

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA

BRUNA TIAKI TIYO

**Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o  
pulso de células dendríticas derivadas de monócitos:  
potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV**

São Paulo

2023

BRUNA TIAKI TIYO

**Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV**

**Versão Corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

Coorientadora: Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida

São Paulo

2023

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tiyo, Bruna Tiaki

Nanopartículas como estratégia de delivery de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos : potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV / Bruna Tiaki Tiyo. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Dermatologia.

Orientador: Alberto José da Silva Duarte.

Coorientadora: Telma Miyuki Oshiro Sumida.

Descritores: 1.HIV 2.Células dendríticas  
3.Imunoterapia 4.Nanopartículas 5.Dióxido de silício  
6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-465/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese a cada pessoa que contribuiu para a realização deste trabalho. É um resultado de muita colaboração, gentileza e seriedade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, pela vida, pela saúde, por ser paz e amparo nos momentos de alegria e também de inquietude. Cada obstáculo vencido nestes últimos anos foi uma pequena vitória.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2019/24849-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, por ser um grande exemplo e referência de pesquisador e, principalmente, de gestor. Sua visão, seu trabalho e dedicação rendem infinitas oportunidades aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56). Agradeço o privilégio de ter sido sua orientanda.

À minha coorientadora, Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa com tanto apreço. Não tenho palavras para agradecer tamanho cuidado e comprometimento com o desenvolvimento deste trabalho, com a evolução de cada fase do projeto, e também com a minha formação como profissional. O “*Grupo Telma*” é um reflexo da líder: respeitoso, colaborativo e gentil. Foi uma honra ter sido orientada por uma pesquisadora ética, justa e paciente.

Aos meus pais, Maurício Tiyo e Marie Mizoguchi Tiyo, por serem a minha base, meu porto seguro, e por nunca terem medido esforços em proporcionar às filhas a melhor formação pessoal e profissional. Mesmo distantes fisicamente, sempre se fazem presentes com palavras de apoio, incentivo e amor. À minha irmã, Larissa Narumi Tiyo, pela cumplicidade, por me transmitir força e por acreditar em mim mais do que eu mesma. Aos meus avós, tios e primos, por sempre demonstrarem preocupação, carinho e suporte, motivando uns aos outros para que a cada geração da família, voos mais altos sejam alcançados.

Ao meu noivo, Mateus Vailant Thomazella, meu parceiro de vida, melhor amigo e confidente. É meu apoio diário e um sincero encorajador dos meus sonhos. Em todos esses anos, sua presença sempre me trouxe força, carinho e cuidado. Não tenho palavras para agradecer por tamanho companheirismo e por tudo que temos construído juntos.

Às minhas colegas e amigas de grupo, Dra. Laís Teodoro da Silva, Marina M. Ortega, Silvia J. Mota, Dra. Luanda M. S. Oliveira e Dra. Gabriela J. H. Schmitz, pelo convívio diário cheio de afeto, parceria e amparo. Juntas, dividimos muitos momentos especiais, dos mais

angustiantes ao mais divertidos. Minha experiência durante o doutorado foi muito melhor ao lado de vocês.

À Prof. Dra. Maria Notomi Sato, por ter me aberto as portas do LIM-56 e me conectado à tantas pessoas importantes ao longo desses anos, sempre muito disponível e atenciosa.

Ao Prof. Dr. Gil Benard e seu grupo, Dra. Juliana R. Fernandes e Thalyta Nery, que ao longo dos anos, além de colegas de trabalho, se tornaram amigos e uma extensão do “*Grupo Telma*”.

A todos os alunos, pesquisadores e colaboradores do LIM-56, por proporcionarem um ambiente leve, fraterno e muito agradável. Em especial, agradeço ao George Gonçalves de Souza e à Tamara Reis Pimenta, por todo acolhimento e carinho, e que hoje são amizades que ultrapassaram o ambiente de trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Ruth Eugenio Meneses e ao Marcelo Alves da Silva, por todo auxílio e disponibilidade durante todos esses anos, sempre gentis e solícitos nos esclarecimentos.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Stephano e a todo grupo do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por terem me acolhido e me ajudado nos passos iniciais ao universo das nanopartículas. Um agradecimento muito especial à toda equipe: Dr. Marcos Camargo Knirsch, Me. Caroline Yumi Kayano, Dr. Alexy Orozco Valencia, Dr. Richard Saldaña e Dra. Natalia Marchesan Bexiga.

Ao Dr. Jonnatan Julival dos Santos, Dr. Sergio Hiroshi Toma e Prof. Dr. Koiti Araki, do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da USP, pela colaboração, parceria e total suporte com as nanopartículas de sílica. Sou muito grata pela confiança em mim e em meus orientadores, pela disponibilidade, e por termos desenvolvido este trabalho sempre em conjunto. Também agradeço à Dra. Mariana Romano pelo suporte e ensinamentos.

À Dra. Paula Ordonhez Rigato, pesquisadora do Laboratório de Imunobiologia e Biomarcadores do Instituto Adolfo Lutz, por prontamente ter nos cedido os peptídeos de HIV utilizados neste trabalho, bem como ter aberto as portas de seu laboratório para colaboração.

Ao Dr. Vinícius Nunes Cordeiro Leal e à Prof. Dra. Alessandra Pontillo, do Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por todo auxílio e disponibilidade com a microscopia de fluorescência.

Às minhas orientadoras de graduação e mestrado, Prof. Dra. Ana Lúcia Falavigna Guilherme, Prof. Dra. Jeane E. L. Visentainer e Prof. Dra. Cristiane M. Colli, por fazerem parte

da minha formação acadêmica. Tive muitos incentivos ao buscar o doutorado além da Universidade Estadual de Maringá e elas têm parte fundamental nisso.

Aos meus amigos de longa data que sempre estiveram comigo, que mesmo distantes fisicamente, sempre se fizeram presentes com muita torcida e apoio: Aline, Amanda, Fabíola Julia, Lincoln, Marina, Marielen, Milena e Thayara.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

Tiyo BT. Nanopartículas como estratégia de delivery de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A imunoterapia baseada em células dendríticas (DC) constitui uma ferramenta potencial para aperfeiçoar o tratamento da infecção pelo HIV, cujo intuito é estimular e direcionar uma resposta imune específica contra a infecção viral. O protocolo mais utilizado para a obtenção de DCs envolve a cultura de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF e posterior ativação das DCs imaturas com citocinas pró-inflamatórias. As aDC1, diferentemente das DCs derivadas de monócitos convencionais, exibem uma capacidade superior de induzir uma resposta de linfócito T CD8+, capaz de eliminar células infectadas pelo HIV-1. Além da importância da qualidade da DC, agentes carreadores têm ganhado notoriedade por melhorarem a entrega do antígeno para célula ou tecido de interesse. A nanopartícula de quitosana (QS) tem sido utilizada por ter origem de um polímero natural, não-tóxico, biocompatível e biodegradável, enquanto a nanopartícula de sílica tem sido amplamente aplicada no contexto de delivery de fármacos e antígenos por conta de sua estabilidade e possibilidade de diferentes formulações. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de nanopartículas para o *delivery* de antígenos de HIV em células dendríticas do tipo aDC1. Nos ensaios iniciais, a avaliação da viabilidade das células de linhagem RAW 264.7, estimuladas com nanopartículas de QS e sílica, foi avaliada por MTT. Entretanto, desafios como a instabilidade e a reprodutibilidade na produção das nanopartículas de QS foram decisivos para encerrarmos os ensaios com a QS. Dessa forma, optamos por dar continuidade somente com as nanopartículas de sílica. A proporção calculada para conjugação de nanopartículas de sílica aos peptídeos de HIV foi de 10:1. A avaliação da viabilidade e análise fenotípica de aDC1, pulsadas com nanopartículas de sílica, foi realizada por citometria de fluxo, assim como a avaliação dos diferentes tempos de internalização das partículas pelas células. Diferentemente, as nanopartículas de sílica, na concentração de 10 µg/ml, conjugadas a 1 µg/ml do peptídeo Gag.27 do HIV, parecem não interferir na viabilidade das aDC1, quando comparadas às nanopartículas sem conjugação à antígenos. Em relação à avaliação do perfil fenotípico das aDC1, na qual foram utilizados os marcadores de ativação e maturação CD40, CCR7, CD80, CD83 e HLA-DR, nenhuma diferença significativa foi observada entre as células que receberam as nanopartículas dos controles. Um achado inesperado foi o aumento na expressão da molécula CD14 nas aDC1 pulsadas com as nanopartículas de sílica, principalmente quando não associadas aos peptídeos, fato que pode estar relacionado à apoptose celular. Por fim, o tempo de 8 horas parece ser o suficiente para a internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV por aDC1, achado demonstrado por citometria e microscopia de fluorescência. Em suma, reiteramos o potencial uso das nanopartículas de sílica conjugadas a peptídeos de HIV para culturas de células com aDC1.

**Palavras-chave:** HIV. Células dendríticas. Imunoterapia. Nanopartículas. Dióxido de silício. Citometria de fluxo.



## ABSTRACT

Tiyo BT. Nanoparticles as a delivery strategy for HIV antigens to pulse monocyte-derived dendritic cells: potential application in anti-HIV immunotherapy [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Immunotherapy based on dendritic cells (DC) is a potential tool for improving the treatment of HIV infection, whose aim is to stimulate a direct and specific immune response against viral infection. The most commonly used protocol for obtaining DCs involves culturing monocytes in the presence of IL-4 and GM-CSF and subsequent activation of immature DCs with pro-inflammatory cytokines. aDC1, unlike conventional monocyte-derived DCs, exhibits a superior ability to induce a CD8<sup>+</sup> T lymphocyte response capable of eliminating HIV-1-infected cells. In addition to the importance of DC quality, carrier agents have gained notoriety for improving antigen delivery to the cells or tissues of interest. Chitosan nanoparticles (QS) have been used because they are from a natural source, non-toxic, biocompatible, and biodegradable polymer, while silica nanoparticles have been widely applied in the context of drug and antigen delivery owing to their stability and the possibility of different formulations. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of nanoparticles on delivery of HIV antigens to aDC1-type dendritic cells. In the initial tests, the viability of RAW 264.7 cells, stimulated with QS and silica nanoparticles was evaluated by MTT. However, challenges, such as instability and reproducibility in the production of QS nanoparticles, were decisive in ending QS trials. Therefore, we chose to continue using only silica nanoparticles. The ratio calculated for the conjugation of silica nanoparticles to HIV peptides was 10:1. Evaluation of the viability and phenotypic analysis of aDC1 pulsed with silica nanoparticles was carried out by flow cytometry, as well as evaluation of the different internalization times of the particles by the cells. In contrast, silica nanoparticles, at a concentration of 10 µg/ml, conjugated to 1 µg/ml of the HIV Gag<sub>27</sub> peptide, did not seem to interfere with the viability of aDC1, when compared to nanoparticles without conjugation to antigens. Regarding the evaluation of the phenotypic profile of aDC1, in which the activation and maturation markers CD40, CCR7, CD80, CD83, and HLA-DR were used, no significant difference was observed between the cells that received nanoparticles and the controls. An unexpected finding was the increase in the expression of the CD14 molecule in aDC1 pulsed with silica nanoparticles, especially when not associated with peptides, which may be related to cell apoptosis. Finally, 8 h seemed to be sufficient for the internalization of silica nanoparticles conjugated to HIV peptides by aDC1, as demonstrated by cytometry and fluorescence microscopy. In summary, we reiterated the potential use of silica nanoparticles conjugated to HIV peptides in aDC1 cell cultures.

**Keywords:** HIV. Dendritic cells. Immunotherapy. Nanoparticles. Silicon dioxide. Flow cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura do HIV-1 .....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema de imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos para pacientes com HIV.....	19
<b>Figura 3.</b> Fluxograma dos ensaios para obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (aDC1) e cocultivo de aDC1 com linfócitos autólogos.....	28
<b>Figura 4.</b> Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo, utilizada para caracterização fenotípica de aDC1, por meio da expressão de moléculas de superfície. ....	33
<b>Figura 5.</b> Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo, utilizada para avaliar a produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos T. ....	36
<b>Figura 6.</b> Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo para avaliação da apoptose de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica.....	38
<b>Figura 7.</b> Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica sobre a viabilidade em células de linhagem. ....	41
<b>Figura 8.</b> Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas à albumina sérica bovina (BSA), sobre a viabilidade em células de linhagem.....	43
<b>Figura 9.</b> Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas ao peptídeo de hemopressina, em diferentes tempos de estímulo, sobre a viabilidade de células de linhagem. ....	45
<b>Figura 10.</b> Cinética do efeito de diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas ao peptídeo de hemopressina sobre a viabilidade de células de linhagem...	46
<b>Figura 11.</b> Avaliação da viabilidade das aDC1 pulsadas com diferentes concentrações de nanopartículas de sílica não associadas a antígenos (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ ).....	48
<b>Figura 12.</b> Análise fenotípica de aDC1 incubadas com concentrações diferentes de nanopartículas de sílica, não associadas a antígenos (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ ).....	50
<b>Figura 13.</b> Avaliação da viabilidade das aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ ) e dois pools de peptídeos de HIV (pool 1 e pool 2).....	53
<b>Figura 14.</b> Análise fenotípica de aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ ) e dois pools de peptídeos de HIV (pool 1 e pool 2). ....	54

<b>Figura 15.</b> Análise fenotípica de aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10 µg/ml), associadas ao pool 1 de peptídeos de HIV (Gag.15, Gag.34 e Gag.35).....	57
<b>Figura 16.</b> Produção de IFN $\gamma$ por linfócitos autólogos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV estimulados por aDC1. ....	60
<b>Figura 17.</b> Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas ao peptídeo Gag.27 da região Gag do HIV-1.....	63
<b>Figura 18.</b> Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas aos peptídeos Gag.34 e Gag.35 da região Gag do HIV-1.....	66
<b>Figura 19.</b> Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas ao pool de peptídeos da região Gag do HIV-1 (Gag.27, Gag.34 e Gag.35).....	69
<b>Figura 20.</b> Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 2, 6 e 24 horas de pulso, analisadas por histograma.....	72
<b>Figura 21.</b> Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 24 horas de contato, analisadas em gráficos pseudocolor plot (smooth).....	72
<b>Figura 22.</b> Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 8 e 24 horas de pulso em histograma.....	74
<b>Figura 23.</b> Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 8 e 24 horas de pulso, analisadas em gráficos pseudocolor plot (smooth)...	74
<b>Figura 24.</b> Esquematização das etapas para obtenção de aDC1 considerando os tempos de 8 e 24 horas de pulso das nanopartículas associadas aos peptídeos de HIV e a duração total dos protocolos. ....	75
<b>Figura 25.</b> Avaliação da viabilidade das aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV após pulso de 8 e 24 horas.....	76
<b>Figura 26.</b> Avaliação da internalização de nanopartículas de sílica por aDC1 através de citometria de fluxo.....	77
<b>Figura 27.</b> Análise fenotípica de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV, após pulso de 8 e 24 horas.....	78
<b>Figura 28.</b> Análise da internalização da nanopartícula de sílica associada ao peptídeo Gag.27 por imunofluorescência. ....	80
<b>Figura 29.</b> Avaliação da apoptose de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos pacientes que participaram do estudo. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Características dos peptídeos de HIV obtidos pelo NIH AIDS Reagent Program, utilizados para pulso das aDC1. ....	30
<b>Tabela 3.</b> Características dos peptídeos de HIV sintetizados pela GenScript Biotech, utilizados para pulso das aDC1. ....	30
<b>Tabela 4.</b> Relação de anticorpos monoclonais utilizados para caracterização fenotípica das aDC1. ....	32
<b>Tabela 5.</b> Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos T. ....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
aDC1	Células dendríticas polarizadas para o tipo $\alpha 1$
ADEE	Ambulatório do Departamento de Dermatologia
AIM-V	Meio de cultura para imunoterapia adotiva versão 5
APC	Aloficocianina (do inglês: <i>Allophycocyanin</i> )
APCs	Célula apresentadora de antígeno
ART	Terapia antirretroviral (do inglês: <i>Antiretroviral Therapy</i> )
AT-2	Aldrithiol 2
ATCC	Coleção Americana de Cultura de Células (do inglês: <i>American Type Culture Collection</i> )
BMDC	Célula dendrítica derivada de medula óssea (do inglês: <i>Bone marrow-derived dendritic cell</i> ).
BSA	Albumina sérica bovina
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CCR	Receptor C-C de quimiocina
CD	Grupo de diferenciação (do inglês: <i>Cluster of differentiation</i> )
CEFAP	Centro de Facilidades para a Pesquisa
CTL	Linfócitos T CD8+ citotóxicos
CXCR	Receptor C-X-C de quimiocina
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DCs	Células Dendríticas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSC	Tamanho das células (do inglês: <i>Forward scatter</i> )
Gag	Gene estrutural do HIV

GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (do inglês: <i>Granulocyte-macrophage Colony-stimulating factor</i> )
GNP	Nanopartículas de ouro (do inglês: <i>Gold nanoparticle</i> )
gp	Glicoproteína
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humano
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano – MHC classe II
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
iDC	Célula dendrítica imatura
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
LIM-56	Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências
LPS	Lipopolissacarídeo
LRS	Câmaras de leucoaférese redução
mDC	Célula dendrítica madura
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
mRNA	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NP	Nanopartícula
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Tampão fosfato-salino
PdI	Índice de polidispersão
PE	Ficoeritrina
PE-Cy	Ficoeritrina-cianina
PGLA	Ácido poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (do inglês: <i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i> )
PLA-NP	Nanopartículas de ácido polilático (do inglês: <i>Poly-lactic acid nanoparticles</i> )

PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Poly I:C	Ácido poli-inosínico-policitidílico (do inglês: <i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> )
PVHA	Pessoas que vivem com HIV ou aids
QS	Quitosana
RAW 264.7	Célula de linhagem de monócito de camundongo
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic acid</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAB	Soro tipo AB humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SiO <sub>2</sub>	Composição química da nanopartícula de sílica
SSC	Granulosidade das células (do inglês: <i>Side scatter</i> )
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de linfócito T
Th	T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i> )
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>Tumor necrosis factor</i> )
TPP	Tripolifosfato de sódio

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	22
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1. Produção e conjugação das nanopartículas.....	23
3.1.1. Nanopartículas de quitosana (QS) .....	23
3.1.2. Nanopartículas de sílica .....	24
3.2. Avaliação da viabilidade celular através de teste colorimétrico de MTT .....	25
3.3. Casuística .....	26
3.4. Obtenção de amostras e fluxo de ensaios .....	27
3.5. Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos polarizadas para o tipo $\alpha 1$ (aDC1).....	28
3.6. Peptídeos de HIV .....	29
3.7. Caracterização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV .....	31
3.8. Determinação do perfil fenotípico das aDC1 .....	31
3.9. Ensaio de cocultivo de aDC1 e linfócitos autólogos .....	33
3.10. Marcação extracelular e intracelular de linfócitos (cocultivo).....	34
3.11. Imunofluorescência .....	37
3.12. Teste de apoptose.....	37
3.13. Congelamento e descongelamento de células.....	38
3.14. Análise de resultados.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana (QS) e sílica sobre a viabilidade em células de linhagem .....	40
4.1.1. Nanopartículas de quitosana (QS) e sílica .....	40
4.1.2. Nanopartículas de QS e sílica conjugadas à proteína .....	42



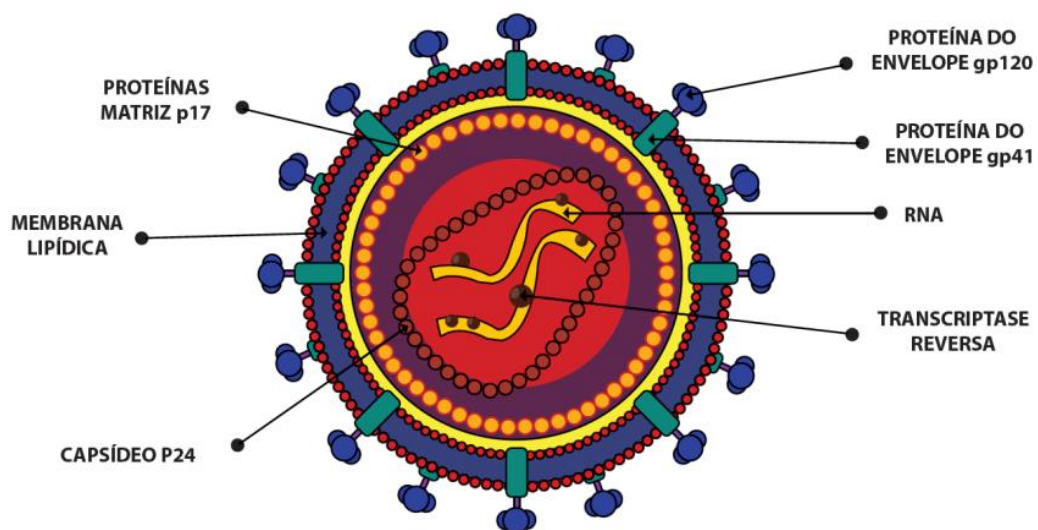
4.1.3. Nanopartículas de QS e sílica conjugadas à peptídeo .....	44
4.2. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica sobre a viabilidade celular e perfil fenotípico de células dendríticas aDC1 .....	47
4.3. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica associadas a peptídeos de HIV sobre a viabilidade celular e perfil fenotípico de células dendríticas aDC1 .....	52
4.4. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica associadas a peptídeos de HIV sobre a viabilidade celular, perfil fenotípico e funcional de células dendríticas aDC1 derivadas de indivíduos infectados pelo HIV .....	56
4.5. Caracterização das nanopartículas conjugadas aos peptídeos de HIV .....	61
4.6. Avaliação da internalização das nanopartículas de sílica, associadas aos peptídeos de HIV, pelas aDC1 .....	71
4.7. Avaliação da apoptose das aDC1 pulsadas com nanopartículas conjugadas a peptídeo de HIV .....	81
5. DISCUSSÃO .....	83
6. CONCLUSÃO .....	91
REFERÊNCIAS .....	92
ANEXOS .....	99

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um grave problema de saúde pública mundial que acomete mais de 39 milhões de pessoas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Em 2022, foram notificados 1,3 milhão de novos casos e 630 mil mortes relacionadas a esta doença (1). No Brasil, entre 2007 e junho de 2022, foram notificados 434.803 casos de infecção pelo HIV, sendo a região Sudeste a mais prevalente, com 183.901 casos (42,3%) (2). A principal característica desta doença é o grave comprometimento do sistema imune do hospedeiro, levando a um quadro de imunossupressão, o que caracteriza a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) (3).

Na tentativa de encontrar o agente causador da aids, o HIV foi descrito em 1983 diferenciando-o, assim, do até então suspeito vírus linfotrópico de célula T humana (HTLV). Com os avanços nas técnicas moleculares, no final de 1984, foi possível comprovar que o HIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus* (4). Este vírus é composto por: um genoma com duas cópias de RNA de fita simples, envoltos por uma camada proteica (ou nucleocapsídeo); um capsídeo; um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica; além de várias proteínas estruturais e enzimas virais (5) (Figura 1).

**Figura 1.** Estrutura do HIV-1



Fonte: Ministério da Saúde, 2013

A infecção acontece quando a glicoproteína gp120 do HIV se liga à molécula CD4 presente na superfície da célula hospedeira, principalmente linfócitos, mas também macrófagos e células dendríticas (DCs) (6)(LEVY, 1989). Após esta interação inicial, há a exposição de uma outra molécula na superfície da célula, o receptor C-C de quimiocina do tipo 5 (CCR5) ou receptor C-X-C de quimiocina do tipo 4 (CXCR4), permitindo a fusão do vírus à célula hospedeira (7).

A principal causa da imunossupressão e consequente progressão para aids em pacientes infectados pelo HIV é o declínio no número de linfócitos T CD4+, visto que estas células são as responsáveis por mediar tanto a resposta imune celular quanto a humoral. Considerando a contínua depleção destes linfócitos, o hospedeiro se torna suscetível às doenças oportunistas, podendo progredir ao óbito (3). Assim, a ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTL), bem como a produção de anticorpos específicos, são importantes no controle da replicação viral, tendo sido observado que os níveis de CTL são inversamente relacionados à carga viral plasmática (8).

Na tentativa de controlar a progressão da doença, as terapias antirretrovirais (ART) melhoraram a qualidade e expectativa de vida das pessoas que vivem com HIV ou aids (PVHA), além de reduzir a transmissão do vírus. Com o avanço da ART, as complicações deixaram de ser decorrentes da infecção em si, mas sim do uso prolongado dos antirretrovirais, de modo que a infecção pelo HIV passou a ser considerada uma doença crônica (9). Por outro lado, embora a ART intervenha na replicação do vírus em diferentes pontos do ciclo e consiga manter a carga viral a níveis indetectáveis, ela não é capaz de promover a cura da infecção. Este fato acontece visto que não é possível erradicar os persistentes reservatórios de HIV, onde os medicamentos não agem, de modo que ao suspender a ART, a carga viral do paciente volta a ser detectável (10).

Assim, considerando que a ART não restaura por completo o sistema imune do paciente, a imunoterapia para o tratamento da infecção por HIV tem se mostrado uma estratégia complementar altamente promissora (11–13). Diante disso, a imunoterapia com citocinas, a partir do final dos anos 90, buscou restabelecer esse sistema comprometido, com uso de interleucina-2 (IL-2) e IL-7, por exemplo. Pouco tempo depois, no começo dos anos 2000, as vacinas terapêuticas surgiram inicialmente como uma alternativa para a ART, como as derivadas de *Poxvirus* ou *Adenovirus*, vacinas com partículas de HIV inativado, de DNA, ou ainda, com DC (14).

A escolha de DCs para uso em vacina terapêutica é devida à sua importância no reconhecimento, processamento e apresentação antigênica para as células T específicas. As DCs são células apresentadoras de antígeno (APCs) que exercem uma importante ponte entre a imunidade inata e adquirida e são as únicas capazes de estimular linfócitos T *naive*, para iniciar novas respostas imunes (15,16). DCs imaturas possuem alta capacidade na captura de antígenos, enquanto que uma resposta celular é estimulada quando a DCs está totalmente madura. Esta última expressa altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas coestimuladoras em sua superfície (15).

Um outro aspecto relevante relacionado à função da DCs é o conjunto de evidências de que as DCs são capazes de ativar reservatórios de HIV (17). Estes reservatórios, localizados principalmente nos tecidos linfoides, se estabelecem muito precocemente no curso da infecção, através da integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, podendo permanecer por longos períodos de latência, sendo que o quanto antes se iniciar o tratamento, menores eles serão (18–23). Além disso, a dificuldade em se quantificar estes reservatórios é um obstáculo para alcançar a cura para esta infecção. Alguns dos métodos atualmente utilizados são a avaliação da quantidade de DNA de HIV integrado às células infectadas, ou ainda, pela replicação viral em células em estado de repouso (24).

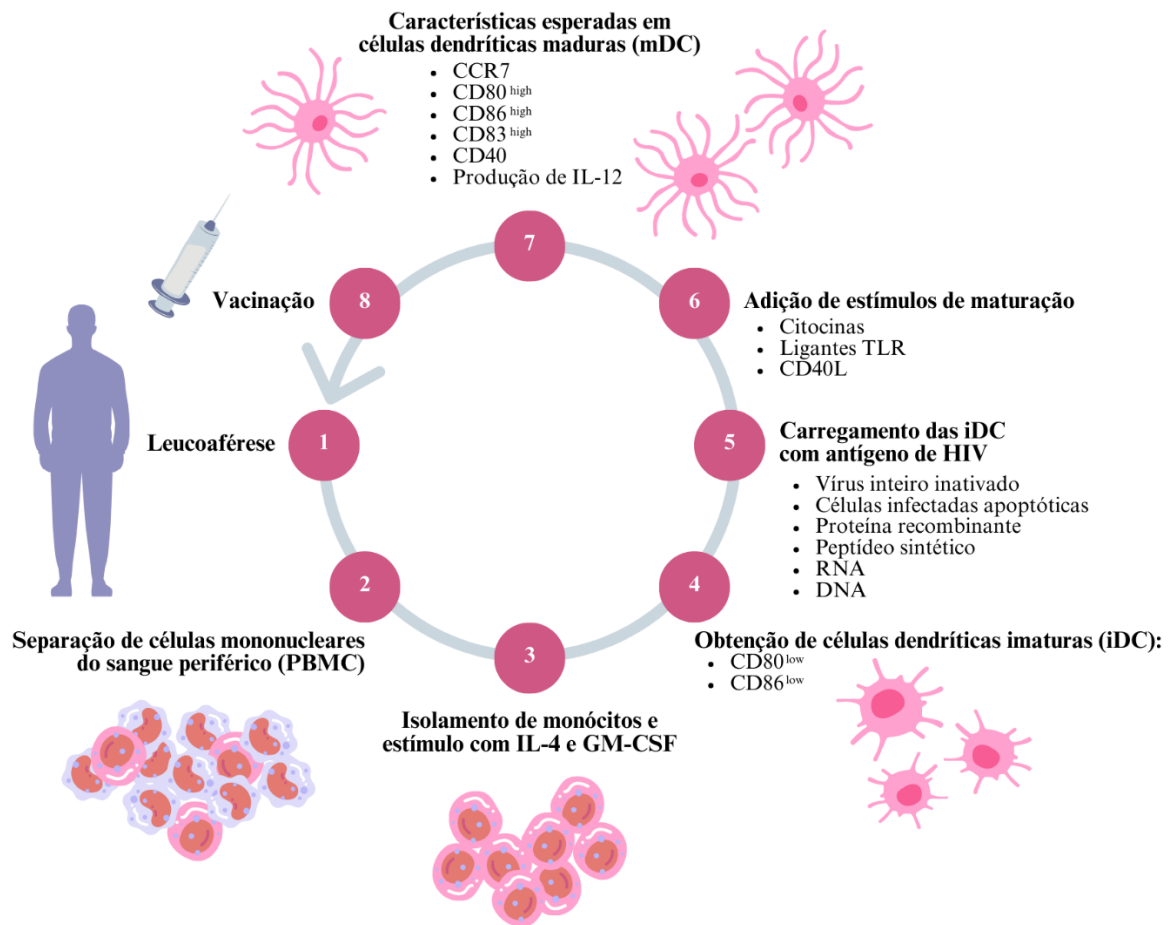
Considerando que a quantidade de DCs circulantes em relação aos leucócitos é de apenas 0,2% (15), a obtenção destas células em quantidade necessária para protocolos de imunoterapia torna-se um desafio complexo. Neste sentido, com o desenvolvimento na década de 1990 de técnicas de obtenção de DCs a partir de precursores captados do sangue periférico (25), foi possível a aplicação das DC em protocolos de imunoterapia. As DCs mais comumente utilizadas para a produção da vacina terapêutica são derivadas de monócitos, tendo sido descritos até o presente vários protocolos para sua diferenciação, resultando em DCs com diferentes características fenotípicas.

