonstrar a diminuição da ativação celular após o tratamento dessas infecções em um estudo experimental, por consequência de seu corte transversal. Além disso, fatores de confusão podem estar presentes e dificultar a interpretação dos dados obtidos, porém os dois grupos são bastante similares em relação a aspectos demográficos e comportamentais. Esse estudo também não permitiu a avaliação da resposta imune na mucosa anorretal, local onde os patógenos estão presentes e a principal porta de entrada da transmissão sexual do HIV-1 na população HSH. Em estudos futuros, também será importante avaliar outras ISTs altamente prevalentes e com cursos assintomáticos e seu impacto no sistema imunológico, entre elas a sífilis latente e infecções pelo vírus da HSV-2 (*Herpes Simplex Virus Type 2*).

Perspectivas

Nossos resultados têm importante aplicação prática ao fornecer novas informações do impacto das infecções assintomáticas anorretais por CT e NG no sistema imunológico em estado quiescente. Essas infecções são de fácil tratamento e têm incidência elevada em uma população com alta vulnerabilidade a aquisição da infecção pelo HIV-1.

Milhares de novas infecções pelo HIV-1 ainda são diagnosticadas anualmente em todo mundo e novas estratégias e tecnologias de prevenção são essenciais para um controle da epidemia. O uso da PrEP na prevenção da aquisição sexual do vírus vem se tornando uma ferramenta primordial na população de HSH(6, 7). Por outro lado, a implementação da PrEP aumentou a preocupação em relação ao crescimento de novos casos de outras ISTs. Apesar de uma tendência a redução de sífilis ao longo do estudo iPrEX(11), em outros dois ensaios clínicos, o número de casos incidentes correspondeu a um terço e a metade das coortes de voluntários ao longo do seguimento(8, 9).

A implementação da PrEP deverá incorporar um pacote de prevenção, incluindo testagem regular para o HIV e outras ISTs, aconselhamento sobre redução de risco e incentivo ao uso de preservativos. Clínicas que fornecem a PrEP deverão ser cada vez mais frequentes nos próximos anos e resultarão em uma oportunidade única para rastreamento periódico e o tratamento precoce de ISTs, entre elas as infecções assintomáticas por CT e NG, atuando como medida adicional a prevenção ao HIV. Novas estratégias de controle e tratamento dessas infecções também devem ser avaliadas, entre elas o tratamento regular sem o diagnóstico confirmatório ou a profilaxia bacteriana pré-exposição em grupos de alto risco. No entanto, ensaios clínicos avaliando essas estratégias precisam ser realizados para acessar a eficácia e impacto dessas estratégias, como o surgimento de cepas resistentes.

6. *Conclusão*

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo mostramos que as infecções assintomáticas anorretal por CT e/ou NG no PrEP Brasil foram altamente prevalentes e similares a dados encontrados em outros estudos de PrEP e em levantamentos epidemiológicos na população de HSH.

Identificamos nesse estudo um aumento da ativação sistêmica de linfócitos T CD8⁺ e de suas subpopulações, assim como a maior expressão de marcadores de exaustão e senescência celular no grupo de indivíduos com infecção anorretal assintomática por CT e/ou NG.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143304.
2. Mayaud P, Mabey D. Approaches to the control of sexually transmitted infections in developing countries: old problems and modern challenges. *Sex Transm Infect*. 2004;80(3):174-82.
3. World Health Organization (WHO). HIV Progress Report 2016. [Internet]. 2016.
4. World Health Organization (WHO). Technical Brief - HIV and young men who have sex with men. [Internet]. 2015.
5. Brasil. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2015. Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. 2016.
6. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2587-99.
7. Buchbinder SP, Glidden DV, Liu AY, McMahan V, Guanira JV, Mayer KH, et al. HIV pre-exposure prophylaxis in men who have sex with men and transgender women: a secondary analysis of a phase 3 randomised controlled efficacy trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(6):468-75.
8. Molina JM, Capitant C, Spire B, Pialoux G, Cotte L, Charreau I, et al. On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(23):2237-46.
9. McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, et al. Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet*. 2016;387(10013):53-60.

10. Marcus JL, Glidden DV, Mayer KH, Liu AY, Buchbinder SP, Amico KR, et al. No evidence of sexual risk compensation in the iPrEx trial of daily oral HIV preexposure prophylaxis. *PLoS One*. 2013;8(12):e81997.
11. Scott HM, Klausner JD. Sexually transmitted infections and pre-exposure prophylaxis: challenges and opportunities among men who have sex with men in the US. *AIDS Res Ther*. 2016;13:5.
12. Blumenthal J, Haubrich RH. Will risk compensation accompany pre-exposure prophylaxis for HIV? *Virtual Mentor*. 2014;16(11):909-15.
13. Volk JE, Marcus JL, Phengrasamy T, Blechinger D, Nguyen DP, Follansbee S, et al. No New HIV Infections With Increasing Use of HIV Preexposure Prophylaxis in a Clinical Practice Setting. *Clin Infect Dis*. 2015;61(10):1601-3.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention. 2015.
15. Dukers-Muijrers NH, Schachter J, van Liere GA, Wolffs PF, Hoebe CJ. What is needed to guide testing for anorectal and pharyngeal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women and men? Evidence and opinion. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):533.
16. Cunha CB, Friedman RK, de Boni RB, Gaydos C, Guimarães MR, Siqueira BH, et al. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and syphilis among men who have sex with men in Brazil. *BMC Public Health*. 2015;15:686.
17. Kent CK, Chaw JK, Wong W, Liska S, Gibson S, Hubbard G, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhea detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):67-74.
18. Workowski KA, Bolan GA, Prevention CfDCA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep*. 2015;64(RR-03):1-137.
19. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(1):33-42.
20. Berman SM, Cohen MS. STD treatment: how can it improve HIV prevention in the South? *Sex Transm Dis*. 2006;33(7 Suppl):S50-7.

21. Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Schillinger JA. HIV incidence among men with and those without sexually transmitted rectal infections: estimates from matching against an HIV case registry. *Clin Infect Dis*. 2013;57(8):1203-9.
22. Bernstein KT, Marcus JL, Nieri G, Philip SS, Klausner JD. Rectal gonorrhea and chlamydia reinfection is associated with increased risk of HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53(4):537-43.
23. Koblin BA, Husnik MJ, Colfax G, Huang Y, Madison M, Mayer K, et al. Risk factors for HIV infection among men who have sex with men. *AIDS*. 2006;20(5):731-9.
24. Scott KC, Philip S, Ahrens K, Kent CK, Klausner JD. High prevalence of gonococcal and chlamydial infection in men who have sex with men with newly diagnosed HIV infection: an opportunity for same-day presumptive treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48(1):109-12.
25. Craib KJ, Meddings DR, Strathdee SA, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, et al. Rectal gonorrhoea as an independent risk factor for HIV infection in a cohort of homosexual men. *Genitourin Med*. 1995;71(3):150-4.
26. Scott HM, Vittinghoff E, Irvin R, Sachdev D, Liu A, Gurwith M, et al. Age, race/ethnicity, and behavioral risk factors associated with per contact risk of HIV infection among men who have sex with men in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;65(1):115-21.
27. Johnson LF, Lewis DA. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 2008;35(11):946-59.
28. Ramsey KH, Schneider H, Cross AS, Boslego JW, Hoover DL, Staley TL, et al. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhea. *J Infect Dis*. 1995;172(1):186-91.
29. Vats V, Agrawal T, Salhan S, Mittal A. Primary and secondary immune responses of mucosal and peripheral lymphocytes during *Chlamydia trachomatis* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(2):280-7.
30. Perry LL, Feilzer K, Caldwell HD. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 1997;158(7):3344-52.

31. Heiligenberg M, Lutter R, Pajkrt D, Adams K, De Vries H, Heijman T, et al. Effect of HIV and chlamydia infection on rectal inflammation and cytokine concentrations in men who have sex with men. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(10):1517-23.
32. Naranbhai V, Abdool Karim SS, Altfeld M, Samsunder N, Durgiah R, Sibeko S, et al. Innate immune activation enhances hiv acquisition in women, diminishing the effectiveness of tenofovir microbicide gel. *J Infect Dis.* 2012;206(7):993-1001.
33. Kahle EM, Bolton M, Hughes JP, Donnell D, Celum C, Lingappa JR, et al. Plasma cytokine levels and risk of HIV type 1 (HIV-1) transmission and acquisition: a nested case-control study among HIV-1-serodiscordant couples. *J Infect Dis.* 2015;211(9):1451-60.
34. Masson L, Mlisana K, Little F, Werner L, Mkhize NN, Ronacher K, et al. Defining genital tract cytokine signatures of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis in women at high risk of HIV infection: a cross-sectional study. *Sex Transm Infect.* 2014;90(8):580-7.
35. Bégaud E, Chartier L, Marechal V, Ipero J, Léal J, Versmisse P, et al. Reduced CD4 T cell activation and in vitro susceptibility to HIV-1 infection in exposed uninfected Central Africans. *Retrovirology.* 2006;3:35.
36. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1318-22.
37. Kuebler PJ, Mehrotra ML, Shaw BI, Leadabrand KS, Milush JM, York VA, et al. Persistent HIV Type 1 Seronegative Status Is Associated With Lower CD8+ T-Cell Activation. *J Infect Dis.* 2016;213(4):569-73.
38. McLaren PJ, Ball TB, Wachihi C, Jaoko W, Kelvin DJ, Danesh A, et al. HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4+ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl 3:S339-44.
39. Pattacini L, Baeten JM, Thomas KK, Fluharty TR, Murnane PM, Donnell D, et al. Regulatory T-Cell Activity But Not Conventional HIV-Specific T-Cell Responses Are

Associated With Protection From HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72(2):119-28.

40. Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, et al. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J Immunol*. 2010;185(2):982-9.

41. Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, Genco CA. Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect Immun*. 2001;69(9):5840-8.

42. Reddy BS, Rastogi S, Das B, Salhan S, Verma S, Mittal A. Cytokine expression pattern in the genital tract of *Chlamydia trachomatis* positive infertile women - implication for T-cell responses. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(3):552-8.

43. Murphy K. *Janeways Immunobiology*, 8th Edition: Garland Science; 2012.

44. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.

45. Kuebler PJ, Mehrotra ML, Shaw BI, Leadabrand KS, Milush JM, York VA, et al. Persistent HIV Type 1 Seronegative Status Is Associated With Lower CD8+ T-Cell Activation. *J Infect Dis*. 2015.

46. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, et al. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol*. 2005;175(9):6117-22.

47. Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Shepard C, Schillinger JA. The high risk of an HIV diagnosis following a diagnosis of syphilis: a population-level analysis of New York City men. *Clin Infect Dis*. 2015;61(2):281-7.

