Fernanda de Mello Malta

**Perfil de células *natural killer* e dendríticas em
casos de soroconversão espontânea e infecção
crônica pelo vírus da Hepatite C**

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

Programa de: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Malta, Fernanda de Mello

Perfil de células *natural killer* e dendríticas em casos de soroconversão espontânea e infecção crônica pelo vírus da Hepatite C / Fernanda de Mello Malta. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Células dendríticas 2.Células *natural killer* 3.Hepatite C crônica
4.Imunidade inata 5.Citometria de fluxo 6.Testes de liberação de interferon-gama
7.Antígenos CD86

USP/FM/DBD-254/13

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cristina e José, por todo o apoio e amor incondicional.

À Gabriela e Marcelo, e às minhas queridas sobrinhas, Maria Luiza e Ana Clara, pelos momentos de descontração.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, por terem acreditado neste trabalho e consentido em participar com o objetivo de contribuir com as pesquisas em Hepatite C.

Ao João Renato Rebello Pinho, meu orientador desde o mestrado, por acreditar no meu potencial e nas minhas ideias, e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Éspér Kallas, por ter aberto as portas de seu laboratório (LIM60) para que eu pudesse desenvolver este trabalho com qualidade.

À Fernanda Romano Bruno, por quem tenho uma enorme gratidão, pois me ensinou tudo o que eu precisava saber para realizar este trabalho, afinal a citometria de fluxo não fazia parte da minha rotina no laboratório.

À Dra. Karina Carvalho, pelo auxílio em diferentes etapas do desenvolvimento deste trabalho, principalmente na análise e discussão dos resultados, e pelas palavras de incentivo.

À Dra. Ana Catharina, pela amizade, pelo incentivo e por ter me ajudado a recrutar os pacientes, sem a sua ajuda nada disso teria acontecido de maneira tranquila e rápida.

À Michele, pela amizade, pelo incentivo e ajuda nos momentos em que eu mais precisei.

À Ketti e Paola, pela ajuda no dia a dia do laboratório, pela paciência e pelo carinho.

Aos colegas do IMT, Clarisse, Cristina, Ariana, Fátima, Kátia, Dona Joana, Fabiana, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada pela amizade e carinho.

Aos colegas do LIM-60, Bianca, Angélica, Carla Alves, Thaís Rodrigues, Priscila, Juliana, Susan, Denise, Maira, Sérgio, Cândida, Isler, Carlos e Ruth, por terem me recebido com tanto carinho, e pela disponibilidade toda vez que eu precisava de alguma coisa, principalmente na sala de cultura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fapesp, pelo suporte financeiro concedido (Processos: 2009/53.270-0 e 2009/53.306-4).

À Fundação Faculdade de Medicina.

EPÍGRAFE

"Nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. E sabe por quê? Porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente."

(Walt Disney).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	A Hepatite C	2
1.2	Sistema imune inato na infecção pelo HCV	2
1.3	Células Dendríticas (DCs)	4
1.4	Células Natural Killer (NKs)	9
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Aspectos Éticos	21
3.2	Casuística	21
3.3	Coleta de amostras	22
3.4	Isolamento e congelamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	23
3.5	Descongelamento das CMSP criopreservadas.....	24
3.6	Imunofenotipagem de Superfície das Células Dendríticas (DCs)	25
3.7	Imunofenotipagem das Células Natural Killer (NKs).....	26
3.7.1	Marcação de moléculas na superfície celular.....	26
3.7.2	Marcação de moléculas intracelulares (ensaio funcional)	27
3.8	Leitura no Citômetro de Fluxo	28
3.9	Estratégia de Análise.....	29
3.9.1	Células Dendríticas (DCs)	29
3.9.2	Células <i>Natural Killer</i> (NKs)	31
3.10	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Exames laboratoriais.....	35
4.2	Frequência de Células Dendríticas (DCs)	36
4.3	Expressão da molécula CD86 pelas Células Dendríticas (DCs)	37
4.4	Frequência de Células Natural Killer (NKs)	39
4.5	Expressão das moléculas CD7, CD57, NKG2A e KIR3DL1/DS1 pelas NKs	40
4.6	Citotoxicidade e produção de IFN γ pelas NKs	44
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES.....	58
7	ANEXOS	60
7.1	ANEXO A – Parecer do comitê de ética e pesquisa	60
7.2	ANEXO B – Artigo aceito para publicação.....	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
ALT	alanina Aminotransferase
APC	célula apresentadora de antígeno
AST	aspartato Aminotransferase
BSA	albumina sérica bovina
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CMV	citomegalovírus
DC	células dendríticas
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunoenzimático
GGT	gama glutamiltransferase
HBV	vírus da Hepatite B
HCV	vírus da Hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
HPV	herpes vírus humano
IFN- α	interferon-alfa
IFN- β	interferon-beta
IFN- γ	interferon-gama
IFN- λ	interferon-lambda
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-15	interleucina 15
IRF-3	<i>interferon-regulatory factor 3</i>
ISG	genes estimulados pelo interferon
KIR	receptor de células NK semelhantes às imunoglobulinas
mDC	células dendríticas mielóides
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade de classe II
NK	células <i>natural killer</i>
NK T	células <i>natural killer T</i>
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	reação de polimerização em cadeia
pDC	células dendríticas plasmocitóides
PFA	paraformaldeído
PMN	leucócitos polimorfomuncleares
PRR	receptores para reconhecimento de padrões
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	ácido ribonucléico
TGF- β	fator transformador de crescimento β
Th	células T <i>helper</i>
TLR	receptor <i>toll-like</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral α
Treg	células T reguladoras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modulação da imunidade inata durante a infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV).....	3
Figura 2: Células Dendríticas humanas (DC) mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC).	6
Figura 3: Células Dendríticas humanas (DC) mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC).	8
Figura 4: Propriedades fenotípicas e funcionais das células NK CD56bright, CD56dim e CD56neg.	11
Figura 5: Regulação da resposta imune mediada por células NKs.	12
Figura 6: Estratégia de análise utilizada para determinação da população de DCs totais presentes no CMSP humano e a expressão da molécula CD86.	30
Figura 7: Estratégia de análise utilizada para determinação das populações de NKs presentes no CMSP humano e a expressão das moléculas CD7, CD57, KIR3DL1/DS1 e NKG2A.	31
Figura 8: Comparação da frequência de células dendríticas totais (DCs) e suas subpopulações entre os três grupos de indivíduos.	36
Figura 9: Expressão da molécula CD86 pelas células dendríticas (DCs).	37
Figura 10: Gráfico do teste de correlação da carga viral do HCV com a expressão da molécula CD86 pelas células dendríticas mielóides (mDCs) em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV ($p < 0,005$).	38
Figura 11: Comparação da frequência das três populações de Células Natural Killer (NKs).	39
Figura 12: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor CD7.....	40
Figura 13: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor CD57.	41
Figura 14: Comparação da frequência de células NKs que expressam o receptor NKG2A.	42
Figura 15: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor KIR3DL1/DS1.	43
Figura 16: Comparação da frequência de células NKs que expressam CD107a e produzem IFN γ sob estímulo de IL-12 e IL-18.	44
Figura 17: Comparação da frequência de células NKs que expressam CD107a e produzem IFN γ sob estímulo de K-562.	45
Figura 18: Comparação da frequência de células NKs que expressam CD7, CD57 e CD107a sob estímulo de K-562.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Dados demográficos dos 90 indivíduos participantes do estudo..... 22

Tabela 2-Dados laboratoriais dos 90 indivíduos participantes do estudo. 35

RESUMO

Malta FM. *Perfil de células natural killer e dendríticas em casos de soroconversão espontânea e infecção crônica pelo vírus da Hepatite C* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: O fato do vírus da Hepatite C (HCV) estabelecer uma infecção crônica persistente, na maioria dos casos, mesmo sendo reconhecido e alvejado pelos sistemas imune inato e adaptativo sugere que o mesmo tenha desenvolvido estratégias eficazes para driblar a ação desses sistemas. O HCV interfere na fase inicial de ativação da resposta imune adaptativa alterando a função das células dendríticas (DCs), o que provavelmente leva a uma ativação deficiente das células *natural killer* (NKs) e de linfócitos T. Portanto, a realização de estudos sobre DCs e NKs na infecção pelo HCV se torna de fundamental importância para a compreensão da patogênese e persistência desta infecção. **MÉTODOS:** Foram selecionados indivíduos com resolução espontânea da infecção pelo HCV, indivíduos com infecção crônica e indivíduos saudáveis. A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para a determinação da frequência e do fenótipo de células dendríticas e NKs nesses indivíduos. Além disso, foi avaliada a atividade citotóxica das células NKs sob estímulo de IL-12 e IL-18, e também da linhagem K-562. **RESULTADOS:** A frequência de DC mielóides (mDC) expressando CD86, nos indivíduos crônicos, foi elevada e uma correlação positiva com a carga viral foi observada. Na análise do ensaio funcional foi observado que as populações de células NKs CD7+ CD57+ apresentaram maior expressão da molécula CD107a e baixa produção de IFN γ nos indivíduos com infecção crônica. A constante exposição das células imunes ao IFN- α , induzido durante a infecção pelo HCV, resulta na polarização do fenótipo citotóxico, caracterizado por células NK ativadas com elevado poder de degranulação, mas com deficiente produção de IFN- γ . **CONCLUSÕES:** As frequências das células DCs e NKs eram semelhantes em todos os indivíduos. A expressão da molécula CD86 na superfície das mDCs pode ter sido induzida pela presença do HCV, uma vez que foi observada correlação positiva com a carga viral. Células NK citotóxicas, altamente diferenciadas e incapazes de produzir IFN- γ foram as mais frequentes na infecção crônica pelo HCV. A baixa produção de IFN- γ por parte dessas células é um dos fatores envolvidos na deficiente ativação de uma resposta imune adaptativa capaz de controlar a infecção pelo HCV.

Descritores: Células dendríticas; células Natural Killer; Hepatite C crônica; imunidade inata; citometria de fluxo; Testes de Liberação de Interferon-gama; antígeno CD86.

SUMMARY

Malta FM. *Profile of natural killer and dendritic cells in cases of spontaneous clearance and chronic infection with Hepatitis C virus*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Hepatitis C virus (HCV) develops a chronic persistent infection in most of the cases, even being recognized and targeted by the innate and adaptive immune systems, suggests that the virus have developed effective strategies to circumvent the action of these systems. HCV interferes in the initial activation of the adaptive immune response by altering the function of dendritic cells (DCs), which probably leads to a deficient activation of natural killer cells (NK) and T lymphocytes. Therefore, studies of DCs and NK in HCV infection are very important for understanding the pathogenesis and the persistence of this infection. **METHODS:** We selected subjects with spontaneous resolution of HCV infection, with chronic infection and healthy subjects. Flow Cytometry was used to determine the frequency and phenotype of dendritic cells and NK cells of these individuals. In addition, we evaluated the NK cell cytotoxic activity in response to stimulation of IL-12 and IL-18 and in co-cultivation with the cell line K-562. **RESULTS:** In individuals with chronic infection, the frequency of myeloid (m) DC cells expressing CD86 was elevated and a positive correlation between these cells and viral load was observed. It was observed in chronic infected individuals that NK cells co-expressing CD7 and CD57 showed higher expression of CD107a and low production of IFN gamma. The constant exposure of immune cells to IFN- α induced during HCV infection results in the polarization of cytotoxic phenotype characterized by activated NK cells with high power degranulation, but with impaired production of IFN- γ . **CONCLUSIONS:** The frequency of DCs and NK cells were similar in all individuals. The expression of CD86 molecule on the surface of mDCs may have been induced by the presence of HCV, since a positive correlation was observed with viral load. Cytotoxic NK cells, highly differentiated and unable to produce IFN- γ , were the most frequent in chronic HCV infection. The low production of IFN- γ by these cells is one of the factors involved in the poor activation of an adaptive immune response able to control HCV infection.

Keywords: Dendritic cells; Natural Killer cells; chronic Hepatitis C; innate immunity; flow cytometry; Interferon-gamma release tests; antigen CD86.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Hepatite C

A infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) é a maior causa de Hepatite Crônica, Cirrose Hepática e Carcinoma Hepatocelular em todo o mundo. O HCV é um vírus envelopado com genoma RNA de fita simples positiva, pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. Foram descritos, principalmente, seis genótipos (1-6) e seus diversos subtipos (a, b, c...).^{1, 2} Estima-se que 3% da população mundial, ou seja, 130-170 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HCV, o que demonstra o impacto global dessa infecção.³

Após a infecção aguda, existem basicamente duas trajetórias possíveis: resolução da infecção (clareamento viral) ou persistência da infecção, ambas determinadas por um conjunto complexo de interações vírus-hospedeiro. A maioria dos indivíduos expostos ao HCV (50-85%) desenvolve infecção crônica.⁴

Os resultados dos protocolos terapêuticos baseados na associação do Interferon Peguilado com a Ribavirina são insatisfatórios, particularmente para os indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1, uma vez que a resposta virológica sustentada é obtida somente por aproximadamente 50% dos indivíduos infectados.^{5, 6} Sendo assim, uma grande parte desses indivíduos persistirá com a infecção.

1.2 Sistema imune inato na infecção pelo HCV

O fato do HCV estabelecer uma infecção crônica persistente mesmo sendo reconhecido e alvejado pelos sistemas imune inato e

adaptativo sugere que o mesmo tenha desenvolvido estratégias eficazes para driblar a ação desses sistemas (Figura 1).⁷⁻¹⁰

Anoma Nellore and Jay A. Fishman, *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 369-377

Figura 1: Modulação da imunidade inata durante a infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV). O HCV altera a resposta imune inata em diferentes pontos. Em resposta à infecção pelo HCV. (1) as células natural killer (NKs) produzem Interferon- γ (IFN- γ) para mediar os efeitos antivirais. No entanto, (2) a proteína E2 do HCV liga-se ao receptor CD81 da NK, resultando na redução da liberação de IFN- γ e grânulos citotóxicos. (3) A proteína core do HCV induz o aumento da expressão da molécula MHC I na superfície do hepatócito infectados, impedindo assim a ação da NK contra essa célula. (4) Proteção e clareamento viral tem sido associado com a expressão de KIR2L3 e seu ligante HLA-C1 (em homozigose). (5) As células Dendríticas (DCs) produzem citocinas IL-12 e IL-15 que contribuem no aumento da função das NK e a sobrevivência da mesma. No entanto, o HCV inibe a função das DCs e reduz o número dessas células. (6) O HCV aumenta o número de células T reguladoras (Tregs) no fígado. As células Treg secretam TGF- β e IL-10 para inibir a ação das NKs. (7) Proteínas não-estruturais do HCV (NS3/4a) interrompem as vias de sinalização na célula infectada por interagirem com moléculas adaptadoras da cascata de ativação do interferon tipo I, bloqueando assim sua produção e seus efeitos antivirais. +=ativação, -=inibição.