O protocolo mais utilizado para a obtenção de DCs envolve a cultura de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF e posterior ativação das DCs imaturas com citocinas pró-inflamatórias. Alternativamente, com base na plasticidade das DCs e seus precursores, métodos diferentes para a obtenção destas células têm sido propostos, no sentido de polarizar a resposta imune para o padrão mais adequado contra o patógeno. Particularmente, no caso de infecção por vírus, o estímulo de uma resposta polarizada para Th1 é desejável a fim de eliminar as células infectadas.

Características críticas para as DCs induzirem um padrão Th1 de resposta incluem: status de ativação completo, capacidade de resposta às quimiocinas de órgãos linfoides secundários e habilidade em produzir altos níveis de IL-12p70. Tal resultado pode ser induzido por DCs ativadas em condições distintas às convencionalmente obtidas, através do estímulo com a combinação de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFN) tipo I e II, sendo denominadas aDC1. Tais células apresentam uma exuberante capacidade de induzir a produção de IL-12p70 e expressar altos níveis de CCR7, receptor de quimiocina responsável pela migração das DCs aos órgãos linfoides secundários (26). Ainda, foi constatado em ensaios *in vitro* que a aDC1 exibe uma capacidade superior de induzir uma resposta de linfócito T CD8+, capaz de eliminar células infectadas pelo HIV-1 (27).

Para a aplicação das DCs em protocolos de imunoterapia, o candidato ao tratamento é submetido a uma leucoaférese para obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). A partir desta população, os monócitos são isolados e posteriormente estimulados *in vitro* com citocinas específicas para diferenciação em DCs imaturas. Em seguida, estas células são pulsadas com antígenos de HIV e submetidas a estímulos inflamatórios para a completa maturação. Por fim, as células maduras capazes de realizar apresentação antigênica são reinoculadas no paciente (Figura 2) (16). O intuito é estimular e direcionar a resposta imune específica do paciente contra uma infecção viral (28,29).

**Figura 2.** Esquema de imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos para pacientes com HIV.



Adaptado de: Oshiro; de Almeida; da Silva Duarte, 2009.

Assim, a qualidade do produto vacinal é decisiva para o sucesso da imunoterapia. Além da importância da qualidade das DCs a ser inoculada no paciente, o tipo de antígeno utilizado para pulsar as DCs é igualmente relevante. Adicionalmente, o modo de pulso destes antígenos pelas DCs também interfere diretamente na qualidade do produto.

Em relação aos antígenos de HIV utilizados para pulsar as aDC1, a literatura apresenta diversos protocolos clínicos (29), tendo sido utilizados peptídeos virais (30,31) e mRNA codificando proteínas do HIV (32–34). Para utilização do vírus inteiro faz-se necessário sua inativação, que pode ser pelo calor (35,36) ou por compostos químicos (37). Estes antígenos de HIV podem ou não estar em um veículo que auxilie sua entrada para as DCs. Recentemente, peptídeos do HIV tem ganhado notoriedade, uma vez que em detrimento ao repertório viral completo oferecido pelo vírus inteiro, a imunização com peptídeos permitiria estimular uma resposta imune mais direcionada a um padrão de resposta imune desejável na infecção pelo HIV, por exemplo, utilizando ferramentas de bioinformática capazes de realizar a predição de peptídeos relevantes para a resposta imune desejada.

Agentes carreadores têm ganhado notoriedade por melhorarem a entrega do antígeno para a célula ou tecido de interesse. Estes veículos podem transportar diversos compostos, como antígenos e fármacos, diferindo em tamanho, composição e estrutura (38). Logo, a utilização de nanopartículas tem promovido avanços nos protocolos de imunoterapia por mediar a modulação do sistema imune (38,39), principalmente contra doenças infecciosas (38,40) e câncer (38,41,42).

Tendo em vista os veículos utilizados para pulso de antígenos de HIV, estudos pré-clínicos com partículas semelhantes ao vírus (VLP) (43,44), nanopartículas de ouro (GNP) (45), nanopartículas de ácido polilático (PLA-NP) e ácido poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PGLA) (46) têm sido desenvolvidos. Ainda, há os veículos associados aos lipídeos, como os lipossomos (44,47), nanocápsulas lipídicas (48) e lipopeptídeos (49). Estes veículos têm mostrado bons resultados na indução de uma resposta imune celular específica, constituindo ferramentas promissoras para melhorar as vacinas anti-HIV.

O uso das nanopartículas pode representar uma nova forma de se comunicar com o sistema imune, já que elas podem ser reconhecidas pelas células imunes e gerar uma modulação na resposta. Este fato pode melhorar as chances de controle de uma doença infecciosa que não tem respondido bem às vacinas tradicionais (39). Um polímero natural que tem sido amplamente estudado como modulador do sistema imune é a quitosana (QS) (38,39,50). Este

polissacarídeo possui vantagens como não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (50). A nanopartícula de QS tem sido utilizada em estudos pré-clínicos como veículo de antígenos em vacinas de mucosas, com aplicações através de sprays nasais, por exemplo, devido a suas propriedades mucoadesivas (51,52). Por ser um sistema livre de agulhas, pesquisadores têm defendido que estas vacinas possuem facilidade na administração e maior adesão de pacientes (53). Além disso, a nanopartícula de QS tem sido utilizada em estudos de terapia gênica (54,55), de vacinas contra a tuberculose (56) e câncer (44,57), e como carreador de antirretrovirais (58,59). No que se refere à sílica, esta nanopartícula é amplamente utilizada em pesquisas biomédicas devido à sua biodegradabilidade, alta capacidade de modificações por conta dos poros ou da superfície, versatilidade e estabilidade (60,61).

Estudos clínicos utilizando DCs para imunoterapia têm sido conduzidos desde o final da década de 90 (62) e desde então muitos estudos têm sido realizados (63). Neste contexto, desde 2006 nosso grupo de pesquisa vem atuando em projetos que visam avaliar e aprimorar protocolos de imunoterapia anti-HIV baseada em DCs e também em protocolo clínico de imunoterapia anti-HIV baseada em DCs. Os resultados obtidos até o presente por nosso grupo, e também por outros, têm demonstrado que os pacientes apresentam variadas intensidades de resposta às vacinas terapêuticas baseadas em DCs. Este fato pode estar relacionado tanto ao tipo de DC quanto ao antígeno utilizado para a sua formulação, que interferem diretamente na qualidade do produto vacinal e, conseqüentemente, na qualidade da resposta ao tratamento. Deste modo, a otimização na entrega de antígenos de HIV às aDC1 pode melhorar a resposta a este tipo de imunoterapia.

Diante disso, pesquisas por estratégias inovadoras para conter a infecção pelo HIV são de grande relevância, não somente por buscar novas alternativas de tratamento, mas também aprimorar estratégias já em uso. Atualmente, nosso grupo de pesquisa vem estudando as DCs do tipo aDC1, desenvolvidas pela equipe do Prof. Robbie B. Maillard, que são nossos colaboradores. Neste contexto torna-se pertinente estudar estratégias de otimização da imunoterapia. Assim, estudar outras formas de pulso antigênico pelas DC poderia aprimorar a qualidade do produto vacinal.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do uso de nanopartículas para o *delivery* de antígenos de HIV em células dendríticas do tipo aDC1.

### 2.2. Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas de quitosana para *delivery* de antígenos HIV;
- Avaliar o efeito das nanopartículas de quitosana e sílica sobre a viabilidade celular;
- Analisar o efeito do pulso de antígenos de HIV associados às nanopartículas, sobre a expressão de moléculas de superfície por aDC1 em comparação a antígenos não associados às nanopartículas;
- Avaliar a capacidade das aDC1 pulsadas com nanopartículas associadas a antígenos de HIV, em induzir resposta imune específica por linfócitos autólogos;
- Avaliar a capacidade das aDC1 em internalizar as nanopartículas associadas a antígenos de HIV.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Produção e conjugação das nanopartículas

##### 3.1.1. Nanopartículas de quitosana (QS)

Para a preparação das nanopartículas de QS foi utilizada QS de baixo peso molecular (Sigma – Aldrich), com grau de desacetilação de 75 a 85%, tripolifosfato (TPP) de sódio 85% (Sigma – Aldrich), ácido acético glacial (Synth), cloreto de sódio (Synth) e hidróxido de sódio 1M (Synth). Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura para o preparo das soluções.

Inicialmente, preparamos a solução de QS, procedendo à diluição da QS em ácido acético glacial 1% e solução de cloreto de sódio 0,9% (massa/volume), para uma concentração final de 2000 µg/ml. Em seguida, a solução de QS teve seu valor de pH ajustado em 5,5. Após completa diluição com auxílio de um agitador magnético, a solução resultante foi primeiramente filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore) para eliminar todo e qualquer tipo de partícula e a QS não solubilizada. Logo após, a solução de QS foi filtrada em filtro 0,22 µm (Millipore) para retenção de possíveis contaminantes microbiológicos.

Paralelamente, preparamos uma segunda solução, composta por TPP com concentração de 1000 µg/ml, em solução de cloreto de sódio 0,9% (massa/volume). Após, a solução de TPP teve seu valor de pH ajustado para 9,0. Ainda, igualmente à solução de QS, esta solução também foi filtrada em filtro 0,22 µm (Millipore).

Em seguida, prosseguimos para a formação das nanopartículas de QS. O processo de geleificação iônica ocorreu a partir da adição de 4 ml de solução de TPP, por gotejamento, em 6 ml de solução de QS, em uma proporção de 3:1 QS/TPP (massa/massa). O gotejamento foi realizado a uma velocidade aproximada de 1 ml/minuto, com auxílio de uma seringa estéril de 10 ml e agulha hipodérmica de 32x0,7 mm (22 G1¼). A solução de TPP foi gotejada sobre a solução de QS, previamente contida em um poço (placa para cultivo de células com 6 poços), de fundo reto e estéril. A velocidade de agitação magnética foi aumentada gradualmente de 450 rpm até 750 rpm.

Após gotejamento total da solução de TPP sobre a solução de QS, a suspensão foi mantida sob agitação a 750 rpm, durante 60 minutos. Como esperado, a solução final apresentou um aspecto visual levemente turvo, com coloração azulada. Este processo foi realizado em temperatura ambiente, dentro de um fluxo laminar. Passados os 60 minutos, a solução foi transferida para um tubo cônico do tipo Falcon de 15 ml, estéril, e armazenada a 4°C até o

momento do uso. Testou-se também uma etapa de centrifugação a 13.000 g, a 25°C, durante 30 minutos, sendo posteriormente suspensas em meio de cultura AIM-V.

Nos ensaios iniciais foram elaboradas somente nanopartículas de QS não-modificadas e, posteriormente, nanopartículas de QS modificadas com 132 µg/ml de albumina bovina sérica (BSA) ou 3,2 µg/ml de peptídeos de hemopressina. Para modificação das nanopartículas de QS, durante o preparo da solução de TPP, foram adicionados o BSA ou o peptídeo de hemopressina. Após junção da solução de TPP, contendo o BSA ou o peptídeo, com a solução de QS, teve-se a formação das nanopartículas modificadas com os respectivos antígenos.

### 3.1.2. Nanopartículas de sílica

As nanopartículas de sílica, de composição química SiO<sub>2</sub>, possuem de 17 a 18 nm de diâmetro, com estrutura rígida e compacta (não-porosas). Sua carga (potencial zeta), quando não modificada, é de aproximadamente -27,7 mV. No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas nanopartículas de sílica de mesma composição, tamanho e carga, com diferenças somente no marcador: 1) corante rodamina, cujo pico de excitação está em 525 nm e 548 nm de emissão; 2) corante fluoresceína (FITC), com excitação e emissão em aproximadamente 495 nm/521 nm; 3) nanopartícula sem corante.

Estas partículas foram desenvolvidas pelo Método de Stöber no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). As definições de suas características físico-químicas foram baseadas em trabalhos anteriormente publicados (64,65).

A proporção calculada entre as nanopartículas de sílica e os peptídeos de HIV foi de 10:1, sendo considerada a quantidade de proteína compatível com a quantidade de sílica (massa/massa). Os cálculos foram realizados por nossos colaboradores do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). As conjugações foram realizadas em temperatura ambiente, dentro de um fluxo laminar. Em um microtubo estéril de 1,5 mL foi adicionada uma solução (água, salina ou PBS), seguido dos peptídeos e, por fim, as nanopartículas. Entre cada reagente adicionado, o microtubo foi agitado por 10 segundos com auxílio de um vórtex. Ainda, as conjugações das nanopartículas foram realizadas com, no mínimo, 24 horas antes de seu uso, seja para caracterização ou pulso em cultura celular.

### 3.2. Avaliação da viabilidade celular através de teste colorimétrico de MTT

Para avaliar se as nanopartículas interferem na viabilidade celular foram realizados testes de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. Nestes ensaios, a viabilidade celular foi quantificada pela redução de sais de tetrazólio (MTT) a formazan, devido à atividade das enzimas desidrogenases. O produto desta reação metabólica deixa de ter uma coloração amarela e passa a ter uma coloração roxa, que pode ser solubilizada e quantificada por espectrofotometria. Estes testes foram realizados no Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

Para os testes foram utilizadas as células de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7, previamente obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Lípidos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Estas células foram criopreservadas em solução de congelamento composta por 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para os ensaios *in vitro*, as células foram acondicionadas em frascos para cultura celular de 25 e 75 cm<sup>2</sup>, tampas com filtro, em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir confluência superior a 80%, as células foram descoladas dos frascos com auxílio de espalhadores de células (*cell scrapers*) de 240 mm de largura (TPP, Trasadingen, Suíça), transferidas para tubo cônico do tipo Falcon estéril de 15 ml, submetidas à lavagem (1200 rpm por 5 minutos) e contagem em câmara de Neubauer com azul de Trypan.

Os testes de MTT foram realizados em placas para cultura celular de 24 poços, e a quantidade de células plaqueadas variou entre 7,5x10<sup>5</sup> células/ml (4,5x10<sup>5</sup> células/poço) e 1,6x10<sup>6</sup> células/ml (1x10<sup>6</sup> células/poço) durante o processo de padronização. O plaqueamento das células foi realizado em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. No dia seguinte, as células receberam os respectivos estímulos:

- a. Dodecil sulfato de sódio (SDS): controle negativo para viabilidade celular;
- b. Lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma): controle positivo, induz ativação celular;
- c. Nanopartícula de sílica: não-modificada ou modificada (com BSA ou peptídeos de hemopressina);

- d. Nanopartícula de quitosana (QS): não-modificada ou modificada (com BSA ou peptídeos de hemopressina);
- e. Basal: poços que continham somente células e não receberam nenhum estímulo.

Foram testadas quatro concentrações diferentes (exceto o basal) para cada uma das variáveis acima citadas, em diluição seriada 1:2, especificadas nos resultados em seus respectivos gráficos. Os estímulos foram adicionados 24 horas antes do encerramento do teste, sendo este o período de contato dos mesmos com as células em cultura.

No terceiro e último dia de cada teste, 2 horas antes do encerramento, foram adicionados 10 µL de MTT para cada 100 µL de volume total por poço (0,5 mg/ml), seguida de incubação de 2 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foi removido todo o volume do meio de cultura de cada poço e adicionado a mesma quantidade de DMSO. A placa foi mantida por 10 minutos em ambiente escuro antes da leitura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

O cálculo de viabilidade celular (%) foi realizado de acordo com a fórmula descrita a seguir:

$$Viabilidade (\%) = \frac{(absorbância\ da\ amostra - absorbância\ branco)}{(absorbância\ média\ do\ basal - absorbância\ branco)} \times 100$$

### 3.3. Casuística

Foram incluídos no estudo um grupo controle sem infecção pelo HIV e nenhuma comorbidade. Este grupo foi composto por 8 doadores voluntários. A seleção dos doadores foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da USP ou no Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Além do grupo controle, foram incluídos 4 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, em uso de terapia antirretroviral e com contagem de células T CD4+ a partir de 200 células/mm<sup>3</sup>. Eles foram selecionados a partir da coorte acompanhada no Ambulatório ADEE-3002, do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características dos pacientes que participaram do estudo.

Paciente	Gênero	Idade (em anos)	Contagem de células T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> )	Tempo de CV indetectável (em anos)
P1	Masculino	57	237	10
P2	Masculino	38	266	9
P3	Masculino	57	628	8
P4	Masculino	58	301	16

CV: carga viral

Como fatores de exclusão foram considerados a contagem de células T CD4+ inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, indivíduos menores de 18 anos, gravidez, patologia capaz de promover alterações na resposta imunológica (coinfecções, câncer, etc).

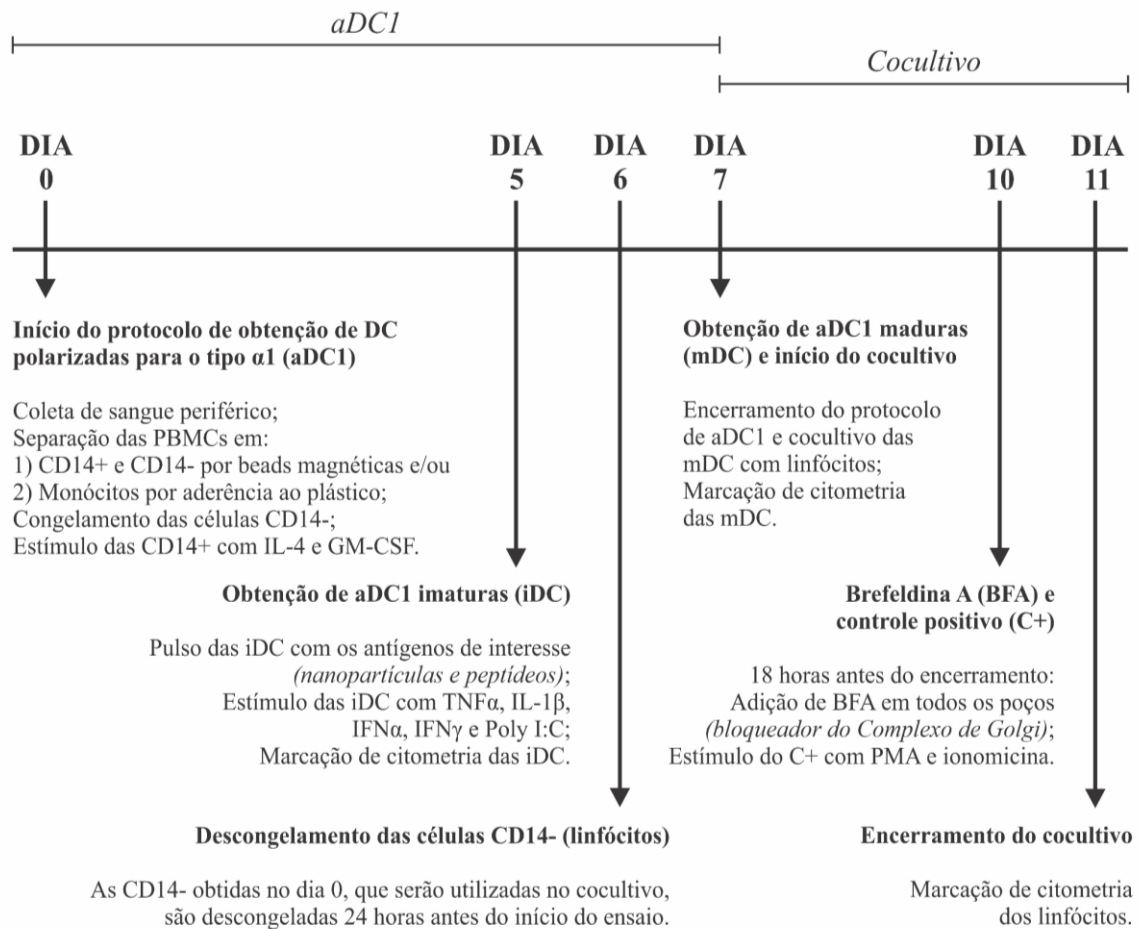
A participação de todos os indivíduos foi voluntária, com assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com a resolução n°. 466/12 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

O projeto está aprovado junto à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq), sob parecer de número 3.586.539 e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) de número 19929019.0.0000.0068.

### 3.4. Obtenção de amostras e fluxo de ensaios

Os voluntários doaram 70 ml de sangue periférico, em tubos contendo heparina ou, no caso do grupo controle, algumas amostras foram oriundas de câmaras de leucoaférese redução (LRS). As células mononucleares de sangue periférico (PBMC), tanto dos indivíduos controles quanto dos pacientes HIV, foram obtidas por meio do gradiente de densidade Ficoll/Hypaque (GE Healthcare). A Figura 3 ilustra um fluxograma das demais etapas que serão descritas a seguir.

**Figura 3.** Fluxograma dos ensaios para obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (aDC1) e cocultivo de aDC1 com linfócitos autólogos.



### 3.5. Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos polarizadas para o tipo $\alpha 1$ (aDC1)

Após obtenção das PBMC conforme citado no tópico anterior, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI (Gibco, Life Technologies), transferidas para placas de cultura de células em uma concentração de  $5,0 \times 10^6$  PBMC/mL, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1h30. Após, as células em suspensão (predominantemente linfócitos) foram descartadas, juntamente com o meio de cultura RPMI. Com as células aderidas (predominantemente monócitos) mantidas, um novo meio de cultura foi adicionado, AIM-V (Gibco, Life Technologies).

Ou então, alternativamente, uma vez obtidas as PBMCs, foi realizada a purificação de células CD14+ (monócitos) por meio de seleção positiva utilizando *beads* magnéticas (Miltenyi Biotec). Após esta etapa, os monócitos foram quantificados e diferenciados em DCs. As células

CD14<sup>-</sup> (predominantemente linfócitos) foram ressuspensas em SFB (Gibco, Life Technologies) contendo 10% de DMSO, e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. Neste caso, para o cultivo de aDC1 foram utilizadas placas de baixa adesão (Corning), conforme preconizado pelo grupo de pesquisa que desenvolveu este protocolo (26). Foram cultivados monócitos a uma concentração de  $10 \times 10^5$  células/ml em meio de cultura AIM-V (Gibco, Life Technologies).

Em ambos protocolos, sobre os monócitos (CD14<sup>+</sup>) foram adicionados, juntamente ao meio de cultura AIM-V (Gibco, Life Technologies), 100 ng/ml de GM-CSF e 200 ng/ml de IL-4 (PeproTech), durante 5 dias, para obtenção das aDC1 imaturas.

Após 5 dias, os monócitos se diferenciam em aDC1 imaturas. Parte destas células imaturas foram pulsadas com nanopartículas (associadas ou não à peptídeos) por diferentes tempos, de 2 a 24 horas, de acordo com as variáveis testadas. Em seguida, as aDC1 imaturas foram estimuladas com um coquetel pró-inflamatório contendo: 25 ng/ml de TNF- $\alpha$  (PeproTech), 10 ng/ml de IL-1 $\beta$  (PeproTech), 20  $\mu$ g/ml de Poly-I:C (Sigma), 1000 UI/ml de IFN- $\alpha$  e 1000 UI/ml de IFN- $\gamma$  (Miltenyi Biotec). As células foram mantidas sob incubação por mais 48 horas (salvo em condição específica, quando indicado no texto) para obtenção de aDC1 maduras.

### 3.6. Peptídeos de HIV

Os peptídeos de HIV utilizados inicialmente para estimular as culturas de aDC1, associadas ou não às nanopartículas de sílica, foram provenientes do *NIH AIDS Reagent Program*. Foram selecionados seis peptídeos dentre os 123 *vials* contemplados no *HIV-1 Consensus B Gag Peptide Set*. A seleção dos peptídeos foi realizada levando em consideração: a solubilidade em água, o ponto isoelétrico (pH) acima de 9,0 e os resultados preliminares de outros trabalhos do nosso grupo (dados não apresentados). As sequências dos peptídeos selecionados fazem parte da região *Gag* do HIV-1, responsável por codificar proteínas do nucleocapsídeo e do core viral (Tabela 2). Para os ensaios, os seis peptídeos foram organizados em dois *pools*, com três peptídeos em cada: o primeiro, contemplando os peptídeos Gag.15, Gag.34 e Gag.35; e o segundo com os três peptídeos da região Gag.27.



**Tabela 2.** Características dos peptídeos de HIV obtidos pelo *NIH AIDS Reagent Program*, utilizados para pulso das aDC1.

Identificação do peptídeo	Sequência do peptídeo	Solubilidade	Nº de resíduos	Peso molecular (g/mol)	Ponto isoelétrico (pH)	
1	Gag.15	PRTLNAWVKVVEEKA	Água	15	1740,01	10,29
2	Gag.27	IRQGPKEPFRDYVDR	Água	15	1876,08	9,74
3	Gag.27	PKEPFRDYVDRFYKT	Água	15	1961,18	9,75
4	Gag.27	FRDYVDRFYKTLRAE	Água	15	1979,20	9,35
5	Gag.34	GHKARVLAEAMSQVT	Água	15	1597,84	10,11
6	Gag.35	SATIMMQRGNFRNQR	Água	15	1810,08	12,40

Nº: número

Em um segundo momento, considerando resultados obtidos com os peptídeos anteriores e tendo havido a oportunidade de se testar peptídeos relevantes, selecionados através de programa preditor em colaboração com a Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pensilvânia, Estados Unidos), os peptídeos inicialmente utilizados foram substituídos pelos peptídeos descritos na Tabela 3. Dessa forma, os peptídeos de HIV que estariam sendo utilizados paralelamente por todo nosso grupo teriam como base o trabalho de Garcia-Bates e colaboradores (2021) (66). Foram utilizados três peptídeos da região Gag do HIV-1: Gag.27, Gag.34 e Gag.35. Também consideramos para a seleção dos peptídeos a solubilidade e ponto isoelétrico (pH) acima de 9,0. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa *GenScript Biotech*.

**Tabela 3.** Características dos peptídeos de HIV sintetizados pela *GenScript Biotech*, utilizados para pulso das aDC1.

Identificação do peptídeo	Sequência do peptídeo	Solubilidade	Nº de resíduos	Peso molecular (g/mol)	Ponto isoelétrico (pH)	
1	Gag.27	QGPKEPFRDYVDRFYKTLRAE	Água	21	2615,89	9,28
2	Gag.34	AEAMSQAQHANIMMQRGNFKG	Ácido acético	21	2320,64	10,18
3	Gag.35	IMMQRGNFKGQKRIKCFNCGK	Ácido acético	21	2488,05	11,07

Nº: número

### 3.7. Caracterização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV

As características das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV, como o tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta, foram determinadas com auxílio do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical), disponível no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Cada leitura foi realizada, no mínimo, em triplicata.

### 3.8. Determinação do perfil fenotípico das aDC1

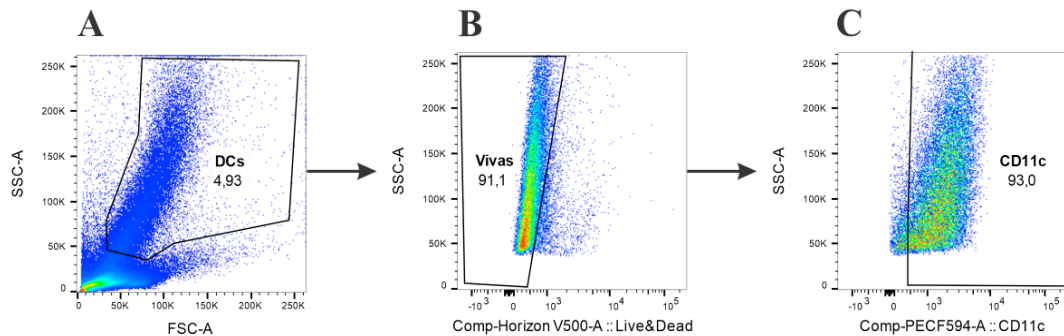
As células aDC1 foram analisadas com relação à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, específicos para a molécula de interesse. Elas foram caracterizadas pelo fenótipo CD11c+ (marcador de DCs mielóides). A expressão de moléculas de superfície foi avaliada por meio de anticorpos monoclonais específicos para: HLA-DR, CD86, CD83, CD80, CD40, CCR7 e CD14 (Tabela 4). Como marcador de viabilidade celular foi utilizado o *Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen™). Adquiriu-se, no mínimo, 10.000 eventos, utilizando o citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD Biosciences). A análise do perfil fenotípico foi realizada segundo características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), excluindo-se a região de linfócitos e células mortas, seguindo as estratégias de *gate* ilustradas na Figura 4. Foi utilizado o software FlowJo™ v10 para a análise.

**Tabela 4.** Relação de anticorpos monoclonais utilizados para caracterização fenotípica das aDC1.

Marcador/ Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Objetivo
Anti-CCR7	V450 PE-Cy7	150503	BD Biosciences	Marcador de migração das DCs para linfonodos.
Anti-CD11c	PE-CF594	B-LY6	BD Biosciences	Marcador de DCs mieloides.
Anti-CD14	PE	M5E2	BD Biosciences	Marcador de linhagem monocítica
Anti-CD40	FITC	5C3	BD Biosciences	Molécula coestimuladora expressa em DCs maduras/ativadas.
Anti-CD83	APC	HB15e	BD Biosciences	Marcador de DCs maduras.
Anti-CD86	PE-Cy7	FUN-1	BD Biosciences	Molécula coestimuladora expressa em altos níveis em DCs maduras.
Anti-CD80	V450	L307.4	BD Biosciences	Molécula coestimuladora expressa em altos níveis em DCs maduras.
Anti-HLA-DR	Alexa Fluor 700	G46-6	BD Biosciences	Molécula responsável pela ligação do antígeno e apresentação ao TCR do linfócito T.
Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	V500	-	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific	Viabilidade celular.

TCR: receptor de linfócito T

**Figura 4.** Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo, utilizada para caracterização fenotípica de aDC1, por meio da expressão de moléculas de superfície.



Nota: Primeiramente seguiu-se o critério de tamanho *versus* granulosidade (FSC-A x SSC-A) para definir a população de aDC1 (A). Em seguida, definimos um *gate* para as células vivas, utilizando a estratégia SSC-A x *Live & Dead* (B) e, por fim, um *gate* para selecionar a população CD11c+ (C). A partir do *gate* das células CD11c+, os demais marcadores de superfície foram estudados. As cores dos gráficos se referem à densidade celular, sendo a área em vermelho a mais densa. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para cada molécula, seguida de aquisição por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortaleza. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

### 3.9. Ensaio de cocultivo de aDC1 e linfócitos autólogos

O objetivo deste ensaio de cocultivo autólogo foi avaliar a capacidade das aDC1 em induzir uma resposta celular específica de linfócitos *in vitro*, por meio da produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4+ e T CD8+. Neste caso, as células CD14- autólogas, predominantemente linfócitos, conservadas por congelamento em nitrogênio (etapa 3.13), foram descongeladas 24 horas antes do início do ensaio e cocultivadas com as aDC1 autólogas, obtidas pelo protocolo anteriormente descrito.

As células CD14- foram cultivadas na proporção 1:5, uma aDC1 ( $4 \times 10^4$  células/poço) para cinco linfócitos ( $20 \times 10^4$  células/poço), em placa de 96 poços (volume total de 200 $\mu$ l), fundo em “U”, por 96 horas, em meio de cultura AIM-V suplementado com 10% de soro AB humano (SAB).