48. Solomon MM, Mayer KH, Glidden DV, Liu AY, McMahan VM, Guanira JV, et al. Syphilis predicts HIV incidence among men and transgender women who have sex with men in a preexposure prophylaxis trial. *Clin Infect Dis*. 2014;59(7):1020-6.

49. Cain TK, Rank RG. Local Th1-like responses are induced by intravaginal infection of mice with the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1995;63(5):1784-9.

50. Cotter TW, Ramsey KH, Miranpuri GS, Poulsen CE, Byrne GI. Dissemination of *Chlamydia trachomatis* chronic genital tract infection in gamma interferon gene knockout mice. *Infect Immun*. 1997;65(6):2145-52.
51. Morrison SG, Su H, Caldwell HD, Morrison RP. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect Immun*. 2000;68(12):6979-87.
52. Boulton IC, Gray-Owen SD. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol*. 2002;3(3):229-36.
53. Lee HS, Ostrowski MA, Gray-Owen SD. CEACAM1 dynamics during neisseria gonorrhoeae suppression of CD4+ T lymphocyte activation. *J Immunol*. 2008;180(10):6827-35.
54. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol*. 2001;2(5):415-22.
55. Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol*. 2000;165(4):1733-7.
56. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-99.
57. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):119-30.

* De acordo com:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Apêndice

Asymptomatic anorectal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections are associated with systemic CD8⁺ T-cell activation

Vinicius A. Vieira^a, Vivian I. Avelino-Silva^c, Natalia B. Cerqueira^a,
Dayane A. Costa^a, Priscilla R. Costa^a, Ricardo P. Vasconcelos^b,
Valdez R. Madruga^d, Ronaldo I. Moreira^e, Brenda Hoagland^e,
Valdiléa G. Veloso^e, Beatriz Grinsztejn^e, Esper G. Kallás^{a,b},
for the PrEP Brasil Study Team

Background: Oral preexposure prophylaxis (PrEP) has been established as a pivotal strategy in HIV prevention. However, bacterial sexually transmitted infections (STIs), such as *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, are also highly prevalent. Although the presence of STI-related mucosal lesions is a known risk factor for HIV acquisition, the potential increase in risk associated with asymptomatic STIs is not completely understood. Recent data demonstrated higher T-cell activation is a risk factor for sexually acquired HIV-1 infection. We examined the effect of asymptomatic *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* anorectal infection on systemic immune activation, potentially increasing the risk of HIV acquisition.

Methods: We analyzed samples from participants of *PrEP Brasil*, a demonstration study of daily oral emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate HIV PrEP among healthy MSM, for T-cell activation by flow cytometry. We included 34 asymptomatic participants with anorectal swab for *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* infection, whereas negative for other STIs, and 35 controls.

Results: We found a higher frequency of human leukocyte antigen DR⁺CD38⁺ CD8⁺ T cells (1.5 vs. 0.9%, $P < 0.005$) and with memory phenotype in the group with asymptomatic *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* infection. Exhaustion and senescence markers were also significant higher in this group. No difference was observed in the soluble CD14 levels.

Conclusion: Our findings suggest asymptomatic anorectal *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* increase systemic immune activation, potentially increasing the risk of HIV acquisition. Regular screening and treatment of asymptomatic STIs should be explored as adjuvant tools for HIV prevention.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2017, 31:000–000

Keywords: cellular immunity, *Chlamydia trachomatis*, HIV, immune activation, *Neisseria gonorrhoeae*, preexposure prophylaxis, T lymphocyte

^aDivision of Clinical Immunology and Allergy, ^bDepartment of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo School of Medicine, ^cInstituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Sírio-Libanês, ^dCentro de Referência e Treinamento em DST/AIDS, São Paulo, São Paulo, and ^eInstituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence to Esper G. Kallás, Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo, Av Dr Arnaldo, 455, 01246-903 São Paulo, SP, Brazil.

Tel: +55 11 3061 8314; fax: +55 11 3061 8315; e-mail: esper.kallas@usp.br
Received: 25 January 2017; revised: 14 June 2017; accepted: 23 June 2017.

DOI:10.1097/QAD.0000000000001580

Introduction

Oral preexposure prophylaxis (PrEP) is effective to prevent sexual HIV acquisition [1–4]. The implementation of PrEP in different settings raised concerns on potential increase in transmission of other sexually transmitted infections (STIs) due to an increase in condomless sexual exposure among PrEP users [5–7], even though there was no consistent evidence of such risk compensation among PrEP clinical trials participants [8,9]. Indeed, STIs are a public health problem with rising importance over the last decades [10]. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* are the most prevalent STIs, with high prevalence were among MSM: 14.9% for *C. trachomatis* and 19.2% for *N. gonorrhoeae* in the United States [10]. In a recent study among HIV-infected and HIV-uninfected MSM in Rio de Janeiro, the prevalence of anorectal *C. trachomatis* was 10.0% and *N. gonorrhoeae* was 9.9%, with high proportion of asymptomatic infections [11]. Asymptomatic STIs may be readily transmitted to an uninfected partner through sexual contact [12].

It is well established that an untreated STI may increase the risk of HIV acquisition [13–15]. Although in observational studies, the association between bacterial STIs and HIV infection may partially result from bias due to confounders, such as sexual exposure and other behavioral factors [16–18], these pathogens are known to decrease epithelial integrity and disturb mucosal immunity, directly facilitating HIV entry [19,20]. However, the potential role of asymptomatic STIs in increasing the risk of HIV acquisition is not completely understood.