Na fase inicial, o sistema imune inato detecta e controla a replicação viral bem como induz uma resposta imune adaptativa que atinge um pico máximo em algumas semanas após a infecção. O esforço coordenado entre a resposta imune inata e adaptativa é necessário para eliminar o HCV. O RNA-HCV é reconhecido por duas principais vias: uma envolve o receptor *Toll-like* 3 (TLR3), expresso na superfície dos

hepatócitos; a outra via envolve o *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) presente no citoplasma dos hepatócitos. O envolvimento de qualquer um desses receptores ativa uma cascata de sinais, incluindo o fator *interferon-regulatory factor 3* (IRF-3), que resulta na indução da expressão de Interferon tipo I (IFN I) que uma vez liberado para o meio extracelular liga-se a receptores de superfície ativando a via Jak/STAT, via esta que ativa uma centena de genes estimulados pelo IFN (ISG) resultando no estado antiviral para controle da infecção e da replicação viral.^{11, 12}

Entre as células efectoras da resposta imune inata estão os monócitos, os macrófagos, as células dendríticas (DCs), os leucócitos polimorfonucleares (PMNs), as células *natural killer* (NKs) e *natural killer T* (NKTs).

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) necessárias para a indução de uma forte resposta de linfócitos T vírus-específicos, através da produção de citocinas e expressão de moléculas co-estimuladoras. Já as NKs interagem com as células infectadas, com os linfócitos T e com as DCs, liberando grânulos contendo perforina e granzimas que promovem a destruição da membrana das células-alvo e posterior morte por apoptose.^{13, 14}

1.3 Células Dendríticas (DCs)

As DCs são células apresentadoras de antígenos que compreendem menos de 1% do número total de células do sangue periférico humano e têm importância crucial na interação entre a resposta imune inata e adaptativa. Após o reconhecimento e processamento dos antígenos, as DCs os apresentam aos linfócitos T e

assim a resposta imune começa a ser direcionada para imunidade, memória ou tolerância.^{14, 15} As DCs constituem uma população celular heterogênea localizada em diferentes órgãos e tecidos. No sangue periférico humano estão caracterizadas como duas distintas subpopulações: as mielóides (mDCs) e as plasmocitóides (pDCs). Essas duas subpopulações celulares são definidas de acordo com seu fenótipo, morfologia e características funcionais.¹⁶

As mDCs são APCs, que apresentam aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtos antigênicos degradados e ao mesmo tempo secretam citocinas, como exemplo a interleucina-12 (IL-12), essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficaz. São amplamente caracterizadas fenotipicamente por não apresentarem proteínas de superfície expressas em linfócitos T, monócitos e células NKs (*Lineage Cocktail 1* - *Lin 1* negativas), por expressarem moléculas do MHC classe II (HLA-DR positivas) e CD11c.¹⁷⁻¹⁹

As pDCs têm a capacidade de produzir enormes quantidades de IFN I, principalmente IFN- α , sendo consideradas "células produtoras naturais de IFN". Essas células são caracterizadas por serem *Lin 1* negativas, HLA-DR positivas e CD123 positivas.^{19, 20}

As DCs detectam a presença de patógenos via receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRR) localizados tanto na superfície celular como em compartimentos intracelulares de células da imunidade inata do hospedeiro, por exemplo, o receptor do tipo *Toll-like* (TLR)²¹

Estes receptores ligam-se a motivos conservados conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs), que estão presentes nos

patógenos e não são expressos pelos mamíferos, permitindo assim a detecção de uma variedade de micróbios.²² Já foram identificados aproximadamente 10 TLRs humanos funcionais com especificidades para padrões moleculares presentes em bactérias, fungos, vírus e parasitas.²³

Em humanos, as distintas subpopulações de DCs expressam diferentes TLRs, as mDCs expressam TLR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10, ao passo que as pDCs expressam TLR-1, 6, 7, 9 e 10.^{24, 25} A interação com diferentes ligantes de TLRs induz a maturação das DCs pelo aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40 e CD86), além de induzir a secreção de diferentes citocinas modulando o balanço Th1/Th2 de acordo com as interações microbianas (Figura 2).^{26, 27}

Liu B et al., J Leukoc Biol. 2009 Feb;85(2):205-14

Figura 2: Células Dendríticas humanas (DC) mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC). As DCs expressam diferentes TLR e, consequentemente, respondem a estímulos distintos. A produção de IL-12 pelas mDCs pode ser estimulada por uma grande variedade de patógenos e pode ser aumentada via ligação com CD40 ou por ação do IFN-γ, resultando na ativação da resposta celular Th1. Citocinas como a IL-10 podem regular negativamente a produção de IL-12. Uma vez ativadas, as pDCs produzem grandes quantidades de IFN-α, um potente antiviral.

As populações de DCs desempenham importante papel no controle das infecções virais. Estudos demonstram que pacientes com infecção persistente pelo HCV apresentam redução no número de mDCs e pDCs circulantes, além do aumento da produção de interleucina-10 (IL-10) e produção reduzida de IL-12 e IFN- α por essas células, mostrando um comprometimento funcional dessas duas subpopulações celulares.²⁸⁻³⁰

O aumento da produção de IL-10 durante a infecção pelo HCV pode contribuir para a evolução de uma infecção persistente associada à fraca ativação da resposta de linfócitos T vírus-específicos.²⁸ Já foi demonstrada uma relação inversa entre o curso clínico da Hepatite C aguda e os níveis de IL-10 no plasma, sendo que elevados níveis de IL-10 foram associados ao desenvolvimento de infecção crônica pelo HCV.³¹

A IL-12, importante citocina reguladora, é capaz de promover a resposta imunológica mediada por células (resposta do tipo Th1) que é fundamental para a detecção e eliminação de células infectadas por vírus, bem como, está diretamente correlacionada com a proliferação de linfócitos T CD4⁺ HCV específicos. Estudos prévios relataram produção reduzida de IL-12 em diferentes modelos experimentais.²⁸

Outro estudo sugere potencial importância da interleucina-6 (IL-6) na resposta ao tratamento com IFN em pacientes com Hepatite C. A IL-6 é uma citocina de ação pleiotrópica fundamental na resposta imunológica às infecções. Essa citocina desempenha um importante papel na infecção pelo HCV, bem como na resposta à terapia, pois interage com componentes da via de sinalização do IFN.^{32, 33}

O HCV interfere na fase inicial de ativação da resposta imune adaptativa alterando a função das DCs, o que provavelmente leva a

uma ativação deficiente de linfócitos T. Essa disfunção foi observada em DCs isoladas do sangue periférico de pacientes cronicamente infectados pelo HCV (Figura 3).^{28, 34}

Pachiadakis, I / *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 296–304

Figura 3: Células Dendríticas humanas (DC) mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC). (A) DC imatura (iDC) pode ser ativada via receptor *Toll-like* (TLR) pelo reconhecimento do vírus e/ou ligação da proteína de envelope 2 (E2), vários receptores são expressos na membrana da DC: SRBI (*receptor scavenger* da classe B tipo I), DC-SIGN (molécula de adesão específica das DCs, não-integrina), e CD81. (B) HCV RNA e/ou proteínas virais, em especial, core e não-estrutural 3 (NS3), a interação dessas moléculas com DCs pode inibir a diferenciação e desenvolvimento das DCs “maduras” (mDC). (C) Na infecção crônica pelo HCV, a frequência das DCs em circulação é reduzida e estudos in vitro demonstraram modulação de diversas funções das DCs, facilitando assim a persistência da infecção. IL-2, IL-10, IL-12 = ou interleucina 2, 10 e 12, respectivamente; células NKs = células natural killer.

Além disso, durante a infecção viral, DCs infectadas desempenham um papel importante na ativação de células NKs. A estreita associação entre a resolução da infecção pelo HCV e atividade das células NKs já foi demonstrada.³⁵ Por outro lado, DCs geradas por

indivíduos infectados do HCV são deficientes na indução da expressão de ligantes ativadores de NKs (MIC A e B) em resposta ao IFN- α . O resultado é a reduzida ativação das NKs e consequentemente persistência da infecção e insuficiente resposta ao tratamento com IFN- α .³⁶

Assim, de modo geral, os resultados observados parecem apoiar a hipótese de que a disfunção das DCs desempenha um importante papel no estabelecimento da infecção persistente pelo HCV.

Portanto, a realização de estudos sobre as subpopulações de DCs nas infecções por vírus se torna de fundamental importância para a compreensão da patogênese e do estabelecimento de várias infecções humanas.

1.4 Células *Natural Killer* (NKs)

As células NKs constituem uma população de linfócitos derivados da Medula Óssea, possuem grânulos citoplasmáticos e compõem de 5 a 20% das células mononucleares do sangue periférico e de 30 a 50% dos linfócitos no fígado.^{37, 38}

Em humanos, as NKs são definidas fenotipicamente pela presença do marcador de superfície CD56 e ausência de CD3. Dependendo do nível de expressão de CD56 na superfície, as NKs podem ser divididas em duas principais populações: CD56^{bright} e CD56^{dim}, cada uma com suas propriedades. A maioria das NKs CD56⁺ também expressam o receptor CD16, que confere a capacidade de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo.³⁹

As células CD56^{dim} CD16⁺ compõem aproximadamente 90% das NK circulantes, enquanto as CD56^{bright} e CD56^{neg} CD16⁺ constituem aproximadamente 10%.⁴⁰

Em indivíduos adultos saudáveis de 30% a 60% das células NK CD56^{dim}CD16⁺ expressam a molécula CD57, essa expressão aumenta com a idade. A expressão de CD57 está relacionada à maturidade celular em células T CD8⁺ e em células NK. Lopez-Vergès e colaboradores especulam que as NKs CD57⁺ representam uma população de células com “memória”⁴¹

As NK CD56^{bright} proliferam e produzem interferon (IFN) em resposta à estimulação com a interleucina-12 (IL-12), enquanto as CD56^{dim} são mais citolíticas e produzem quantidades significativas de citocinas via seus receptores de ativação.⁴² As células NK diferenciam-se em CD56^{dim} a partir das células NK CD56^{bright} (Figura 4).⁴³⁻⁴⁵

Além das duas populações de NKs descritas, existe outra população de células NKs, as CD56^{neg} CD16⁺. Embora as células CD56^{neg} existam em indivíduos saudáveis, elas são raras. Em um estudo publicado em 1995 foi relatado o aumento do número de células NKs CD56^{neg} em pacientes com infecção crônica pelo HIV-1.⁴⁶ Desde então, esse achado têm sido confirmado.⁴⁷⁻⁵¹ Recentemente, a expansão de células NKs CD56^{neg} também foi descrita em pacientes com Hepatite C crônica.^{52, 53} Esta expansão parece ocorrer durante a fase crônica da infecção, por exemplo, na infecção pelo HIV-1, durante a fase aguda apresentam o número de células CD56^{neg} no sangue periférico é normal ou discretamente aumentado.⁵⁴

Björkström, N.K. / *Trends in Immunol*, 2010; 31:401-6 (modificado)

Figura 4: Propriedades fenotípicas e funcionais das células NK CD56^{bright}, CD56^{dim} e CD56^{neg}. (a) Representação esquemática da expressão de CD56 e CD16 nas células CD3⁺CD4⁺CD14⁺CD19⁻, em azul são as CD56^{bright}, em vermelho as CD56^{dim} e em verde as CD56^{neg}. (b) Níveis de expressão relativa de receptores inibidores e ativadores na superfície das CD56^{bright} (azuis), CD56^{dim} (vermelhas) e CD56^{neg} (verdes). (c) Representação esquemática das funções das NKs do sangue periférico.

As NKs têm papel central na resposta imune inata contra a infecção viral. Dentre as suas funções primárias, está a lise direta de células alvo, a secreção de Interferon gama (IFN- γ), de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), de Fator Estimulador de Colônia de Monócitos e Granulócitos (GM-CSF), além da interação com as DCs. Também ativam os macrófagos para destruírem os microrganismos fagocitados e produzem citocinas que estimulam a resposta do tipo Th1 gerando condições que levam a uma resposta imune adaptativa antiviral satisfatória. Suas respostas são moduladas e coordenadas pelas citocinas IFN- α , IFN- β , interleucinas 2, 12, 15 e 18.

A função das NKs é regulada por um equilíbrio entre os sinais gerados por seus receptores celulares de ativação e inibição. A integração dos sinais destes receptores determina o estado de ativação

da NK. Quando uma célula NK encontra uma célula saudável, sob circunstâncias normais, sinais inibitórios predominam sobre os sinais ativadores e a NK não é ativada. Por outro lado, quando uma célula infectada é encontrada, sinais ativadores devem predominar para ativar a célula NK a produzir citocinas ou realizar a lise da célula-alvo (Figura 5).⁵⁵⁻⁵⁷

Vivier, E / *NATURE IMMUNOLOGY* 2008; 9 (5): 503-510

Figura 5: Regulação da resposta imune mediada por células NKs. Após estímulo por diversos fatores (por exemplo, IL-15, IFN tipo I, IL-12, IL-18), as células NKs induzem (setas vermelhas) a maturação e ativação das DCs, macrófagos e linfócitos T, através de uma combinação de citocinas e receptores na superfície celular. Contrariamente, as células NKs também podem eliminar (setas azuis) DC imaturas, linfócitos T CD4 + ativados e macrófagos superativados. Estas funções reguladoras são mantidas sob controle pelo reconhecimento de moléculas expressas (por exemplo, moléculas MHC classe I) e por meio de receptores inibitórios (por exemplo, em humanos, KIRs; em ratos, Ly49; e, para ambos, CD94-NKG2A).

55

A identificação dos receptores das células NKs tem contribuído para o entendimento de sua reatividade e especificidade. O reconhecimento das células estranhas ou células próprias alteradas acontece via moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade

de classe I (MHC I) e seus receptores de ativação. Deste modo, as células alteradas ou com ausência de expressão de moléculas de MHC I ficam susceptíveis ao ataque mediado pelas células NKs ao ligarem-se aos seus receptores de ativação.⁵⁸

A atividade citotóxica destas células é regulada por seus receptores inibitórios, os quais reconhecem as moléculas do MHC I, e com isto, previnem a atividade lítica contra as células normais.^{56, 58}

A célula NK é ativada pela perda dos antígenos MHC I nas células-alvo, a partir dessa característica foi formulada a hipótese da “perda do próprio”, que estabelece que a perda da molécula de MHC I remove os ligantes dos receptores inibitórios das células NKs levando ao desencadeamento da função efetora da mesma. De acordo com esta hipótese, os sinais inibitórios e seus ligantes respectivos controlam a função da célula NK. Contudo, ainda não está totalmente esclarecido como os sinais ativadores e inibitórios interagem para regular a função da célula NK.^{56, 59}

Receptores de ativação têm sido identificados, entre eles: os receptores citotóxicos naturais humanos (NKp30, NKp44, NKp46) e os receptores NKG2. Por causa de possíveis consequências da ativação das células NKs, as células normais apresentadoras de antígeno devem ser capazes de rapidamente inibir a ativação das células NKs.^{60, 61} Vários receptores inibitórios são expressos por subtipos de células NKs, incluindo os receptores de imunoglobulinas das células NKs, denominados KIR, que se ligam a HLA-A, B, C e os heterodímeros de *lectin-like* (CD94/NKG2A) que se ligam ao HLA-E. Entre os receptores inibitórios da família NKG2, o NKG2A é o principal.⁶²

A inibição das células NK é fundamental para a manutenção da tolerância aos constituintes próprios. Assim, os genes KIRs que codificam receptores inibidores estão presentes em virtualmente todos os indivíduos. Por outro lado, são conhecidos vários haplótipos que não possuem genes KIRs ativadores.⁶³

Dentre os genes que codificam receptores KIR inibidores, o gene KIR3DL1 possui grande importância na modulação da ativação das células NK e sua frequência é elevada em todas as populações.⁶⁴ O receptor ativador KIR3DS1 também possui frequências elevadas e sua importância na ativação das células NK no combate a infecções já foi verificada em estudos anteriores.^{65, 66}

A investigação do KIR e seus ligantes HLA classe I se tornou mais evidente na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Citomegalovírus (CMV) e Vírus do Papiloma Humano (HPV) devido ao papel chave que as células NKs desempenham nas infecções virais.