Nas últimas 18 horas do ensaio de cocultivo, foram adicionados 30 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e 300 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich) aos poços de controle positivo (composto somente por linfócitos), além de 20  $\mu$ g/ml de brefeldina A (Sigma-Aldrich) em todos os poços, atuando como bloqueador de complexo de Golgi.

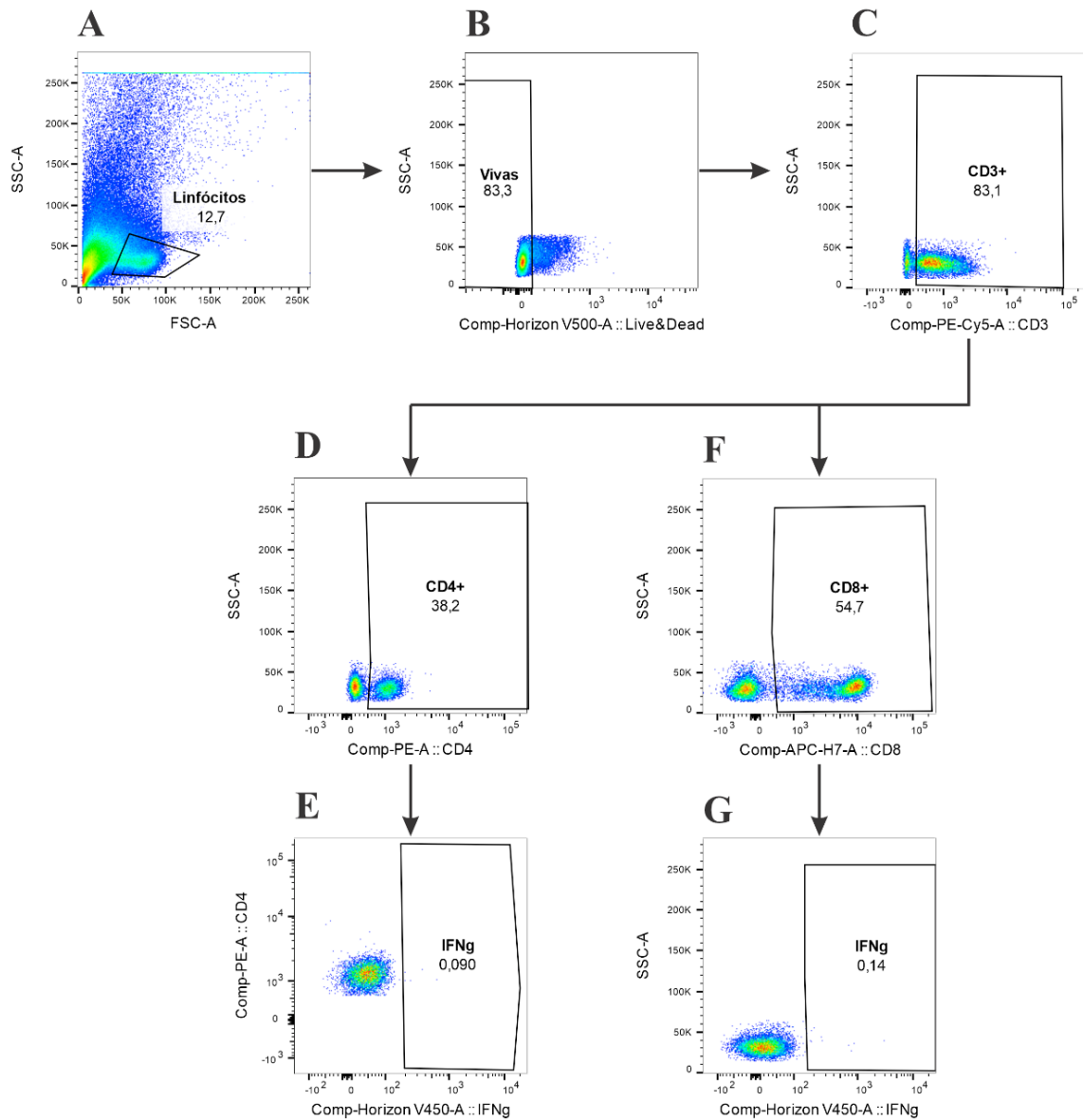
### 3.10. Marcação extracelular e intracelular de linfócitos (cocultivo)

Ao término do cocultivo, as células foram coletadas das placas de cultura e transferidas para tubos de citometria, para início da marcação extracelular. Após, foi adicionado tampão de marcação (PBS contendo 0,2% de BSA) em todos os tubos, seguido de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos (lavagem 1). Para a marcação extracelular, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 (Tabela 5) e, como marcador de viabilidade celular, o Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™). Durante a incubação, as células foram mantidas sob refrigeração a 4°C por 30 minutos, sempre protegidas da luz. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos (lavagem 2), foi adicionada a solução de fixação (BD Cytofix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization Kit), seguida de incubação por 20 minutos a 4°C. Após a terceira lavagem com tampão de marcação, as células foram ressuspensas em solução BD Perm/Wash 1X (BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit) e submetidas à quarta lavagem. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo monoclonal específico para IFN- $\gamma$  (Tabela 5) a 4°C por 30 minutos (marcação intracelular). Posteriormente, os linfócitos foram submetidos a duas centrifugações, novamente com a solução BD Perm/Wash 1X (BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit) (lavagens 5 e 6). Por fim, as células foram ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow (BD Biosciences) e adquiridas no citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD Biosciences) em até 24 horas. A estratégia de análise utilizada para avaliação da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T está ilustrada na Figura 5.

**Tabela 5.** Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T.

<b>Marcador/ Anticorpo monoclonal</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Objetivo</b>
Anti-CD3	PE-Cy5.5	UCHT1	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific	Marcador de células T
Anti-CD4	PE	RPA-T4	BD Biosciences	Marcador de células T CD4
Anti-CD8	APC-H7	SK1	BD Biosciences	Marcador de células T CD8
Anti-IFN- $\gamma$	V450	B27	BD Biosciences	Marcador intracelular de células que expressam IFN- $\gamma$
Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	V500	-	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific	Viabilidade celular

**Figura 5.** Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo, utilizada para avaliar a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T.



Nota: Primeiramente seguiu-se o critério de tamanho *versus* granulosidade (FSC-A x SSC-A) para definir a população de linfócitos (A). Em seguida, definimos um *gate* para as células vivas, utilizando a estratégia SSC-A *versus* Live & Dead (B) e um posterior *gate* para selecionar a população CD3+ (C). A partir das células CD3+, foram definidos os *gates* referentes às células CD4+ (D) e CD8+ (F) e, por fim, a produção de IFN $\gamma$  oriunda de cada uma dessas populações: IFN $\gamma$  produzido por CD4+ (E) e IFN $\gamma$  produzido por CD8+ (G). As cores dos gráficos se referem à densidade celular, sendo a área em vermelho a mais densa. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para cada molécula, seguida de aquisição por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortessa. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

### 3.11. Imunofluorescência

As aDC1 foram cultivadas em placas de cultura celular de 24 poços, sobre lamínulas de vidro (*coverslips*) de 12 mm de diâmetro, em uma concentração de  $1,25 \times 10^5$  por poço ( $2,5 \times 10^5$  células/ml). Os tempos e as concentrações de estímulos e nanopartículas adicionados à cultura de células seguem o protocolo de obtenção de aDC1. Obtidas as células, ainda na placa, as lamínulas foram cuidadosamente lavadas em PBS 1X, seguidas pela etapa de fixação (tampão de fixação com 3,7% de formaldeído) por 15 minutos, sob abrigo da luz. Após fixação, as lamínulas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de saponina). Em seguida, as células receberam o tampão de bloqueio (PBS + 2,5% BSA + 0,1% de saponina) por 1 hora, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após etapa de bloqueio, as lamínulas foram lavadas com o tampão de lavagem antes de receberem 1  $\mu\text{g/ml}$  do marcador nuclear, DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol, Biolegend), por 5 minutos, também em temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, as lamínulas foram lavadas antes de prosseguirem para a montagem das lâminas. Com auxílio de uma pinça de ponta fina, as lamínulas foram dispostas sob 4  $\mu\text{l}$  do meio de montagem (ProLong™ Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher), no qual o lado contendo as aDC1 ficassem em contato com o meio de montagem e a lâmina. Todas as etapas de marcação para imunofluorescência foram realizadas no Laboratório de Imunogenética, no Instituto de Ciências Biomédicas IV (ICB-IV) da Universidade de São Paulo (USP). As lâminas foram analisadas no microscópio invertido de fluorescência Axio Vert A1 (Zeiss), equipado com a câmera AxioCam ICm1 (Zeiss), localizado no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP), no campus da Universidade de São Paulo (USP). As imagens adquiridas foram analisadas com auxílio do software ImageJ (v.1.54f, *National Institutes of Health*).

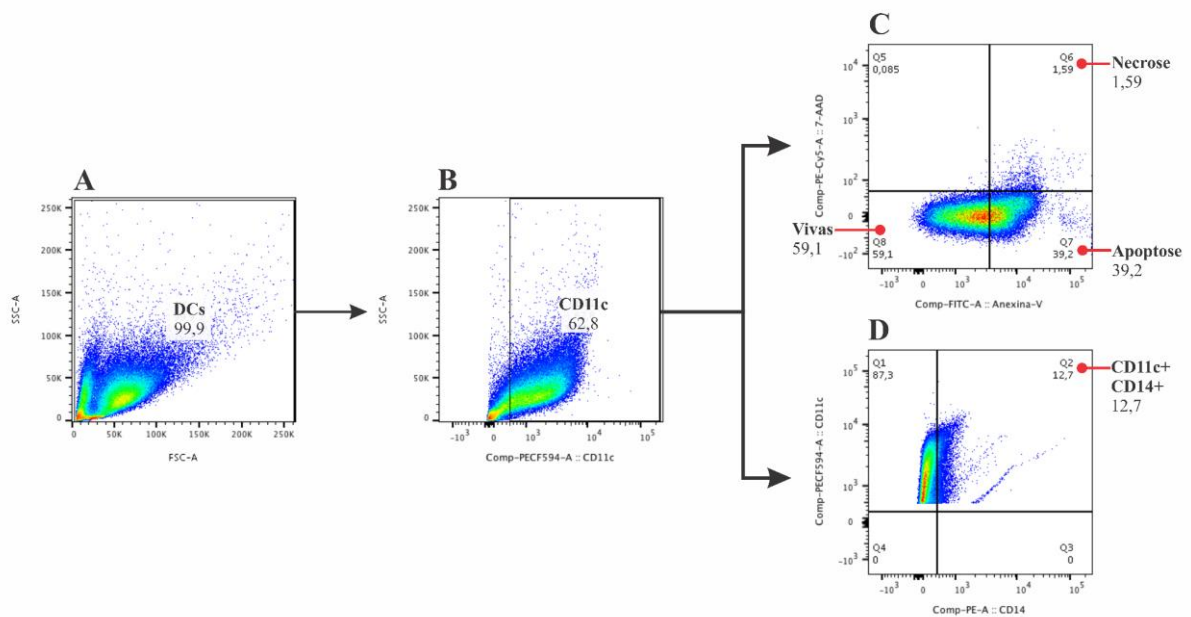
### 3.12. Teste de apoptose

Com o intuito de avaliar o possível efeito das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV em relação ao processo de apoptose das aDC1, realizamos o teste de apoptose utilizando Anexina-V marcada com FITC (BD Biosciences), e o corante 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). A Anexina-V foi utilizada para monitorar células apoptóticas devido à sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, presente na bicamada lipídica da membrana celular. A fosfatidilserina, em uma célula íntegra e sadia, encontra-se do lado interno da célula. Uma vez que a célula entra em processo de apoptose, a fosfatidilserina passa a se localizar do lado externo da célula, sendo possível sua marcação pela Anexina-V. Já o 7-AAD



é um corante de ácidos nucleicos, sendo utilizado para marcar células não-viáveis (necróticas), uma vez que estas células não possuem uma membrana celular íntegra. Após a marcação, as células foram adquiridas no citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD Biosciences) em até 1 hora. A estratégia de análise utilizada para avaliação da apoptose das aDC1 está ilustrada na Figura 6.

**Figura 6.** Representação da estratégia de análise de dados adquiridos por citometria de fluxo para avaliação da apoptose de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica.



Nota: Primeiramente seguiu-se o critério de tamanho *versus* granulosidade (FSC-A x SSC-A) para seleção da população de DCs (A). Em seguida, definimos um *gate* para as células CD11c+, utilizando a estratégia SSC-A x CD11c (B). A partir das células CD11c+ foram definidos os quadrantes referentes às células vivas, em apoptose e em necrose (C), e também as células CD11c+ que expressaram CD14 em sua superfície (D). As cores dos gráficos se referem à densidade celular, sendo a área em vermelho a mais densa. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos, seguida de aquisição por meio do citômetro de fluxo BD LRS Fortessa. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.

### 3.13. Congelamento e descongelamento de células

Para congelamento, as células CD14- foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspensado em quantidade de SFB para que a concentração fosse de  $2 \times 10^7$  células/ml. Em seguida, uma solução de congelamento (SFB contendo 20% de DMSO) foi gotejado à suspensão celular, sob banho de gelo. A concentração final de DMSO deve ser de 10%. O material foi transferido para tubos de criopreservação e os tubos foram acondicionados em dispositivo para congelamento com redução gradual de temperatura,  $-1^\circ\text{C}/\text{minuto}$  (Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo

Fisher). Após, a caixa foi transferida para freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e, após 24 horas, os tubos foram transferidos para *container* de nitrogênio líquido.

Para descongelamento, o tubo criogênico contendo as células foi parcialmente descongelado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, seu conteúdo foi transferido para tubo contendo solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% estéril. As células foram lavadas duas vezes para remoção completa do DMSO, ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SAB, e mantidas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  até o momento do uso.

### **3.14. Análise de resultados**

A análise estatística e a elaboração dos gráficos foram realizadas no software Prism 8.3.0 (GraphPad Software, Inc). As variáveis numéricas foram avaliadas quanto às diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Quando aplicável, os resultados foram expressos pela mediana. Foi considerado um p-valor inferior a 0,05 para significância estatística.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana (QS) e sílica sobre a viabilidade em células de linhagem**

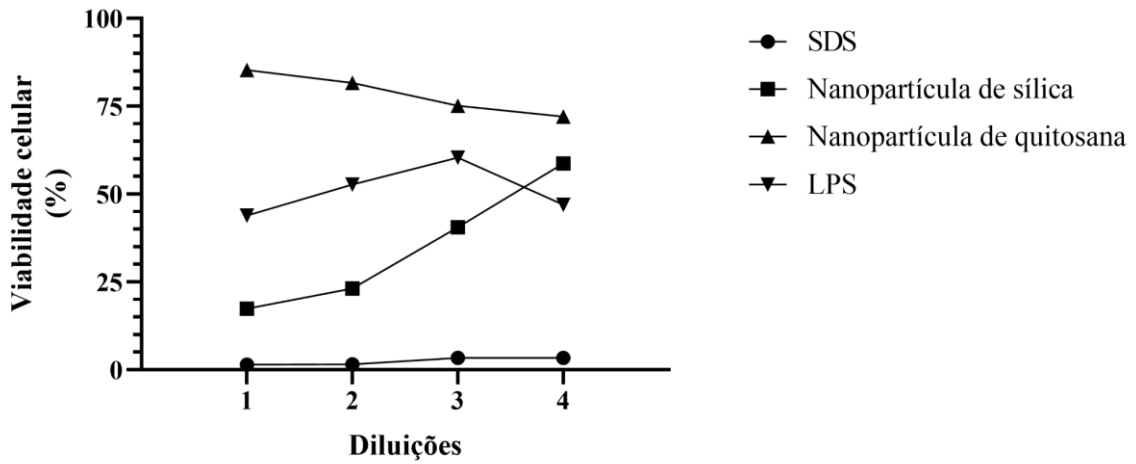
#### **4.1.1. Nanopartículas de quitosana (QS) e sílica**

Para fins de padronização e na tentativa de definir concentrações de nanopartículas que não interferissem na viabilidade celular, inicialmente testamos o efeito de nanopartículas de QS e sílica sobre a viabilidade de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7, por meio do ensaio de MTT. Os controles do ensaio foram compostos por células na presença de SDS (controle negativo da viabilidade celular) e LPS (controle positivo, indutor de ativação celular).

Tanto as nanopartículas de QS quanto as de sílica foram testadas seguindo a diluição 1:2, sendo que a concentração inicial variou entre 2000 e 250  $\mu\text{g/ml}$  para as nanopartículas de QS, enquanto que a nanopartícula de sílica foi de 250 a 31,25  $\mu\text{g/ml}$ . Salientamos que neste ensaio as nanopartículas ainda não estavam associadas a antígenos.

A Figura 7 representa os resultados obtidos. Com relação à nanopartícula de QS, observamos um leve declínio nos percentuais de viabilidade celular à medida que as nanopartículas são diluídas, ao contrário das nanopartículas de sílica, que promoveram menores níveis de viabilidade nas maiores concentrações. Ainda assim, mesmo na menor diluição observamos que esta nanopartícula ainda apresenta toxicidade, levando a percentuais de viabilidade de aproximadamente 60%, considerados baixos para uma cultura celular.

**Figura 7.** Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica sobre a viabilidade em células de linhagem.



Nota: Células de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram submetidas ao teste de viabilidade celular (MTT) após tratamento com nanopartículas de sílica ou quitosana. Neste ensaio, as nanopartículas utilizadas não estavam modificadas com antígenos. Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle negativo para viabilidade e o lipopolissacarídeo (LPS) como indutor de ativação celular. Diluições: SDS (1) 5%, (2) 2,5%, (3) 1,25%, (4) 0,625%; Nanopartícula de sílica (1) 250 µg/ml, (2) 125 µg/ml, (3) 62,5 µg/ml, (4) 31,25 µg/ml; Nanopartícula de quitosana (1) 2000 µg/ml, (2) 1000 µg/ml, (3) 500 µg/ml, (4) 250 µg/ml; LPS (1) 1 µg/ml, (2) 0,5 µg/ml, (3) 0,25 µg/ml, (4) 0,125 µg/ml. Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células RAW 264.7 por poço ( $1,6 \times 10^6$  células/ml), em placas de cultura de 24 poços. O tempo de contato entre os estímulos e as células em cultura foi de 24 horas.

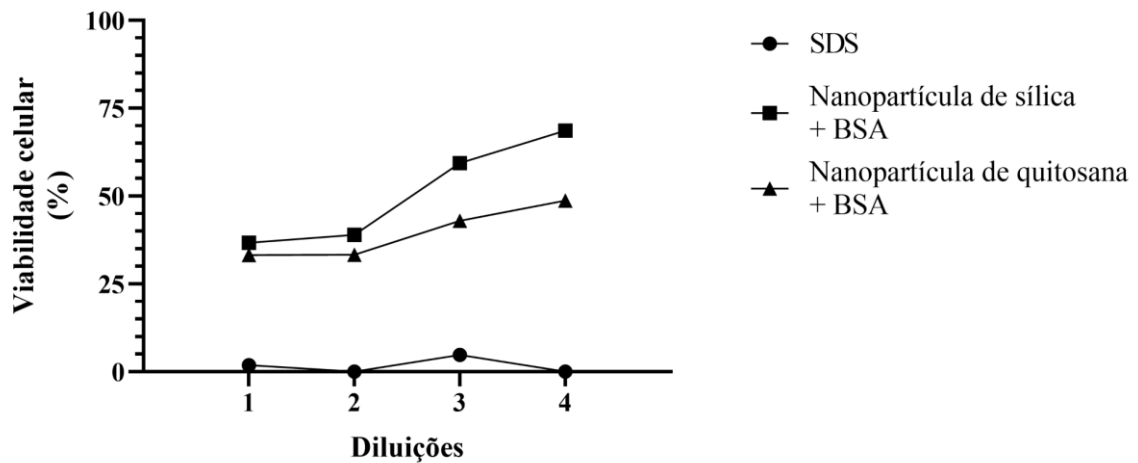
#### **4.1.2. Nanopartículas de QS e sílica conjugadas à proteína**

Em seguida, associamos as nanopartículas à proteína BSA, no intuito de simular a conjugação antigênica, para estudar o efeito do produto sobre a viabilidade celular.

Este teste preliminar seguiu um protocolo já estabelecido no Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), com nanopartículas de QS associadas ao BSA. Para a formação das nanopartículas de QS associadas ao BSA, a solução de TPP a 1 mg/ml foi associada a 500 µg/ml de BSA, assim como para as nanopartículas de sílica, no qual a proporção foi de 1 mg/ml para 500 µg/ml da proteína, de acordo com cálculos previamente realizados.

Diferentemente dos testes anteriores, a nanopartícula de sílica associada ao BSA apresentou uma viabilidade celular superior quando comparada aos resultados da nanopartícula de QS. As duas últimas diluições de nanopartículas de sílica, 25 e 12,5 µg/ml, apresentaram 59,4% e 68,7% de viabilidade celular, respectivamente. Embora os resultados da nanopartícula de QS acompanhem a tendência da outra nanopartícula, todos as diluições para QS apresentaram viabilidade celular inferior a 50% (Figura 8).

**Figura 8.** Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas à albumina sérica bovina (BSA), sobre a viabilidade em células de linhagem.



Nota: Células de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram submetidas ao teste de viabilidade celular (MTT) após tratamento com nanopartículas de sílica ou quitosana. Neste ensaio, as nanopartículas utilizadas estavam modificadas com BSA. Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle negativo para viabilidade celular. Diluições: SDS (1) 5%, (2) 2,5%, (3) 1,25%, (4) 0,625%; Nanopartícula de sílica com BSA (1) 100 µg/ml, (2) 50 µg/ml, (3) 25 µg/ml, (4) 12,5 µg/ml; Nanopartícula de quitosana com BSA (1) 2000 µg/ml, (2) 1000 µg/ml, (3) 500 µg/ml, (4) 250 µg/ml. Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células RAW 264.7 por poço ( $1,6 \times 10^6$  células/ml), em placas de cultura de 24 poços. O tempo de contato entre os estímulos e células em cultura foi de 24 horas.

Cabe ressaltar que, inicialmente, tanto as nanopartículas de QS quanto as de sílica seriam conjugadas às partículas de HIV-1 inativadas por Aldrithiol-2 (2,2'-Dipyridyldisulfide, AT-2), que seria o antígeno para pulso de DCs, até então utilizado por nosso grupo. Entretanto, devido a questões de biossegurança e infraestrutura, o antígeno acabou por ser substituído, posteriormente, por peptídeos da região Gag do HIV-1 (Tabela 2). Esta decisão foi decorrente da pandemia da COVID-19, no qual muitos trabalhos relacionados ao SARS-CoV-2 estavam em pleno desenvolvimento e, devido a isso, perdemos o acesso ao laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3), necessário para a realização de culturas de expansão viral. Por essa razão, optamos por não dar segmento à expansão e inativação do HIV e propusemos a troca da partícula viral por peptídeos do HIV.

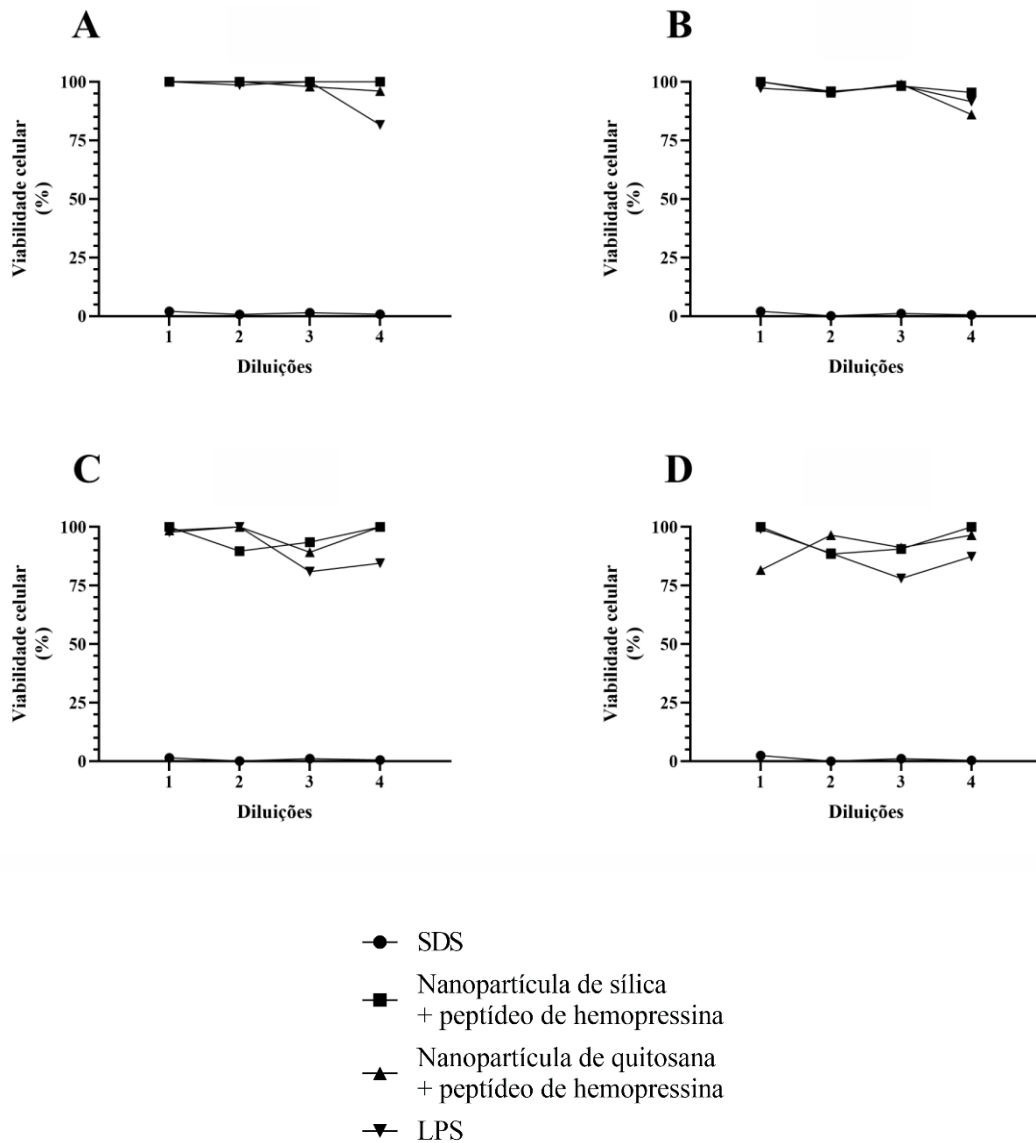
#### 4.1.3. Nanopartículas de QS e sílica conjugadas à peptídeo

Uma vez definido que trocaríamos as partículas virais inativadas por peptídeos de HIV, para fins de padronização, simulamos a condição de associar nanopartículas a peptídeos de hemopressina (1088,25 g/mol), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Para a formação das nanopartículas de QS associadas aos peptídeos de hemopressina, a solução de TPP a 1 mg/ml foi associada a 3,2 µg/ml de peptídeos de hemopressina. Já para as nanopartículas de sílica, a proporção foi de 1 mg/ml para 2,4 µg/ml de peptídeos.

Neste teste foram avaliados diferentes tempos de incubação: 2, 4, 18 e 24 horas (Figura 9). As concentrações de nanopartículas para cada variável se mantiveram idênticas ao teste anterior (Figura 8), sendo alterada somente a quantidade de células de  $1 \times 10^6$  células por poço ( $1,6 \times 10^6$  células/ml) para  $4,5 \times 10^5$  células por poço ( $7,5 \times 10^5$  células/ml), uma vez que desconfiamos que a confluência de células na superfície de cada poço da placa de cultura pudesse estar interferindo no desempenho do teste. Sendo assim, optamos por reduzir a densidade celular. Cabe ressaltar que as concentrações descritas se referem às nanopartículas e não à somatória delas com BSA ou peptídeos.

Para este ensaio, de modo geral, observamos valores de viabilidade acima de 75%, superiores aos observados nos ensaios anteriores, fato possivelmente atribuído a uma concentração mais ajustada de células e a associação das partículas ao peptídeo. Observamos que tanto as nanopartículas de QS quanto as de sílica promoveram perfis similares de viabilidade celular em cada tempo testado.

**Figura 9.** Avaliação do efeito de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas ao peptídeo de hemopressina, em diferentes tempos de estímulo, sobre a viabilidade de células de linhagem.

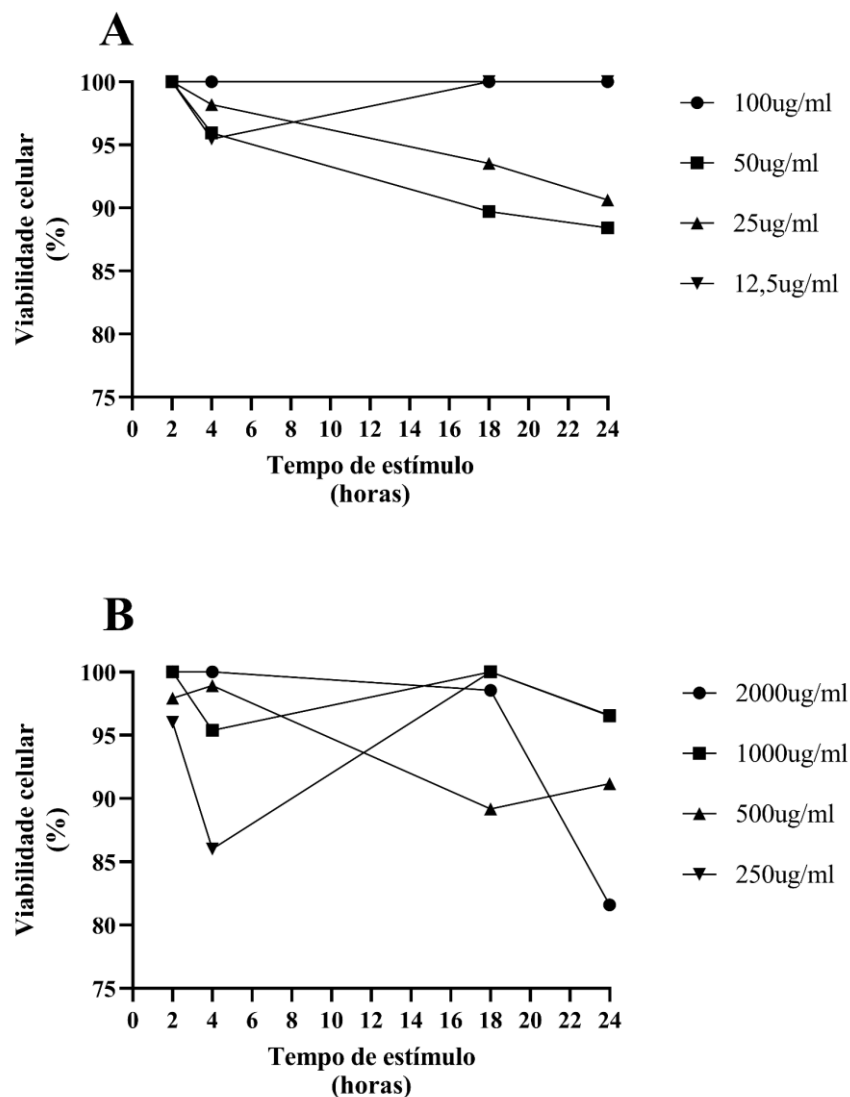


Nota: Neste ensaio, foram testados 4 diferentes tempos de contato entre os estímulos e células em cultura: 2, 4, 18 e 24 horas (A, B, C e D, respectivamente). Células de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram submetidas ao teste de viabilidade celular (MTT) após tratamento com nanopartículas de sílica e quitosana. As nanopartículas utilizadas estavam modificadas com peptídeos de hemopressina. Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como controle negativo para viabilidade e lipopolissacarídeo (LPS) como indutor de ativação celular. Diluições: SDS (1) 5%, (2) 2,5%, (3) 1,25%, (4) 0,625%; Nanopartícula de sílica com peptídeos de hemopressina (1) 100 µg/ml, (2) 50 µg/ml, (3) 25 µg/ml, (4) 12,5 µg/ml; Nanopartícula de quitosana com peptídeos de hemopressina (1) 2000 µg/ml, (2) 1000 µg/ml, (3) 500 µg/ml, (4) 250 µg/ml; LPS (1) 1 µg/ml, (2) 0,5 µg/ml, (3) 0,25 µg/ml, (4) 0,125 µg/ml. Foram plaqueadas  $4,5 \times 10^5$  células RAW 264.7 por poço ( $7,5 \times 10^5$  células/ml), em placas de cultura de 24 poços.