Asymptomatic STIs may impact systemic immune quiescence status by increasing T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion. Immune activation as a host cofactor for increased susceptibility to HIV-1 infection has long been identified [21]. Recent data suggest that reduced immune activation is associated with protection against HIV-1 acquisition in serodiscordant partners [22]. In addition, T-cell activation was associated with higher HIV transmission, whereas higher frequency of regulatory T cells was a protective marker [23–27].

In this cross-sectional study, we addressed the association between asymptomatic anorectal *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* and immune activation in a cohort of MSM participants of a PrEP demonstration study.

Materials and methods

Study participants and procedures

A total of 546 HIV-uninfected MSM at high risk of sexually transmitted HIV from São Paulo and Rio de Janeiro were enrolled in PrEP Brasil, a 48-week open-

label demonstration study of daily oral coformulated emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate (TDF/FTC). At study entry, assessments procedures included a medical assessment with physical exam, HIV rapid testing, pooled or individual HIV RNA, HBsAg, Hepatitis C antibody, syphilis serology, creatinine clearance and proteinuria (urine dipstick 1+ or more). A rectal sample was collected for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* detection. Participants answered a computer-assisted self-interview, including demographics, sexual and drug use behavior questions. Eligible individuals were offered daily oral PrEP with TDF/FTC. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained at baseline and in case of HIV seroconversion.

For this cross-sectional study, we selected all asymptomatic individuals who presented with a positive rectal swab test for *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* at study entry and had no other STIs on laboratory tests for hepatitis B and C and syphilis. Based on the sample availability, asymptomatic participants with negative rectal swab test and without any laboratory STI were randomly selected as comparison group.

Laboratory procedures

Diagnosis of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections

C. trachomatis and *N. gonorrhoeae* were detected with a commercially available kit (Abbott RealTime CT/NG assay; Chicago, Illinois, USA), an in-vitro PCR for qualitative detection of the plasmid DNA for *C. trachomatis* and the genomic colony opacity-associated (*Opa*) gene for *N. gonorrhoeae* according to the manufacturer instructions.

Flow cytometry and phenotype staining protocol

PBMC were thawed and resuspended in supplemented RPMI1640 medium (10% fetal bovine serum). The viable cells were counted by Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and plated 1.0×10^6 cells/well in a 96-well cell V-bottom plate. The cells were stained for live/dead using a kit from Invitrogen. Surface markers examined by phenotype staining and the clone used include: CD3 (UCHT1), CD4⁺ (RPA-T4), CD8⁺ (SK1), CD45RA (HI1000), CCR7 (3D12), human leukocyte antigen DR (HLA-DR) (G46-6), CD27 (L128), CD28 (CD28.2), CD57 (NK-1), CD297 (EH12.1) and CD95 (DX2) from BD Biosciences (San Jose, California, USA).

All samples were stained for 30 min in the dark, then washed once with fluorescence-activated cell sorting buffer and fixed in 1% paraformaldehyde in PBS. The samples were acquired using a LSR II Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, Oregon, USA). We defined a gate strategy (see Supplementary Fig. 1, <http://links.lww.com/QAD/B126>) and two different scientists analyzed the data.

Soluble CD14 levels

Soluble CD14 (sCD14) levels were determined in stored plasma samples (−80 °C) by an ELISA (Human CD14 DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) according to the manufacturer's instructions. The plates were read with Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA).

Statistical methods

For sample size estimation, a pilot study, including 18 participants (nine uninfected and nine *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae*-infected, based on the rectal swab results), was initially conducted to estimate mean percentage of activated CD8⁺ T cells in both groups; using a chi-squared test, alpha error of 0.05 and 80% power, the estimated sample size was 40 individuals per group.

Clinical and demographic characteristics of participants in each group were described using frequencies, percentages, medians and interquartile ranges. Comparisons were performed using Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and chi-square or Fisher's exact test for categorical variables as appropriate.

For all analyses, we assumed a two-sided alpha error of 0.05 and used the statistical software Stata version 13.1 (StataCorp, College Station, Texas, USA) and GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and SPICE version 5.1 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA) [28].

Ethical aspects

All volunteers in the *PrEP Brasil* study have signed an informed consent form at enrollment. The study was approved by the Institutional Review Boards in each contributing site. Participant-identifiable data were

maintained in locked cabined and secured electronic forms.

Results

Among the 546 participants in *PrEP Brasil*, 31 had positive rectal swab tests for *C. trachomatis*, 15 for *N. gonorrhoeae* and six for both *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* at baseline. After initial exclusion of five participants due to positive serologic test for syphilis, 34 individuals with asymptomatic positive *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* rectal swab were selected considering sample availability, along with randomly selected 35 individuals in the control group. Some samples were not available; low cell viability or positive or negative control results failing quality control standards were discarded, explaining some missing values. Demographic and clinical characteristics were similar in both groups. Although the proportion of participants reporting receptive anal intercourse in the 3 months prior to enrollment was similar in both groups ($P=0.26$), *C. trachomatis/N. gonorrhoeae*-positive group had a higher median number of male sexual partners in the same period [7, interquartile range (IQR) 2–15] compared with *C. trachomatis/N. gonorrhoeae*-negative group (2, IQR 1–7, $P=0.01$; Table 1).

***Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* asymptomatic anorectal infection is associated with lower CD4⁺ and higher CD8⁺ T-cell percentages**

Individuals with a *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* infection had lower percentage of CD4⁺ T cell and higher percentage of CD8⁺ T cell, changing the CD4⁺-and-CD8⁺ T-cell ratio compared with controls, as shown

Table 1. Demographics of the study population.

	STI ^a -positive N = 34	STI ^a -negative N = 35	P value ^b
Swab positive			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	22 (65%)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	9 (26%)		
Both	3 (9%)		
Age at enrollment (SD) ^{a,c}	29 (25–34)	29 (24–36)	0.93
Ethnicity			
White	21 (64%)	23 (70%)	0.60
Nonwhite	12 (36%)	10 (30%)	
HIV-positive male sexual partner in the last 3 months ^b	14 (44%)	18 (58%)	0.26
Number of male sexual partners in the last 3 months ^c	7 (2–15)	2 (1–7)	0.01
Had receptive anal intercourse in the last 3 months ^d	14 (42%)	17 (52%)	0.26
Alcohol use ^d	19 (58%)	23 (70%)	0.31
Smoking ^e	15 (50%)	15 (48%)	0.90

^aSTI, sexually transmitted infection.

^bData available for 63 participants.

^cContinuous variables are shown as medians and interquartile ranges.

^dData available for 66 participants.

^eData available for 61 participants.

Fig. 1. T-cell phenotyping in individuals with anorectal *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae* infection and uninfected controls. (a) Percentage of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and the CD4⁺-to-CD8⁺ ratio are shown for uninfected controls (closed dots) and *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected (open dots). (b) and (c) Percentage of CD8⁺ and CD4⁺ T-cell memory subsets for *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected participants and for uninfected controls, respectively, as defined by expression of CD45RA, CCR7 and CD27.

in Fig. 1a. Differentiation pattern of CD8⁺ T cell revealed lower percentage of naive (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) and higher percentage of effector memory CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ in the *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* infection group but no differences were found in the central memory (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), transitional memory (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) and terminal effector memory (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) CD8⁺ T-cell subpopulations (Fig. 1b). These results suggest a shift in CD8⁺ T-cell differentiation to more

mature forms in the group with *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* infection. In the CD4⁺ T-cell compartment, we did not find any significant difference in T-cell subsets comparing *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* infection and negative groups (Fig. 1c).

***Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae* asymptomatic anorectal infection is associated with systemic CD8⁺ T-cell activation**

Individuals with *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* asymptomatic anorectal infection had a 1.67-fold greater percentage of HLA-DR⁺CD38⁺CD8⁺ T cell than the control group (1.5 vs. 0.9%, respectively, $P = 0.003$; Fig. 2b). We found no statistically significant difference between the two groups in the frequency of activated CD4⁺ T cells (0.7 vs. 0.6%, $P = 0.2$; Fig. 2d). There was also no statistically significant difference in CD4⁺ T cell expressing a single activation marker (Supplementary Table 1, <http://links.lww.com/QAD/B126>).

The assessment of CD8⁺ T cells with a memory phenotype showed a significant difference in percentage of transitional memory subset (2.4 in *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-positive vs. 1.2 in *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-negative group, $P = 0.018$) and a substantial difference in naive (0.2 vs. 0.1%, $P = 0.09$), central memory (2.9 vs. 1.9%, $P = 0.07$) and effector memory (2.0 vs. 1.4%, $P = 0.06$) subsets, although not reaching statistical significance (Fig. 2a). We found a similar trend for some CD4⁺ T-cell subsets (Fig. 2c), but none were statistically different when comparing both groups (Supplementary Table 1, <http://links.lww.com/QAD/B126>).

The overall signature of activation in CD8⁺ and CD4⁺ T cells, as depicted by differentiation stages, was not significantly different between the two groups (Fig. 2b and d).

***Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-positive participants present higher expression of exhaustion and senescence markers on CD8⁺ T cells**

Percentage of CD8⁺ T cells with exhaustion and senescence markers were higher in individuals with *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* anorectal infection than in the negative group (Fig. 3a). The percentage of activated CD8⁺ T cells expressing PD-1 (0.9 vs. 0.5%, $P = 0.009$), CD95 (1.5 vs. 0.8%, $P = 0.002$) and coexpressing both markers (0.9 vs. 0.5%, $P = 0.009$) were significantly higher in the *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-positive group compared with controls. These findings were evident in the subsets of central, transitional and effector memory CD8⁺ T cells. As expected, we did not find the same difference in naive and terminal effector subsets. There were no statistically significant differences in the CD4⁺ T-cell exhaustion and senescence markers (data not shown).

Fig. 2. T-cell activation. (a) and (c) Percentage of total and memory subsets of CD8⁺ and CD4⁺ T cell, respectively, coexpressing the activation markers. The activation status was phenotypically defined by the coexpression of HLA-DR and CD38 markers. (b) and (d) pie charts illustrate the differentiation of activated CD8⁺ and CD4⁺ T cells, respectively, in the two groups (*Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected and uninfected controls). HLA, human leukocyte antigen.