Entretanto, até o momento poucos estudos têm associado à infecção pelo Vírus da Hepatite C aos receptores KIRs. Khakoo e colaboradores (2004) relataram que a homozigose para ambos HLA-C e KIR2DL3 estão associadas com a resolução da infecção aguda. A hipótese proposta para explicar este achado é que KIR2DL3 liga-se ao HLA-C com menor afinidade do que os receptores KIR2DL1 e KIR2DL2, e desta forma reduz a inibição da NK favorecendo a resolução da infecção.³⁵

Contudo, outro estudo relatou que a frequência do receptor do HLA-C grupo C 1 (KIR2DL3) foi maior e estatisticamente significativa entre os pacientes com infecção crônica pelo HCV. Para explicar os resultados discordantes, os autores deste estudo relataram vários

fatores, entre eles consideraram o tamanho da amostragem, a diversidade populacional e a rota de infecção.⁶⁷ Consequentemente será necessária a realização de mais estudos para tentar esclarecer o papel das células NKs e do par KIR/ligante no curso e na evolução da Hepatite C.

Tem sido relatada a redução da frequência de células NKs no sangue periférico de pacientes com infecção crônica pelo HCV⁶⁸ e foi associada com baixa expressão de receptores de ativação nas células NKs. Nattermann e colaboradores (2006) relataram uma significativa redução na proporção de células NKs, expressando NKp30 e NKp46, em pacientes com Hepatite C Crônica em comparação com indivíduos saudáveis e indivíduos infectados pelo Vírus da Hepatite B. Também descrevem que pacientes que clarearam o HCV sob terapia antiviral apresentaram expressão normal de NKp30, NKp44 e NKp46.⁶⁹ Em contraste, De Maria e colaboradores (2007) relataram que as células NKs de pacientes infectados com HCV tinham expressão aumentada de NKp30 e NKp46. Portanto, a associação entre a expressão desses receptores nas células NKs e o curso clínico da infecção pelo HCV permanece indefinida.²⁹

Jinushi e colaboradores (2004) relataram que a expressão do receptor inibitório CD94/NKG2A nas células NKs estava aumentada, pacientes com infecção crônica pelo HCV, levando à diminuição da resposta de células NKs contra células hepáticas expressando HLA-E.⁷⁰ Além disso, também mostraram que a regulação negativa de células NKs (por CD94/NKG2A) levou a alteração da modulação das funções de células dendríticas induzida pelas células NKs. Estes resultados sugerem que a expressão aberrante de CD94/NKG2A tem impacto negativo

sobre a imunidade inata e subsequente sobre a imunidade adaptativa em pacientes infectados cronicamente pelo HCV.⁷¹

A interação das células NKs e DCs sugere um papel relevante na iniciação e regulação da resposta imune inata e consequentemente da resposta adaptativa em diversas infecções virais.

Desta forma, o conhecimento sobre a base molecular destas “comunicações” celulares poderá oferecer oportunidades para novas intervenções clínicas.⁷² Assim a compreensão da interação do Vírus da Hepatite C e a defesa imune do hospedeiro, principalmente da resposta imune inata, se faz necessária para melhorar as estratégias terapêuticas já existentes visando assim modular a imunidade para melhor combater esta infecção.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos fenotípicos das subpopulações de células dendríticas e de células *natural killer* de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C com diferentes evoluções clínicas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Células Dendríticas

- Analisar no contexto *ex vivo* a frequência, no sangue periférico, das células dendríticas totais e das suas subpopulações mielóides e plasmocitóides;
- Avaliar a expressão da molécula CD86 nas duas subpopulações de DCs.

2.2.2 Células *Natural Killer*

- Analisar no contexto *ex vivo* a frequência das diferentes populações de NKs (CD56^{bright}, CD56^{dim} e CD56^{neg}) no sangue periférico;
- Avaliar a expressão das moléculas CD7, CD57 e dos receptores de superfície KIR3DL1/DS1 e NKG2A nas três subpopulações de NKs;
- Avaliar a produção de IFN- γ e expressão de CD107a, mediante a presença do estímulo das interleucinas 12 e 18 ou da linhagem celular K562.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Os participantes voluntários incluídos neste estudo foram indivíduos com antecedentes de infecção pelo HCV encaminhados ao ambulatório de Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) que concordaram em participar estando cientes dos riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cappesq HCFMUSP projeto nº 1163/09).

3.2 Casuística

Foram constituídos três grupos, de acordo com os seguintes critérios:

Grupo 1 (n= 30)- Indivíduos com resolução espontânea da infecção pelo HCV (clareamento viral espontâneo) caracterizados por ausência de RNA viral detectável pela técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), simultaneamente à detecção de anticorpos anti-HCV por ensaio imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* (ELISA de 3^a geração), em ao menos dois momentos distintos. Os resultados positivos obtidos no teste ELISA

foram confirmados pelo teste de Imunoblot em tiras (CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SAI, CHIRON, Emeryville, CA, USA).

Grupo 2 (n= 30)- Indivíduos com infecção crônica pelo HCV *genótipo 1* caracterizados por resultado positivo do ELISA e pela detecção de RNA viral por técnica de PCR.

Grupo 3 (n= 30)- Grupo controle formado por indivíduos saudáveis da população geral sem infecção prévia pelo HCV, confirmado por resultado negativo do ELISA.

Os indivíduos com sorologia positiva para HIV e HBV foram excluídos do estudo. A tabela 1 caracteriza os indivíduos selecionados para o presente estudo.

Tabela 1-Dados demográficos dos 90 indivíduos participantes do estudo.

	Grupo 1 (clareamento viral espontâneo)	Grupo 2 (infecção crônica)	Grupo 3 (indivíduos controles)
Número de indivíduos	30	30	30
Idade (anos)*	49 (41-58.25)	47.5 (34.5-53.25)	46 (35.5-52.25)
Feminino (%)	70	63,3	70
Genótipo do HCV	NA	1	NA

*Os dados estão apresentados em mediana e interquartil (25th-75th).

NA, não se aplica;

3.3 Coleta de amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos tratados com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (K3 EDTA) e também em tubos com gel e sem aditivos (BD Vacutainer™). Foram realizados exames laboratoriais e também foram isoladas as células

mononucleares do sangue periférico (CMSP) para as análises das populações de DCs e NKs através da técnica de Citometria de Fluxo.

3.4 Isolamento e congelamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As amostras de sangue total colhidas em tubos contendo K3 EDTA foram diluídas 1:2 em Solução Salina Balanceada *Hank's*-HBSS (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA), aplicadas cuidadosamente sobre gradiente de Ficoll-Paque™ PLUS ($d < 0.12$ EU/ml, Amersham Biosciences), e centrifugadas a $300 \times g$ por 40 minutos a temperatura ambiente (TA) para obtenção da camada de células mononucleares. As células presentes na interface plasma-Ficoll foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com a solução HBSS para a remoção de resíduos de Ficoll.

As hemácias ainda presentes foram lisadas utilizando-se a solução Tampão de Lise ACK (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA) seguida de uma neutralização com meio de cultura R-10, composto por meio RPMI 1640 acrescido de Soro Fetal Bovino, Tampão Hepes 1M, L-Glutamina 200mM, Solução Piruvato 100mM, Penicilina-Estreptomicina, 2-Mercaptoethanol (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA) e novamente centrifugadas por 10 minutos a $330 \times g$ a TA.

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer (Boeco Germany) utilizando o corante Azul de Tripan 0,4% (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA), na diluição 1:10. As células foram ressuspendidas em solução de congelamento, constituída 90% de Soro Fetal Bovino + 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich,

Steinhein, Alemanha). Em seguida foram distribuídas 1×10^7 células/ml em criotubos, armazenadas no freezer -80°C por aproximadamente 24 horas e posteriormente transferidas para o reservatório de nitrogênio líquido, onde permaneceram estocadas até a realização dos experimentos.

3.5 Descongelamento das CMSP criopreservadas

Os criotubos foram transferidos para o banho-maria a 37°C para descongelamento parcial. Foi adicionado ao criotubo 1mL de meio de cultura R-10 acrescido de Dnase I na concentração final de $10\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), em seguida o conteúdo todo foi transferido para um tubo cônico contendo meio de cultura R-10 acrescido de Dnase I para a realização da etapa de lavagem por centrifugação a $330 \times g$ por 10 minutos a TA. Após mais duas etapas de lavagem, as células foram ressuspensas em 3mL de meio R-10 + Dnase I e colocadas na incubadora a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 onde permaneceram por 15 horas.

Após o período de incubação, as células foram contadas em câmara de Neubauer e resuspensas em meio R-10 + Dnase I para obtenção de 1×10^6 células em $100\mu\text{L}$. Após o ajuste da concentração, a suspensão de células foi transferida para uma placa de cultura celular contendo 96 poços para a realização de diferentes ensaios.

3.6 Imunofenotipagem de Superfície das Células Dendríticas (DCs)

A imunofenotipagem de superfície foi realizada para a determinação da frequência de células dendríticas, bem como, para avaliar a expressão da molécula CD86 nas populações mielóide (mDCs) e plasmocitóide (pDCs). Para a realização desse ensaio foram utilizadas 1×10^6 células de cada paciente, as células foram dispostas em placa de cultura com 96 poços de fundo V.

Após a distribuição das células na placa de cultura, a primeira etapa realizada foi a marcação da viabilidade celular utilizando o reagente LIVE/DEAD® *Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Molecular Probes®, Inc. Life Technologies, Carlsbad, CA). A cada poço foram adicionados 45 µL de Tampão MACS, composto por 498 mL de Tampão Salina Fosfatada pH 7.2 (PBS 1x) (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA), 2 mL de EDTA [500mM] e 2,5 g de Albumina Sérica Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 5 µL de uma solução 1:20 do reagente LIVE/DEAD (1 µL LIVE/DEAD + 19 µL de Tampão MACS). Posteriormente, a placa permaneceu por 15 minutos sob incubação a 4°C protegida da luz. Para finalizar esta etapa, foi realizada uma lavagem com adição de 150µL de Tampão MACS e centrifugação a 400 x g por 5 minutos (TA), em seguida foi iniciada a marcação de superfície.

Para isso, as células foram ressuspensas em Tampão MACS, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos e permaneceram 40 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados para a marcação de superfície das DCs foram o coquetel Lin1 (FITC), HLA-DR (APC-Cy7), CD11c (PE-Cy7), CD123 (PE),

CD86 (PerCP) (BD Biosciences, San Jose, CA). O coquetel Lin1 é constituído por uma combinação de anticorpos monoclonais anti proteínas de superfície expressas em linfócitos T e B, monócitos e NK (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56).

Após a etapa de incubação, foram realizadas duas lavagens por centrifugação com Tampão MACS e o processo de marcação foi finalizado com a fixação por adição de Paraformaldeído (PFA) a 1% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Permaneceram armazenadas sob refrigeração até o momento da leitura no Citômetro de Fluxo.

3.7 Imunofenotipagem das Células *Natural Killer* (NKs)

3.7.1 Marcação de moléculas na superfície celular

Foram realizados experimentos para marcação de moléculas de superfície para a determinação da frequência das diferentes populações de células NKs CD56^{bright}, CD56^{dim} e CD56^{neg}, bem como, para avaliar a expressão das moléculas CD7, CD57, KIR3DL1/DS1 e NKG2A nessas populações. Para a realização desse ensaio foram utilizadas 1×10^6 células de cada paciente, as células foram dispostas em uma placa de cultura de 96 poços.

Após a distribuição das células na placa de cultura com 96 poços de fundo V, a primeira etapa realizada foi a marcação da viabilidade celular utilizando o reagente LIVE/DEAD®, conforme metodologia descrita na imunofenotipagem de células dendríticas.

Os anticorpos utilizados para a marcação de superfície das NKs: CD57 (FITC), CD3, CD14, CD19 (PE TXRD), CD16 (APC-Cy7), CD56 (PE-Cy7), CD7 (Alexa Fluor 700), KIR3DL1/DS1 (PE) e NKG2A (APC).

3.7.2 Marcação de moléculas intracelulares (ensaio funcional)

O ensaio funcional foi realizado para a avaliação da produção de IFN γ e a expressão da molécula CD107a que é uma proteína associada à membrana dos lisossomos, que marca a liberação de perforina e granzima, é um marcador de degranulação.

Para a avaliação da atividade citotóxica das células NKs e produção de IFN γ , 1×10^6 células permaneceram sob incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO $_2$ com meio R-10 acrescido dos estímulos IL-12 e IL-18 ou K-562 na razão de 10:1 (NK:K-562), do anticorpo anti-CD107a, de Brefeldina A e monensina por um período de 6 horas.

Após finalizar o período da incubação foi realizada a marcação da viabilidade celular utilizando o reagente LIVE/DEAD®, conforme metodologia anteriormente descrita. Posterior a esta marcação de viabilidade, as células foram ressuspendidas em Tampão MACS para adição dos anticorpos monoclonais para a marcação de moléculas de superfície, permaneceram 40 minutos a 4°C ao abrigo da luz.

Os anticorpos utilizados na marcação de superfície deste ensaio foram: CD57 (FITC), CD3, CD14, CD19 (PE TXRD), CD16 (Pacific Blue), CD56 (PE-Cy7), CD7 (Alexa Fluor 700), CD107a (APC), IFN γ (PE) e CD8 (APC-Cy7) (BD Biosciences, San Jose, CA).

Ao final da incubação, foram realizadas duas lavagens por centrifugação com Tampão MACS. O processo de marcação de superfície foi finalizado com a adição da solução *FACS Lysing Solution 1X* (BD Biosciences™, San Jose, CA) e incubação por 10 minutos protegido da luz a TA. Após essa incubação, foi realizada uma lavagem com Tampão MACS e adição da solução permeabilizante *1X FACS Perm* (BD

Biosciences™, San Jose, CA), que permaneceu por 10 minutos protegida da luz a TA, essa etapa deixou a célula pronta para receber os anticorpos da marcação intracelular. Ao término da incubação com *FACS Perm*, foram realizadas duas lavagens com Tampão MACS.

Em seguida, foi realizada a marcação intracelular com o anticorpo anti-IFN γ . Após a adição do anticorpo, as células permaneceram 1 hora a 4°C ao abrigo da luz. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com Tampão MACS e fixadas com PFA a 1%. Permaneceram armazenadas sob refrigeração até o momento da leitura no Citômetro de Fluxo.