Além disso, analisamos as nanopartículas separadamente em relação às suas respectivas diluições e tempos de estímulo (Figura 10). A viabilidade celular em ambos os gráficos foi satisfatória, os resultados obtidos, tanto com a nanopartícula de sílica (Figura 10A) quanto a de QS (Figura 10B), ficaram acima de 80%, independentemente das concentrações de partículas testadas.

**Figura 10.** Cinética do efeito de diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana ou sílica, associadas ao peptídeo de hemopressina sobre a viabilidade de células de linhagem.



Nota: Dados referentes ao teste de viabilidade celular por MTT, no qual foram testados 4 diferentes tempos de contato entre os estímulos e células em cultura: 2, 4, 18 e 24 horas. Células de macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram submetidas ao teste de viabilidade após tratamento com nanopartículas de sílica (A) ou quitosana (B). As concentrações descritas se referem às nanopartículas e não à somatória delas aos peptídeos. Foram plaqueadas  $4,5 \times 10^5$  células RAW 264.7 por poço ( $7,5 \times 10^5$  células/ml), em placas de cultura de 24 poços.

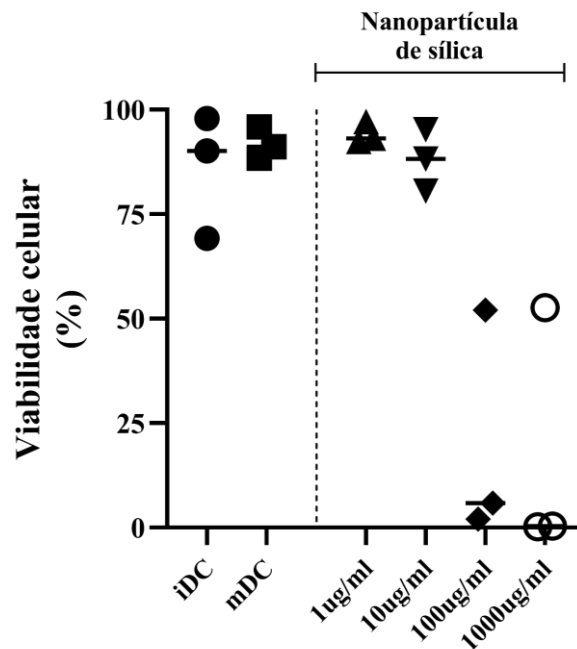
Devido às dificuldades na reprodutibilidade das nanopartículas de QS, bem como a impossibilidade de sua produção em condição estéril, tornou-se inviável a continuidade dos trabalhos com esta nanopartícula. Dentre os principais motivos está a instabilidade em meio neutro, uma vez que sua produção é realizada em meio ácido (pH=5,5) para que a partícula tenha carga positiva (pKa=6,5). Neste caso, mesmo após centrifugação e suspensão das partículas, o meio ácido é danoso à viabilidade celular. Ainda, esta instabilidade acarreta em um curto prazo de validade (inferior a 7 dias), inviabilizando o uso de um mesmo lote em diferentes ensaios. Cogitou-se o processo de liofilização, mas além do alto rigor técnico e tempo necessário para o desenvolvimento de um protocolo, a solubilização do material liofilizado se daria em meio ácido. Diante disso, na ausência de constância e reprodutibilidade na produção das nanopartículas de QS, optamos por dar continuidade aos ensaios somente com as nanopartículas de sílica, tornando-se, assim, nossa partícula de estudo. Desta forma, os ensaios subsequentes foram realizados avaliando somente as nanopartículas de sílica. Além disso, considerando que células humanas diferenciadas *in vitro* podem apresentar atividade biológica diferente de linhagens celulares imortalizadas, os ensaios passaram a ser realizados com as aDC1, que são as células de interesse de nosso estudo.

#### **4.2. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica sobre a viabilidade celular e perfil fenotípico de células dendríticas aDC1**

Para fins de padronização, avaliamos o efeito de diferentes concentrações das nanopartículas de sílica, quais sejam 1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml, sobre a viabilidade das aDC1. Para este ensaio passamos a monitorar a viabilidade utilizando corantes vitais e analisando as amostras por meio da citometria de fluxo.

Os resultados indicaram que nas condições testadas, concentrações crescentes de nanopartículas de sílica promoveram redução na viabilidade celular (Figura 11). Isto é, quando observamos as aDC1 que receberam as concentrações de 1 e 10 µg/ml de nanopartículas de sílica, notamos a similaridade destes achados aos controles (DCs imaturas e maduras, respectivamente, iDC e mDC), que correspondem às células que não receberam as nanopartículas. Diferentemente, nas concentrações de 100 e 1000 µg/ml de nanopartículas de sílica, percebemos a redução na viabilidade celular quando comparadas às menores concentrações de pulso e aos controles.

**Figura 11.** Avaliação da viabilidade das aDC1 pulsadas com diferentes concentrações de nanopartículas de sílica não associadas a antígenos (1, 10, 100 e 1000 µg/ml).



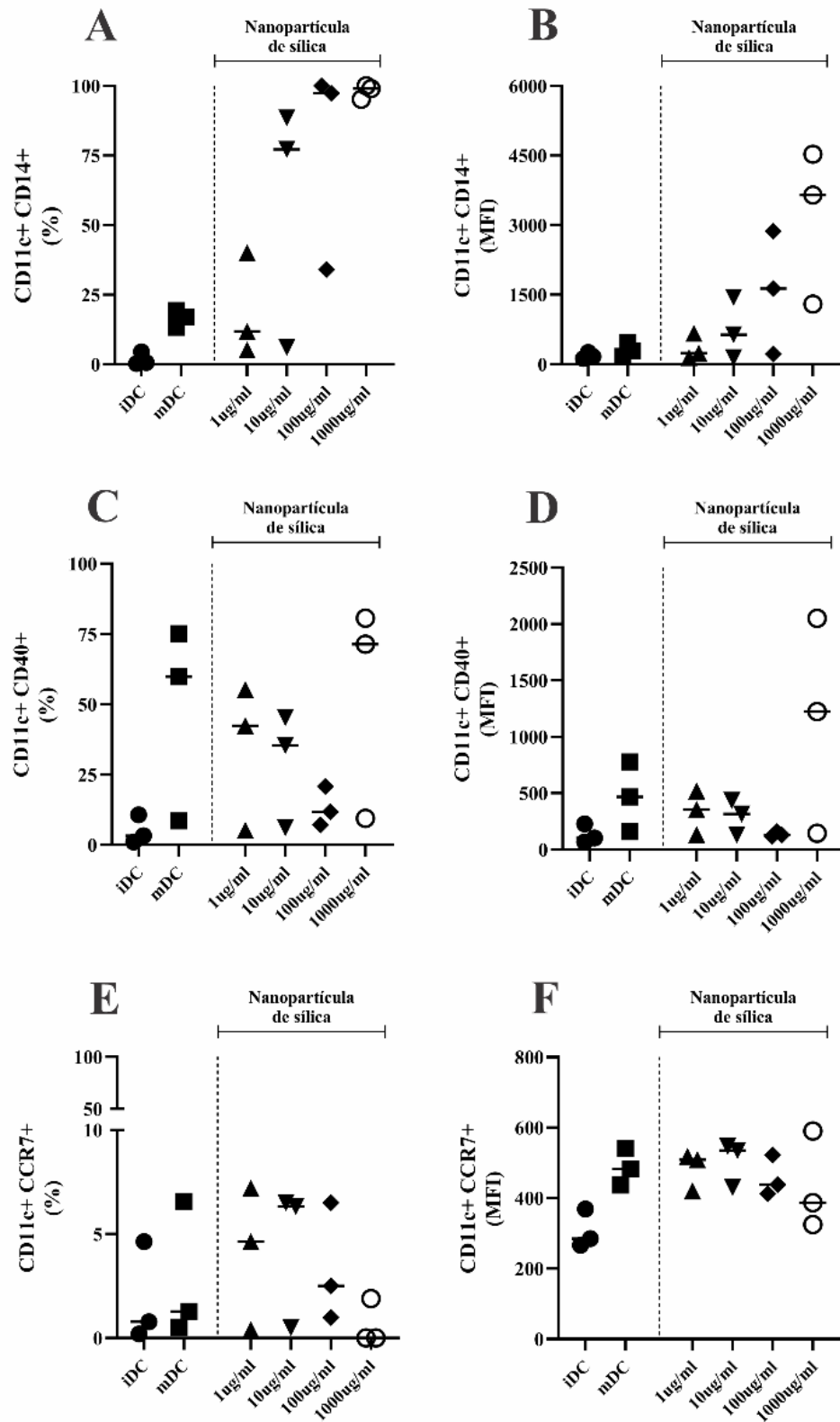
Nota: As células foram avaliadas pelo marcador Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™), por citometria de fluxo. iDC: células dendríticas imaturas sem pulso de nanopartícula de sílica; mDC: células dendríticas maduras sem pulso de nanopartícula de sílica. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=3.

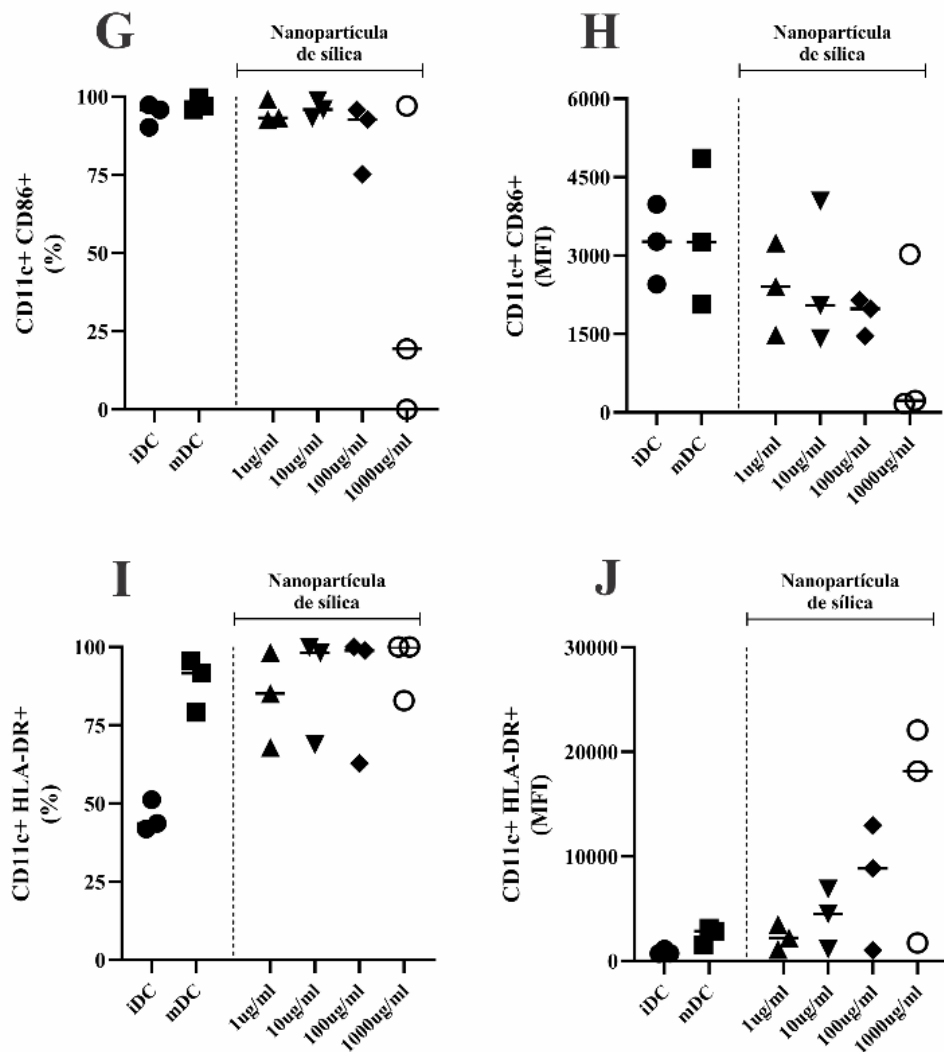
Para a caracterização do perfil fenotípico das aDC1, cultivadas na presença de diferentes concentrações de nanopartículas de sílica e ativadas com citocinas pró inflamatórias, a análise dos marcadores de superfície CD14, CD40, CCR7, CD86 e HLA-DR foi realizada dentre a população de células vivas expressando a molécula CD11c (Figura 4). Neste sentido, vale ressaltar que a viabilidade das culturas na presença de 100 e 1000 µg/mL de nanopartículas de sílica apresentaram-se muito baixas (Figura 11). Assim, embora a análise tenha sido realizada levando em conta somente a população de células vivas, o número pequeno de eventos obtidos na aquisição de dados de citometria pode comprometer os resultados apresentados, que deste modo devem ser considerados com cautela.

Chama a atenção o perfil observado para a expressão da molécula CD14. Trata-se de uma molécula expressa por monócitos e que é perdida à medida que os monócitos são diferenciados em DCs, como observado pelos baixos níveis de expressão pelas iDC e mDC. Por outro lado, observamos que a presença de nanopartículas de sílica levou a um aumento na expressão de CD14 nas concentrações a partir de 10 µg/mL, o que foi um achado inesperado, considerando que os monócitos já tinham se diferenciado em DCs (Figura 12A).

Por sua vez, com relação às demais moléculas analisadas, quais sejam CD40 e CD86 (moléculas coestimuladoras), CCR7 (molécula relacionada à migração celular) e HLA-DR (molécula relacionada à apresentação antigênica), não observamos diferenças relevantes entre as culturas de aDC1 maduras na presença ou não de nanopartículas de sílica, nas concentrações testadas, sugerindo que as nanopartículas não interferem na expressão destas moléculas nestas condições (Figura 12).

**Figura 12.** Análise fenotípica de aDC1 incubadas com concentrações diferentes de nanopartículas de sílica, não associadas a antígenos (1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).





Nota: Os controles foram compostos por aDC1 imaturas e aDC1 maduras não incubadas com nanopartículas. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície e avaliadas por citometria de fluxo. As moléculas analisadas foram: CD14 (A)(B); CD40 (C)(D); CCR7 (E)(F); CD86 (G)(H); HLA-DR (I)(J). Os resultados estão representados em porcentagem de células vivas que expressam cada marcador (gráficos à esquerda), e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) de cada marcador na superfície das células (gráficos à direita). iDC: células dendríticas imaturas sem pulso de nanopartícula de sílica, somente citocinas para diferenciação (de monócitos para DCs); mDC: células dendríticas maduras sem pulso de nanopartícula de sílica, somente citocinas de ativação (de iDC para mDC). O gráfico representa as medianas de cada variável. N=3.

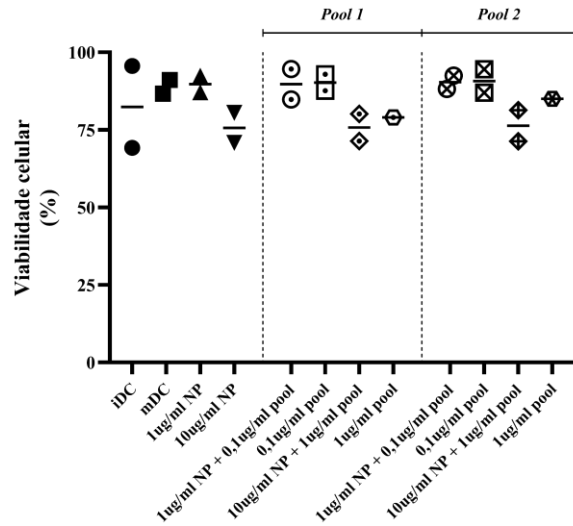
Em conjunto, os resultados obtidos mostram que a presença de nanopartículas de sílica em concentração igual ou superior a 100 µg/ml compromete a viabilidade das aDC1. Por sua vez, as concentrações de 1 e 10 µg/mL não alteraram a viabilidade celular nem interferiram na expressão das moléculas CD40, CCR7, CD86 e HLA-DR, entretanto, inesperadamente, a expressão de CD14 foi aumentada pela presença das nanopartículas.

#### **4.3. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica associadas a peptídeos de HIV sobre a viabilidade celular e perfil fenotípico de células dendríticas aDC1**

Uma vez que a proporção calculada entre as nanopartículas e os peptídeos foi de 10:1, duas concentrações de nanopartículas foram testadas: 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , associadas a 0,1 e 1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos, respectivamente.

Desta forma, nas Figuras 13 e 14 estão representados os achados referentes respectivamente à viabilidade celular e à análise fenotípica de aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ), conjugadas a dois *pools* de peptídeos de HIV (*pool* 1 e *pool* 2). A viabilidade celular observada para todas as variáveis testadas foi considerada satisfatória ( $> 75\%$ ), embora tenhamos observado que as culturas pulsadas com a concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  de sílica apresentaram valores de mediana inferiores, comparada às culturas pulsadas com 1  $\mu\text{g/ml}$ . Por sua vez, observamos que não houve diferença nos níveis de viabilidade celular entre os dois *pools* testados, que apresentaram resultados bastante similares (Figura 13).

**Figura 13.** Avaliação da viabilidade das aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e dois *pools* de peptídeos de HIV (*pool* 1 e *pool* 2).



Nota: Para conjugação das nanopartículas aos *pools* de peptídeos, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 1  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartícula de sílica foi associada à 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos, e 10  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas receberam 1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos. Os controles foram constituídos por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas por nanopartículas não-associadas a *pool* de peptídeos; e por fim, aDC1 pulsadas por *pool* de peptídeos não-associados a nanopartículas. As células foram avaliadas pelo marcador Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™), por citometria de fluxo. iDC: células dendríticas imaturas; mDC: células dendríticas maduras; NP: nanopartícula. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2.

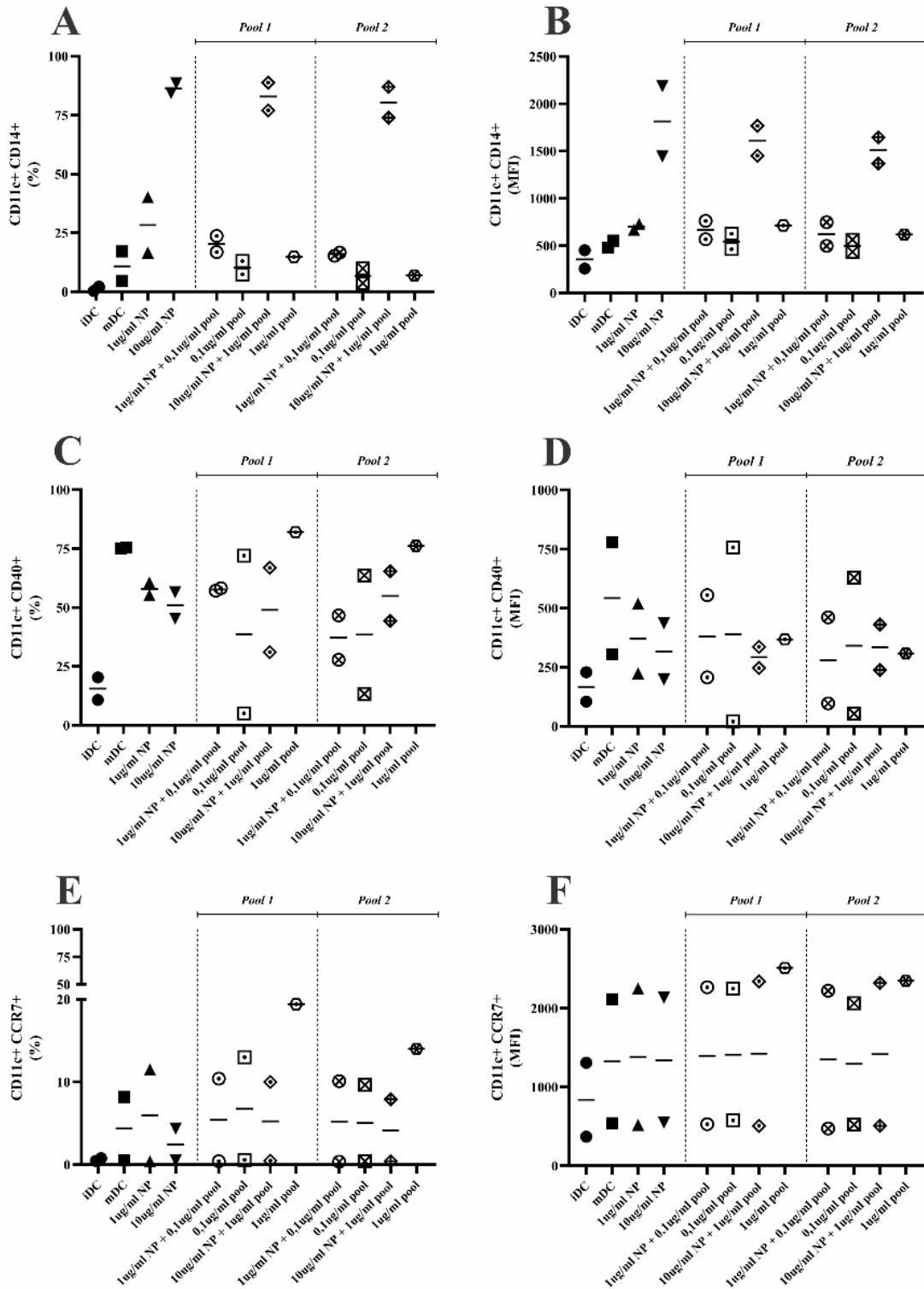
Em relação perfil fenotípico, da mesma forma que observado com relação a viabilidade, não notamos diferenças relevantes entre os *pools* testados com relação ao percentual de células nem com relação à intensidade de expressão (MFI) de cada marcador (Figura 14).

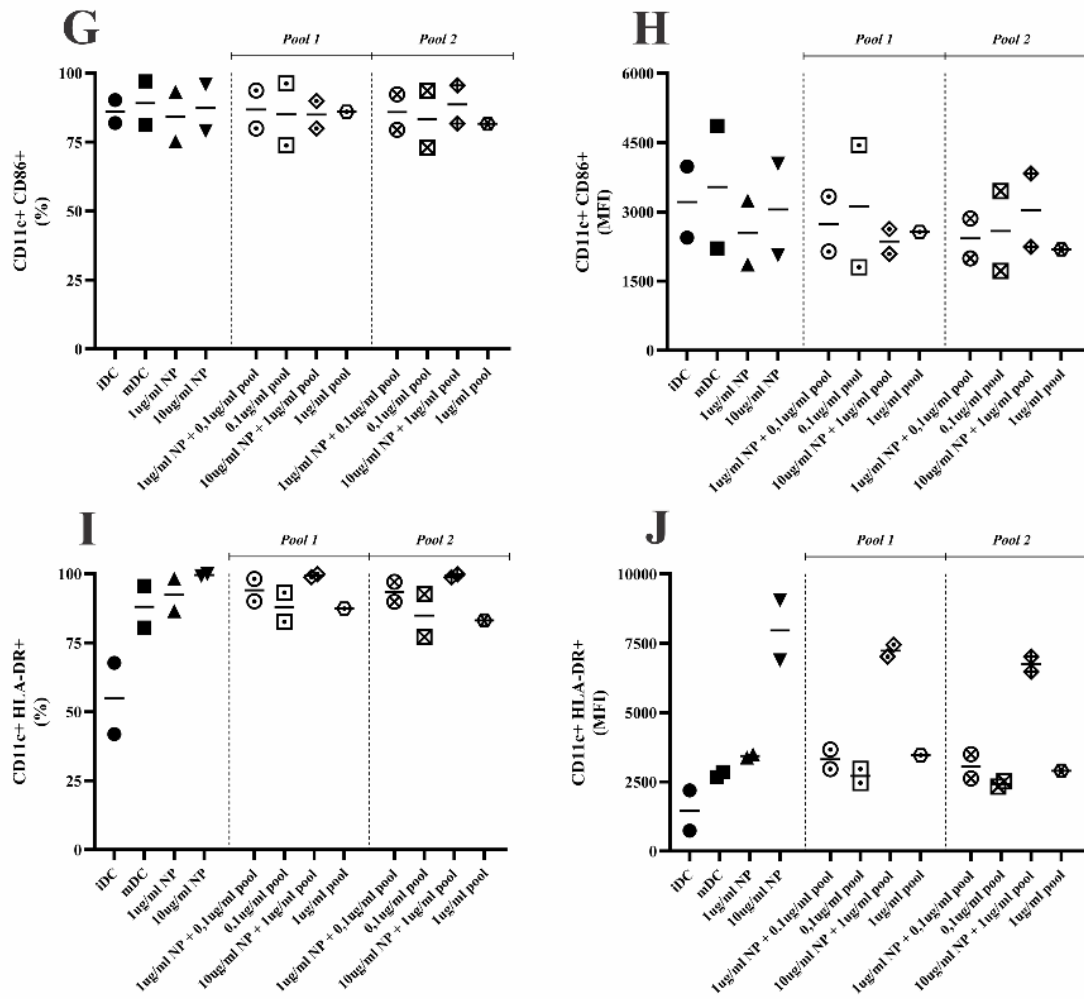
Por outro lado, diferentemente dos ensaios anteriores, neste teste foi possível avaliar a ação dos *pools* de peptídeos no pulso das aDC1, associados ou não às nanopartículas. Tendo como exemplo o marcador CD14, as variáveis que receberam as nanopartículas na concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$ , independentemente da conjugação ao *pool*, expressaram muito mais este marcador quando comparadas aos controles (iDC e mDC), àquelas aDC1 que não receberam as nanopartículas (Figura 14A).

Entretanto, considerando a proporção 10:1 sílica:peptídeo, uma menor concentração de nanopartícula implica em uma concentração de apenas 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos conjugados à sílica. Diante deste cenário, indagamos se esta quantidade de peptídeos seria capaz de desencadear uma resposta imune específica ao HIV.



**Figura 14.** Análise fenotípica de aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e dois *pools* de peptídeos de HIV (*pool 1* e *pool 2*).





Nota: Para conjugação das nanopartículas aos *pools* de peptídeos, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 1 µg/ml de nanopartícula de sílica foi associada à 0,1 µg/ml de *pool* de peptídeos, e 10 µg/ml de nanopartículas receberam 1 µg/ml de *pool* de peptídeos. Os controles foram constituídos por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas por nanopartículas não-associadas a *pool* de peptídeos; e por fim, aDC1 pulsadas por *pool* de peptídeos não-associados a nanopartículas. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície e avaliadas por citometria de fluxo. As moléculas analisadas foram: CD14 (A)(B); CD40 (C)(D); CCR7 (E)(F); CD86 (G)(H); HLA-DR (I)(J). Os resultados estão representados em porcentagem de células vivas que expressam cada marcador (gráficos à esquerda), e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) de cada marcador na superfície das células (gráficos à direita). Cada *pool* de peptídeos foi composto por três peptídeos de HIV, todos da região *Gag* do vírus. NP: nanopartícula. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2.