Fig. 3. (a) Expression and coexpression of activation, exhaustion and senescence markers in total and memory subsets of CD8⁺ T cells. The difference of CD8⁺ T-cell expression of exhaustion markers (PD-1⁺), activation markers (CD95⁺CD38⁺ and HLA-DR⁺) and senescence markers (CD57⁺ and CD28⁺) between *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected participants and uninfected controls. All statically significant differences observed are associated with a higher expression in the *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected group over the control group. (b) Comparison between the levels of soluble CD14 in plasma in the *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-infected and uninfected controls. Bars represent the mean and SD. HLA, human leukocyte antigen.

Levels of soluble CD14 were not significantly different between the *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*-positive and *Chlamydia trachomatis*/NG-negative groups

We did not find any significant difference in the sCD14 levels comparing *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-positive and *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*-negative groups (2208 ± 308 vs. 2286 ± 307 pg/ml, $P = 0.96$) (Fig. 3b). Mean sCD14 values were within normal range.

Discussion

In this study, we examined the association between asymptomatic *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* anorectal infection and systemic T-cell immune activation among HIV-uninfected MSM participants of PrEP Brasil. We found a baseline prevalence of *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* anorectal infection of 9.5%, similar to the prevalence described in a large national study in the United States [29]. Therefore, this was an ideal environment to conduct our study. Asymptomatic *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* anorectal infection were associated with lower CD4⁺-to-CD8⁺ T-cell ratio, higher frequency of CD8⁺ T cells coexpressing the activation markers HLA-DR and CD38 and higher expression of exhaustion and senescence markers on CD8⁺ T cells.

Our results showed a substantial difference in the expression of activation markers for almost all CD8⁺ T-cell subsets. Even though the differences among the memory populations were not statistically significant, the patterns were consistent with disturbance of the quiescence immune status. When naive T cells are activated during an infection, they proliferate and become effector T cells to fulfill their functions [30,31]. As expected and reinforcing our hypothesis, we found a shift toward central memory and effector memory activation and a quiescence status for naive cells.

Chronic immune activation and inflammation are well known hallmarks of HIV infection despite effective antiretroviral therapy and have been related to increased mortality and non-AIDS morbidity [32–34]. The level of T-cell activation in blood has been also implicated in HIV-acquisition risk [25,27,35]. It has been associated with range of possible causes from HIV-1 exposure to STIs [36–39]. In prior studies, different STIs, including syphilis [16,40,41] and anorectal *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infection, have been shown to facilitate HIV acquisition [16,17], likely through a physical disrupt in the skin or mucosal integrity along with local inflammatory conditions leading to a higher exposure of HIV-susceptible cells [19,20]. Although STIs are an important cause of inflammatory cytokine upregulation in the genital mucosa, potentially resulting in immune activation [20,38,39], our findings first report the evidence of

asymptomatic STIs, leading to systemic immune activation, which suggests STIs could be associated with higher risk of HIV acquisition despite epithelial integrity and absent or low mucosal inflammation in asymptomatic infections. Indeed, systemic CD8⁺ T-cell activation has been prior implicated as an independent risk factor of HIV acquisition [25].

Although CD4⁺ T-cell activation would be an important marker of HIV susceptibility, we did not find a statistically significant difference in CD4⁺ T-cell activation between the two groups. This might in part be justified by biological characteristics of immune responses to both pathogens. *C. trachomatis* is an obligate intracellular agent, and the adaptive immune response is predominantly directed by CD8⁺ T cells. The role of CD4⁺ T cells in response to intracellular pathogens is controversial. On the other hand, CD8⁺ T cells control intracellular infections through cytotoxicity, antimicrobial peptides and release of cytokines [42]. *N. gonorrhoeae* in turn has been shown to suppress CD4⁺ T cells through the Opa (colony opacity-associated proteins) binding to carcinoembryonic Ag-related cellular adhesion molecule family of receptors and inhibiting expression of activation markers (CD69) and proliferation [43]. We could hypothesize that after initial infection with *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*, a low or absent mucosal inflammation in asymptomatic infections might be associated with an ineffective immune response, unable to clear off the pathogen but leading to a permanent, subtle stimulus resulting in immune activation. Although these pathogens usually cause acute infections, a potential subacute and/or chronic asymptomatic stimulus can lead in the development of CD8⁺ T cells that are capable of cytokine secretion yet incapable of cell division [44]. This hypothesis is in line with our findings of higher expression of exhaustion and senescence markers of CD8⁺ T cell in the *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* infection group, especially in the effector memory cells. The absence of increased level of plasma sCD14 indirectly reinforces our hypothesis that the infection of these pathogens can disturb the quiescence immune status, without evidence of surrogate markers of bacterial translocation from the gut.

Despite these relevant results, our study presents some limitations such as the cross sectional design and the inability to demonstrate the resolution of immune activation after treatment of the asymptomatic STI. The sample size might be a limitation but we do believe the effect obtained is suitable to accurately demonstrate the impact of these asymptomatic rectal infections in the activation of the CD8⁺ T-cell compartment. We cannot rule out that residual confounders such as behavioral factors might be present and disturb our results, although they are unlikely considering the similarity of the two groups concerning demographic characteristics. We were also unable to simultaneously address the presence of

asymptomatic epithelial damage and the intensity of local immune response in the anorectal mucosa, in which the infection occurs and the HIV-1 acquired infection may start. Finally, the impact of other highly prevalent and often asymptomatic infections in the immune system, like latent syphilis and HSV-2, were not addressed. HSV-2 has been associated with systemic activation and high cytokine genital levels [20,45].