3.8 Leitura no Citômetro de Fluxo

Antes de cada leitura, foi realizada uma verificação das condições ópticas e eletrônicas do equipamento utilizando o reagente *Cytometer Setup and Tracking* (CST, BD Biosciences™, San Jose, CA). A aquisição das amostras foi realizada no equipamento Citômetro de Fluxo LSR II – Fortessa™ utilizando o programa FACS-Diva™ versão 6.13 (BD Biosciences™, San Jose, CA).

Foram empregadas no procedimento de compensação microesferas *Beads Anti-mouse IgG* (BD Biosciences™, San Jose, CA) marcadas com cada fluorocromo separadamente. A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo 9.2 (FlowJo Software, Tree Star™, Ashland, OR).

3.9 Estratégia de Análise

A estratégia de análise dos diferentes experimentos incluiu primeiramente a seleção da população de células que passaram sozinhas pelo feixe do laser, chamadas de *singlets*, para isso foram utilizados os parâmetros de dispersão frontal, *Forward Scatter Height* (FSC-H, eixo y) vs *Forward Scatter Area* (FSC-A, eixo x). Dessa maneira, foi possível excluir possíveis grumos de células, chamados *doublets* e a partir dessa seleção, foram iniciadas as estratégias específicas para cada população celular de interesse (DCs e NKs).

3.9.1 Células Dendríticas (DCs)

A partir da seleção dos *singlets*, o próximo passo foi selecionar uma janela ampla de análise denominada *gate* que contemplou as populações de linfócitos e monócitos, os parâmetros utilizados para tal seleção foram *Side Scatter Area* (SSC-A) (eixo y) vs *FSC-A* (eixo x) (Figura 6A). A partir da seleção dos linfócitos e monócitos foi verificada a viabilidade dessas células utilizando um histograma com número de células (eixo y) vs LIVE/DEAD® (eixo x). As células vivas são as fracamente marcadas em sua superfície, representadas pela população de células deslocada para o lado esquerdo no eixo x do histograma. Vale ressaltar que todos os dados gerados e analisados neste estudo foram baseados apenas nas informações da população de células vivas (Figura 6B).

Figura 6: Estratégia de análise utilizada para determinação da população de DCs totais presentes no CMSP humano e a expressão da molécula CD86. A: Gráfico de tamanho (FSC) vs granularidade (SSC) para a determinação das populações de linfócitos e monócitos. B: Seleção das células vivas; C: Caracterização das DCs totais pelo fenótipo coquetel *Lin1* negativas e HLA-DR positivas. D: Identificação das populações plasmocitóides (CD123⁺) e mielóides (CD11c⁺), respectivamente. E e F: Histograma da expressão da molécula CD86 nas subpopulações plasmocitóide (pDCs) e na mielóide (mDCs) utilizando FMO.

A partir da seleção das células vivas foram identificadas as células dendríticas utilizando os parâmetros coquetel *Lin1* (eixo x) vs HLA-DR (eixo y), a população de DCs totais foi definida como células *Lin1* negativas e HLA-DR positivas (Figura 6C). Uma vez identificada a população das células DCs totais, seguiu-se à identificação das duas subpopulações de células dendríticas, mielóides e plasmocitóides com base na presença ou ausência de expressão do CD11c (eixo x) e CD123 (eixo y), respectivamente (Figura 6D). Posteriormente, foi avaliada a expressão da molécula CD86 (marcador de ativação e maturação) nessas duas subpopulações (Figuras 6E e F). A expressão da molécula CD86 foi analisada com base na metodologia *Fluorescence minus one* (FMO) em um poço foram colocados todos os anticorpos monoclonais do painel exceto o anti-CD86.

3.9.2 Células *Natural Killer* (NKs)

A partir da seleção dos *singlets*, os parâmetros FSC-A (eixo x) vs SSC-A (eixo y) foram utilizados para selecionar a população de linfócitos (Figura 7A).

Figura 7: Estratégia de análise utilizada para determinação das populações de NKs presentes no CMSP humano e a expressão das moléculas CD7, CD57, KIR3DL1/DS1 e NKG2A. A: Gráfico de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) para a determinação da população de linfócitos. B: Gráfico para determinar a viabilidade celular; C: Exclusão das células positivas para as moléculas CD3, CD14 e CD19. D: Identificação das 3 populações de NKs baseada na intensidade de expressão de CD16 e CD56. E a H: Identificação das NKs que expressam as moléculas CD7, CD57, KIR3DL1/DS1 e NKG2A, respectivamente.

A partir da população de linfócitos foi verificada a viabilidade celular utilizando os parâmetros LIVE/DEAD®(eixo x) vs SSC-A (eixo y). As células vivas são as fracamente marcadas em sua superfície, representadas pela população de células deslocada para o lado esquerdo no eixo x (Figura 7B). O passo seguinte foi excluir as células CD3⁺ CD14⁺ e CD19⁺ (linfócitos T totais, monócitos e linfócitos B) (Figura 7C). As células NKs são classicamente definidas como linfócitos CD3⁻

CD56⁺ e são subdivididas em células NKs CD56^{bright}, CD56^{dim} e CD56^{neg} (Figura 7D).

Posterior à identificação das três populações das NKs foi avaliada a expressão das moléculas CD7, CD57, NKG2A e KIR3DL1/DS1 (Figura 7E a H). Para a determinação das frequências de células expressando ou não essas moléculas, foi utilizada a ferramenta do programa de análise FlowJo conhecida como *boolean gate*, essa ferramenta é muito utilizada na Técnica de Citometria de Fluxo multiparamétrica e permite a análise de todas as combinações possíveis entre os parâmetros avaliados.

Milush e colaboradores⁷³ descrevem que a combinação de CD7 e CD56 melhora muito a capacidade de distinguir células NK, uma vez que a co-expressão de CD7 e CD56 permite discriminar células NK CD56⁺ de células mielóides CD56⁺, as quais não expressam CD7. A molécula CD7 é expressa de forma homogênea pelas células NKs e não parece ter sua expressão reduzida após a ativação.

Para a análise do ensaio funcional das NKs foram seguidos os mesmos passos da imunofenotipagem de superfície citados anteriormente, entretanto foram avaliadas as expressões das seguintes moléculas CD7, CD57, CD8, CD107a e IFN γ . Nessa análise também foi utilizada a ferramenta *boolean gate* que permitiu avaliar todas as combinações possíveis desses marcadores, permitindo a análise dos diferentes perfis de células com base na expressão ou não dessas cinco moléculas.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 5* (versão 5.04, *GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). As análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis e os resultados estão apresentados em forma gráfica para melhor interpretação das informações mais relevantes. Para a análise dos dados gerados nos ensaios de citometria foram feitas comparações entre os três grupos utilizando o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste *Dunn*, considerando o valor de $p < 0,05$ para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Exames laboratoriais

Os seguintes exames foram realizados: dosagem sérica de enzimas hepáticas (ALT- Alanina Aminotransferase, AST- Aspartato Aminotransferase e GGT- Gama Glutamiltransferase), PCR qualitativo e quantitativo para RNA-HCV; os resultados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2-Dados laboratoriais dos 90 indivíduos participantes do estudo.

	Grupo 1 (clareamento viral espontâneo)	Grupo 2 (infecção crônica)	Grupo 3 (indivíduos controles)
Dosagens			
ALT (U/L)	20.5 (14.75-28.0)	50.0 (34.75-63.5) ***	18.5 (15.75-57.0)
AST (U/L)	21.0 (19.5-24.0)	40.0 (29.0-53.75) ***	20.0 (16.25-24.0)
GGT (U/L)	26.5 (17.75-36.0)	51.5 (28.75-78.5) **	20.0 (15.5-30.0)
RNA HCV (log ₁₀ UI/mL)	ND	6.02 (5.68-6.81)	ND

Os dados estão apresentados em valores de mediana e interquartil (25th-75th).

ND, não detectado. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$

As amostras dos indivíduos com clareamento viral espontâneo além de terem sido testadas utilizando-se a técnica de ELISA para buscar anticorpos contra o HCV, também foram submetidas ao teste Immunoblot em tiras (CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SAI) para a confirmação, uma vez que esses pacientes não apresentam viremia (RNA HCV não detectável). O resultado do teste immunoblot dos indivíduos selecionados no Grupo 1 foi positivo, confirmando o teste de ELISA.

4.2 Frequência de Células Dendríticas (DCs)

As frequências de células dendríticas totais (DCs) e também de suas subpopulações: mielóides (mDCs) e plasmocitóides (pDCs) foram obtidas por imunofenotipagem de superfície realizada nas amostras dos 90 indivíduos participantes deste estudo. As porcentagens das DCs totais e de suas subpopulações praticamente não diferiram entre os 3 grupos (Figuras 8A, 8B e 8C, respectivamente).

Figura 8: Comparação da frequência de células dendríticas totais (DCs) e suas subpopulações entre os três grupos de indivíduos. (A) Gráfico da população de células dendríticas totais; (B) Gráfico da subpopulação mielóide; (C) Gráfico da subpopulação plasmocitóide. G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos sem infecção pelo HCV. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

4.3 Expressão da molécula CD86 pelas Células Dendríticas (DCs)

A expressão da molécula CD86 na superfície das DCs foi determinada descontando-se os valores de fluorescência obtidos na leitura da amostra marcada com o painel sem o anticorpo anti-CD86 (*FMO*) dos valores obtidos na leitura da amostra marcada com o painel completo de anticorpos (Figura 9A).

Figura 9: Expressão da molécula CD86 pelas células dendríticas (DCs). (A) Histograma da expressão de CD86 nas subpopulações mielóides e plasmocitóides, respectivamente, utilizando a estratégia de FMO; (B) Gráfico de células dendríticas mielóides que expressam CD86; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles. A linha horizontal indica a mediana ($p<0,005$).

Nessa análise foi observado que nos indivíduos com infecção crônica as células dendríticas mielóides (mDCs) que expressam CD86 apresentaram frequência superior a 60% e quando comparada à frequência do grupo controle foi estatisticamente significativa (Figura 9B). Em relação à subpopulação de células plasmocitóides (pDCs) foi observado um perfil de expressão da molécula CD86 semelhante nos três grupos de indivíduos estudados (Figura 9C).

A partir da observação de que as mDCs apresentaram maior expressão da molécula CD86 nos indivíduos com infecção crônica, foi realizado o teste de correlação de *Pearson* para testar se a frequência dessas células estaria correlacionada com a carga viral do HCV (HCV-RNA), e o resultado desse teste foi a observação de uma correlação positiva ($r=0.4121$) entre essas duas variáveis (Figura 10).

Figura 10: Gráfico do teste de correlação da carga viral do HCV com a expressão da molécula CD86 pelas células dendríticas mielóides (mDCs) em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV ($p<0,005$).

4.4 Frequência de Células *Natural Killer* (NKs)

As frequências das populações CD56^{bright}, CD56^{dim} e CD56^{neg} de células NKs dos 90 indivíduos participantes do presente estudo foram determinadas por imunofenotipagem de superfície. Nesta análise observou-se que as populações de células CD56^{bright} e CD56^{neg} apresentaram frequência inferior a 5% (Figura 11A e C) enquanto a população CD56^{dim} foi a mais frequente, com mediana acima de 50% nos três grupos (Figura 11B). Além disso, nos indivíduos crônicos verificou-se maior frequência da população CD56^{bright} comparada ao do grupo de indivíduos com resolução espontânea e essa diferença foi estatisticamente significativa.

Figura 11: Comparação da frequência das três populações de Células Natural Killer (NKs). (A) Porcentagem de células CD56^{bright}; (B) Porcentagem de células CD56^{dim}; (C) Porcentagem de células CD56^{neg}; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controle saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

4.5 Expressão das moléculas CD7, CD57, NKG2A e KIR3DL1/DS1 pelas NKs

Na avaliação da expressão do receptor CD7 (Figura 12), as três populações de células NK apresentaram elevada expressão dessa molécula, com destaque para a população $CD56^{dim}$ que apresentou medianas superiores a 90% (Figura 12B). Além disso, nas populações de células $CD56^{dim}$ e $CD56^{neg}$ foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação das frequências entre os indivíduos com infecção crônica e os controles (Figuras 12B e C).

Figura 12: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor CD7. (A) Porcentagem de células $CD56^{bright}$; (B) Porcentagem de células $CD56^{dim}$; (C) Porcentagem de células $CD56^{neg}$; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

A expressão da molécula CD57 foi baixa na população de células CD56^{bright}, menos de 5% (Figura 13A). Entretanto, nas populações CD56^{dim} e CD56^{neg} a expressão de CD57 foi observada em aproximadamente 60% e 40% das células, respectivamente (Figuras 13B e C). Destaque para a população CD56^{dim} dos indivíduos com infecção crônica cuja comparação de frequências com os controles foi estatisticamente significativa (Figura 13B).

Figura 13: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor CD57. (A) Porcentagem de células CD56^{bright}; (B) Porcentagem de células CD56^{dim}; (C) Porcentagem de células CD56^{neg}; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p<0,005$).

Na avaliação da expressão do receptor NKG2A, praticamente não foi observada expressão desse receptor na superfície das células CD56^{bright} (Figura 14A). Entretanto, as populações CD56^{dim} e CD56^{neg} dos indivíduos com clareamento viral espontâneo apresentaram medianas próximas a 20% (Figura 14B e C).

Figura 14: Comparação da frequência de células NKs que expressam o receptor NKG2A. (A) Porcentagem de células CD56^{bright}; (B) Porcentagem de células CD56^{dim}; (C) Porcentagem de células CD56^{neg}; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

Em relação ao receptor KIR3DL1/DS1, foi observada baixa expressão pela população CD56^{bright} (Figura 15A), já nas populações CD56^{bright} e CD56^{neg} as medianas dos 3 grupos ficaram próximas de 10% e 5%, respectivamente (Figuras 15B e C).

Figura 15: Comparação da frequência de Células NKs que expressam o receptor KIR3DL1/DS1. (A) Porcentagem de células CD56^{bright}; (B) Porcentagem de células CD56^{dim}; (C) Porcentagem de células CD56^{neg}; G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

4.6 Citotoxicidade e produção de IFN γ pelas NKs

Para determinar a funcionalidade das células NKs quanto a sua capacidade de degranular e produzir citocinas, foram realizados ensaios funcionais nos quais as células (CMSP) dos indivíduos estudados foram incubadas com os estímulos IL-12 e IL-18 ou co-cultivadas com a linhagem celular K-562 para posterior avaliação da expressão da molécula CD107a (superfície) e da produção de IFN γ (intracelular).

Na análise do ensaio funcional utilizando como estímulo a IL-12 e IL-18 foi observado que a população de células CD56^{bright} apresentou a maior expressão da molécula CD107a e a maior produção de IFN γ (intracelular) quando comparada as populações CD56^{dim} e CD56^{neg} (Figuras 16A e B, respectivamente), isso foi observado nos 3 grupos.

Figura 16: Comparação da frequência de células NKs que expressam CD107a e produzem IFN γ sob estímulo de IL-12 e IL-18. (A) Expressão de CD107a; (B) Produção de IFN γ . G1: indivíduos com clearance viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana (p<0,005).