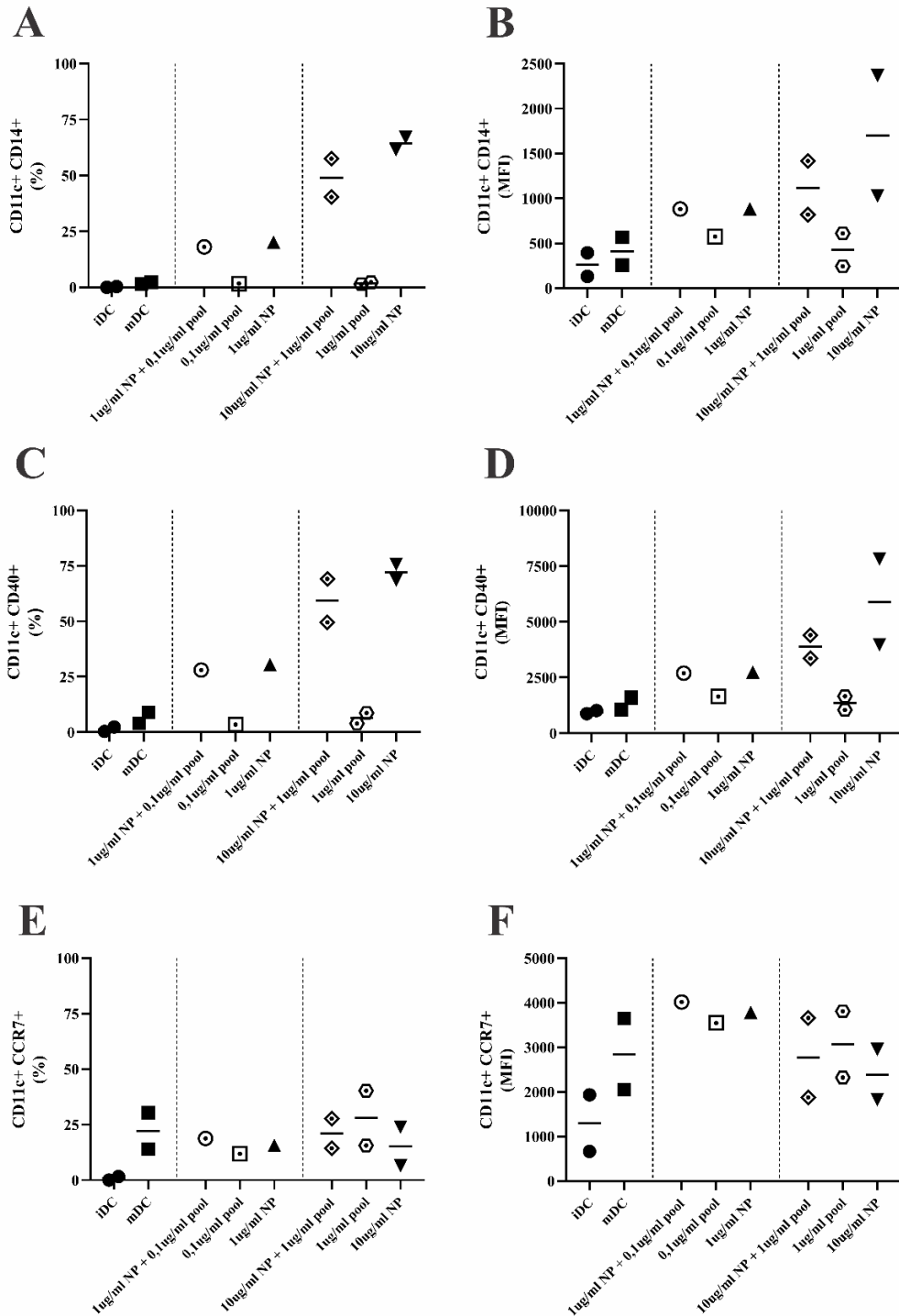
#### **4.4. Avaliação do efeito de nanopartículas de sílica associadas a peptídeos de HIV sobre a viabilidade celular, perfil fenotípico e funcional de células dendríticas aDC1 derivadas de indivíduos infectados pelo HIV**

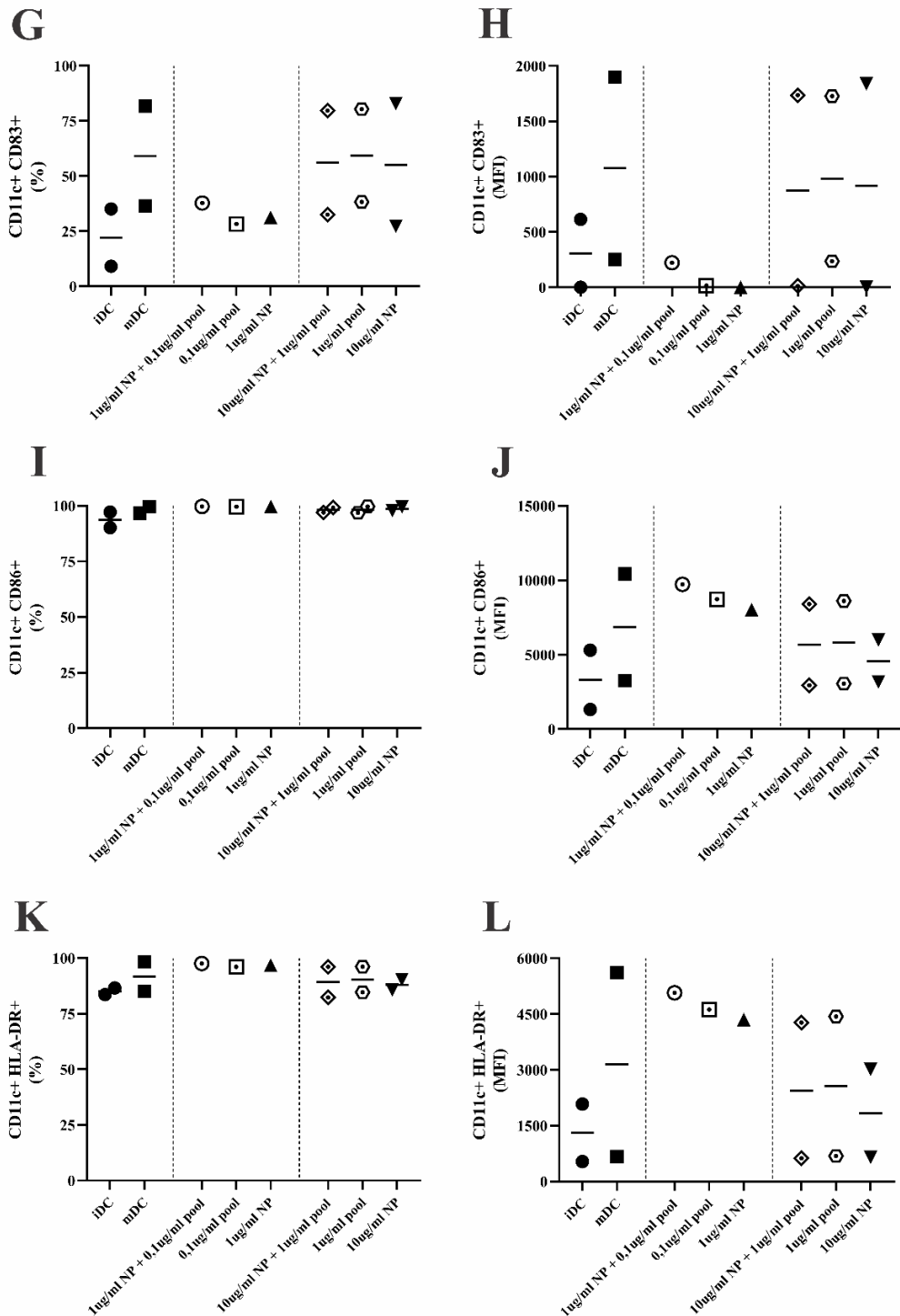
Analisar isoladamente somente o fenótipo das aDC1 não é suficiente para definirmos a concentração final de uso das nanopartículas de sílica, muito menos se a concentração de *pool* de peptídeos a elas associadas seria capaz de gerar uma resposta imune específica. Em razão disso, diferentemente dos ensaios anteriores, convidamos indivíduos cronicamente infectados pelo HIV para participarem do estudo, visto que nosso objetivo é padronizar um protocolo que seja capaz de induzir resposta específica anti-HIV ao estímulo. Dessa forma, direcionamos os ensaios para a análise fenotípica das aDC1, e na sequência, análise funcional por meio do ensaio de cocultivo entre as aDC1 e os linfócitos autólogos. Cabe ressaltar que, para estes ensaios, utilizamos duas concentrações de nanopartículas de sílica (1 e 10 µg/ml), ambas associadas somente ao *pool* 1 (Gag.15, Gag.34, Gag.35), devido à quantidade restrita de células.

Conforme descrito na Figura 3, as aDC1 foram estimuladas no dia 5 da cultura celular com nanopartículas de sílica, associadas ou não ao *pool* 1. No dia 7, parte das aDC1 foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para superfície, e as demais foram cocultivadas com os linfócitos autólogos, dando continuidade ao ensaio. O resultado da marcação de superfície das aDC1 está representado na Figura 15.

Analisando separadamente, embora não seja estatisticamente significativo, na Figura 15 podemos observar que as aDC1, pulsadas somente com o *pool* de peptídeos, tiveram aparentemente uma baixa expressão dos marcadores CD14 e CD40 (Figuras 15A e C), similar aos resultados encontrados para os controles. Ao observar os demais marcadores deste ensaio, CCR7, CD83, CD86 e HLA-DR, nenhuma diferença entre as variáveis é observada.

**Figura 15.** Análise fenotípica de aDC1 imaturas e maduras, pulsadas com duas concentrações de nanopartícula de sílica (1 e 10 µg/ml), associadas ao *pool* 1 de peptídeos de HIV (Gag.15, Gag.34 e Gag.35).



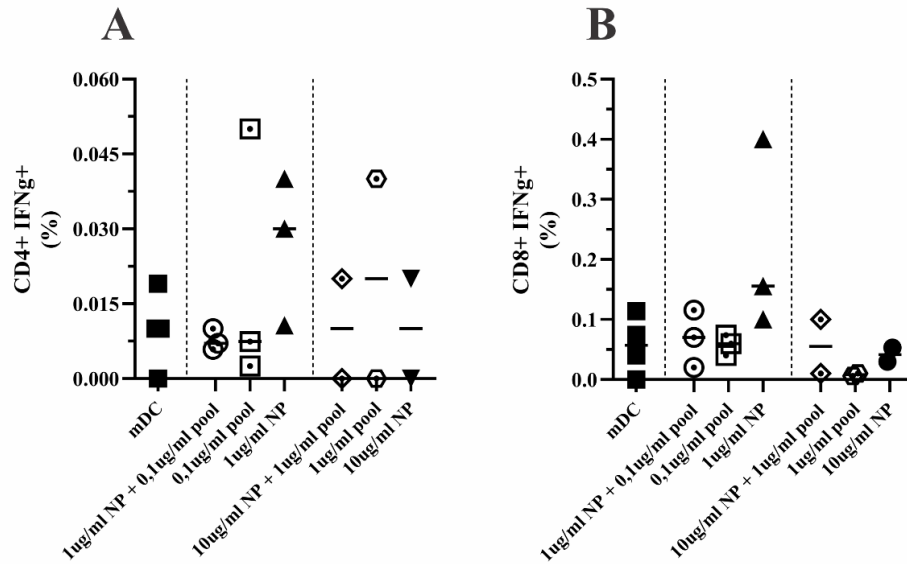


Nota: Para conjugação das nanopartículas ao *pool* de peptídeos, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 1 µg/ml de nanopartícula de sílica foi associada à 0,1 µg/ml de *pool* de peptídeos, e 10 µg/ml de nanopartículas receberam 1 µg/ml de *pool* de peptídeos. Os controles foram constituídos por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas por nanopartículas não-associadas a *pool* de peptídeos; e por fim, aDC1 pulsadas por *pool* de peptídeos não-associados a nanopartículas. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície e avaliadas por citometria de fluxo. As moléculas analisadas foram: CD14 (A)(B); CD40 (C)(D); CCR7 (E)(F), CD83 (G)(H); CD86 (I)(J); HLA-DR (K)(L). Os resultados estão representados em porcentagem de células vivas que expressam cada marcador (colunas 1 e 3), e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) de cada marcador na superfície das células (colunas 2 e 4). NP: nanopartícula. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2.

Para a análise funcional, parte das aDC1 pulsadas ou não com nanopartículas associadas a peptídeos foram cocultivadas com os linfócitos autólogos de seus respectivos doadores. Ao final do cocultivo, os linfócitos foram marcados intracelularmente com anticorpos específicos para IFN $\gamma$ , a fim de avaliar se as aDC1 pulsadas seriam capazes de promover uma resposta aos antígenos virais. O IFN $\gamma$  tem importante papel na resposta antiviral e o ensaio de cocultivo teve por objetivo avaliar o desfecho do uso das nanopartículas de sílica associadas aos peptídeos, no contexto para potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV.

Os resultados dos ensaios de cocultivo estão apresentados na Figura 16, na qual percebemos uma baixa produção de IFN $\gamma$  pelas células T, sem diferenças significativas das demais variáveis com relação à variável mDC, constituído por linfócitos que receberam aDC1 sem pulso antigênico. À princípio, as maiores medianas encontradas, sejam em células CD4 (Figura 16A) ou CD8 (Figura 16B), parecem ter sido das culturas estimuladas por aDC1 pulsadas com 1  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartícula de sílica. Porém, estatisticamente, esta diferença não é visualizada quando comparada às demais variáveis. De forma geral, não houve produção de IFN $\gamma$  em resposta a um estímulo específico, uma vez que os valores são similares.

**Figura 16.** Produção de IFN $\gamma$  por linfócitos autólogos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV estimulados por aDC1.



Nota: As aDC1 foram pulsadas com duas concentrações de nanopartículas de sílica (1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ), associadas a *pool* 1 de peptídeos de HIV (Gag.15, Gag.34 e Gag.35). Para conjugação das nanopartículas ao *pool* de peptídeos, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 1  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartícula de sílica foi associada a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos, e 10  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas receberam 1  $\mu\text{g/ml}$  de *pool* de peptídeos. Os controles foram constituídos por linfócitos cultivados na presença de: aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas por nanopartículas não-associadas a *pool* de peptídeos; e por fim, aDC1 pulsadas por *pool* de peptídeos não-associados a nanopartículas. Por meio da técnica de citometria de fluxo, a análise dos marcadores foi realizada a partir da população de células vivas e, sequencialmente, de células CD3 positivas. Em seguida, os linfócitos T foram selecionados mediante marcadores CD4+ IFN $\gamma$ + (A) e CD8+ IFN $\gamma$ + (B). As porcentagens apresentadas estão subtraídas pelo basal (linfócitos que não receberam nenhum estímulo). O controle positivo, que foi estimulado por phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) e ionomicina nas últimas 18 horas de cocultivo, apresentou média de expressão em 6,95% e 30,44% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. NP: nanopartícula. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=4.

#### 4.5. Caracterização das nanopartículas conjugadas aos peptídeos de HIV

Até esta ocasião, os resultados obtidos não tinham nos dado clareza quanto à melhor concentração de nanopartículas de sílica para pulso das aDC1, ou se a nanopartícula de sílica seria uma boa escolha para potencial uso na imunoterapia anti-HIV. Nossos achados indicaram que a produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T se deu de maneira inespecífica, uma vez que não tivemos diferenças significativas das demais variáveis com relação à variável mDC, constituído por linfócitos que receberam aDC1 sem pulso antigênico. Considerando que em nosso grupo de pesquisa a concentração padronizada de 1  $\mu\text{g/ml}$  de peptídeos é capaz de gerar uma resposta celular específica por linfócitos T, nos ensaios subseqüentes mantivemos somente uma concentração de nanopartículas de sílica. Dessa forma, mantendo a proporção calculada de 10:1 entre as nanopartículas e os peptídeos, a concentração a ser testada ficou de 10  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas de sílica associadas a 1  $\mu\text{g/ml}$  de peptídeos.

Cabe ressaltar que durante o desenvolvimento desta tese, a colaboração estabelecida com o grupo de pesquisa do Prof. Robbie B. Mailliard, da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pensilvânia, Estados Unidos), permitiu o uso de peptídeos relevantes de HIV, selecionados através de métodos preditivos para otimizar a resposta específica. Deste modo, considerando que não conseguimos detectar a produção específica de IFN $\gamma$  no ensaio anterior e buscando melhorar a resposta ao HIV, passamos a utilizar tais peptídeos em substituição aos anteriormente testados. Uma vez que ficaram definidos os peptídeos de HIV que seriam utilizados pelo grupo, para esta tese os peptídeos anteriormente utilizados (Tabela 2) foram substituídos pelos peptídeos descritos na Tabela 3.

Dessa forma, antes de dar segmento aos ensaios com as nanopartículas de sílica associadas aos novos peptídeos de HIV, uma etapa imprescindível foi realizada: a caracterização das partículas modificadas. Ou seja, a análise do tamanho e da carga das nanopartículas de sílica associadas aos novos peptídeos de HIV. Nas Figuras 17, 18 e 19 estão representados os resultados obtidos com auxílio do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical). Cabe ressaltar que embora a caracterização das partículas seja bastante importante e informativa, para os ensaios anteriores esta etapa não foi executada, fato que pode ter limitado nossos achados preliminares.

Na Figura 17 estão representados os resultados obtidos da conjugação da nanopartícula de sílica ao peptídeo Gag.27 do HIV. Na Figura 17A, na qual a conjugação foi realizada em salina, percebe-se que houve uma agregação das partículas, gerando um diâmetro médio



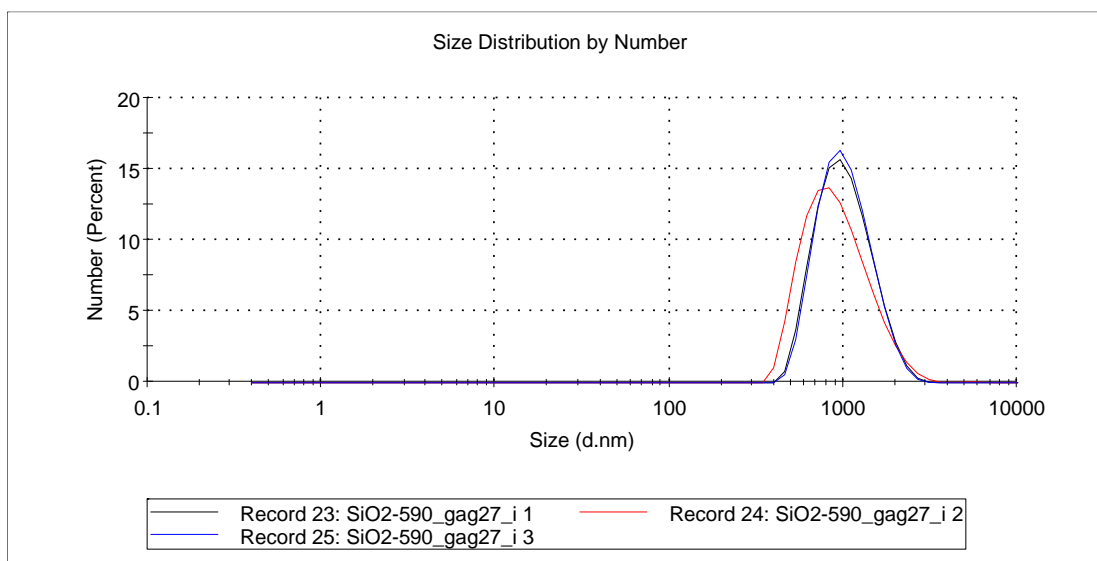
superior a 1000 nm. Diferentemente da salina, as partículas conjugadas em água (Figura 17B) e PBS 1X (Figura 17C) não sofreram agregação, tendo o pico médio do diâmetro superior a 17 nm. Ainda, quanto ao índice de polidispersividade (PDI), quando abaixo de 0,25, indica que a população das partículas possuía baixa polidispersidade. Isso significa que há uma homogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas analisadas.

**Figura 17.** Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas ao peptídeo Gag.27 da região Gag do HIV-1.

**A**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 1006	<b>Peak 1:</b> 1056	100.0	389.8
<b>Pdl:</b> 0.194	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.970	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

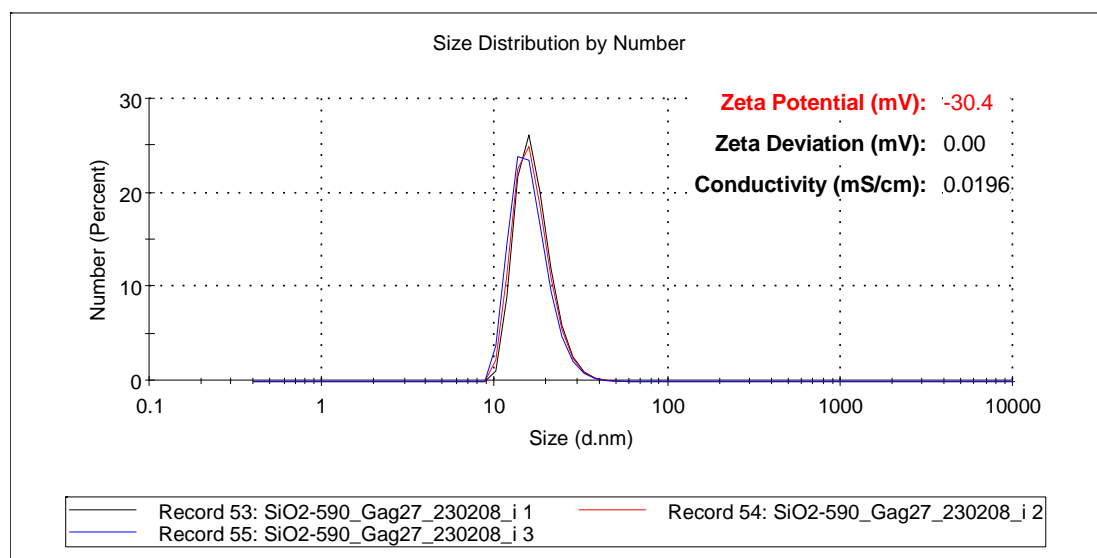
**Result quality Good**



**B**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 28.59	<b>Peak 1:</b> 17.09	100.0	4.511
<b>Pdl:</b> 0.227	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.889	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

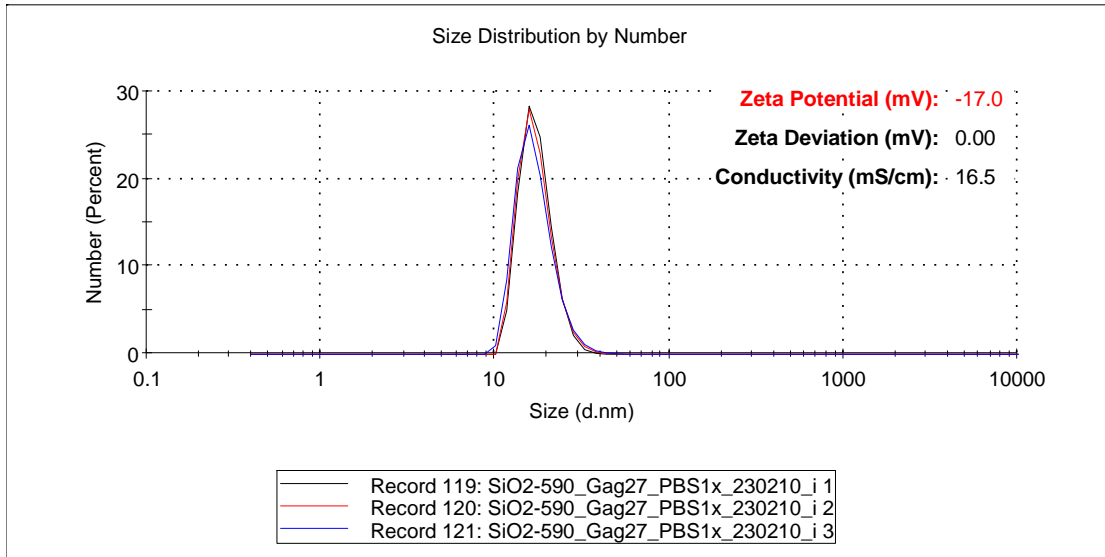
**Result quality Good**



C

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 261.3	<b>Peak 1:</b> 17.42	100.0	3.810
<b>Pdl:</b> 0.396	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.960	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

**Result quality Refer to quality report**



Nota: As nanopartículas de sílica foram associadas aos peptídeos na proporção 10:1, sendo 100 µg/ml da nanopartícula de sílica para 10 µg/ml do peptídeo Gag.27. A conjugação foi testada em três soluções: salina (A), água (B) e PBS 1X (C). As leituras foram realizadas, no mínimo, em triplicata, pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical). Os gráficos para distribuição do tamanho foram analisados pelo parâmetro de número. Para as amostras estáveis (B) e (C), foram inseridas nas figuras o valor de potencial Zeta. Pdl: índice de polidispersividade.

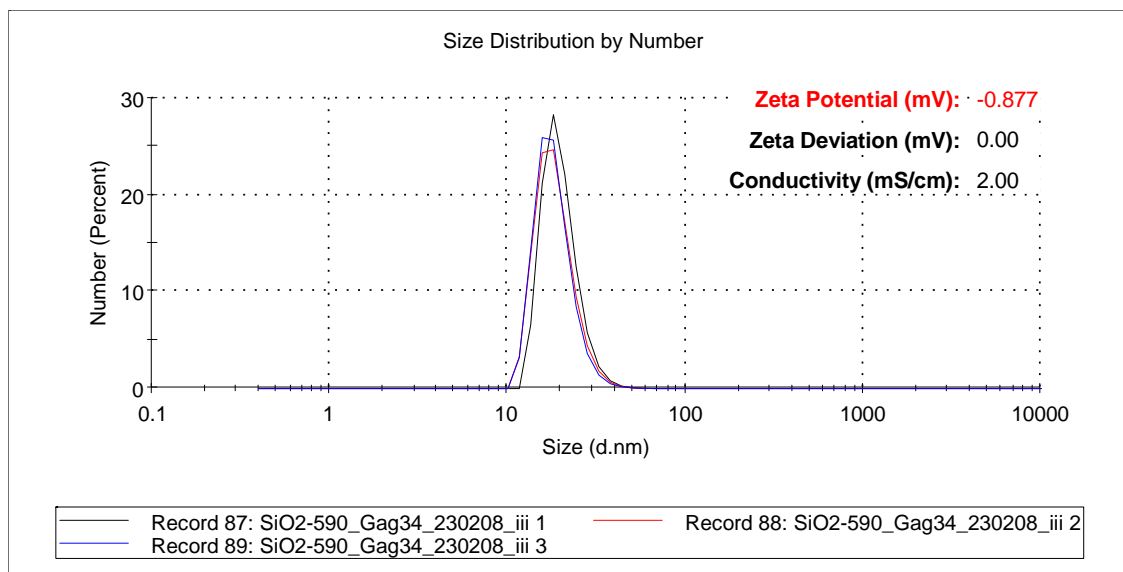
Na Figura 18 estão representados os resultados obtidos da conjugação da nanopartícula de sílica ao peptídeo Gag.34 (Figuras 18A e B) e Gag.35 do HIV (Figuras 18C e D). Diferentemente do peptídeo Gag.27, que é solúvel em água, os peptídeos Gag.34 e Gag.35 são solúveis em ácido acético 0,1M. Dessa forma, a solução de conjugação necessariamente precisaria ser tamponante. Sendo assim, para a conjugação foram utilizados PBS 0,1X (Figuras 18A e C) e PBS 1X (Figuras 18B e D). As partículas inclinaram-se a uma polidispersão de média a alta, com PDI variando entre 0,4 e 0,6, indicando uma heterogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas analisadas, exceto a nanopartícula de sílica conjugada ao peptídeo Gag.34 em solução de PBS 1X (Figura 18B), no qual formaram-se agregados com tamanho superior a 1600 nm.

**Figura 18.** Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas aos peptídeos Gag.34 e Gag.35 da região Gag do HIV-1.

**A**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 109.4	<b>Peak 1:</b> 19.95	100.0	4.977
<b>Pdl:</b> 0.601	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.953	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

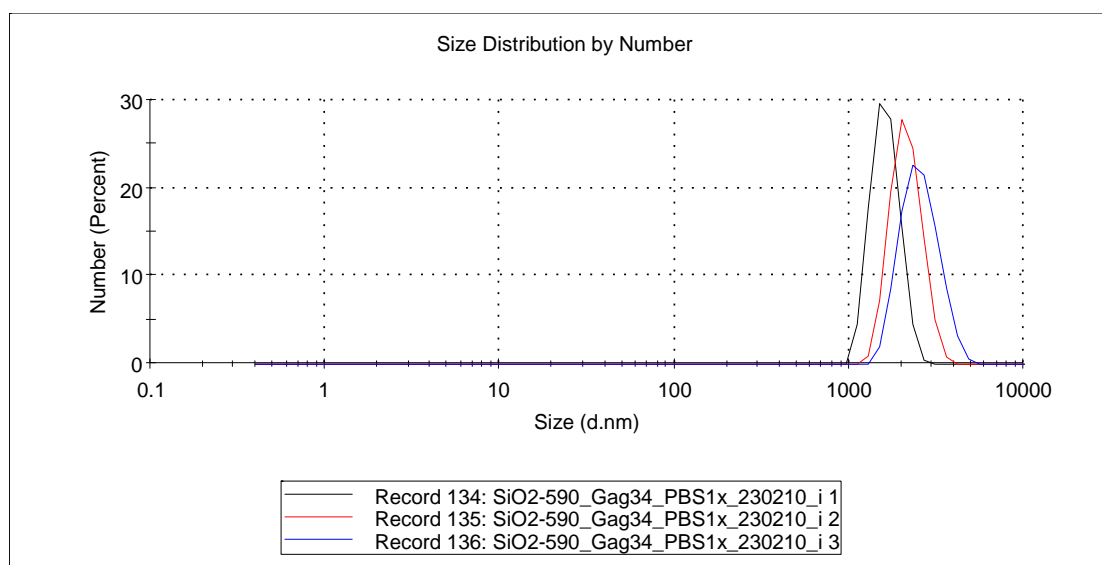
**Result quality** Refer to quality report



**B**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 2941	<b>Peak 1:</b> 1617	100.0	296.2
<b>Pdl:</b> 0.412	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.970	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

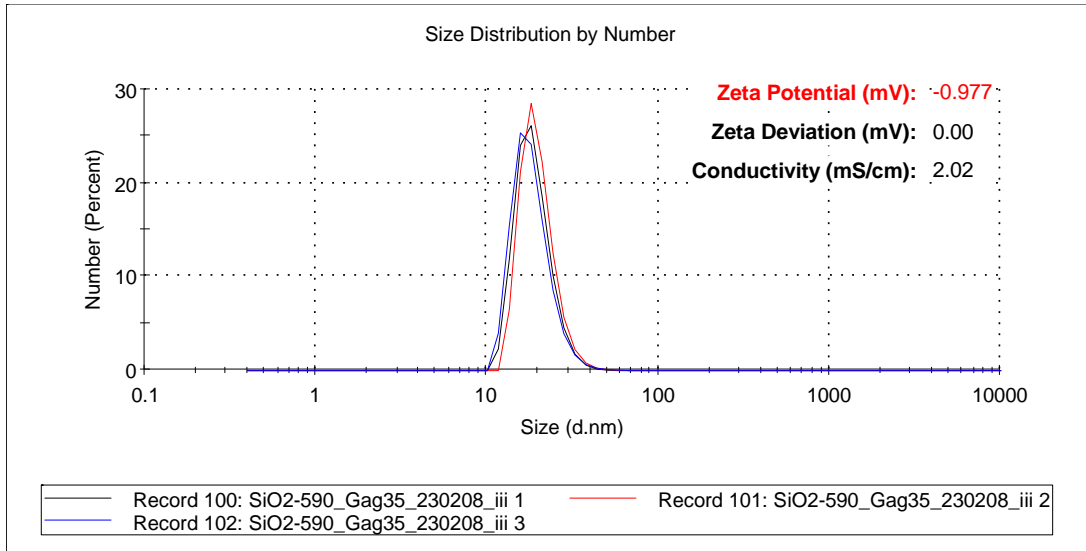
**Result quality** Refer to quality report



**C**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 102.7	<b>Peak 1:</b> 18.94	100.0	4.896
<b>Pdl:</b> 0.579	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.948	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

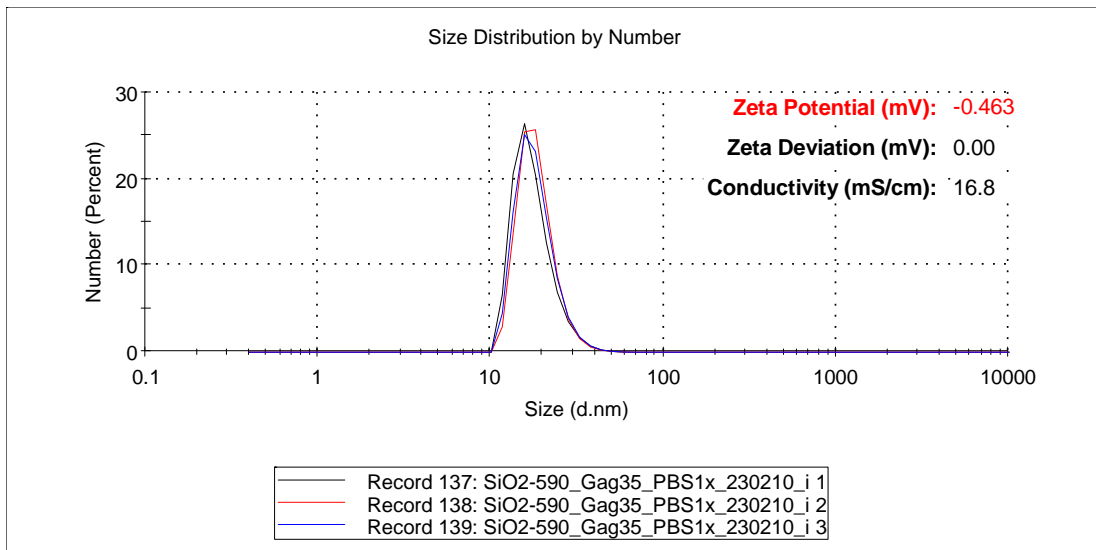
**Result quality Refer to quality report**



**D**

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 303.4	<b>Peak 1:</b> 17.79	100.0	5.083
<b>Pdl:</b> 0.444	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Intercept:</b> 0.992	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

**Result quality Refer to quality report**

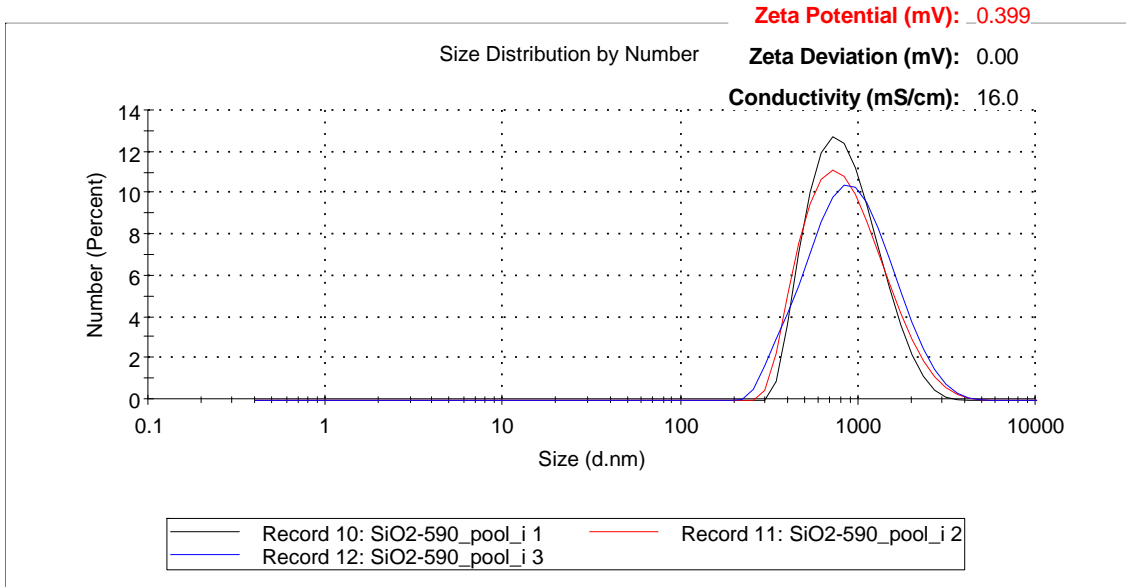


Nota: As nanopartículas de sílica foram associadas aos peptídeos na proporção 10:1, sendo 100 µg/ml da nanopartícula de sílica para 10 µg/ml do peptídeo Gag.34 (A)(B) ou Gag.35 (C)(D). A conjugação foi testada em duas soluções: PBS 0,1X (A)(C) e PBS 1X (B)(D). As leituras foram realizadas, no mínimo, em triplicata, pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical). Os gráficos para distribuição do tamanho foram analisados pelo parâmetro de número. Para as amostras estáveis (A), (C) e (D), foram inseridas nas figuras o valor de potencial Zeta Pdl: Índice de polidispersividade.