Our findings have important practical implications. As the HIV-1 epidemic continues to spread globally and a prophylactic vaccine is still a challenge, the attention has been directed to other preventive methods. There has been renewed hope in HIV prevention with the implementation of PrEP after several favorable results [1–3]. Although not conclusive, several studies indicate that an increase in sexual exposure, or risk compensation, could potentially result from a reduced perceived risk under PrEP, leading to an increase in the incidence of other STIs [2–6]. But importantly, PrEP is expected to become increasingly available in the future years and may provide an excellent opportunity to early diagnosis, periodic screening and early treatment of other STIs as an additional HIV-prevention tool. One could also speculate that the deleterious impact of asymptomatic STIs on HIV infection risk merits new approaches for diagnosis, treatment and prevention of such infections. For instance, treatment on a regular basis even without confirmed diagnosis, and even PrEP for bacterial STIs could be considered for high-risk sexual behavior groups, especially taking into consideration the high global prevalence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infections in MSM. For this approach, the local patterns of drug-resistant STIs must be carefully considered.

In conclusion, our study showed that asymptomatic *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* anal infection is associated with increased systemic immune activation, which in turn was previously shown to result in increased risk of HIV acquisition. Asymptomatic STIs are typically under-diagnosed and undertreated, but this omission can be attenuated among PrEP users, for whom STI diagnosis and treatment opportunities are expanded.

Acknowledgements

Funding agencies did not participate or interfere in the concept, implementation, generation of data, analyses of results and preparation of this article.

The current work and PrEP Brasil study was supported by the Brazilian Ministry of Health (#01/2013 BRA/K57), National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq (#402004/2012-4, # 454931/2014-0) SVS (#281/2013), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (#E-26/

110.261/2014) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (#2012/51743-0). Gilead Sciences donated the study drug and covered the costs related to drug level assessment. D.A.C.'s scholarship was funded by FAPESP; P.R.C.'s scholarship was funded by Programa de Excelência Acadêmica – PROEX Program, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Conflicts of interest

V.A.V., V.I.A.-S., N.B.C., D.A.C., P.R.C., J.V.M., V.G.V., B.G., and E.G.K. have no conflicts of interest. R.P.V. has received travel grant by Gilead.

Presented in part at the Immuno 2016 – the Brazilian Congress of Immunology, Campos do Jordão, Brazil, 2016.

References

- Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, *et al.* Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med* 2010; **363**:2587–2599.
- Buchbinder SP, Glidden DV, Liu AY, McMahan V, Guanira JV, Mayer KH, *et al.* HIV preexposure prophylaxis in men who have sex with men and transgender women: a secondary analysis of a phase 3 randomised controlled efficacy trial. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**:468–475.
- Molina JM, Capitant C, Spire B, Pialoux G, Cotte L, Charreau I, *et al.* On-demand preexposure prophylaxis in men at high risk for HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2015; **373**:2237–2246.
- McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, *et al.* Preexposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet* 2016; **387**:53–60.
- Scott HM, Klausner JD. Sexually transmitted infections and preexposure prophylaxis: challenges and opportunities among men who have sex with men in the US. *AIDS Res Ther* 2016; **13**:5.
- Blumenthal J, Haubrich RH. Will risk compensation accompany preexposure prophylaxis for HIV? *Virtual Mentor* 2014; **16**:909–915.
- Volk JE, Marcus JL, Phengrasamy T, Blechinger D, Nguyen DP, Follansbee S, *et al.* No new HIV infections with increasing use of HIV preexposure prophylaxis in a clinical practice setting. *Clin Infect Dis* 2015; **61**:1601–1603.
- Fonner VA, Dalglish SL, Kennedy CE, Baggaley R, O'Reilly KR, Koechlin FM, *et al.* Effectiveness and safety of oral HIV preexposure prophylaxis for all populations. *AIDS* 2016; **30**:1973–1983.
- Liu AY, Vittinghoff E, Chillag K, Mayer K, Thompson M, Grohskopf L, *et al.* Sexual risk behavior among HIV-uninfected men who have sex with men participating in a tenofovir preexposure prophylaxis randomized trial in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; **64**:87–94.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014. Atlanta, GA. Available at: <https://www.cdc.gov/std/stats14/surv-2014-print.PDF>.
- Cunha CB, Friedman RK, de Boni RB, Gaydos C, Guimarães MR, Siqueira BH, *et al.* Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and syphilis among men who have sex with men in Brazil. *BMC Public Health* 2015; **15**:686.
- Baker J, Plankey M, Josayma Y, Elion R, Childe P, Shahkolahi A, *et al.* The prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis among asymptomatic men who have sex with men in a prospective cohort in Washington, D.C. *AIDS Patient Care STDS* 2009; **23**:585–588.