No ensaio funcional utilizando a linhagem celular K-562 como estímulo, foi observado que a população de células $CD56^{\text{bright}}$ apresentou maior expressão da molécula $CD107a$, assim como no experimento anterior. Entretanto, com estímulo de K-562, as células $CD56^{\text{dim}}$ e $CD56^{\text{neg}}$ também expressaram $CD107a$, aproximadamente 5% (Figura 17A). Já em relação à produção de $IFN\gamma$, as três populações de células NK apresentaram baixa produção dessa citocina (Figura 17B), diferente do que foi observado no experimento com IL-12 e IL-18.

Figura 17: Comparação da frequência de células NKs que expressam $CD107a$ e produzem $IFN\gamma$ sob estímulo de K-562. (A) Expressão de $CD107a$; (B) Produção de $IFN\gamma$. G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

Na análise dos ensaios funcionais utilizando a ferramenta *boolean gate*, com a qual é possível avaliar a co-expressão de moléculas em uma célula, foi possível observar que os indivíduos crônicos apresentaram maior frequência de uma população de células NK com perfil mais diferenciado (CD57⁺) e citotóxico (CD107a⁺).

No ensaio com estímulo de IL-12 e IL-18 esse perfil foi observado somente na população de células CD56^{bright} ($p=0,006$; dado não mostrado). Enquanto no ensaio com estímulo de K-562 essa característica foi encontrada nas 3 populações de células NKs, e quando as frequências foram comparadas às do grupo controle a diferença foi estatisticamente significativa (Figura 18).

Figura 18: Comparação da frequência de células NKs que expressam CD7, CD57 e CD107a sob estímulo de K-562. (A) Porcentagem de células CD56^{bright}; (B) Porcentagem de células CD56^{dim}; (C) Porcentagem de células CD56^{neg}. G1: indivíduos com clareamento viral espontâneo; G2: indivíduos com infecção crônica pelo HCV; G3: indivíduos controles saudáveis. A linha horizontal indica a mediana ($p < 0,005$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a frequência e o fenótipo de células dendríticas (DCs) e *natural killer* (NKs) em uma coorte composta por indivíduos infectados pelo HCV que evoluíram para infecção persistente ou para resolução espontânea da infecção, e também por indivíduos não infectados pelo HCV.

DCs são reguladoras-chave do sistema imunológico, essas células fazem a ponte entre os sistemas inato e adaptativo e desempenham um papel insubstituível na defesa imunológica contra infecções virais. Apesar de extensa investigação, não há um consenso geral sobre os efeitos do HCV sobre as DCs e a evolução clínica da infecção.

Em pacientes com infecção crônica, alguns estudos observaram defeitos funcionais das DCs^{74, 75}, enquanto outros claramente demonstraram que a função das DCs estava preservada.^{76, 77} Ryan e O'Farrelly⁷⁸ revisaram diversos estudos que avaliaram o efeito do HCV sobre a função das DCs e publicaram os principais achados. A conclusão principal foi de que nenhum distúrbio específico dessas células foi encontrado nos pacientes avaliados.

DCs são células apresentadoras de antígenos especializadas que precisam ser ativadas a fim de estimular eficientemente células T e induzir sua diferenciação.^{14, 23} A maturação de DCs é essencial para a ativação da resposta imune adaptativa. Sabe-se que o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, como por exemplo, a molécula CD86, é uma etapa crucial na maturação das DCs.⁷⁹

No presente estudo, as frequências de DCs e suas subpopulações foram avaliadas, e não foi observada diferença nas frequências dessas células entre todos os indivíduos avaliados. Vale ressaltar que os indivíduos estudados foram pareados por sexo e idade, e todos os pacientes crônicos estavam infectados pelo HCV genótipo 1.

Além disso, observou-se que o HCV não apresentou efeito inibitório sobre a maturação das células dendríticas mielóides (mDCs), uma vez que nos indivíduos cronicamente infectados houve um aumento da expressão de CD86 pelas mDCs, que pode ter sido induzido pela viremia, pois foi observada uma correlação positiva entre essas duas variáveis.

A regulação da maturação e da migração DCs é feita por meio de sinalizações intracelulares. O HCV pode ativar ou bloquear essas vias de sinalização e assim alterar a função das DCs, esse é um de seus mecanismos de evasão ao sistema imune.^{16, 76, 80}

Em relação às células dendríticas plasmocitóides (pDCs) circulantes, em nosso estudo, foi observado um fenótipo imaturo caracterizado pela baixa expressão da molécula CD86 na superfície dessas células, mais estudos são necessários para podermos descrever melhor o perfil encontrado, como por exemplo a realização de ensaios funcionais.

As pDCs são especializadas na produção de grandes quantidades de interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β) e menor quantidade do interferon do tipo III (IFN- λ) durante uma infecção viral.⁷⁵ Em particular, o IFN- λ (IL-28B) pode desempenhar um papel central na resposta antiviral contra o HCV. Recentemente foram descritos polimorfismos no gene da IL-28B (rs12979860 e rs8099917) associados ao sucesso da

terapia antiviral e também à resolução espontânea da infecção pelo HCV.⁸¹⁻⁸⁴ Contudo, os mecanismos que explicam como esses polimorfismos afetam as respostas antivirais do hospedeiro permanecem evasivos.

Os resultados obtidos em diferentes estudos sustentam a hipótese de que a disfunção das DCs leva ao estabelecimento da infecção persistente pelo HCV. Durante a infecção viral, as DCs desempenham diversas funções importantes, entre elas a ativação de células NKs, e a estreita associação entre a resolução da infecção pelo HCV e atividade das células NKs já foi demonstrada.³⁵

A célula NK é componente importante da imunidade inata, atua no controle de infecções virais, quer através da citotoxicidade direta ou pela produção de citocinas imunomoduladoras, em particular IFN- γ e TNF- α , que modulam a imunidade adaptativa e inibem diretamente a replicação viral.⁸⁵ Estas funções são aparentemente mediadas por diferentes subpopulações de NKs, a citotoxicidade geralmente está associada às células NK CD56^{dim}, que representam a maior população de células NK do sangue periférico, enquanto as células NK CD56^{bright} são responsáveis pela secreção de citocinas.⁸⁶

No presente estudo, a técnica de citometria de fluxo multiparamétrica foi utilizada para analisar características fenotípicas e funcionais das populações de células NKs na infecção pelo HCV. A distribuição de células NK entre os grupos foi praticamente a mesma, com exceção da maior frequência de células CD56^{bright} observada no grupo dos indivíduos crônicos comparada ao grupo de soroconversão espontânea, apesar disso, a frequência dessas células parece não ter determinado o curso da infecção.

A falta de um marcador específico para diferenciação de células NKs, bem como a potencial sobreposição de suas características fenotípicas e funcionais com outras células do sistema imune, dificultam a completa distinção entre NKs e células mielóides, particularmente as DCs.

Com o objetivo de melhorar a identificação das NKs, no presente estudo, foi utilizado o marcador CD7. Autores de um estudo recente⁸⁷ descrevem o uso do marcador CD7 para discriminar as células NKs CD56+ dos monócitos CD56+. O CD7 é uma proteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Embora ela seja expressa em estágios iniciais de desenvolvimento tanto da linhagem linfóide como da mielóide⁸⁸, no sangue periférico, o CD7 está restrito às células T e as células NK.^{89, 90} Por fim, a conclusão foi que a combinação de CD7 e CD56 é a melhor opção para a identificação de células NK permitindo o estudo refinado de seu fenótipo e função.

No presente estudo, as porcentagens de células NKs que expressam CD7 foram comparadas entre os grupos e foi observada variação significativa das populações CD56^{dim} e CD56^{neg}. Os indivíduos com infecção crônica apresentaram menor frequência dessas células em relação ao grupo de indivíduos controles. No entanto, essa observação não é suficiente para sugerir que essa diferença tenha influenciado a persistência da infecção.

Diferentes estudos avaliaram a expressão de CD57 nas células NK humanas.⁹¹⁻⁹⁶ A partir da observação de que as células NKs fetais não expressam CD57 e que sua expressão aumenta com a idade, a expressão de CD57 na superfície celular foi associada com reduzida capacidade proliferativa e pode definir uma subpopulação de células NK

altamente diferenciadas, caracterizando o estado de senescência celular.⁹⁷⁻⁹⁹

Nossos resultados mostram que a expressão de CD57 foi mais frequente na superfície das células NK CD56^{dim} e CD56^{neg} dos indivíduos com infecção crônica, o que pode reforçar a ideia de que a infecção viral induz a expressão de CD57 na superfície celular, refletindo diferenciação e expansão dessa população de células. Na infecção pelo HIV-1, já foi proposto que a molécula CD57 caracteriza não apenas senescência, mas pode ser visto como um marcador de diferenciação terminal de células NK (maturação), e sua expressão coincide com o aumento da expressão de KIR, produção de granzima B e diminuição da capacidade proliferativa dessas células.^{41, 94, 100-102} Portanto, identificamos que na infecção crônica pelo HCV, assim como para o HIV, as células NKs apresentam um perfil mais diferenciado direcionado para a citotoxicidade celular.

A função das células NKs é controlada por sinais complexos que envolvem receptores ativadores e inibidores. Rehmann e colaboradores¹⁰³ demonstraram que a expressão de NKG2A, na superfície das NKs, atinge seu ápice cerca de 6 semanas após a exposição ao HCV, e tende a diminuir após 24 semanas naqueles indivíduos que resolvem a infecção espontaneamente. Esse mesmo grupo reporta elevada expressão de NKG2A na infecção crônica pelo HCV, principalmente na superfície de células NK CD56^{dim}.¹⁰⁴ Outro grupo de pesquisadores associaram a elevada expressão do receptor inibidor NKG2A à falha terapêutica, esse achado sugere que a ativação da célula NK tem papel importante na determinação do curso da infecção pelo HCV.^{101, 102}

Avaliamos a expressão do receptor NKG2A na superfície de células NKs, e os nossos resultados foram parcialmente contrários aos reportados na literatura, praticamente não observamos expressão desse receptor nas populações de células NKs CD56^{bright}. Já as populações de NKs CD56^{dim} e CD56^{neg} apresentaram expressão desse receptor, diferente do que foi descrito, os indivíduos com resolução espontânea apresentaram maior mediana de expressão de NKG2A, entretanto na comparação com os outros grupos essa diferença não foi significativa, ou seja, não pudemos associar a expressão com um determinado perfil de evolução clínica da Hepatite C. Vale ressaltar que todos os indivíduos cronicamente infectados eram virgens de tratamento, portanto não foi possível avaliar a influência da expressão de NKG2A na resposta à terapia.

A redução da expressão do receptor NKG2A em células NK foi descrita como consequência do processo de diferenciação dessas células. Björkstrom e colaboradores (2010)¹⁰⁰ sugerem um modelo de diferenciação de células NK, em que as células CD56^{bright} são as precursoras das células CD56^{dim} e CD56^{neg}, essa diferenciação é caracterizada pela perda gradual da expressão de NKG2A concomitante com a aquisição da molécula CD16, de receptores KIRs (inibidores) e de CD57 em sua superfície. Sendo assim, a expressão de NKG2A precede a expressão de KIRs, além disso, a aquisição de receptores KIRs está associada à perda de NKG2A. Essa diferenciação promove a mudança de um perfil imunomodulador e proliferativo para um perfil de citotoxicidade.

Os fatores que regulam a expressão de receptores KIRs no desenvolvimento das células NKs permanecem indefinidos. A avaliação

da expressão do KIR3DL1/DS1 foi realizada no presente estudo. Esse receptor está envolvido na citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) exercida pelas NKs. As populações de células CD56^{dim} e CD56^{neg} apresentaram maior expressão desse receptor em relação às CD56^{bright}, entretanto essa expressão não foi restrita a um determinado grupo de indivíduos. Esse resultado corrobora achados de outros estudos que mostram a aquisição de receptores KIR associada à maturação de células NKs e citotoxicidade.^{65, 66}

Além das análises da imunofenotipagem de superfície, nosso estudo mostra resultados de experimentos funcionais utilizando como estímulo: IL-12 e IL-18 e a linhagem celular K-562. Foram selecionadas duas moléculas para medir a atividade efetora das células NK: IFN- γ e CD107a.

A expressão de IFN- γ é uma medida geral do estado efetor das NKs. Já a molécula CD107a, proteína associada à membrana dos lisossomos (LAMP), marca a presença de vesículas que se fundiram com a membrana plasmática, liberando moléculas efetoras como perforina e granzima, o que reflete a atividade citotóxica dessas células.

A estimulação das células utilizando as citocinas IL-12 e IL-18 resultou na produção de IFN- γ e na expressão de CD107a principalmente pelas NK CD56^{bright}, comparativamente, a frequência dessas células foi bem maior do que as de CD56^{dim} e CD56^{neg}. Uma explicação para essa observação, é que as citocinas IL-12 e IL-18 atuam preferencialmente em células NK imaturas, uma vez que ao longo do processo de maturação ocorre redução da expressão de receptores de IL-12 e de IL-18 na superfície celular. Dessa maneira ao estimular células

NK com essas citocinas resultará na estimulação preferencial ou até exclusiva de células CD56^{bright}.^{41, 100, 105}

Utilizando a linhagem celular K-562 para estimular as células, foi observado principalmente a expressão de CD107a e uma discreta expressão de IFN- γ . Além disso, nos dois experimentos funcionais realizados, os três grupos apresentaram o mesmo perfil de expressão, ou seja, foi indiferente ter ou não ter viremia detectável do HCV.

Na avaliação dos dados gerados usando a ferramenta *boolean gate* do *Flow Jo*, ou seja, a co-expressão dos marcadores CD7, CD57 e CD107a, o grupo cronicamente infectado pelo HCV se destacou em relação ao grupo controle quanto à frequência de células com perfil citotóxico, estágio avançado de diferenciação e deficiente em produzir IFN- γ . Esse achado sugere a participação do HCV, direta ou indiretamente, na diferenciação desse perfil celular.

Ahlenstiel e colaboradores¹⁰⁴ descreveram esse fenômeno como polarização para citotoxicidade em células NK. Na infecção pelo HCV, os hepatócitos e as células dendríticas plasmocitóides são as principais fontes de IFN- α (IFN tipo I). O HCV induz a produção de IFN tipo I dias após a infecção, mas consegue subverter sua ação anti-viral. Contudo, durante toda a infecção, os níveis de expressão dos genes regulados pelo interferon permanecem elevados, mas isso não é suficiente para resolver a infecção. Como resultado, a constante exposição das células imunes ao IFN- α , resulta na polarização do fenótipo citotóxico, caracterizado por células NK ativadas com elevado poder de degranulação, mas com deficiente produção de IFN- γ . O resultado é a persistência viral e uma inflamação contínua no fígado.^{106, 107}

Em resumo, o vírus da Hepatite C é um exemplo de patógeno muito bem sucedido no estabelecimento de infecção persistente, pois possui diferentes estratégias para evadir ao sistema imune do hospedeiro. Nos últimos anos foram publicados diversos artigos sobre mecanismos imunológicos envolvidos tanto na eliminação da infecção aguda, bem como na persistência da infecção pelo HCV. A expansão das pesquisas sobre os distintos papéis das células do sistema imune nas diferentes fases dessa infecção é necessária. Em particular, é importante compreender em mais detalhes a regulação da atividade de células DCs e NKs durante a infecção aguda e também na crônica, o que poderá ajudar a otimizar e a diversificar as estratégias de tratamento beneficiando a grande maioria dos indivíduos portadores deste vírus.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ As frequências de células dendríticas e *natural killer* não foram alteradas na infecção pelo HCV, indicando que a frequência dessas células não teve um papel determinante na evolução da infecção;
- ✓ A elevada expressão da molécula CD86 na superfície das células dendríticas mielóides, na infecção crônica, mostra que as mesmas estão ativadas, e essa expressão pode ter sido induzida pela presença do HCV, uma vez que foi observada correlação positiva com a carga viral;
- ✓ As células dendríticas plasmocitóides dos indivíduos com infecção crônica apresentaram perfil imaturo caracterizado pela baixa expressão de CD86, o que pode ter influenciado persistência da infecção;
- ✓ Células NK citotóxicas, altamente diferenciadas e incapazes de produzir IFN- γ se destacaram na infecção crônica pelo HCV;
- ✓ A baixa produção de IFN- γ por parte das células NK é um dos fatores envolvidos na deficiente ativação de uma resposta imune adaptativa capaz de controlar a infecção pelo HCV.