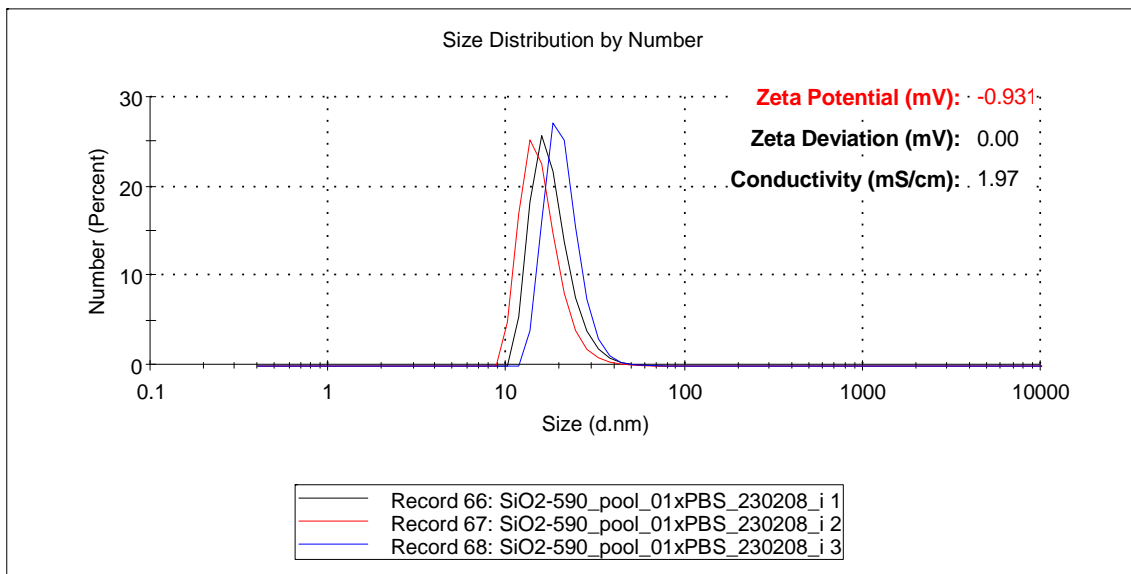
Por fim, na Figura 19 estão representados os resultados obtidos da conjugação da nanopartícula de sílica ao *pool* dos peptídeos da região Gag do HIV (Gag.27, Gag.34 e Gag.35). As conjugações foram testadas em três soluções: salina (Figura 19A), PBS 0,1X (Figura 19B) e PBS 1X (Figura 19C). Assim como para a conjugação com o peptídeo Gag.27 (Figura 17), as nanopartículas conjugadas ao *pool* de peptídeos em salina (Figura 19A) levaram a uma agregação das partículas, gerando um diâmetro médio superior a 1000 nm, o que não se observa nas partículas em PBS (Figuras 19B e C).

**Figura 19.** Análise de tamanho e carga das nanopartículas de sílica associadas ao *pool* de peptídeos da região Gag do HIV-1 (Gag.27, Gag.34 e Gag.35).

		Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>A</b>	<b>Z-Average (d.nm):</b> 1163	<b>Peak 1:</b> 1021	100.0	583.6
	<b>Pdl:</b> 0.211	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
	<b>Intercept:</b> 0.960	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality Good</b>				



		Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>B</b>	<b>Z-Average (d.nm):</b> 221.4	<b>Peak 1:</b> 18.23	100.0	5.395
	<b>Pdl:</b> 0.484	<b>Peak 2:</b> 0.000	0.0	0.000
	<b>Intercept:</b> 0.954	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality Refer to quality report</b>				

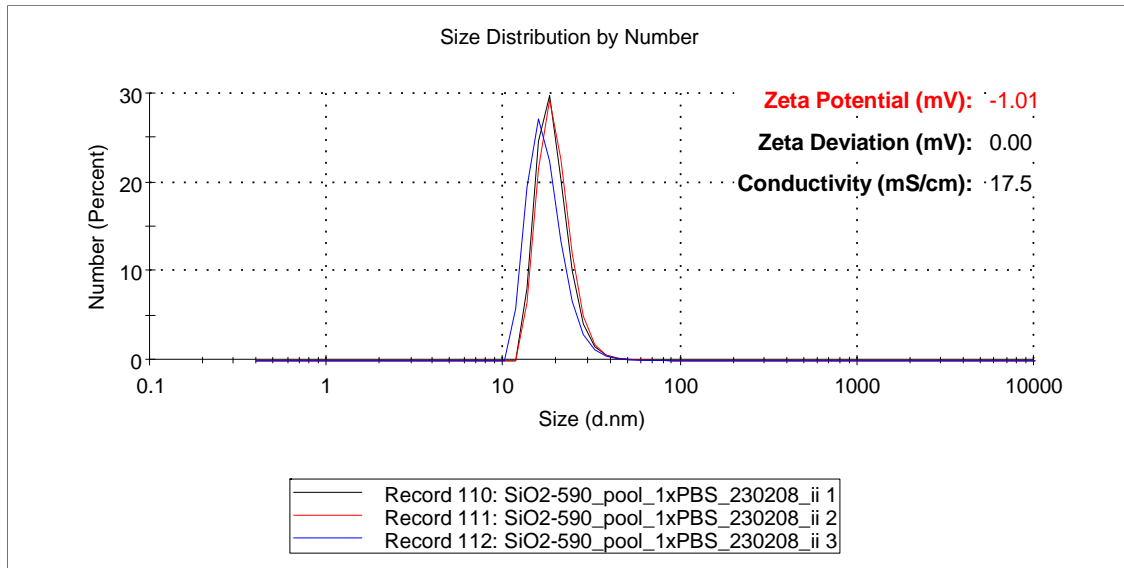




**C**

<b>Z-Average (d.nm):</b> 91.66	<b>Peak 1:</b> 19.43	<b>Size (d.nm):</b> 19.43	<b>% Number:</b> 100.0	<b>St Dev (d.nm):</b> 5.533
<b>Pdl:</b> 0.524	<b>Peak 2:</b> 0.000	<b>Size (d.nm):</b> 0.000	<b>% Number:</b> 0.0	<b>St Dev (d.nm):</b> 0.000
<b>Intercept:</b> 0.942	<b>Peak 3:</b> 0.000	<b>Size (d.nm):</b> 0.000	<b>% Number:</b> 0.0	<b>St Dev (d.nm):</b> 0.000

**Result quality** Good



Nota: As nanopartículas de sílica foram associadas aos peptídeos na proporção 10:1, sendo 100 µg/ml da nanopartícula de sílica para 10 µg/ml do *pool* de peptídeos (Gag.27, Gag.34 e Gag.35). A conjugação foi testada em três soluções: salina (A), PBS 0,1X (B) e PBS 1X (C). As leituras foram realizadas, no mínimo, em triplicata, pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical). Os gráficos para distribuição do tamanho foram analisados pelo parâmetro de número. Foram inseridas nas figuras as medições do potencial Zeta. Pdl: Índice de polidispersividade.

#### 4.6. Avaliação da internalização das nanopartículas de sílica, associadas aos peptídeos de HIV, pelas aDC1

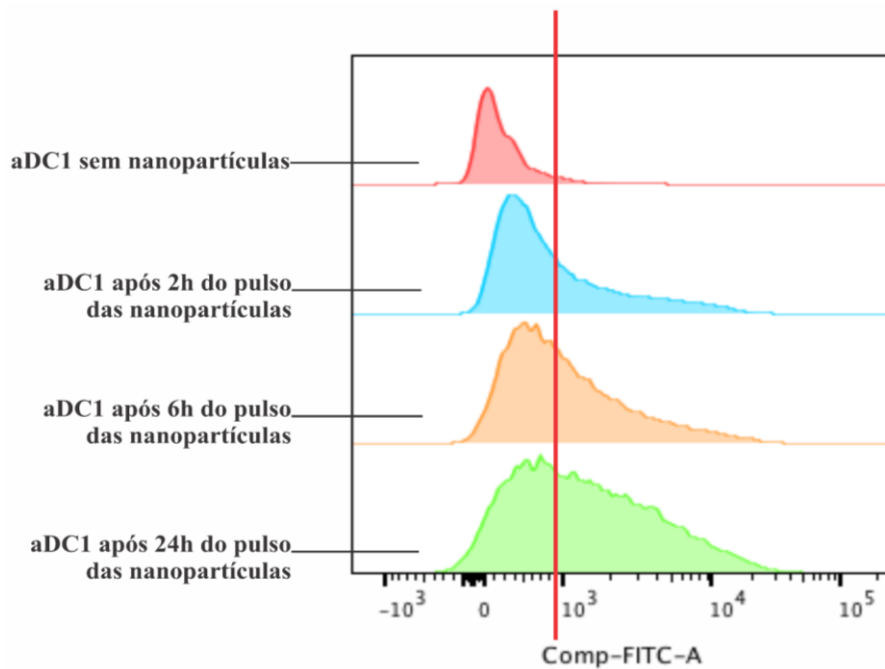
Uma vez estabelecida a concentração de nanopartículas para o pulso das aDC1, passamos a avaliar as condições referentes ao tempo necessário para a internalização das partículas pelas células. Até então as aDC1 eram incubadas por 2 horas com as nanopartículas, com base em protocolos de pulso antigênico utilizados em nosso laboratório. Por sugestão de nossos colaboradores, resolvemos testar se a incubação por um período mais extenso poderia influenciar a dinâmica de internalização.

A concentração da nanopartícula de sílica ficou estabelecida em 10 µg/ml para 1 µg/ml do peptídeo Gag.27. Preliminarmente, mantivemos somente o peptídeo Gag.27 da região do HIV em nossos ensaios, uma vez que nesta etapa de padronização optamos por seguir com o peptídeo que apresentou melhores resultados na caracterização das partículas (Figura 17), bem como para otimizar a quantidade de variáveis em teste. Além disso, para facilitar o monitoramento do pulso antigênico pelas aDC1, utilizamos nanopartículas de sílica coradas com fluoresceína (FITC), o que permitiu avaliar sua internalização por citometria de fluxo.

Deste modo, analisamos as aDC1 em diferentes tempos de incubação com as nanopartículas, quais sejam: 2, 6 e 24 horas (Figura 20 e 21). Observamos que houve internalização das nanopartículas em todos os tempos avaliados, em comparação às aDC1 sem nanopartículas. Além disso, a intensidade de fluorescência aumenta à medida em que se aumenta o tempo de incubação, sendo possível visualizar maior internalização no período de 24 horas de incubação (Figura 20).

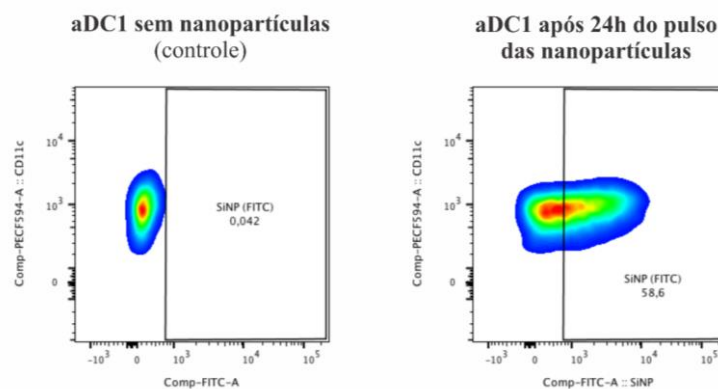
Tais achados são corroborados pela análise de *dotplot*, no qual é possível visualizar um deslocamento da população positiva para a marcação com FITC nas culturas incubadas com nanopartículas por 24 horas (Figura 21).

**Figura 20.** Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 2, 6 e 24 horas de pulso, analisadas por histograma.



Nota: As células ficaram em contato com as nanopartículas durante 2 (azul), 6 (laranja) e 24 horas (verde). À direita da linha vermelha têm-se as células que internalizaram as nanopartículas coradas com fluoresceína (FITC). À esquerda da linha vermelha, próxima ao fim da emissão das aDC1 que não receberam as nanopartículas (vermelho), estão as células que não emitiram a fluorescência para FITC. Este ensaio foi realizado por citometria de fluxo.

**Figura 21.** Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 24 horas de contato, analisadas em gráficos *pseudocolor plot (smooth)*.

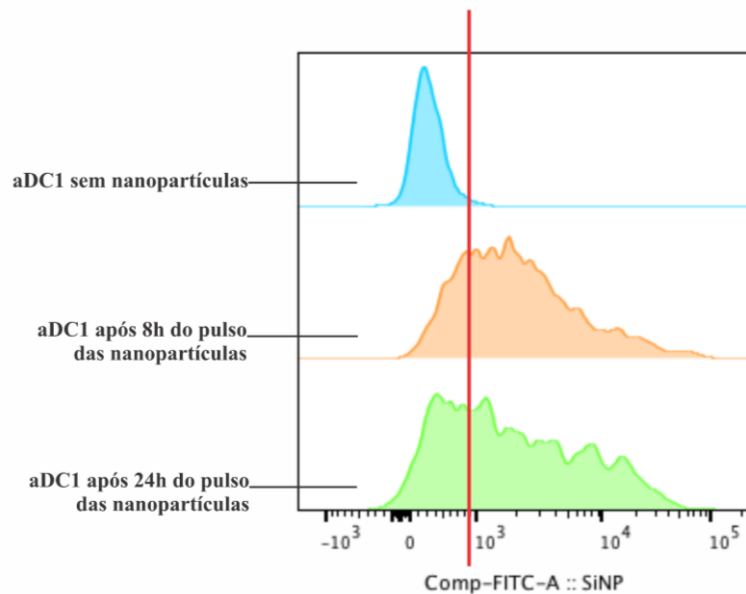


Nota: À esquerda tem-se a análise para as aDC1 que não receberam as nanopartículas, enquanto à direita segue análise das aDC1 que ficaram 24 horas em contato com as nanopartículas coradas com fluoresceína (FITC). Para este resultado, seguiu-se a seguinte estratégia de análise: no primeiro *gate* foram selecionadas as células dendríticas (DC) com base em seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC), seguido da viabilidade celular, avaliadas pelo marcador Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™), logo após foi definido o *gate* para seleção de células positivas para a molécula CD11c e, por fim, o *gate* contendo a porcentagem de emissão de fluorescência para FITC pelas células dendríticas (CD11c+). Este ensaio foi realizado por citometria de fluxo.

Embora o tempo de 24 horas de incubação tenha mostrado melhor internalização das nanopartículas em comparação ao tempo de 2 horas, que foi o tempo de pulso anteriormente padronizado para internalização de peptídeos por aDC1 em nosso grupo de pesquisa, tal fato implicaria em um aumento de 24 horas no tempo total do protocolo para obtenção de aDC1. Ou seja, a duração passaria de 7 para 8 dias de cultura celular, o que pode não ser conveniente para adoção em protocolo clínico, além da possibilidade de interferir na viabilidade celular. Neste sentido, com o intuito de buscar um tempo de incubação conveniente e capaz de promover a internalização de nanopartículas de forma otimizada, além do tempo de 24 horas de incubação, também avaliamos o tempo de 8 horas.

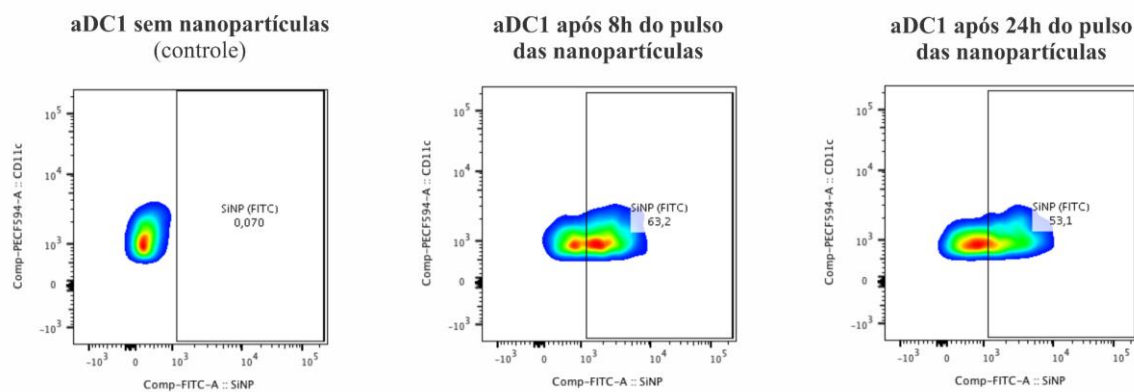
Dessa forma, a Figura 22 mostra os resultados observados referentes à comparação do pulso das aDC1 com as nanopartículas por 8 e 24 horas. Observamos que o perfil de deslocamento da expressão de FITC é similar entre ambas as culturas mantidas por 8 e 24 horas, inclusive com percentual de positividade ligeiramente superior para o tempo de 8 horas (Figura 23). Tal fato sugere que em 8 horas de incubação a internalização das nanopartículas parece atingir um platô que é mantido por pelo menos até 24 horas de incubação. Deste modo, a incubação por 8 horas parece ser suficiente para a internalização das nanopartículas pelas aDC1.

**Figura 22.** Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 8 e 24 horas de pulso em histograma.



Nota: As células ficaram em contato com as nanopartículas durante 8 (laranja) e 24 horas (verde). À direita da linha vermelha têm-se as células que internalizaram as nanopartículas coradas com fluoresceína (FITC). À esquerda da linha vermelha, próxima ao fim da emissão das aDC1 que não receberam as nanopartículas (azul), estão as células que não emitiram a fluorescência para FITC. Este ensaio foi realizado por citometria de fluxo.

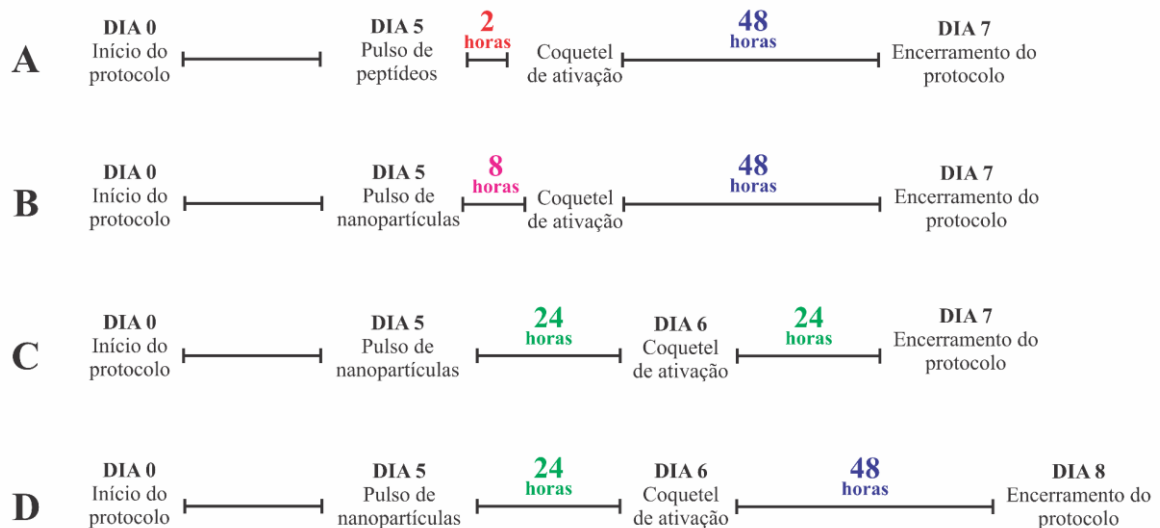
**Figura 23.** Internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos Gag.27 do HIV pelas aDC1 após 8 e 24 horas de pulso, analisadas em gráficos *pseudocolor plot* (*smooth*).



Nota: À esquerda tem-se a análise para as aDC1 que não receberam as nanopartículas; ao centro, a análise das aDC1 após pulso das nanopartículas por 8 horas; e à direita segue análise das aDC1 após pulso de 24 horas. As nanopartículas de sílica utilizadas estavam conjugadas à fluoresceína (FITC). Para este resultado, seguiu-se a seguinte estratégia de análise: no primeiro *gate* foram selecionadas as células dendríticas (DC) com base em seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC), seguido da viabilidade celular, avaliadas pelo marcador Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™), logo após foi definido o *gate* para seleção de células positivas para a molécula CD11c e, por fim, o *gate* contendo a porcentagem de emissão de fluorescência para FITC pelas células dendríticas (CD11c+). Este ensaio foi realizado por citometria de fluxo.

Ao dar continuidade às comparações dos tempos de pulso das nanopartículas entre 8 e 24 horas, alguns pontos foram considerados. O primeiro deles era, de fato, encontrar o melhor tempo de internalização das nanopartículas de sílica, período este que é compreendido entre o pulso das partículas na cultura de aDC1 (dia 5) e a adição do coquetel de citocinas para ativação das células. O segundo ponto considerado é o período pelo qual as aDC1 estariam sob estímulo do coquetel de ativação, ou seja, por quanto tempo após a adição das citocinas as aDC1 ficariam mantidas em cultura, até o encerramento do protocolo. Dito isso, conforme anteriormente mencionado, nos protocolos padronizados em nosso grupo de pesquisa, o tempo de pulso para peptídeos, sem associação às nanopartículas, é de 2 horas. Além disso, o tempo padronizado para ativação das aDC1 é de 48 horas (Figura 24A). Dessa forma, na tentativa de encontrar a melhor opção para o tempo de pulso das nanopartículas, sem comprometer a ativação das aDC1, propusemos as variáveis descritas na Figura 24.

**Figura 24.** Esquematização das etapas para obtenção de aDC1 considerando os tempos de 8 e 24 horas de pulso das nanopartículas associadas aos peptídeos de HIV e a duração total dos protocolos.

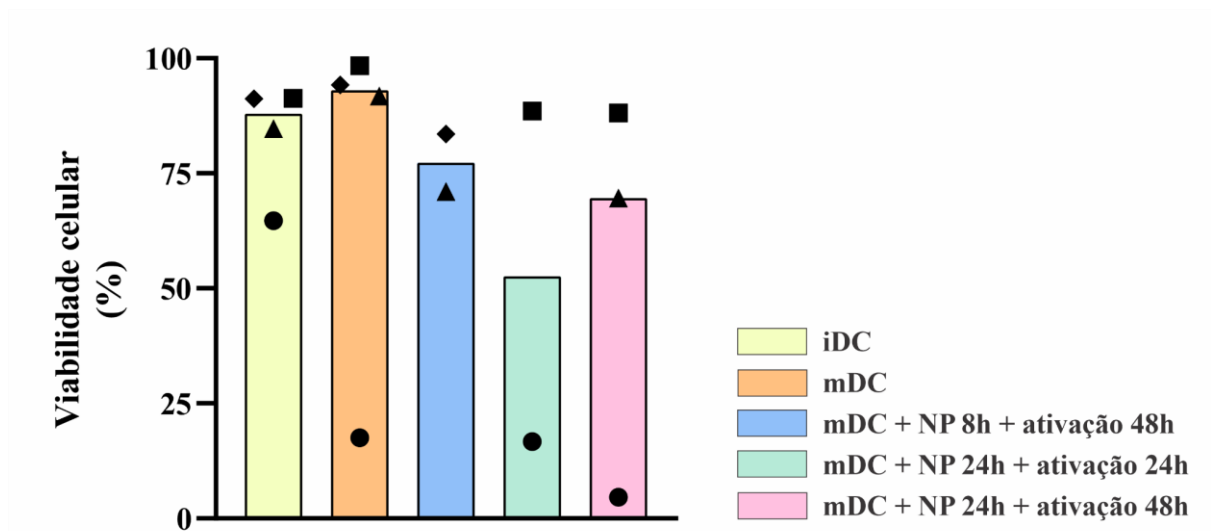


Nota: Em (A) tem-se o esquema do protocolo previamente padronizado em nosso grupo, com tempo de pulso de 2 horas dos peptídeos, além das 48 horas de ativação das aDC1, com duração total de 7 dias. Em (B), diferentemente do protocolo padrão, tem-se pulso de 8 horas das nanopartículas, conjugadas ao peptídeo de HIV. Em (C), além do tempo de pulso de 24 horas, tem-se somente 24 horas de ativação das aDC1, porém com protocolo com duração total de 7 dias. Por fim, em (D), tem-se o pulso de 24 horas das nanopartículas, conjugadas ao peptídeo de HIV, além das 48 horas de ativação, encerrando o protocolo após 8 dias.

Reiterando, uma vez que os tempos de pulso escolhidos até o momento estavam entre 8 e 24 horas, caso mantivéssemos as 48 horas de ativação previamente padronizadas, as aDC1 com 24 horas de pulso teriam um protocolo total com 8 dias de duração (Figura 24D), diferentemente da duração de 7 dias já definida. Assim sendo, testamos também a variável com pulso de 24 horas somado as 24 horas de ativação, mantendo a duração do protocolo padronizado (Figura 24C).

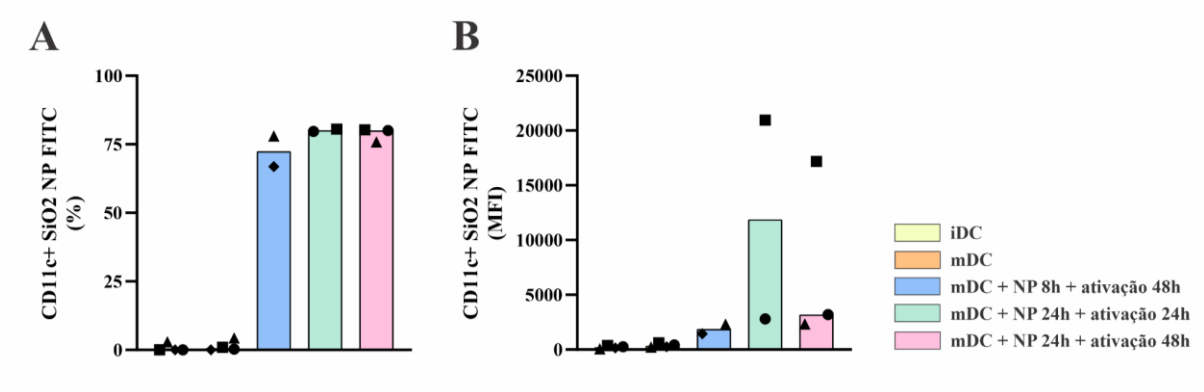
Portanto, considerando as variáveis propostas na Figura 24, avaliamos a viabilidade das aDC1 (Figura 25) bem como a análise fenotípica destas células (Figuras 26 e 27).

**Figura 25.** Avaliação da viabilidade das aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV após pulso de 8 e 24 horas.



Nota: Para conjugação da nanopartícula ao peptídeo Gag.27 do HIV, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 10µg/ml de nanopartículas de sílica foram associadas à 1µg/ml de peptídeos. As variáveis foram constituídas por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas com nanopartículas por 8 horas; e por fim, aDC1 pulsadas com nanopartículas por 24 horas, mais 24 ou 48 horas de ativação. As células foram avaliadas pelo marcador Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen™), por citometria de fluxo. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2-4.