13. Galvin SR, Cohen MS. **The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission.** *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**:33–42.
14. Cohen MS. **Sexually transmitted diseases enhance HIV transmission: no longer a hypothesis.** *Lancet* 1998; **351** (Suppl 3):5–7.
15. Cohen MS. **HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy.** *Top HIV Med* 2004; **12**:104–107.
16. Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Schillinger JA. **HIV incidence among men with and those without sexually transmitted rectal infections: estimates from matching against an HIV case registry.** *Clin Infect Dis* 2013; **57**:1203–1209.
17. Bernstein KT, Marcus JL, Nieri G, Philip SS, Klausner JD. **Rectal gonorrhea and chlamydia reinfection is associated with increased risk of HIV seroconversion.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**:537–543.
18. Craib KJ, Meddings DR, Strathdee SA, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, et al. **Rectal gonorrhoea as an independent risk factor for HIV infection in a cohort of homosexual men.** *Genitourin Med* 1995; **71**:150–154.
19. Masson L, Passmore JA, Liebenberg LJ, Werner L, Baxter C, Arnold KB, et al. **Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women.** *Clin Infect Dis* 2015; **61**:260–269.
20. Masson L, Mlisana K, Little F, Werner L, Mkhize NN, Ronacher K, et al. **Defining genital tract cytokine signatures of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis in women at high risk of HIV infection: a cross-sectional study.** *Sex Transm Infect* 2014; **90**:580–587.
21. Hahn T, Schattner A, Handzel ZT, Levin S, Bentwich Z. **Possible role of natural cytotoxic activity in the pathogenesis of AIDS.** *Clin Immunol Immunopathol* 1989; **50** (1 Pt 1):53–61.
22. Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB. **Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations.** *J Infect Dis* 2010; **202** (Suppl 3):S377–381.
23. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. **Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells.** *J Infect Dis* 2009; **199**:1318–1322.
24. McLaren PJ, Ball TB, Wachihi C, Jaoko W, Kelvin DJ, Danesh A, et al. **HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4⁺ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors.** *J Infect Dis* 2010; **202** (Suppl 3):S339–344.
25. Kuebler PJ, Mehrotra ML, Shaw BI, Leadabrand KS, Milush JM, York VA, et al. **Persistent HIV type 1 seronegative status is associated with lower CD8⁺ T-cell activation.** *J Infect Dis* 2016; **213**:569–573.
26. Pattacini L, Baeten JM, Thomas KK, Fluharty TR, Murnane PM, Donnell D, et al. **Regulatory T-cell activity but not conventional HIV-specific T-cell responses are associated with protection from HIV-1 infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; **72**:119–128.
27. Bégaud E, Chartier L, Marechal V, Ipero J, Léa J, Versmisse P, et al. **Reduced CD4 T cell activation and in vitro susceptibility to HIV-1 infection in exposed uninfected central Africans.** *Retrovirology* 2006; **3**:35.
28. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. **SPICE: exploration and analysis of postcytometric complex multivariate datasets.** *Cytometry A* 2011; **79**:167–174.
29. Tao G, Hoover KW, Nye MB, Peters P, Gift TL, Peruvemba R, et al. **Rectal infection with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in men in the United States.** *Clin Infect Dis* 2016; **63**:1325–1331.
30. Kaech SM, Ahmed R. **Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells.** *Nat Immunol* 2001; **2**:415–422.
31. Murali-Krishna K, Ahmed R. **Cutting edge: naïve T cells masquerading as memory cells.** *J Immunol* 2000; **165**:1733–1737.
32. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narváez AB, et al. **Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load.** *Blood* 2004; **104**:942–947.
33. Hunt PW. **HIV and inflammation: mechanisms and consequences.** *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; **9**:139–147.
34. Avelino-Silva VI, Miyaji KT, Hunt PW, Huang Y, Simoes M, Lima SB, et al. **CD4/CD8 ratio and KT ratio predict yellow fever vaccine immunogenicity in HIV-infected patients.** *PLoS Negl Trop Dis* 2016; **10**:e0005219.
35. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, et al. **Low-level CD4⁺ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection.** *J Immunol* 2005; **175**:6117–6122.
36. Restrepo C, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, et al. **Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals.** *J Immunol* 2010; **185**:982–989.
37. Kahle EM, Bolton M, Hughes JP, Donnell D, Celum C, Lingappa JR, et al. **Plasma cytokine levels and risk of HIV type 1 (HIV-1) transmission and acquisition: a nested case-control study among HIV-1-serodiscordant couples.** *J Infect Dis* 2015; **211**:1451–1460.
38. Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, Genco CA. **Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells.** *Infect Immun* 2001; **69**:5840–5848.
39. Reddy BS, Rastogi S, Das B, Salhan S, Verma S, Mittal A. **Cytokine expression pattern in the genital tract of *Chlamydia trachomatis* positive infertile women – implication for T-cell responses.** *Clin Exp Immunol* 2004; **137**:552–558.
40. Solomon MM, Mayer KH, Glidden DV, Liu AY, McMahan VM, Guanira JV, et al. **Syphilis predicts HIV incidence among men and transgender women who have sex with men in a preexposure prophylaxis trial.** *Clin Infect Dis* 2014; **59**:1020–1026.
41. Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Shepard C, Schillinger JA. **The high risk of an HIV diagnosis following a diagnosis of syphilis: a population-level analysis of New York City men.** *Clin Infect Dis* 2015; **61**:281–287.
42. Redgrove KA, McLaughlin EA. **The role of the immune response in *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: a double-edged sword.** *Front Immunol* 2014; **5**:534.
43. Lee HS, Ostrowski MA, Gray-Owen SD. **CEACAM1 dynamics during *Neisseria gonorrhoeae* suppression of CD4⁺ T lymphocyte activation.** *J Immunol* 2008; **180**:6827–6835.
44. Wherry EJ, Kurachi M. **Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.** *Nat Rev Immunol* 2015; **15**:486–499.
45. Sheth PM, Sunderji S, Shin LY, Rebbapragada A, Huibner S, Kimani J, et al. **Coinfection with herpes simplex virus type 2 is associated with reduced HIV-specific T cell responses and systemic immune activation.** *J Infect Dis* 2008; **197**:1394–1401.