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A – Parecer do comitê de ética e pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1163/09**, intitulado: **"PERFIL DE CÉLULAS NK E DENDRÍTICAS EM CASOS DE SOROCONVERSÃO ESPONTÂNEA E INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C"** apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **João Renato Rebello Pinho**

Pesquisador (a) Executante: **Fernanda de Mello Malta**

CAPPesq, 19 de Novembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

7.2 ANEXO B – Artigo aceito para publicação

Subject:	JMV-13-3475.R1 – Decision
From:	jmvir@ucl.ac.uk (jmvir@ucl.ac.uk)
To:	femalta@yahoo.com;
Date:	Monday, June 10, 2013 8:20 AM

10-Jun-2013

Dear Miss Malta,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "HCV viremia drives an increment of CD86 expression by myeloid dendritic cells" in its current form for publication in Journal of Medical Virology.

First Look NEW: Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided one you should do so immediately. You can access the copyright transfer agreement at <http://www.wiley.com/go/ctaaus> Please print the form, complete both sides and forward to the Production Editor, Mrs Lori Hamilton at: jmvprod@wiley.com in the United States. PLEASE ENSURE THAT YOUR MANUSCRIPT NUMBER IS INCLUDED ON THE CORRESPONDENCE.

You will receive your typeset proofs in due course

Thank you for your contribution

Kind regards,

Professor A J Zuckerman editor-in-Chief
jmvir@ucl.ac.uk

HCV Viremia Drives an Increment of CD86 Expression by Myeloid Dendritic Cells

F. Q. Malta,^{1*} F.R. Bruno,² K.L. Carvalho,^{2,3} A.C.S.S. Natri,^{1,4} J. Kalil,² F.J. Carrilho,¹ E.G. Kallas,² and J.R.R. Pinho^{1,3}

¹Departamento de Gastroenterologia, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Clinical Immunology and Allergy Branch, Department of Internal Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

⁴Department of Infectious and Parasitic Diseases, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The host immune response, including innate and adaptive immunity, plays a critical role in determining the outcome of viral infection. Nevertheless, little is known about the exact reasons for the failure of the host immune system in controlling hepatitis C virus (HCV) infection. Impairment of dendritic cells (DCs) function is probably one of the mechanisms responsible for immune evasion of HCV. In this study, the frequency and phenotype of DCs subsets were analyzed in three groups: HCV-infected individuals who developed viral persistence (1), HCV-infected individuals who spontaneously cleared the virus (2) and HCV-seronegative uninfected subjects (3). The results showed that the frequency of DCs subsets was not statistically significant between groups. Plasmacytoid DCs circulating exhibited an immature phenotype characterized by low expression of CD86. On the other hand, CD86 expression in myeloid DCs was significantly higher in chronic infected individuals compared to healthy controls ($P = 0.037$). A positive correlation was observed between CD86⁺ myeloid DC (mDC) and HCV viral load ($r = 0.4121$, $P = 0.0263$). These results suggest that HCV did not have an inhibitory effect on mDC maturation and the HCV viremia drives the increase of CD86 expression in mDC. The regulation of DCs maturation and migration lies at the level of intracellular signaling. HCV can activate or block intracellular signaling pathways and alter DC function. In conclusion, the present study suggests that imbalance of DC maturation by the virus represents a mechanism of evasion of the immune system despite the fact that HCV viremia appears to exert a "stimulatory" effect on cell-surface immune phenotype. *J. Med. Virol.* 9999:1-6, 2013.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: hepatitis C virus; innate immunity; dendritic cell; chronic infection; CD86

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease worldwide. HCV is a small, enveloped, single-stranded, and positive-sense RNA virus. It is a member of the family *Flaviviridae*, genus *Hepacivirus* [Chen et al., 1989]. It is estimated that less than 20% of HCV-infected individuals spontaneously clear the infection, while it persists in the majority of patients, evolving to chronic hepatitis and to end-stage liver disease requiring liver transplantation [Alter et al., 1999; Lechner et al., 2000; Poynard et al., 2003]. The host immune response, including innate and adaptive immunity, plays a critical role in determining the outcome of viral infection. HCV appears to be more successful than many other viruses in evading the protective immunity of the host [Behrmann, 2000, 2009; Behrmann and Chisari, 2000]. Nevertheless,

Grant sponsor: FAPESP; Grant numbers: 04/03.270-0, 09/03.306-4; Grant sponsor: FFM; Grant sponsor: HC-FMUSP; Grant sponsor: Alves de Queiroz Family Fund; Grant sponsor: Tropical Medicine Institute of São Paulo

Conflict of interest: The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

*Correspondence to: Fernanda de Mello Malta, PhD, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 500-2º Andar—IMT II, São Paulo, SP 05408-000, Brazil. E-mail: fmalta@usp.br

Accepted 10 June 2013

DOI 10.1002/jmv.23692

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

little is known about the exact reasons for the failure of the host immune system in controlling HCV infection. The failure to mount a successful immune response is multi-factorial and includes dysfunctional T, B, natural killer (NK), and dendritic cells (DCs) responses. While B and T lymphocytes are the effectors of the adaptive immunity, their development and function are under the control of DCs [Banchereau et al., 2000; Harrison et al., 2010; Landi et al., 2011].

DCs are the most important antigen-presenting cells, playing a pivotal role in T-cell function and in the link between innate and adaptive immunity [Banchereau and Steinman, 1998; Steinman and Hemmi, 2006]. It has been suggested that they are targets for HCV with impaired function in patients with chronic hepatitis C [Rehermann, 2000; Landi et al., 2011]. There are two major DC subsets: conventional or myeloid (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). Human mDCs and pDCs differ markedly in their ability to capture, process, and present antigens; express co-stimulatory molecules; and produce cytokines [Barchet et al., 2005]. mDCs are more efficient in priming T cell responses, while pDCs are the most potent releasers of type I interferon (IFN- α/β) upon viral infection [Wu and Liu, 2007; Reitz et al., 2011].

Studies demonstrated a decreased frequency of DCs in the peripheral blood and functional defects of monocyte-derived DCs from patients with chronic hepatitis C in comparison with healthy controls [Kanto et al., 1999; Aufermann-Gretzinger et al., 2001; Bain et al., 2001; Della Bella et al., 2007]. In contrast, other studies reported increased or preserved frequency of DCs in patients with chronic hepatitis C [Sun et al., 2001; Longman et al., 2004, 2005; Piccoli et al., 2005; Barnes et al., 2008].

Despite extensive investigation, there is no general consensus regarding the effects of HCV on DC functions. The aim of this study was to determine the frequency and phenotype of mDCs and pDCs in a cohort of individuals who developed persistent HCV infection or spontaneous viral clearance.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

Volunteers were recruited at the University of São Paulo. Written informed consent approved by the Institutional Review Board was obtained from all volunteers, according to the Brazilian Ministry of Health Guidelines. A total of 90 subjects were enrolled in this study, including 30 individuals with spontaneous viral clearance, 30 individuals with chronic hepatitis C infection, and 30 HCV-seronegative uninfected subjects used as a reference population (controls). Sex and age of all individuals were matched. None of the patients had received antiviral therapy before enrollment. All individuals were tested negative for human immunodeficiency virus and hepatitis B virus serological markers.

HCV RNA Testing and Quantification

Anti-HCV antibodies were assayed by a third-generation enzyme-linked immunosorbent assay (HCV 2.0 EIA, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Reactive samples were confirmed using a supplemental recombinant immunoblot assay (RIBA 3.0, Chiron Corporation, Emeryville, CA). HCV RNA was detected by polymerase chain reaction (Cobas Amplicor and Amplicor HCV Monitor v2.0; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). HCV genotype was determined using the Innogenetics Line Probe assay (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL).

Cell Isolation From Peripheral Blood

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by centrifugation in Ficoll gradient (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) and aliquots of 10^7 cells/mL were cryopreserved in liquid nitrogen in 10% Dimethyl Sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 90% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA) until use.

Flow Cytometry Assay

The phenotype and frequency of DC subsets were determined by staining 1 million thawed PBMCs. After thawing, cells were centrifuged at 1,500 rpm for 5 min and transferred into 96 V bottom well plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in 100 μ L of staining buffer (phosphate buffered saline-PBS [Gibco Life Technologies] supplemented with 0.1% sodium azide [Sigma-Aldrich] and 1% FBS [Gibco], pH 7.4–7.6) with the surface monoclonal antibodies. Cells were incubated at 4°C in darkness for 30 min, washed twice, and re-suspended in 100 μ L of fixation buffer (1% paraformaldehyde [Polysciences, Warrington, PA] in PBS, pH 7.4–7.6).

For staining DCs, the following fluorochrome-labeled antibodies were used: allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)-conjugated anti-HLA-DR, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Lineage Cocktail 1 (Lin1: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD11c, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD123, peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP Cy 5.5)-conjugated anti-CD86. All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA).

Fluorescence minus one (FMO) sample was prepared for fluorochrome conjugated with anti-CD86 to gate strategy [Roederer, 2001]. Cellular viability was determined using the LIVE/DEAD fixable aqua dead stain (Molecular Probes Life Technologies).

All the samples were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS and acquired on a BD LSR-Fortessa flow cytometer using FACS diva software and then analyzed with Flow Jo software version 9.4 (Tree Star, Ashland, OR). Fluorescence voltages were

TABLE I. Demographic and Clinical Features of Studied Subjects

	Spontaneous clearance	Chronic infection	Healthy control
Number	30	30	30
Age (years)	49 (41–58.25)	47.50 (34.5–53.25)	46 (35.5–52.25)
Female (%)	70	63.3	70
Laboratory findings			
ALT (U/L)	20.5 (14.75–28.0)	50.0 (34.75–63.5)**	18.5 (15.75–27.0)
AST (U/L)	21.0 (19.5–24.0)	40.0 (29.0–53.75)**	20.0 (16.25–24.0)
GGT (U/L)	26.5 (17.75–36.0)	51.5 (28.75–78.5)*	20.0 (15.5–30.0)
IL28B genotype (rs12979860)			
%; TT/CT; CC	37; 68	67; 33	58; 47
HCV genotype	ND	1	NA
HCV RNA (log ₁₀ UI/mL)	NA	6.02 (5.68–6.51)	NA

Data are represented as median (25th–75th), number or percentages.

NA, not applicable; ND, not determined; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transferase.

* $P < 0.001$.

** $P < 0.0001$.

determined using matched unstained cells. Compensation was carried out with CompBeads (BD Biosciences) single-stained FITC, PE, PerCP Cy5.5, APC, and APC-Cy7.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 5.04 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). The non-parametric Kruskal–Wallis test was used to compare phenotype frequencies differences among individuals groups when more than two groups were involved. Pearson's test was used for correlation analysis. A P -value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Subjects Characteristics

Demographic and clinical features of the studied subjects are summarized in Table I. All of those with chronic infection were infected with HCV genotype 1. As expected, individuals with chronic infection had alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and gamma glutamyl transferase levels significantly higher than the other groups ($P < 0.0001$). ALT levels and HCV viral load were not correlated

(data not shown). The protective rs12979860 CC IL28B genotype was more frequent in individuals who resolved spontaneously HCV infection and CT genotype in chronically infected individuals.

The Frequency of DCs in Peripheral Blood

DCs were identified as mononuclear cells that lacked Lin1 cell markers (Fig. 1), but expressed human leukocyte antigen (HLA-DR). There was no significant difference in the DCs frequency between the three groups ($P = 0.9478$). The frequencies of mDCs and pDCs in these groups did not show either statistically significant differences ($P = 0.9324$ and $P = 0.5681$, respectively) (Fig. 2A–C).

Expression of CD86 by DCs Subsets

The frequency of mDCs and pDCs expressing CD86 was analyzed (Fig. 3A). There was no significant difference in the frequency of CD86⁺ pDCs between the three groups of subjects (data not shown). However, a significant increase was observed in the frequency of CD86⁺ mDCs in chronic individuals when compared to healthy controls (Fig. 3B). In addition, a positive correlation ($r = 0.4121$) between HCV viral load and frequency of CD86⁺ mDC was observed,

Fig. 1. Representative gating strategy to identify the dendritic cells (DCs) in peripheral blood. A: Selection of singlet cells. B: Lymphocytes and monocytes were gated based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). C: Selection of live cells. D: DCs were identified gating HLA-DR⁺ cells and excluding Lin1⁺ cells. E: Plasmacytoid cells (pDC) and myeloid dendritic cells (mDC) were distinguished based on CD123 and CD11c expression, respectively.

4

Malta et al.

Fig. 2. A: Comparison of frequency of DCs in peripheral blood between the three groups. A: The frequency of total DCs in the peripheral blood of individuals with spontaneous clearance of HCV and in patients with chronic hepatitis C was similar to the DCs frequency in healthy controls. No significant difference was either observed in the frequency of mDCs (B) and pDCs (C) in the three groups.

suggesting no impairment of mDC maturation in HCV chronic individuals. Interestingly, two among the three individuals with viral load lower than 10^6 UI/mL had less than 20% mDC expressing CD86⁺ (Fig. 3C).

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the frequency and phenotype of DCs subsets in a cohort

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

of HCV-infected individuals who evolved to persistent infection or spontaneous clearance comparing to uninfected individuals. In the present study, HCV did not show an inhibitory effect on mDC maturation and HCV viremia led to an increase of CD86 expression by mDC in chronically infected individuals.

DCs are key regulators of the immune system; these cells act like a bridge between the innate and adaptive immune systems and play an irreplaceable role in immune defense against viral infections. Despite extensive investigation, there is not a general consensus regarding the effects of HCV on DC.

In patients with chronic HCV infection, some studies supported the initial observation of a DC defect [Bain et al., 2001; Kanto et al., 2004], while others clearly demonstrated intact DC function [Barnes et al., 2008; Pachiadakis et al., 2009]. Ryan and O'Farrelly [2011] reviewed the studies of the effect of HCV on DC function and they summarized the main findings about peripheral blood DCs obtained from patients with chronic HCV infection. Their conclusion was that no clear functional defect was found in all patients.