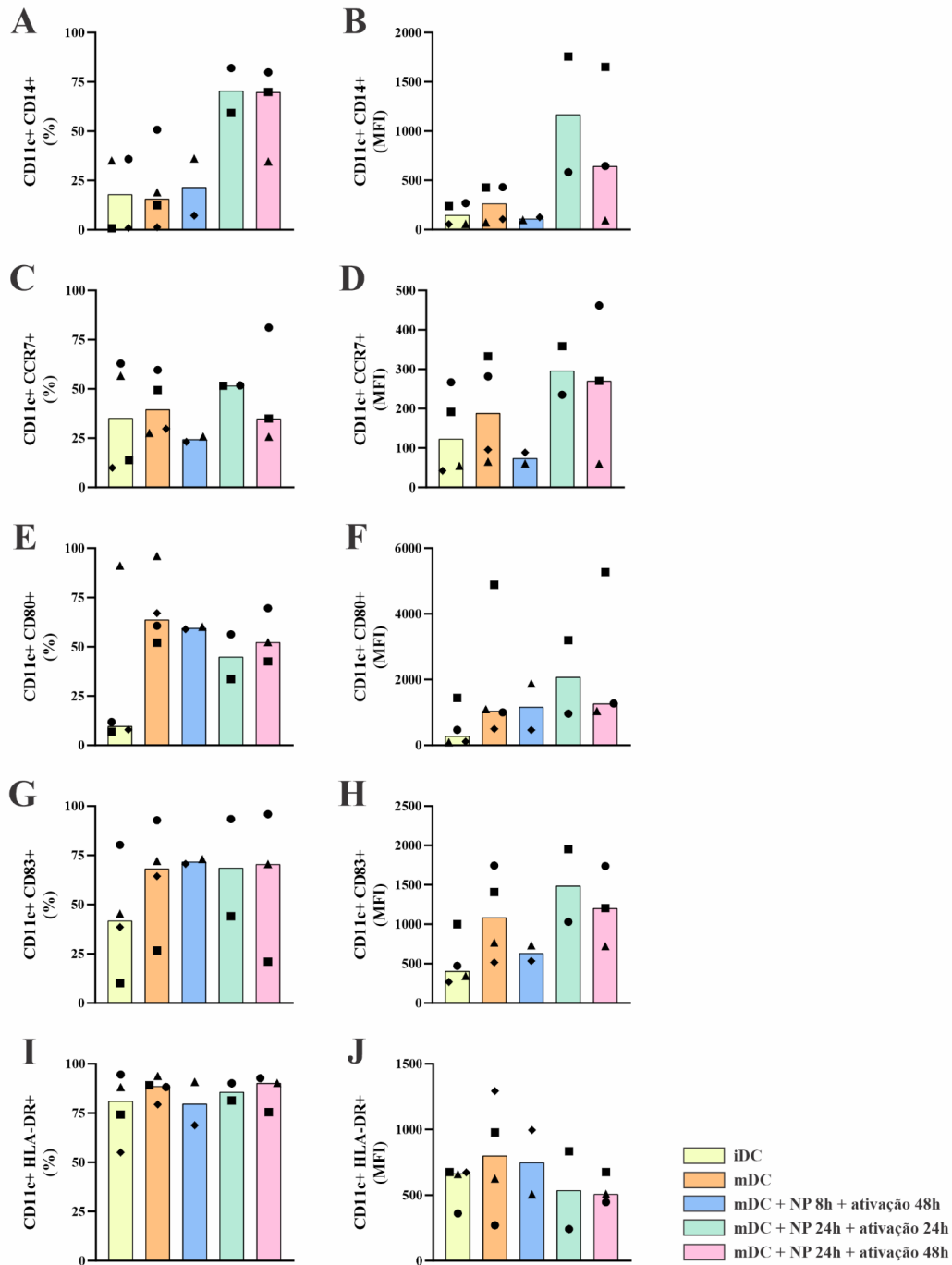
**Figura 26.** Avaliação da internalização de nanopartículas de sílica por aDC1 através de citometria de fluxo.



Nota: Para conjugação da nanopartícula ao peptídeo Gag.27 do HIV, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 10µg/ml de nanopartículas de sílica foram associadas à 1µg/ml de peptídeos. As variáveis foram constituídas por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas com nanopartículas por 8 horas; e por fim, aDC1 pulsadas com nanopartículas por 24 horas, mais 24 ou 48 horas de ativação. A expressão do fluorocromo FITC foi avaliada dentro da população de células CD11c positivas por citometria de fluxo. Os resultados estão representados em porcentagem de células vivas que expressam este fluorocromo (A), e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) do marcador na célula (B). O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2-4.



**Figura 27.** Análise fenotípica de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV, após pulso de 8 e 24 horas.



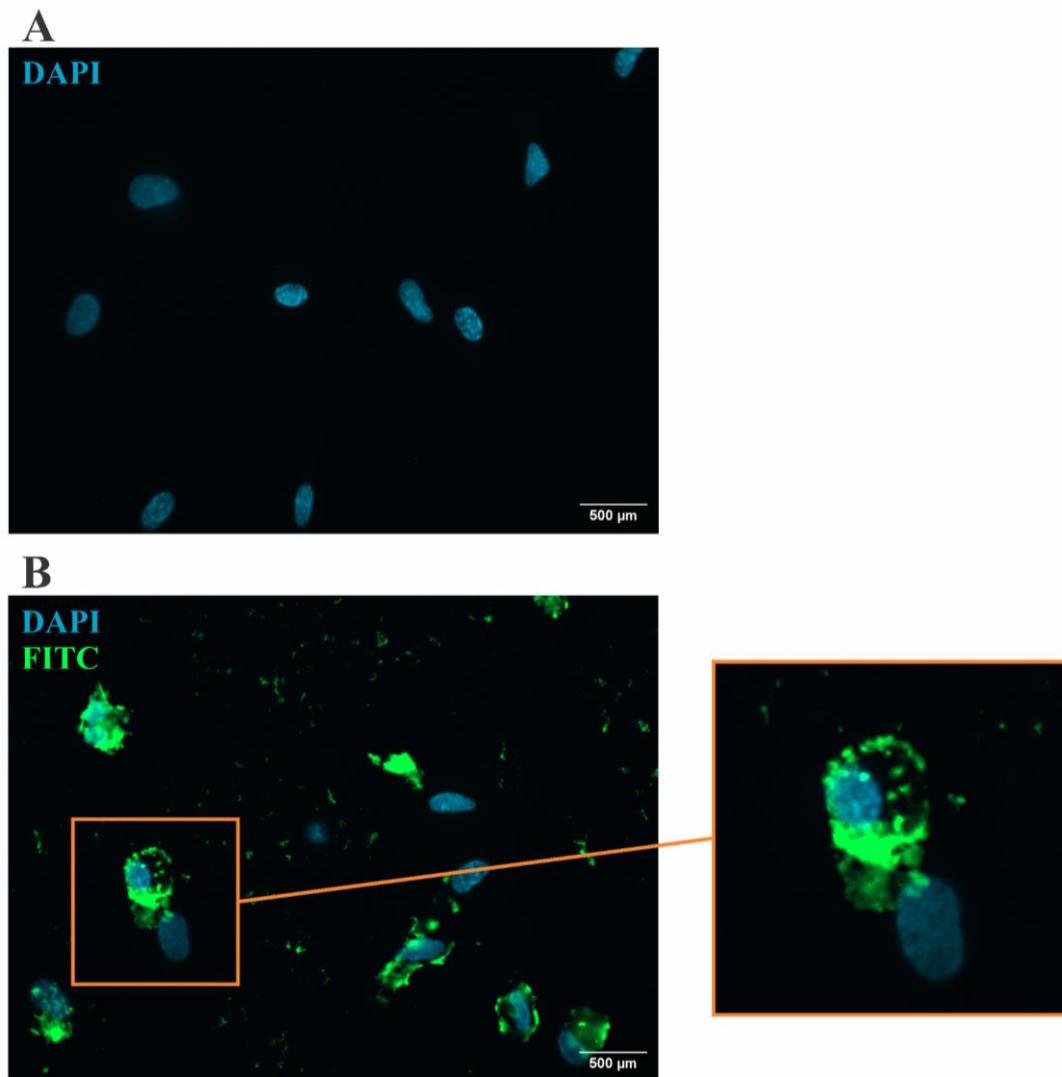
Nota: Para conjugação da nanopartícula ao peptídeo Gag.27 do HIV, a proporção utilizada foi de 10:1, no qual 10 $\mu$ g/ml de nanopartículas de sílica foram associadas à 1 $\mu$ g/ml de peptídeos. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície e avaliadas por citometria de fluxo. As moléculas analisadas foram: CD14 (A)(B); CCR7 (C)(D); CD80 (E)(F); CD83 (G)(H); HLA-DR (I)(J). Os resultados estão representados em porcentagem de células vivas que expressam cada marcador (gráficos à esquerda), e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) de cada marcador na superfície das células (gráficos à direita). As variáveis foram constituídas por aDC1 imaturas (iDC); aDC1 maduras (mDC); aDC1 pulsadas com nanopartículas por 8 horas; e por fim, aDC1 pulsadas com nanopartículas por 24 horas, mais 24 ou 48 horas de ativação. O gráfico representa as medianas de cada variável. N=2-4.

Na tentativa de aprimorar o protocolo de obtenção de aDC1 aliado à internalização das nanopartículas de sílica, no último ensaio de análise fenotípica adicionamos o tempo de pulso de 8 horas, comparativamente ao tempo de 24 horas (Figura 27). Como resultado, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos marcadores, seja comparando os tempos de pulso entre 8 e 24 horas, tal como diferentes tempos de ativação. Entretanto, é possível notar que no tempo de 8 horas a expressão da molécula CD14 é ligeiramente reduzida (Figura 27A), muito similar aos controles sem pulso de nanopartículas. Em relação à expressão dos demais marcadores, com exceção do CCR7 no tempo de 8 horas (Figura 27C), encontram-se semelhanças nas variáveis que receberam as nanopartículas.

Sendo assim, optamos por considerar o tempo de 8 horas para o pulso das nanopartículas de sílica associadas aos peptídeos de HIV, mantendo a duração total do protocolo em 7 dias, sob o tempo previamente padronizado para completa maturação, conforme demonstra a Figura 3. Além disso, é possível manter todas as etapas de execução do protocolo em paralelo, da variável que recebe o pulso de 8 horas com a variável controle (mDC), de forma que não seria possível no protocolo com pulso das nanopartículas por 24 horas.

Com o objetivo de comprovar os dados de internalização das nanopartículas obtidos por citometria de fluxo, procedemos à aquisição de imagens de aDC1 incubadas com nanopartículas por meio da técnica de imunofluorescência, ressaltando que as partículas se apresentam conjugadas a FITC. As imagens obtidas estão representadas na Figura 28. Observamos a presença das nanopartículas ao redor do núcleo da célula, demonstrando que elas foram internalizadas pelas aDC1 (Figura 28B), diferente de culturas de aDC1 na ausência de nanopartículas, nas quais visualizamos apenas o núcleo da célula, corado com DAPI (Figura 28A).

**Figura 28.** Análise da internalização da nanopartícula de sílica associada ao peptídeo Gag.27 por imunofluorescência.

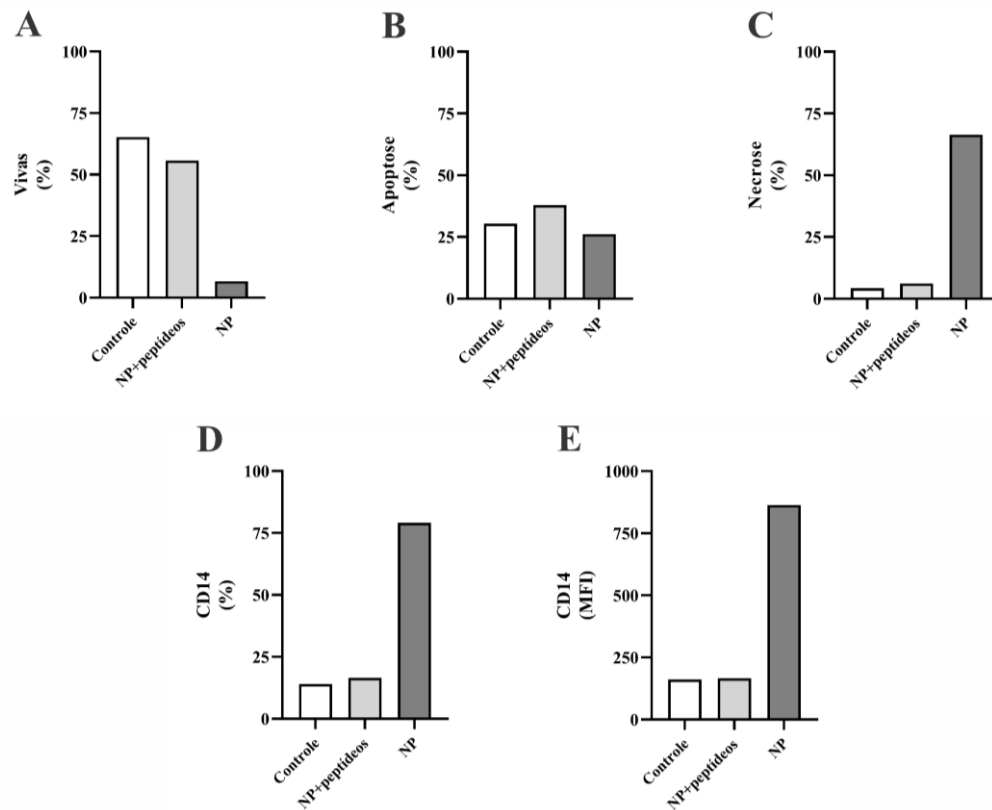


Nota: Nanopartículas previamente coradas com FITC, conjugadas ao peptídeo Gag.27, na proporção de 10:1 (10 μg/ml de nanopartículas de sílica associadas a 1 μg/ml de peptídeos) foram incubadas por 8 horas com aDC1, que em seguida foram ativadas. As células foram marcadas com o corante de núcleo (DAPI) e. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência, no aumento de 63X. Em (A) temos aDC1 sem pulso de nanopartículas, somente com marcação do núcleo (em azul, DAPI). Em (B) temos aDC1 com pulso de nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV (em verde, FITC), além da marcação do núcleo (em azul, DAPI). N=1.

#### **4.7. Avaliação da apoptose das aDC1 pulsadas com nanopartículas conjugadas a peptídeo de HIV**

Adicionalmente, avaliamos a apoptose de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV (Figura 29). Neste ensaio analisamos as aDC1 no que se refere à viabilidade (Figura 29A), apoptose (Figura 29B) e necrose (Figura 29C) celular, tanto nas variáveis controle quanto nas variáveis que receberam as nanopartículas. Embora tenha sido um ensaio único, sendo passível de trazer resultados imprecisos, as aDC1 pulsadas somente com as nanopartículas de sílica, sem conjugação a peptídeo, parecem se manter menos viáveis quando comparadas ao controle e, conseqüentemente, apresentando uma maior porcentagem de células em necrose. Ainda, considerando o aumento da expressão da molécula CD14 nos ensaios iniciais desta tese, adicionamos esse marcador ao teste de apoptose (Figura 29D e 29E). Embora mais testes sejam necessários para fundamentar os achados, foi possível observar que a nanopartícula de sílica, utilizada em sua forma pura, sem associação aos peptídeos de HIV, têm impacto direto na viabilidade celular e na expressão de CD14.

**Figura 29.** Avaliação da apoptose de aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica conjugadas ao peptídeo Gag.27 do HIV.



Nota: As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para avaliar a viabilidade (A), apoptose (B) e necrose (C) celular, além da molécula de superfície CD14 (D)(E). As células foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados representam a porcentagem de células CD11c+ que expressam cada marcador (A)(B)(C)(D), com exceção da intensidade mediana de fluorescência (MFI) referente à molécula de superfície CD14 (E). Controle: células dendríticas maduras sem pulso de nanopartícula de sílica; NP+peptídeos: células dendríticas maduras com pulso de nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV; NP: células dendríticas maduras com pulso de nanopartículas de sílica não-modificadas (sem conjugação aos peptídeos). N=1.

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos usando nanopartículas compostas por QS e sílica. Quanto à escolha destas partículas, levamos em consideração o seu uso em pesquisas biomédicas, a capacidade de modificação (conjugação à antígenos) e principalmente a compatibilidade para ensaios celulares *in vitro*. Diante disso, tanto a nanopartícula de QS quanto a de sílica, de início, conferiam os atributos requeridos (50,54,55,60,61).

Dessa forma, nosso primeiro questionamento foi avaliar o efeito dessas partículas sobre a viabilidade celular, na tentativa de definir as melhores concentrações de uso *in vitro*, sem ocasionar efeito tóxico indesejado. No que se refere à toxicidade, o uso da QS é bastante defendido por se tratar de um polímero natural, pouco tóxico, biocompatível e biodegradável (67,68). Quanto ao uso das nanopartículas de QS em cultura celular, as concentrações foram definidas seguindo os protocolos do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Diferentemente, em relação às nanopartículas de sílica os trabalhos são divergentes, visto que além das diferentes formulações, existem variações nos métodos de avaliação da toxicidade. Kwon e colaboradores (2014) não encontraram resultados que sugerissem uma genotoxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, de nanopartículas de sílica de 20 e 100 nm (69). Ainda, um recente artigo de revisão propôs a sílica mesoporosa como uma importante ferramenta para imunoterapias contra o câncer, defendendo o uso da nanotecnologia para melhorar a eficácia do tratamento de pacientes oncológicos (70). Em contrapartida, outros trabalhos apontaram o perfil toxicológico das nanopartículas de sílica, não só considerando os achados *in vitro*, mas também questionando a exposição ambiental do indivíduo (71–73). Além disso, um recente artigo de revisão compilou vários achados mostrando os efeitos que diferentes formulações de nanopartícula de sílica desencadearam em ensaios *in vitro* e *in vivo*, como aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, apoptose e morte celular em cultura de células, bem como disfunção e fibrose hepática em animais (74).

Durante os testes de padronização, tivemos bastante dificuldade na execução do protocolo de produção das nanopartículas de QS. Devido aos desafios inerentes da própria QS e das etapas do protocolo, como exemplo a viscosidade do composto, solubilidade somente em meio ácido e o curto tempo de prateleira, não foi possível garantir um produto estéril, reprodutível e estável em meio neutro. Embora os resultados preliminares com esta partícula pudessem ser promissores, devido aos impasses em sua produção, optamos por não avançar nos

ensaios com a nanopartícula de QS. Em relação à nanopartícula de sílica, no que se refere a sua produção, as partículas utilizadas em todos os nossos ensaios foram produzidas por nossos colaboradores do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Dessa forma, as nanopartículas de sílica possuem todas as suas características físico-químicas bem descritas, além de atenderem às expectativas quanto ao meio neutro, estabilidade e esterilidade. Sendo assim, decididos sobre a continuidade dos ensaios somente com as nanopartículas de sílica, as trouxemos para o contexto do nosso grupo de pesquisa.

O uso das nanopartículas de sílica no contexto do HIV é bastante amplo, sendo em parte relacionado ao *delivery* de drogas antirretrovirais (75,76), *bioimaging* (77), e também para o desenvolvimento de métodos sorológicos mais sensíveis (78). Ainda, há trabalhos que mostram resultados promissores na modificação de nanopartículas de sílica com de trimeros de proteínas do envelope do HIV-1, como candidatos para uma futura plataforma vacinal (79,80). Embora existam trabalhos associando a nanopartícula de sílica a diversos contextos, como HIV, imunoterapia para câncer (70,81,82) e alergias (83), até onde temos conhecimento, não existem trabalhos relacionando esta nanopartícula à protocolos de imunoterapia com uso de aDC1. Além disso, há uma infinidade de tamanhos, formulações e outras características imprescindíveis a serem consideradas quando, genericamente, falamos sobre as nanopartículas de sílica.

Nossos resultados iniciais mostraram que as concentrações testadas das nanopartículas de sílica tiveram menos impacto sobre a viabilidade celular quando comparado ao fato dessas partículas estarem associadas ou não a peptídeos. De fato, as concentrações mais altas da nanopartícula de sílica, superiores a 100 µg/ml, quando utilizadas sem associação aos peptídeos, declinaram drasticamente a viabilidade celular, não somente nas culturas com células de linhagem (Figuras 7 e 8) como também nas com aDC1 (Figura 11). Os achados para aDC1 por citometria de fluxo, quando comparados aos encontrados pelos ensaios de MTT com células de linhagem, embora sejam metodologias e células diferentes, têm-se resultados concordantes. Outro ponto importante a ser considerado no que diz respeito à melhora nos achados de viabilidade celular é a concentração de células em cultura nos ensaios de MTT. Diferentemente dos resultados com o peptídeo de hemopressina (Figura 9), as nanopartículas associadas ao BSA não obtiveram o mesmo feito na viabilidade (Figura 8), o que não se era esperado, uma vez que as nanopartículas também estavam associadas a um antígeno. Entretanto, cabe destacar que além do tipo de antígeno utilizado, tem-se a diferença na concentração de células de linhagem utilizada em cada ensaio, e podemos especular que devido à alta confluência celular sobre os

poços, a viabilidade das células pulsadas com BSA pode ter ficado comprometida. Dito isso, Winter e colaboradores (2011), que à princípio utilizaram nanopartículas de sílica sem associações à antígenos, afirmaram que as partículas ativaram o inflamassoma, levando ao aumento da secreção de IL-1 $\beta$ , além de induzirem a apoptose de células dendríticas de camundongos (84). Dessa forma, além de considerar a qual antígeno as nanopartículas estão conjugadas, fatores inerentes ao protocolo são igualmente relevantes na assertividade dos resultados.

Diante disso, após considerarmos o efeito das nanopartículas de sílica associadas a peptídeos de HIV sobre a viabilidade celular, avaliamos também o perfil fenotípico das células aDC1. No que diz respeito à análise do fenótipo das aDC1, selecionamos algumas moléculas presentes na superfície das células para avaliar seu processo de diferenciação, maturação e ativação celular. Em relação à molécula de superfície CD14, esperávamos utilizá-la como controle para seleção da população das aDC1. Isto é, o marcador CD14 é utilizado para diferenciar células de linhagem monocítica, tal qual utilizamos *beads* magnéticas deste mesmo marcador para separar as células CD14<sup>+</sup> das PBMCs. Em seguida, durante o processo de diferenciação destas células precursoras, as aDC1 reduzem a expressão de CD14. Assim, o marcador CD14 é comumente utilizado como critério de seleção negativa dentro de uma estratégia de análise para definir a população de aDC1, tendo como característica células CD14<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>. No entanto, no primeiro resultado relativo à análise fenotípica das aDC1, notamos que as células modificadas com nanopartículas de sílica estavam voltando a expressar o marcador CD14 na superfície celular, quando comparadas às variáveis controle, iDC e mDC, que receberam somente as citocinas de diferenciação e ativação e não foram pulsadas com as nanopartículas (Figura 12A). É válido ressaltar que as DCs presentes no sangue humano podem ser distinguidas fenotipicamente em três tipos: as plasmocitoides (pDC), e as mieloides CD141<sup>+</sup>DC e as CD1c<sup>+</sup>DC. As aDC1 que utilizamos em nosso grupo de pesquisa e também neste trabalho possuem similaridade com as DCs de origem mielóide. Dito isso, Heger e colaboradores (2020) revisaram a existência de subgrupos de CD1c<sup>+</sup>DC que expressam CD14 na superfície e, neste caso, compartilham características com os monócitos, como alta expressão de CD69, CD115 e CD163. Neste caso, houve então a distinção das CD1c<sup>+</sup>DC em CD1c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> das CD1c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>. Uma das diferenças notadas entre essas células foi que, as CD1c<sup>+</sup>DC que expressam a molécula CD14 não produzem IFN $\gamma$  como as células que não a expressa. Diante disso, os autores sugerem que as CD1c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> impedem a proliferação das células T e a diferenciação delas na linhagem Th1, fato que está aliado à baixa capacidade de apresentação



antigênica. Estes autores concluem que a razão pela qual essas DCs apresentam características de monócitos permanece incerta, e uma das suposições é de que essas células sejam derivadas de monócitos maduros, assim como são as aDC1, diferenciadas em culturas *in vitro* (85). Cabe ressaltar que o aumento na expressão da molécula CD14 em aDC1 já diferenciadas foi um achado inesperado, que nos levou a correlacionar, despretensiosamente, o processo de apoptose celular ao aumento da expressão deste marcador. Contudo, reforçamos que mais ensaios são necessários para sustentar tal hipótese.

No que diz respeito à molécula de superfície CD40, ela se expressa em altos níveis quando as DCs migram da periferia para os órgãos linfoides secundários. Assim, espera-se que sua expressão esteja aumentada nas aDC1 que receberam o coquetel de ativação e maturação, quando comparada à expressão em aDC1 imaturas (iDC). Outro aspecto a ser pontuado em relação ao marcador CD40 é a sua importância em estimular a expressão de outras moléculas coestimuladoras, no qual todo este conjunto de interações é bastante significativo para ativação de células T. A partir desta ativação, tem-se a liberação de citocinas pelas DCs, como por exemplo a IL-12. Esta citocina é capaz de direcionar a resposta imune para o tipo Th1, acarretando na indução de uma potente resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) e conseqüentemente, na produção de IFN $\gamma$ , tendo papel fundamental no controle de uma infecção viral. Assim como o marcador CD40, o CCR7 é um marcador que indica potencial de migração das DCs para os órgãos linfoides secundários, no qual as células maduras tendem a expressar mais significativamente este marcador quando comparadas às imaturas. Os marcadores CD80 e CD86 são moléculas coestimuladoras e estão expressas em altos níveis em DCs maduras quando comparado às imaturas, assim com a molécula CD83, que é um marcador de maturação de DCs. Por fim, o HLA-DR (MHC de classe II) é uma molécula necessária para apresentação antigênica às células T, e espera-se que seja mais expressa nas aDC1 em sua forma madura.

Dessa forma, das análises fenotípicas realizadas, esperávamos que a expressão dos marcadores de maturação e ativação das aDC1 estivesse relativamente aumentada quando comparada à expressão dos mesmos em sua forma imatura. Embora para alguns marcadores as medianas apresentadas tendem a mostrar essas diferenças, nenhuma significância estatística foi observada. Além disso, um achado inesperado foi a expressão da molécula CD14 em aDC1 já diferenciadas de monócitos.

Ainda que a análise fenotípica seja de suma importância nas etapas de padronização, avaliar isoladamente estes resultados não é o suficiente para validar a capacidade das aDC1, pulsadas com as nanopartículas associadas a peptídeos de HIV, em gerar uma resposta imune

específica. Desse modo, somado à análise fenotípica, faz-se necessária a análise funcional destas células que, neste caso, envolveu o cocultivo das aDC1 com linfócitos autólogos de pacientes cronicamente infectados pelo HIV. É válido destacar que, neste ensaio, a produção de IFN $\gamma$  foi inespecífica para os estímulos testados, não sendo possível observar diferenças significativas entre os linfócitos que receberam as aDC1 pulsadas com as nanopartículas dos controles.

Diante deste cenário, no qual não observamos uma resposta celular esperada no ensaio de cocultivo de aDC1 com linfócitos, avaliamos possíveis pontos de melhoria nos protocolos testados. Nossa primeira consideração nesta reestruturação dos ensaios foi selecionar novos peptídeos de HIV, isto porque nossos colaboradores da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, Pensilvânia, Estados Unidos) realizaram um trabalho para definir peptídeos relevantes de HIV, de regiões imunogênicas, com potencial para promover uma resposta específica. Dessa forma, a seleção de peptídeos para os nossos ensaios foi baseada no trabalho de Garcia-Bates e colaboradores (2021), cujo objetivo foi selecionar peptídeos que representassem epítomos altamente conservados e topologicamente restritos ao HIV-1, capazes de induzirem uma resposta específica por CTL, para aplicação terapêutica em protocolo clínico (66). Logo, baseando-se nestes resultados publicados, selecionamos alguns dos peptídeos que foram capazes de gerar resposta em um maior número de indivíduos estudados, e também consideramos a amplitude dessa resposta. Somado a este fato, ainda avaliamos a solubilidade dos peptídeos em água, a similaridade no número de resíduos e peso molecular, e também o ponto isoelétrico (pH), que deveria ser acima de 9,0. Em relação ao último critério, o intuito foi garantir que os peptídeos tivessem cargas positivas quando adicionados às soluções e reagentes de uso (pH $\pm$ 7,0), tornando possível a ligação às nanopartículas de sílica que possuem carga negativa. Todas as características acima mencionadas foram cautelosamente analisadas para se obter uma desejável conjugação dos peptídeos às nanopartículas. Ou seja, nosso intuito foi selecionar peptídeos de HIV capazes de gerar uma boa resposta celular, mas que também tivessem boa conjugação às nanopartículas de sílica. Uma vez decidido que manteríamos a concentração de nanopartículas em 10  $\mu$ g/ml, a concentração de peptídeos a elas associadas ficou em 1  $\mu$ g/ml, mantendo a proporção de 10:1 previamente calculada. Lembrando que a escolha por essa concentração foi pautada na concentração de 1  $\mu$ g/ml de peptídeos padronizada em nosso grupo como sendo o suficiente para induzir uma resposta celular específica por linfócitos T. Cabe ressaltar que um trabalho na área de dermatite de contato, ao utilizar uma nanopartícula de sílica de tamanho aproximado de 20 nm e carga negativa (-21,9 mV), definiu

como sendo de 0,01 mg/ml (10 µg/ml) a menor concentração não-citotóxica desta partícula, para uso em culturas de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) (86).

Dessa forma, tendo as concentrações de nanopartículas e peptídeos definidas, bem como os novos peptídeos de HIV que seriam utilizados, realizamos a caracterização das nanopartículas conjugadas aos peptídeos de HIV em relação ao tamanho e a carga. Ou seja, comparadas às nanopartículas vazias, as nanopartículas conjugadas aos peptídeos tiveram suas cargas modificadas, reforçando que houve a associação. Esta caracterização se faz importante para garantir que a modificação das partículas prosseguiu da forma desejada, e evitar, por exemplo, as agregações observadas nas partículas conjugadas sob as soluções não apropriadas (Figura 17A, 18B e 19A). Dito isso, talvez possamos especular que a expressão aumentada da molécula CD14 na variável “10 µg/ml NP + 1 µg/ml *pool*”, seja para “*Pool 1*” quanto para “*Pool 2*” (Figura 14A) possa ser decorrente de problemas na conjugação das nanopartículas aos peptídeos. Neste exemplo em questão foram utilizados os primeiros peptídeos selecionados (Tabela 2) e não foi realizada a caracterização das partículas após conjugação. A ausência desta etapa pode ter prejudicado nossos achados, uma vez que os resultados para estas variáveis se encontram muito similares à variável controle que recebeu somente a nanopartícula, sem conjugação aos *pools*.