In the current study, no difference was observed on frequency of DCs subsets circulating in individuals chronically infected with HCV when compared to uninfected subjects and those who naturally clear HCV. It is noteworthy that the cohort was matched for age and sex, and the chronic infected patients were always exposed to the HCV genotype 1.

DCs are specialized antigen presenting cells that need to be activated in order to efficiently stimulate naive T cells and induce their differentiation [Mazzeoni and Segal, 2004; Steinman and Hemmi, 2006]. Maturation of DCs is essential for the stimulation of naive T lymphocytes as well as the ignition of adaptive immune responses. It has long been known that up-regulation of the co-stimulatory molecules, such as CD86, is a crucial step in DC maturation [Larsen et al., 1994].

In this study, circulating pDCs exhibited an immature phenotype characterized by low expression of CD86. On the other hand, mDCs from HCV chronic infected individuals expressed higher levels of CD86 than those from healthy subjects. Furthermore, HCV viremia drives the increase of CD86 expression by mDC. These observations suggest that HCV did not have an inhibitory effect on mDC maturation. The regulation of DCs maturation and migration lies at the level of intracellular signaling. HCV can activate or block intracellular signaling pathways and alter DC function [Pachiadakis et al., 2005; Pachiadakis et al., 2009; Jo et al., 2011]. Imbalance of DC function by the virus represents a mechanism of evasion of the immune system.

pDCs are specialized in the production of large amounts of type I interferon (IFN- α and IFN- β) and lower of type III IFN (IFN- λ) upon virus infection [Kanto et al., 2004]. In particular, IFN- λ may play a pivotal role in the antiviral response

CD86⁺ mDCs in HCV Infection

5

Fig. 3. Comparison of frequency of mDCs expressing maturation marker (CD86) in peripheral blood between the three groups. A: The CD86 expression by pDC and mDC were analyzed using fluorescence minus one (FMO) for gate strategy. B: The frequency of CD86⁺ mDCs in the peripheral blood was higher in individuals with chronic hepatitis C than in individuals with spontaneous viral clearance and healthy controls. C: The CD86⁺ mDCs frequency in individuals with chronic hepatitis C was positively correlated ($r=0.4121$) with HCV viral load.

against HCV and, polymorphisms close to the IL-28B gene (rs12979860) have been linked to the outcome of HCV infection during spontaneous and treatment induced viral elimination [Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Thomas et al., 2009; Rauch et al., 2010]. However, the mechanisms to explain how polymorphisms in the region of the IFN- λ genes affect antiviral host responses remain elusive. The CC genotype was revealed to be an important factor for spontaneous clearance of HCV. In the present study, a higher frequency of CC genotype was observed between the individuals with spontaneous viral clearance compared to the chronically infected but this difference was not statistically significant, probably due to the small number of individuals analyzed.

In conclusion, the present study suggests that DCs maturation is impaired in patients with chronic HCV infection despite the fact that HCV viremia appears to exert a "stimulatory" effect on cell-surface immune phenotype. Further advances in understanding of the role of host factors in the pathogenesis of the hepatitis C are key elements in finding new therapies that may help to develop evidence-based patient management strategies.

ACKNOWLEDGMENT

We thank each individual included in this study.

REFERENCES

- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Naiman OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341:556-562.
- Auffermann-Gretzinger S, Kiedlich EB, Levy S. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171-3178.
- Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Karviti JP, Trepo C, Indaumeche G. 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 120:512-524.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Damslet J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Bardet W, Cella M, Colonna M. 2008. Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 17:283-291.
- Barnes E, Salio M, Gerundolo V, Francesco L, Pardoll D, Kleemann P, Cox A. 2008. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 15:219-228.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

- Della Bella S, Casagrandi A, Riva A, Presdon P, Benatti A, Longhi R, Podda M, Villa MI. 2007. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* 121:283-292.
- Ge D, Fellay J, Thompson AL, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Benson EL, Qiu P, Hestekin AH, Musz AJ, Sullivan M, McHutchison JG, Goldstein DB. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:91-95.
- Harrison RJ, Ribeiro A, Little AM, Khakoo SE. 2010. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 161:306-314.
- Jo J, Lohmann V, Bartenschlager R, Thimme R. 2011. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 92:477-483.
- Kato T, Hayashi N, Takeda T, Tatematsu T, Kurohata N, Ito A, Sawada Y, Kawahara A, Hori M. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 162:854-860.
- Kato T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yatsushiro T, Ota C, Hori I, Himmatsu N, Takeda T, Kawahara A, Hayashi N. 2004. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190:1919-1926.
- Landi A, Yu H, Bahinsk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2011. Human dendritic cells expressing hepatitis C virus core protein display transcriptional and functional changes consistent with maturation. *J Viral Hepat* 18:704-713.
- Larson CP, Ritchie SC, Hendrix R, Lindsey PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry BP, Pearson TC. 1994. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecules (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152:8208-8219.
- Lehner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohmenwend P, Robbins G, Phillips R, Klemsman P, Waller BD. 2006. Analysis of seroreactive immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 193:1409-1512.
- Longman RS, Takeda AH, Jacobson IM, Albert ML, Riss CM. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103:1028-1029.
- Longman RS, Takeda AH, Jacobson IM, Riss CM, Albert ML. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 192:497-503.
- Mazzoni A, Segal BM. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 75:721-730.
- Pachadakis I, Pollan G, Chain BM, Naumov NV. 2006. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 6:296-304.
- Pachadakis I, Chokshi S, Cooley H, Farmakiotis D, Serman C, Zeeman S, Mihalak TI, Naumov NV. 2008. Early viraemia clearance during antiviral therapy of chronic hepatitis C improves dendritic cell functions. *Clin Immunol* 131:415-428.
- Paroli D, Tavarini S, Neri S, Colombatto P, Benvenuto M, Borzini F, Ciccorossi P, Zorzi F, Pozzato G, Comar C, Abbramati S, Wade A. 2005. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J Hepatol* 42:61-67.
- Poyard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Julio J, Mueller T, Rothbarth M, Battagay M, Bernasconi E, Beresford J, Colombo S, Camy A, Dubois JF, Furter H, Gunthard HF, Heim M, Hirschel R, Malinverni R, Moradpour D, Mullhaupt B, Witzel A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Nagel F, Tselimi A, Rothbarth PY. 2010. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 138:1338-1345.
- Rehermann B. 2000. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 20:127-141.
- Rehermann B. 2009. Hepatitis C virus: innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 119:1745-1754.
- Rehermann B, Chisari FV. 2000. Cell mediated immune response to the hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:299-320.
- Reize R, Colonna M, Trinchieri G, Barrat F, Gillet M. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol* 11:559-569.
- Rodiere M. 2011. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45:304-305.
- Ryan EJ, O'Farrell C. 2011. The effect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat* 18:601-607.
- Steinman RM, Hemmi H. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17-69.
- Sim J, Rodola F, Fan X, Ischah H, Soong I, Lemon SM, Chan TS. 2001. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 75:11930-11936.
- Stappah V, Moldovan M, Ahlstedt G, Berg T, Welman M, Abate ML, Bassoandina M, Spengler U, Dom GJ, Powell E, Riederer S, Sheridan D, Stedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100-1104.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.
- Wu L, Liu YJ. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunology* 20:741-750.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
2. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96-102.
3. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29 Suppl 1:74-81.
4. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S21-9.
5. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
6. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-67.
7. Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:254-65.
8. Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008;389:1283-98.
9. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-10.
10. Nellore A, Fishman JA. NK cells, innate immunity and hepatitis C infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2011;52:369-77.
11. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS, Ffrench RA. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:24-32.
12. Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:217-27.
13. Kaisho T, Akira S. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 2000;20:393-405.
14. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17-58.
15. Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol* 2002;3:699-702.
16. Pachiadakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 2005;5:296-304.
17. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621-67.
18. Pollara G, Jones M, Handley ME, Rajpopat M, Kwan A, Coffin RS, Foster G, Chain B, Katz DR. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid

- dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. *J Immunol* 2004;173:4108-19.
19. Ida JA, Shrestha N, Desai S, Pahwa S, Hanekom WA, Haslett PA. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods* 2006;310:86-99.
 20. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-7.
 21. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
 22. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89-97.
 23. Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 2004;75:721-30.
 24. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.
 25. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
 26. Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999;11:392-9.
 27. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
 28. Della Bella S, Crosignani A, Riva A, Presicce P, Benetti A, Longhi R, Podda M, Villa ML. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* 2007;121:283-92.
 29. De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, Congia S, Mingari MC, Moretta L. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 2007;37:445-55.
 30. Szabo G, Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. *Clin Liver Dis* 2008;12:675-92, x.
 31. Kaplan DE, Ikeda F, Li Y, Nakamoto N, Ganesan S, Valiga ME, Nunes FA, Rajender Reddy K, Chang KM. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. *J Hepatol* 2008;48:903-13.
 32. Nattermann J, Vogel M, Berg T, Danta M, Axel B, Mayr C, Bruno R, Tural C, Klausen G, Clotet B, Lutz T, Grunhage F, Rausch M, Nischalke HD, Schewe K, Bienek B, Haerter G, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. *Hepatology* 2007;46:1016-25.
 33. Huang Y, Feld JJ, Sapp RK, Nanda S, Lin JH, Blatt LM, Fried MW, Murthy K, Liang TJ. Defective hepatic response to interferon and activation of

- suppressor of cytokine signaling 3 in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:733-44.
34. Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2004;39:754-62.
 35. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-4.
 36. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003;170:1249-56.
 37. Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997;109:451-7.
 38. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 2011;60:268-78.
 39. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633-40.
 40. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4480-6.
 41. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 2010;116:3865-74.
 42. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1715-22.
 43. Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T, Bowness P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 2007;179:89-94.
 44. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques Y, Spits H, Di Santo JP. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 2009;206:25-34.
 45. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Munz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells

- display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2007;178:4947-55.
46. Hu PF, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Hirji K, Jewett A, Bonavida B, Detels R, Giorgi JV. Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;10:331-40.
 47. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, O'Shea MA, Kinter A, Kovacs C, Moretta A, Fauci AS. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2886-91.
 48. Mavilio D, Lombardo G, Kinter A, Fogli M, La Sala A, Ortolano S, Farschi A, Follmann D, Gregg R, Kovacs C, Marcenaro E, Pende D, Moretta A, Fauci AS. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2006;203:2339-50.
 49. Alter G, Suscovich TJ, Kleyman M, Teigen N, Streeck H, Zaman MT, Meier A, Altfeld M. Low perforin and elevated SHIP-1 expression is associated with functional anergy of natural killer cells in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2006;20:1549-51.
 50. Brunetta E, Fogli M, Varchetta S, Bozzo L, Hudspeth KL, Marcenaro E, Moretta A, Mavilio D. The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia. *Blood* 2009;114:3822-30.
 51. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ahmad F, Ballmaier M, Bhatnagar N, Zielinska-Skowronek M, Schmidt RE, Meyer-Olson D. Phenotypically and functionally distinct subsets contribute to the expansion of CD56-/CD16+ natural killer cells in HIV infection. *AIDS* 2010;24:1823-34.
 52. Gonzalez VD, Falconer K, Michaelsson J, Moll M, Reichard O, Alaeus A, Sandberg JK. Expansion of CD56- NK cells in chronic HCV/HIV-1 co-infection: reversion by antiviral treatment with pegylated IFNalpha and ribavirin. *Clin Immunol* 2008;128:46-56.
 53. Gonzalez VD, Falconer K, Bjorkstrom NK, Blom KG, Weiland O, Ljunggren HG, Alaeus A, Sandberg JK. Expansion of functionally skewed CD56-negative NK cells in chronic hepatitis C virus infection: correlation with outcome of pegylated IFN-alpha and ribavirin treatment. *J Immunol* 2009;183:6612-8.
 54. Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010;31:401-6.
 55. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9:503-10.
 56. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237-44.
 57. Murphy WJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL. Natural killer cells and bone marrow transplantation. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1475-82.
 58. Brodsky FM, Lem L, Solache A, Bennett EM. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol Rev* 1999;168:199-215.

59. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
60. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 2002;55:229-32.
61. Orange JS, Fasset MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol* 2002;3:1006-12.
62. Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 2001;166:3923-32.
63. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 2010;129:8-19.
64. Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 2007;39:1114-9.
65. Martin MP, Pascal V, Yeager M, Phair J, Kirk GD, Hoots K, O'Brien SJ, Anderson SK, Carrington M. A mutation in KIR3DS1 that results in truncation and lack of cell surface expression. *Immunogenetics* 2007;59:823-9.
66. Pascal V, Yamada E, Martin MP, Alter G, Altfeld M, Metcalf JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Carrington M, Anderson SK, McVicar DW. Detection of KIR3DS1 on the cell surface of peripheral blood NK cells facilitates identification of a novel null allele and assessment of KIR3DS1 expression during HIV-1 infection. *J Immunol* 2007;179:1625-33.
67. Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gomez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2005;66:1106-9.
68. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, Emerson SS, Shuhart MC, Gretch DR. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006;43:573-80.
69. Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006;55:869-77.
70. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004;173:6072-81.
71. Takehara T, Hayashi N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:S78-81.
72. Ferlazzo G, Munz C. Dendritic cell interactions with NK cells from different tissues. *J Clin Immunol* 2009;29:265-73.
73. Milush JM, Long BR, Snyder-Cappione JE, Cappione AJ, 3rd, York VA, Ndhlovu LC, Lanier LL, Michaelsson J, Nixon DF. Functionally distinct subsets of

- human NK cells and monocyte/DC-like cells identified by coexpression of CD56, CD7, and CD4. *Blood* 2009;114:4823-31.
74. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001;120:512-24.
 75. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2004;190:1919-26.
 76. Pachiadakis I, Chokshi S, Cooksley H, Farmakiotis D, Sarrazin C, Zeuzem S, Michalak TI, Naoumov NV. Early viraemia clearance during antiviral therapy of chronic hepatitis C improves dendritic cell functions. *Clin Immunol* 2009;131:415-25.
 77. Barnes E, Salio M, Cerundolo V, Francesco L, Pardoll D, Klenerman P, Cox A. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2008;15:219-28.
 78. Ryan EJ, O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat* 2011;18:601-7.
 79. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994;152:5208-19.
 80. Jo J, Lohmann V, Bartenschlager R, Thimme R. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2011;92:477-93.
 81. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401.
 82. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;41:1100-4.
 83. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801.
 84. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Gunthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Mullhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and

- treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010;138:1338-45, 1345 e1-7.
85. Biron CA. Natural killer cell regulation during viral infection. *Biochem Soc Trans* 1997;25:687-90.
 86. Mondelli MU, Oliviero B, Mele D, Mantovani S, Gazzabin C, Varchetta S. Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis? *Front Immunol* 2012;3:351.
 87. Milush JM, Long BR, Snyder-Cappione JE, Cappione AJ, 3rd, York VA, Ndhlovu LC, Lanier LL, Michaelsson J, Nixon DF. Functionally distinct subsets of human NK cells and monocyte/DC-like cells identified by coexpression of CD56, CD7, and CD4. *Blood*. Volume 114, 2009:4823-31.
 88. Sempowski GD, Lee DM, Kaufman RE, Haynes BF. Structure and function of the CD7 molecule. *Crit Rev Immunol* 1999;19:331-48.
 89. Ginaldi L, Farahat N, Matutes E, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of T cell antigens in normal peripheral blood lymphocytes: a quantitative analysis by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1996;49:539-44.
 90. Rabinowich H, Pricop L, Herberman RB, Whiteside TL. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. *J Immunol* 1994;152:517-26.
 91. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:2711-20.
 92. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 2009;85:88-97.
 93. Hayhoe RP, Henson SM, Akbar AN, Palmer DB. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. *Hum Immunol* 2010;71:676-81.
 94. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ballmaier M, Bhatnagar N, Zielinska-Skowronek M, Schmidt RE, Meyer-Olson D. HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J Virol* 2010;84:1183-8.
 95. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983;131:1789-96.
 96. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989;143:3183-91.
 97. Abo T, Miller CA, Balch CM. Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur J Immunol* 1984;14:616-23.
 98. Krishnaraj R, Svanborg A. Preferential accumulation of mature NK cells during human immunosenescence. *J Cell Biochem* 1992;50:386-91.

99. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debre P, Merle-Beral H, Vieillard V. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 2010;9:527-35.
100. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010;116:3853-64.
101. Golden-Mason L, Bambha KM, Cheng L, Howell CD, Taylor MW, Clark PJ, Afdhal N, Rosen HR. Natural killer inhibitory receptor expression associated with treatment failure and interleukin-28B genotype in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;54:1559-69.
102. Harrison RJ, Ettorre A, Little AM, Khakoo SI. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2010;161:306-14.
103. Werner JM, Heller T, Gordon AM, Sheets A, Sherker AH, Kessler E, Bean KS, Stevens M, Schmitt J, Rehermann B. Innate immune responses in hepatitis C virus exposed healthcare workers who do not develop acute infection. *Hepatology* 2013.
104. Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, Ghany MG, Hoofnagle JH, Liang TJ, Heller T, Rehermann B. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* 2010;138:325-35 e1-2.
105. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010;115:2167-76.
106. Supekova L, Pezacki JP, Su AI, Loweth CJ, Riedl R, Geierstanger B, Schultz PG, Wemmer DE. Genomic effects of polyamide/DNA interactions on mRNA expression. *Chem Biol* 2002;9:821-7.
107. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-66.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

1. Higienizar a cabine de segurança biológica nível 2, esterilizar por 15 minutos utilizando a luz ultravioleta (UV). Registrar na planilha do Fluxo (hora/data/usuário);
2. Separar e organizar o material que será utilizado durante cada etapa do procedimento (Gaze, álcool 70%, garrafas de cultura, pipetas sorológicas e de transferência, tubos para centrifugação, tampão HBSS, Ficoll Paque Plus, solução ACK, Meio R-10 e de congelamento, ponteiras, tubos eppendorf e solução de azul de Tripan);
3. Separar os tubos contendo as amostras que serão processadas, dispensar todo o volume desses tubos em uma garrafa de cultura e adicionar tampão HBSS completando o volume para 100 mL (diluição da amostra).
4. Reservar 3 tubos de 50 mL, adicionar a cada um deles 15 mL de Ficoll Paque (gelado), adicionar a amostra (diluída) cuidadosamente sobre a camada de Ficoll para evitar misturar as duas soluções;
5. Centrifugar os tubos a 2.300 rpm durante 40 minutos com temperatura entre 18° e 20°C (ajustar a aceleração e freio da centrífuga para 5);
6. Durante a centrifugação, as células mononucleares se separam pela densidade de gradiente, e a camada celular formada entre o Ficoll e o plasma será transferida para outros tubos;
7. Reservar 2 tubos de 50 mL para dispensar a camada de células e lavar com tampão HBSS. Adicionar HBSS para completar o volume de 50 mL, centrifugar a 1.700 rpm durante 10 minutos com temperatura entre 18° e 20°C. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante invertendo os tubos no descarte de líquidos e desmanchar o pellet. Repetir mais uma vez essa etapa; (**realizar 2x essa lavagem**)
8. Após a lavagem, realizar a lise de hemácias utilizando 3 mL de solução ACK, deixar agir por 2 minutos e neutralizar adicionando 10 mL de Meio R-10;
9. Centrifugar a 1.700 rpm durante 10 minutos com temperatura entre 18° e 20°C. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante invertendo os tubos no descarte de líquidos e ressuspender o pellet em 20 mL (esse volume pode variar) de Meio-R10;
10. Diluir 10 uL dessa suspensão celular em 90 uL de Azul de Tripan (diluição 1:10). Montar a câmara de Neubauer (limpar com álcool), adicionar 10 uL da diluição e realizar a contagem de células. Fazer os cálculos para saber qual o volume de meio de congelamento necessário para que a concentração final seja 1×10^7 células/mL.
11. Fazer alíquotas de 1 mL em tubos de criopreservação (resistente ao nitrogênio líquido), identificar os tubos com etiquetas, vedar com parafilm e congelar.

APÊNDICE B - Preparo das soluções

Meio de Cultura R-10

500 mL de Meio RPMI 1640
50 mL de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor
5 mL de L-Glutamina (200mM)
5 mL de Tampão Hepes (1M)
5 mL de Piruvato de Sódio (100mM)
5 mL de Penicilina-Streptomicina (100x)
0,5 mL de 2-Mercaptoetanol (55 mM)

Meio de Congelamento

90% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor
10% de DMSO

Tampão MACS

498 mL de PBS 1X pH 7.2
2 mL de EDTA (500 mM)
2,5 g de Albumina Sérica Bovina (BSA)

Solução de Paraformaldeído a 10% (PFA 10%)

25 mL de PBS 1X pH 7.2
2,5 g de Paraformaldeído

Solução de Paraformaldeído a 4% (PFA 4%)

1,5 mL de PBS 1X pH 7.2
1 mL de Solução de Paraformaldeído a 10%

Solução de Paraformaldeído a 1% (PFA 1%)

9 mL de PBS 1X pH 7.2
1 mL de Solução de Paraformaldeído a 10%

Solução Permeabilizante 10X (PB 10X)

100 mL de PBS 1X pH 7.2
1,0 g de Albumina Sérica Bovina (BSA) (1%)
1,0 g de Saponina (1%)

Solução Permeabilizante 1X (PB 1X)

45 mL de PBS 1X pH 7.2
5 mL de Solução Permeabilizante 1x (PB 1X)

APÊNDICE C - Imunofenotipagem de superfície

Painel para as células DC:

Live/Dead (Amcyan) - 1 uL de AARD + 19 uL de PBS (adicionar 5 uL dessa solução/poço + 45 uL de MACS)

MIX: 15 uL de Acs + 35 uL de Tampão MACS

Anticorpos	Fluorocromo	Volume	Volume ____x
Lin1	FITC	5 uL	
CD123	PE	3 uL	
CD86	PerCP	3 uL	
HLADR	APC Cy7	2 uL	
CD11c	PE Cy7	2 uL	
		15 uL	

FMO CD86: 12 uL de Acs + 38 uL de Tampão MACS

Painel para as células NK:

Live/Dead (Amcyan) - 1 uL de AARD + 19 uL de PBS (adicionar 5 uL dessa solução/poço + 45 uL de MACS)

26,5 uL de Acs + 23,5 uL de Tampão MACS

Anticorpos	Fluorocromo	Volume	X____
CD57	FITC	5 uL	
KIR3DL1/DS1	PE	5 uL	
CD3	PE-Texas Red	2 uL	
CD14	PE-Texas Red	1 uL	
CD19	PE-Texas Red	1 uL	
NKG2A	APC	5 uL	
CD16	APC Cy7	2 uL	
CD56	PE Cy7	5 uL	
CD7	Alexa 700	0,5 uL	
	MACS buffer	23,5 uL	

FMO NKG2A: 21,5 uL de Acs + 28,5 uL de Tampão MACS

FMO KIR: 21,5 uL de Acs + 28,5 uL de Tampão MACS

NK HCV (Funcional)				Protocolo:																																																															
Data:																																																																			
ETAPA 1: Estimulação				ETAPA 2: LIVE/DEAD																																																															
BFA/Monensin/CD 107a (para todas as amostras marcadas)				<table> <tr> <td colspan="2"></td><td colspan="2">MIX</td></tr> <tr> <td></td><td>uL/teste</td><td>x__</td><td></td></tr> <tr> <td>BFA</td><td>0,2</td><td></td><td rowspan="4">50ul/well</td></tr> <tr> <td>Monensin</td><td>0,2</td><td></td></tr> <tr> <td>CD107alpha APC</td><td>1,0</td><td></td></tr> <tr> <td>R-10 +DNase</td><td>48,6</td><td></td></tr> <tr> <td>Total</td><td>50,0</td><td></td><td></td></tr> </table>						MIX			uL/teste	x__		BFA	0,2		50ul/well	Monensin	0,2		CD107alpha APC	1,0		R-10 +DNase	48,6		Total	50,0																																					
		MIX																																																																	
	uL/teste	x__																																																																	
BFA	0,2		50ul/well																																																																
Monensin	0,2																																																																		
CD107alpha APC	1,0																																																																		
R-10 +DNase	48,6																																																																		
Total	50,0																																																																		
BFA/Monensin (para o nao marcado)				ETAPA 3: Marcação de superficie																																																															
<table> <tr> <td colspan="2"></td><td colspan="2">MIX</td></tr> <tr> <td></td><td>uL/teste</td><td>x__</td><td></td></tr> <tr> <td>BFA</td><td>0,2</td><td></td><td rowspan="5">50ul/well</td></tr> <tr> <td>Monensin</td><td>0,2</td><td></td></tr> <tr> <td>R-10 +DNase</td><td>49,6</td><td></td></tr> <tr> <td>Total</td><td>50,0</td><td></td></tr> </table>						MIX			uL/teste	x__		BFA	0,2		50ul/well	Monensin	0,2		R-10 +DNase	49,6		Total	50,0		<table> <tr> <td colspan="2">Painel de superficie</td><td colspan="2">MIX</td></tr> <tr> <td>NK</td><td>uL/teste</td><td>x__</td><td></td></tr> <tr> <td>CD57 FITC</td><td>5,0</td><td></td><td rowspan="13">50ul/well</td></tr> <tr> <td>CD56 PE-Cy7</td><td>5,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD16 Pacific Blue</td><td>3,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD7 Alexa700</td><td>1,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD8 APC-Cy7</td><td>1,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD3 PE-TXRD</td><td>2,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD14 PE-TXRD</td><td>1,0</td><td></td></tr> <tr> <td>CD19 PE-TXRD</td><td>1,0</td><td></td></tr> <tr> <td>PBS com 2% de SFB inativa</td><td>31,0</td><td></td></tr> <tr> <td>Total (por well)</td><td>50,0</td><td></td></tr> </table>				Painel de superficie		MIX		NK	uL/teste	x__		CD57 FITC	5,0		50ul/well	CD56 PE-Cy7	5,0		CD16 Pacific Blue	3,0		CD7 Alexa700	1,0		CD8 APC-Cy7	1,0		CD3 PE-TXRD	2,0		CD14 PE-TXRD	1,0		CD19 PE-TXRD	1,0		PBS com 2% de SFB inativa	31,0		Total (por well)	50,0	
		MIX																																																																	
	uL/teste	x__																																																																	
BFA	0,2		50ul/well																																																																
Monensin	0,2																																																																		
R-10 +DNase	49,6																																																																		
Total	50,0																																																																		
Painel de superficie		MIX																																																																	
NK	uL/teste	x__																																																																	
CD57 FITC	5,0		50ul/well																																																																
CD56 PE-Cy7	5,0																																																																		
CD16 Pacific Blue	3,0																																																																		
CD7 Alexa700	1,0																																																																		
CD8 APC-Cy7	1,0																																																																		
CD3 PE-TXRD	2,0																																																																		
CD14 PE-TXRD	1,0																																																																		
CD19 PE-TXRD	1,0																																																																		
PBS com 2% de SFB inativa	31,0																																																																		
Total (por well)	50,0																																																																		
IL12/IL18 Stim				ETAPA 4: Marcação intracelular																																																															
<table> <tr> <td colspan="2"></td><td colspan="2">MIX</td></tr> <tr> <td></td><td>p/ 24 testes</td><td>x__</td><td></td></tr> <tr> <td>IL12</td><td>5,0</td><td></td><td rowspan="4">50ul/well</td></tr> <tr> <td>IL18</td><td>5,0</td><td></td></tr> <tr> <td>R-10 +DNase</td><td>1200,0</td><td></td></tr> </table>						MIX			p/ 24 testes	x__		IL12	5,0		50ul/well	IL18	5,0		R-10 +DNase	1200,0		<table> <tr> <td colspan="2"></td><td colspan="2">MIX</td></tr> <tr> <td></td><td>uL/teste</td><td>x__</td><td></td></tr> <tr> <td>IFNgamma PE</td><td>2,5</td><td></td><td rowspan="3">50ul/well</td></tr> <tr> <td>PBS com 2% de SFB inativa</td><td>47,5</td><td></td></tr> <tr> <td>Total (por well)</td><td>50,0</td><td></td></tr> </table>						MIX			uL/teste	x__		IFNgamma PE	2,5		50ul/well	PBS com 2% de SFB inativa	47,5		Total (por well)	50,0																									
		MIX																																																																	
	p/ 24 testes	x__																																																																	
IL12	5,0		50ul/well																																																																
IL18	5,0																																																																		
R-10 +DNase	1200,0																																																																		
		MIX																																																																	
	uL/teste	x__																																																																	
IFNgamma PE	2,5		50ul/well																																																																
PBS com 2% de SFB inativa	47,5																																																																		
Total (por well)	50,0																																																																		

APÊNDICE E - Ensaio funcional de células NKs

Estímulo: linhagem celular K562

NK HCV (Funcional com K-562)				Protocolo:			
Data:							
ETAPA 1: Estimulação				ETAPA 2: LIVE/DEAD			
BFA/Monensin/CD 107a (para todas as amostras marcadas)				MIX			
	uL/teste	x		AARD Stain	uL/teste	x	
BFA	0,2			AARD	0,4		50ul/well
Monensin	0,2			PBS 1X	49,6		
CD107alpha APC	1,0		50ul/well	Total (por well)	50,0		
R-10 +DNase	48,6						
Total	50,0						
BFA/Monensin (para o nao marcado)				ETAPA 3: Marcação de superficie			
	uL/teste	x		Painel de superficie		MIX	
BFA	0,2			NK	uL/teste	x	
Monensin	0,2		50ul/well	CD57 FITC	5,0		
R-10 +DNase	49,6			CD56 PE-Cy7	5,0		
Total	50,0			CD16 Pacific Blue	3,0		
				CD7 Alexa700	1,0		50ul/well
				CD8 APC-Cy7	1,0		
				CD3 PE-TXRD	2,0		
				CD14 PE-TXRD	1,0		
				CD19 PE-TXRD	1,0		
				PBS com 2% de SFB inativa	31,0		
				Total (por well)	50,0		
ESTÍMULO:				ETAPA 4: Marcação intracelular			
10:1 (NK:K-562)			50ul/well		uL/teste	x	
				IFNgamma PE	2,5		50ul/well
				PBS com 2% de SFB inativa	47,5		
				Total (por well)	50,0		