Em seguida à caracterização das nanopartículas de sílica, conjugadas aos novos peptídeos de HIV selecionados, avaliamos a capacidade das aDC1 em internalizar estas partículas modificadas. Para tal, utilizamos as nanopartículas de sílica coradas com FITC, um fluorocromo amplamente utilizado em nosso laboratório e que sabidamente não teria interferência sobre a fluorescência dos marcadores celulares. Cabe ressaltar que diferentemente do ensaio com os *pools* de peptídeos, neste momento foi utilizado somente o peptídeo Gag.27 para conjugação às nanopartículas, para minimizar as chances de agregação das partículas e otimizar a quantidade de variáveis. Dessa forma, para avaliar o melhor tempo para internalização das nanopartículas de sílica, conjugadas ao peptídeo Gag.27, diferentes tempos de pulso foram testados por citometria de fluxo. Consideramos que a internalização das nanopartículas nas variáveis de 8 e 24 horas foi satisfatória, principalmente quando comparamos às 2 horas de pulso anteriormente utilizadas. Diante disso, se levarmos em consideração que nos ensaios anteriores aos testes de internalização o pulso das nanopartículas, associadas ou não a peptídeos, tiveram somente 2 horas de pulso, os achados podem estar subestimados, tendo tido uma menor internalização das partículas pelas células. Tendo em vista os resultados obtidos com os tempos de 8 e 24 horas, optamos por dar segmento com o tempo

de 8 horas de pulso, visto que a duração total das aDC1 em cultura ficaria em 7 dias, da mesma forma que o controle, conforme já mencionamos em seções anteriores. Complementando a avaliação da internalização das partículas pelas aDC1 por citometria de fluxo, prosseguimos na tentativa de visualizar esta internalização por microscopia. Dito isso, a padronização do protocolo para marcação de imunofluorescência foi realizada em colaboração ao Laboratório de Imunogenética, do Instituto de Ciências Biomédicas IV (ICB-IV) da Universidade de São Paulo (USP). Embora tenha sido realizado um único ensaio, foi possível constatar a presença das nanopartículas ao redor do núcleo das aDC1, corroborando dados obtidos anteriormente, confirmando a internalização das nanopartículas de sílica pelas aDC1. Devido à escassez de tempo não foi possível a realização de mais ensaios, sendo importante considerar que ajustes no protocolo são necessários para aprimorar as imagens adquiridas, como a adição de um marcador para a superfície das células, etapas de lavagem para reduzir o *background*, e também optar pela aquisição das imagens por microscopia confocal, o que ofertaria mais detalhes do processo de internalização.

Cabe ressaltar que após todas as etapas realizadas nesta tese, esperava-se o ensaio de cocultivo de linfócitos autólogos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV com as aDC1 pulsadas com nanopartículas de sílica associadas aos novos peptídeos selecionados. De fato, a ausência destes dados alimenta os questionamentos referentes, por exemplo, ao potencial dos peptídeos selecionados em induzir uma resposta específica por linfócitos T. Ainda, nos indaga sobre a eficiência das nanopartículas de sílica no melhoramento do *delivery* antigênico para as aDC1. Outro ponto passível de testes é quanto ao pulso dos peptídeos sobre as aDC1, em se dando de forma individual ou em *pool*, e o impacto sobre a produção de uma resposta linfocítica. Além disso, reconhecemos que a amostragem de nossos ensaios foi restrita e os achados contam com vieses por ora imprecisas.

Em suma, até o momento, diante dos resultados apresentados nesta tese, reiteramos o potencial uso das nanopartículas de sílica conjugadas a peptídeos de HIV para culturas de células com aDC1. Embora a nanopartícula de QS e sua manipulação em meio ácido não favoreça a viabilidade de culturas celulares, um dos detalhes que nos fez optar por deixá-la, obtivemos resultados satisfatórios no que diz respeito à viabilidade com a nanopartícula de sílica quando conjugadas aos peptídeos de HIV. Além disso, estas nanopartículas de sílica, conjugadas aos peptídeos de HIV, até a concentração de 10 µg/ml, parecem não interferir na viabilidade das aDC1. Quanto à análise fenotípica das aDC1 pulsadas com as nanopartículas de sílica, foi observado um aumento na expressão da molécula CD14, o que pode estar relacionado

com a apoptose celular. Por fim, o tempo de 8 horas parece ser o suficiente para a internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de Gag.27 do HIV por aDC1.

## 6. CONCLUSÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de nanopartículas para o *delivery* de antígenos de HIV em células dendríticas do tipo aDC1. Em síntese, obtivemos as seguintes conclusões:

- Não foi possível a produção de nanopartículas de quitosana para *delivery* de antígenos de HIV dentro dos critérios estabelecidos.
- Embora a nanopartícula de quitosana tenha sido descontinuada de nossos ensaios, no que diz respeito à viabilidade das aDC1, quando pulsadas com a nanopartícula de sílica, os resultados foram satisfatórios. Até a concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas de sílica, conjugadas a 1  $\mu\text{g/ml}$  de peptídeos de HIV, parece não interferir na viabilidade das aDC1.
- Nenhuma diferença significativa foi observada quanto à expressão de moléculas de ativação e maturação sobre a superfície de aDC1, quando pulsadas com nanopartículas associadas à peptídeos. Entretanto, foi observado um aumento na expressão da molécula CD14, o que pode estar relacionado com a apoptose celular.
- As aDC1, pulsadas com as nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV inicialmente testados, não foram capazes de induzir uma resposta imune específica por linfócitos autólogos. Mais ensaios, preferencialmente com os novos peptídeos selecionados, são necessários.
- O tempo de 8 horas parece ser o suficiente para a internalização das nanopartículas de sílica conjugadas aos peptídeos de HIV por aDC1.

## REFERÊNCIAS

1. HIV and AIDS [Internet]. [cited 2023 Nov 2]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
2. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - HIV/AIDS 2022. 2022;1–78. Available from: [https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2022/hiv-aids/boletim\\_hiv\\_aids\\_-2022\\_internet\\_31-01-23.pdf/@download/file](https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2022/hiv-aids/boletim_hiv_aids_-2022_internet_31-01-23.pdf/@download/file)
3. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of clinical virology*. 2005;34(4):233–44.
4. Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(24):2283–5.
5. Ministério da Saúde. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV [Internet]. Wersom ESS, Motta LR da, Bazzo ML, Franchini M, Junior O da CF, editors. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2013. 1–55 p. Available from: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)
6. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;567(1):58–68.
7. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):279.
8. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* (1979). 1998;279(5359):2103–6.
9. Deeks SG, Lewin SR, Havlir D V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*. 2013;382(9903):1525–33.
10. Chun TW, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, Collier AC, et al. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS*. 2010;24(18):2803.
11. Ahmad A, Rinaldo CR. A novel anti-HIV immunotherapy to cure HIV. *Aids*. 2017;31(3):447–9.
12. Naran K, Nundalall T, Chetty S, Barth S. Principles of Immunotherapy: implications for treatment strategies in cancer and infectious diseases. *Front Microbiol*. 2018;9.
13. Yang H, Wallace Z, Dorrell L. Therapeutic targeting of HIV reservoirs: how to give T cells a new direction. *Front Immunol*. 2018;9:2861.
14. Carcelain G, Autran B. Immune interventions in HIV infection. *Immunol Rev*. 2013;254(1):355–71.
15. Figdor CG, de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*. 2004;10(5):475.

16. Oshiro TM, De Almeida A, da Silva Duarte AJ. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. *Immunotherapy*. 2009;1(6):1039–51.
17. Andrés C, Plana M, Guardo AC, Alvarez-Fernández C, Climent N, Gallart T, et al. HIV-1 reservoir dynamics after vaccination and antiretroviral therapy interruption are associated with dendritic cell vaccine-induced T cell responses. *J Virol*. 2015;89(18):9189–99.
18. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir D V., Günthard HF, Lam RY, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(9):1410–8.
19. Hocqueloux L, Avettand-fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(5):1169–78.
20. Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang Z, Sun H, Li JZ, et al. Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *J Virol*. 2014;88(17):10056–65.
21. Cunningham WJH, Murray JM, Natarajan V, Amin J, Moore CL, Emery S, et al. Early antiretroviral therapy with raltegravir generates sustained reductions in HIV reservoirs but not lower T-cell activation levels. *Aids*. 2015;29(8):911–9.
22. Laanani M, Ghosn J, Essat A, Melard A, Seng R, Gousset M, et al. Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(11):1715–21.
23. Massanella M, Bender Ignacio RA, Lama JR, Pagliuzza A, Dasgupta S, Alfaro R, et al. Long-term effects of early antiretroviral initiation on HIV reservoir markers: a longitudinal analysis of the MERLIN clinical study. *Lancet Microbe*. 2021;2(5):e198–209.
24. Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. HIV. *The Lancet*. 2018;6736(18).
25. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(4):1109–18.
26. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, et al.  $\alpha$ -type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*. 2004;64(17):5934–7.
27. Smith KN, Mailliard RB, Piazza PA, Fischer W, Korber BT, Fecek RJ, et al. Effective cytotoxic T lymphocyte targeting of persistent HIV-1 during antiretroviral therapy requires priming of naive CD8+ T cells. *mBio*. 2016;7(3):10–1128.
28. Patham B, Simmons GL, Subramanya S. Advances in dendritic cell-based vaccines for HIV. *Curr Med Chem*. 2011;18(26):3987–94.



29. da Silva LT, da Silva WC, de Almeida A, da Silva Reis D, Santillo BT, Rigato PO, et al. Characterization of monocyte-derived dendritic cells used in immunotherapy for HIV-1-infected individuals. *Immunotherapy*. 2018;10(10):871–85.
30. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, et al. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. *J Med Virol*. 2006;78(6):711–8.
31. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(2):284–92.
32. Routy JP, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Nicolette C, Healey D, Jain R, et al. Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clinical immunology*. 2010;134(2):140–7.
33. Allard SD, De Keersmaecker B, de Goede AL, Verschuren EJ, Koetsveld J, Reedijk ML, et al. A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption. *Clinical immunology*. 2012;142(3):252–68.
34. Van Gulck E, Vlieghe E, Vekemans M, Van Tendeloo VFI, Van De Velde A, Smits E, et al. mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients. *Aids*. 2012;26(4):F1–12.
35. García F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(10):1680–5.
36. Gil C, Climent N, García F, Hurtado C, Nieto-Márquez S, León A, et al. Ex vivo production of autologous whole inactivated HIV-1 for clinical use in therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2011;29(34):5711–24.
37. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*. 2004;10(12):1359.
38. Bookstaver ML, Tsai SJ, Bromberg JS, Jewell CM. Improving vaccine and immunotherapy design using biomaterials. *Trends Immunol*. 2018;39(2):135–50.
39. Dacoba TG, Olivera A, Torres D, Crecente-Campo J, Alonso MJ. Modulating the immune system through nanotechnology. In: *Seminars in immunology*. Elsevier; 2017. p. 78–102.
40. Qasim M, Lim DJ, Park H, Na D. Nanotechnology for diagnosis and treatment of infectious diseases. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(10):7374–87.
41. Shao K, Singha S, Clemente-Casares X, Tsai S, Yang Y, Santamaria P. Nanoparticle-based immunotherapy for cancer. *ACS Nano*. 2014;9(1):16–30.

42. Grippin AJ, Sayour EJ, Mitchell DA. Translational nanoparticle engineering for cancer vaccines. *Oncoimmunology*. 2017;6(10):e1290036.
43. Pankrac J, Klein K, Mann JFS. Eradication of HIV-1 latent reservoirs through therapeutic vaccination. *AIDS Res Ther*. 2017;14(1):45.
44. Shi GN, Zhang CN, Xu R, Niu JF, Song HJ, Zhang XY, et al. Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. *Biomaterials*. 2017;113:191–202.
45. Climent N, García I, Marradi M, Chiodo F, Miralles L, Maleno MJ, et al. Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses. *Nanomedicine*. 2018;14(2):339–51.
46. Coolen AL, Lacroix C, Mercier-Gouy P, Delaune E, Monge C, Exposito JY, et al. Poly (lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation. *Biomaterials*. 2019;195:23–37.
47. Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Front Immunol*. 2018;9:155.
48. Pejawar-Gaddy S, Kovacs JM, Barouch DH, Chen B, Irvine DJ. Design of lipid nanocapsule delivery vehicles for multivalent display of recombinant Env trimers in HIV vaccination. *Bioconjug Chem*. 2014;25(8):1470–8.
49. Surenaud M, Lacabaratz C, Zurawski G, Lévy Y, Lelièvre JD. Development of an epitope-based HIV-1 vaccine strategy from HIV-1 lipopeptide to dendritic-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(10):955–72.
50. Zhao D, Yu S, Sun B, Gao S, Guo S, Zhao K. Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2018;10(4):462.
51. Ariza-Sáenz M, Espina M, Bolaños N, Calpena AC, Gomara MJ, Haro I, et al. Penetration of polymeric nanoparticles loaded with an HIV-1 inhibitor peptide derived from GB virus C in a vaginal mucosa model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;120:98–106.
52. Mehrabi M, Montazeri H, Mohamadpour Dounighi N, Rashti A, Vakili-Ghartavol R. Chitosan-based nanoparticles in mucosal vaccine delivery. *Arch Razi Inst*. 2018;73(3):165–76.
53. Singh B, Maharjan S, Sindurakar P, Cho KH, Choi YJ, Cho CS. Needle-free immunization with chitosan-based systems. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3639.
54. Gu J, Al-Bayati K, Ho EA. Development of antibody-modified chitosan nanoparticles for the targeted delivery of siRNA across the blood-brain barrier as a strategy for inhibiting HIV replication in astrocytes. *Drug Deliv Transl Res*. 2017;7(4):497–506.
55. Cao Y, Tan YF, Wong YS, Liew MWJ, Venkatraman S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar Drugs*. 2019;17(6):381.

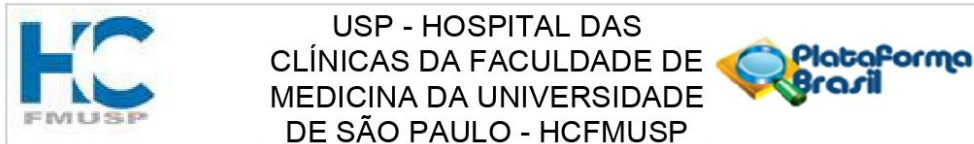
56. Khademi F, Taheri RA, Avarvand AY, Vaez H, Momtazi-Borojeni AA, Soleimanpour S. Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines? *Microb Pathog*. 2018;121:218–23.
57. Chen WR. Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
58. R Aghasadeghi M, Heidari H, M Sadat S, Irani S, Amini S, D Siadat S, et al. Lamivudine-PEGylated chitosan: A novel effective nanosized antiretroviral agent. *Curr HIV Res*. 2013;11(4):309–20.
59. Ramana LN, Sharma S, Sethuraman S, Ranga U, Krishnan UM. Evaluation of chitosan nanoformulations as potent anti-HIV therapeutic systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(1):476–84.
60. Hudson SP, Padera RF, Langer R, Kohane DS. The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Nov 10];29(30):4045–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18675454/>
61. Li W, Liu Z, Fontana F, Ding Y, Liu D, Hirvonen JT, et al. Tailoring Porous Silicon for Biomedical Applications: From Drug Delivery to Cancer Immunotherapy. *Advanced Materials* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Nov 10];30(24):1703740. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.201703740>
62. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shapero MH, Dupuis M, Van Schooten WCA, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 1998 May 1 [cited 2022 Nov 7];14(7):551–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9591709/>
63. da Silva LT, Santillo BT, de Almeida A, Duarte AJ da S, Oshiro TM. Using Dendritic Cell-Based Immunotherapy to Treat HIV: How Can This Strategy be Improved? *Front Immunol* [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2022 Nov 7];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30619346/>
64. Bagwe RP, Yang C, Hilliard LR, Tan W. Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. *Langmuir* [Internet]. 2004 Sep 14 [cited 2022 Nov 9];20(19):8336–42. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la049137j>
65. Auger A, Samuel J, Poncelet O, Raccurt O. A comparative study of non-covalent encapsulation methods for organic dyes into silica nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* [Internet]. 2011 [cited 2022 Nov 9];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21711855/>
66. Garcia-Bates TM, Palma ML, Anderko RR, Hsu DC, Ananworanich J, Korber BT, et al. Dendritic cells focus CTL responses toward highly conserved and topologically important HIV-1 epitopes. *EBioMedicine*. 2021;63.
67. Tian B, Hua S, Liu J. Multi-functional chitosan-based nanoparticles for drug delivery: Recent advanced insight into cancer therapy. *Carbohydr Polym*. 2023;120972.

68. Iqbal Y, Ahmed I, Irfan MF, Chatha SAS, Zubair M, Ullah A. Recent advances in chitosan-based materials; The synthesis, modifications and biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2023;121318.
69. Kwon JY, Kim HL, Lee JY, Ju YH, Kim JS, Kang SH, et al. Undetectable levels of genotoxicity of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in in vitro and in vivo tests. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2022 Nov 10];9(Suppl 2):173. Available from: [/pmc/articles/PMC4279720/](#)
70. Escriche-Navarro B, Escudero A, Lucena-Sánchez E, Sancenón F, García-Fernández A, Martínez-Mañez R, et al. Mesoporous Silica Materials as an Emerging Tool for Cancer Immunotherapy. *Advanced Science* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2022 Nov 10];9(26):2200756. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/advs.202200756>
71. Yazdimamaghani M, Moos PJ, Dobrovolskaia MA, Ghandehari H. Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: Status and prospects. *Nanomedicine* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Nov 8];16:106–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30529789/>
72. Liu N, Tang M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *J Appl Toxicol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Nov 8];40(1):16–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31294482/>
73. Liu JY, Sayes CM. A toxicological profile of silica nanoparticles. *Toxicol Res (Camb)* [Internet]. 2022 Aug 29 [cited 2022 Nov 10];11(4):565–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36051665/>
74. Liang Q, Sun M, Ma Y, Wang F, Sun Z, Duan J. Adverse effects and underlying mechanism of amorphous silica nanoparticles in liver. *Chemosphere* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Nov 6];311(Pt 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36280121/>
75. Vasilyeva S V., Shtil AA, Petrova AS, Balakhnin SM, Achigecheva PY, Stetsenko DA, et al. Conjugates of phosphorylated zalcitabine and lamivudine with SiO<sub>2</sub>nanoparticles: Synthesis by CuAAC click chemistry and preliminary assessment of anti-HIV and antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2017;25(5):1696–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.038>
76. Fotooh Abadi L, Kumar P, Gajbhiye V, Paknikar KM, Kulkarni S. Non-nuke HIV-1 inhibitor shuttled by mesoporous silica nanoparticles effectively slows down HIV-1 replication in infected human cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 Nov 6];194. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32629364/>
77. Choi JH, Kang SR, Kim H, Um SH, Shin K, Choi JW, et al. Dye-doped silica nanoparticle with HIV-1 TAT peptide for bioimaging. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2022 Nov 6];9(2):291–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23627057/>
78. Chunduri LAA, Kurdekar A, Haleygirisetty MK, Bulagonda EP, Kamisetti V, Hewlett IK. Femtogram Level Sensitivity achieved by Surface Engineered Silica Nanoparticles

- in the Early Detection of HIV Infection. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Nov 6];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28769052/>
79. Thalhauser S, Peterhoff D, Wagner R, Breunig M. Presentation of HIV-1 Envelope Trimers on the Surface of Silica Nanoparticles. *J Pharm Sci* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Nov 6];109(1):911–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31682830/>
  80. Li S, Wang B, Jiang S, Pan Y, Shi Y, Kong W, et al. Surface-Functionalized Silica-Coated Calcium Phosphate Nanoparticles Efficiently Deliver DNA-Based HIV-1 Trimeric Envelope Vaccines against HIV-1. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2021 Nov 17 [cited 2022 Nov 6];13(45):53630–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34735127/>
  81. Dong Y, Gao J, Pei M, Wang X, Zhang C, Du Y, et al. Antigen-conjugated silica solid sphere as nanovaccine for cancer immunotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2685–97.
  82. Yang F, Shi K, Jia Y peng, Hao Y, Peng J rong, Qian Z yong. Advanced biomaterials for cancer immunotherapy. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2020;41(7):911–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0372-z>
  83. Scheibelhofer S, Machado Y, Feinle A, Thalhamer J, Hüsing N, Weiss R. Potential of nanoparticles for allergen-specific immunotherapy - use of silica nanoparticles as vaccination platform. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Nov 6];13(12):1777–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27321476/>
  84. Winter M, Beer HD, Hornung V, Krämer U, Schins RPF, Förster I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology*. 2011;5(3):326–40.
  85. Heger L, Hofer TP, Bigley V, de Vries IJM, Dalod M, Dudziak D, et al. Subsets of CD1c<sup>+</sup> DCs: Dendritic Cell Versus Monocyte Lineage. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Sep 30 [cited 2022 Nov 8];11. Available from: </pmc/articles/PMC7554627/>
  86. Wong Lau A, Perez Pineda J, DeLouise LA. Immunomodulatory effects of nanoparticles on dendritic cells in a model of allergic contact dermatitis: importance of PD-L2 expression. *Sci Rep*. 2023;13(1):15992.

## ANEXOS

### ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Nanopartículas como estratégia de delivery de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV

**Pesquisador:** Telma Miyuki Oshiro Sumida

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19929019.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.586.539

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa que visa avaliar se células dendríticas pulsadas com HIV inativado carregado por nanopartículas é capaz de potencializar in vitro a resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV, constituindo potencial produto vacinal para imunoterapia anti-HIV.

##### Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto, visa avaliar o efeito do uso de nanopartículas de quitosana para o delivery de HIV inativado em células dendríticas derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV-1.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco baixo, correspondente à coleta de sangue para realização dos ensaios laboratoriais. Os benefícios estão relacionados à contribuição do participante para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento anti-HIV, que poderá trazer muitos benefícios futuramente.

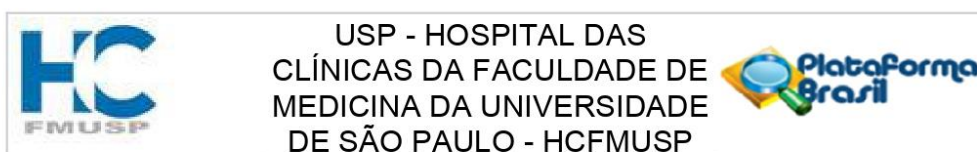
##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa factível, que visa avaliar a capacidade das nanopartículas em melhorar a internalização do HIV pelas células dendríticas, constituindo potencial produto vacinal para imunoterapia anti-HIV.

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLEs encontram-se em anexo e redigidos de maneira clara. As adequações solicitadas foram

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



Continuação do Parecer: 3.586.539

prontamente atendidas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto poderá contribuir para melhor caracterização in vitro da resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV, constituindo potencial produto para imunoterapia anti-HIV.

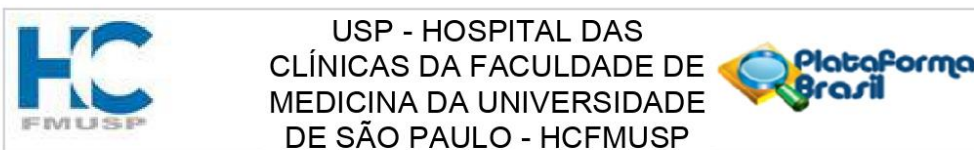
**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1393421.pdf	11/09/2019 16:27:58		Aceito
Outros	cartarespostaplataformabrasil.pdf	11/09/2019 16:24:21	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Outros	tlegrupocontrole.pdf	11/09/2019 16:17:10	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	28/08/2019 14:26:12	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetobruna.pdf	16/08/2019 16:53:47	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Outros	aprovacaoconselho.pdf	16/08/2019 16:26:10	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tlecorrigido.pdf	16/08/2019 16:21:27	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	declaracaorecursos.pdf	11/07/2019 16:35:46	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	11/07/2019 16:30:23	Bruna Tiaki Tiyo	Aceito

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



Continuação do Parecer: 3.586.539

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 19 de Setembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador(a))**

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



## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

##### DADOS DA PESQUISA

**Título da pesquisa:** Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV

**Pesquisadora principal:** Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida

**Departamento/Instituto:** Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM56

Convidamos o(a) senhor(a) para participar de uma pesquisa que futuramente poderá contribuir para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os resultados obtidos com este trabalho poderão melhorar a qualidade de vida de pessoas vivendo com HIV/aids.

O Laboratório de Investigação Médica – LIM-56, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP está desenvolvendo uma pesquisa relacionada ao tratamento da infecção pelo HIV. Este estudo consiste em retirar alguns glóbulos brancos do sangue e testar em laboratório algumas estratégias para melhorar a imunidade do paciente.

Para participar do estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço, entre outros) e será solicitado que o(a) senhor(a) assine um documento autorizando a utilização de seus dados e material coletado, que serão identificados por códigos para preservar seu sigilo e sua identidade.

Após esta etapa, serão coletados cerca de 70mL (aproximadamente 5 colheres de sopa) de sangue. A coleta não trará nenhum risco grave a sua saúde, somente poderá causar um desconforto devido a picada para introdução da agulha no seu antebraço, idêntico ao processo comum de coleta de sangue. O sangue coletado será utilizado para realização de exames em um laboratório especializado.

Este estudo não prevê benefícios diretos para o(a) senhor(a), mas poderá ajudar no desenvolvimento de métodos para melhorar a qualidade de vida de pessoas vivendo com HIV/aids. Participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. O(a) senhor(a) tem direito de recusar fazer parte do estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalização alguma, podendo continuar com o tratamento na rede pública de saúde sem nenhum problema. Uma vez aceitando fazer parte do estudo, o(a) senhor(a) fica com uma via deste termo de consentimento, assinado também pelo pesquisador responsável.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros participantes, e o(a) senhor(a) não será identificado. Não haverá nenhum resultado direto para ser entregue ao(à) senhor(a), mas se o(a) senhor(a) desejar poderá solicitar informações sobre o andamento do estudo e ter acesso aos resultados dos seus exames. Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos que possam afetar sua saúde, bem-estar ou vontade de continuar participando deste estudo.

Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se for necessário, o orçamento da pesquisa disponibilizará uma ajuda de custo de R\$20,00 por participante para custear o transporte. Todo material será utilizado durante e exclusivamente para o projeto.

Aceitando participar deste estudo, o(a) senhor(a) estará autorizando a utilização da sua amostra neste estudo, sendo que essas informações receberão um código e a identidade do(a) senhor(a) não será revelada. Somente as pessoas envolvidas diretamente no estudo poderão ter acesso às suas informações, e elas se comprometem a não divulgá-las. Os dados gerados nesta pesquisa somente serão utilizados pela equipe deste projeto.

O(A) senhor(a) autoriza a equipe deste projeto acessar seus prontuários para coletar dados que sejam relevantes para esta pesquisa?

(  ) SIM (  ) NÃO

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Telma M. Oshiro Sumida, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio IMT 2, 3º andar, Cerqueira César, São Paulo/SP; telefone (11) 3061-7499, e-mail: [tmoshiro@yahoo.com](mailto:tmoshiro@yahoo.com). Se o(a) senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar; Cerqueira César, São Paulo/SP; telefone: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).

Caso, em algum momento, deseje que seu material e/ou informações não sejam mais utilizados para futuras pesquisas, deverá fazer essa solicitação por escrito e entregá-la para a equipe de pesquisa. A partir da data de entrega da sua carta de desistência, seu material e/ou informações não serão mais utilizados para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito do estudo "Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV". Eu discuti as informações acima com a pesquisadora responsável (Dra. Telma M. Oshiro Sumida) ou a pessoa por ela delegada (Bruna Tiaki Tiyo) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros, para mim, os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos, riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pela pesquisadora.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa/representante legal

Data / /

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO : M  F 

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO : M  F 

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

---

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para grupo controle

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### Grupo Controle

---

#### DADOS DA PESQUISA

**Título da pesquisa:** Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV

**Pesquisadora principal:** Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida

**Departamento/Instituto:** Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM56

Convidamos o(a) senhor(a) para participar de uma pesquisa que futuramente poderá contribuir para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os resultados obtidos com este trabalho poderão melhorar a qualidade de vida de pessoas vivendo com HIV/aids.

O Laboratório de Investigação Médica – LIM-56, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP está desenvolvendo uma pesquisa relacionada ao tratamento da infecção pelo HIV. Este estudo consiste em retirar alguns glóbulos brancos do sangue e testar em laboratório algumas estratégias para avaliar a imunidade. Devido à necessidade de comparação de amostras de pessoas vivendo com HIV/aids com amostras de indivíduos saudáveis, o(a) senhor(a) foi convidado(a) para participar desta pesquisa para compor o grupo de indivíduos não afetados pela doença, que chamamos de grupo controle.

Para participar do estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço, entre outros) e será solicitado que o(a) senhor(a) assine um documento autorizando a utilização de seus dados e material coletado, que serão identificados por códigos para preservar seu sigilo e sua identidade.

Após esta etapa, serão coletados cerca de 70mL (aproximadamente 5 colheres de sopa) de sangue. A coleta não trará nenhum risco grave a sua saúde, somente poderá causar um desconforto devido a picada para introdução da agulha no seu antebraço, idêntico ao processo comum de coleta de sangue. O sangue coletado será utilizado para realização de exames em um laboratório especializado, e posteriormente comparado com os exames das pessoas vivendo com HIV/aids.

Este estudo não prevê benefícios diretos para o(a) senhor(a), mas poderá ajudar no desenvolvimento de métodos para melhorar a qualidade de vida de pessoas vivendo com HIV/aids. Participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. O(a) senhor(a) tem direito de recusar fazer parte do estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalização alguma. Uma vez aceitando fazer parte do estudo, o(a) senhor(a) fica com uma via deste termo de consentimento, assinado também pelo pesquisador responsável.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros participantes, e o(a) senhor(a) não será identificado. Não haverá nenhum resultado direto

para ser entregue ao(à) senhor(a), mas se o(a) senhor(a) desejar poderá solicitar informações sobre o andamento do estudo e ter acesso aos resultados dos seus exames.

Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se for necessário, o orçamento da pesquisa disponibilizará uma ajuda de custo de R\$20,00 por participante para custear o transporte. Todo material será utilizado durante e exclusivamente para o projeto.

Aceitando participar deste estudo, o(a) senhor(a) estará autorizando a utilização da sua amostra neste estudo, sendo que essas informações receberão um código e a identidade do(a) senhor(a) não será revelada. Somente as pessoas envolvidas diretamente no estudo poderão ter acesso às suas informações, e elas se comprometem a não divulgá-las. Os dados gerados nesta pesquisa somente serão utilizados pela equipe deste projeto.

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Telma M. Oshiro Sumida, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, prédio IMT 2, 3º andar, Cerqueira César, São Paulo/SP; telefone (11) 3061-7499, e-mail: [tmoshiro@yahoo.com](mailto:tmoshiro@yahoo.com). Se o(a) senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, Cerqueira César, São Paulo/SP; telefone: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).

Caso, em algum momento, deseje que seu material e/ou informações não sejam mais utilizados para futuras pesquisas, deverá fazer essa solicitação por escrito e entregá-la para a equipe de pesquisa. A partir da data de entrega da sua carta de desistência, seu material e/ou informações não serão mais utilizados para pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito do estudo “Nanopartículas como estratégia de *delivery* de antígenos de HIV para o pulso de células dendríticas derivadas de monócitos: potencial aplicação na imunoterapia anti-HIV”. Eu discuti as informações acima com a pesquisadora responsável (Dra. Telma M. Oshiro Sumida) ou a pessoa por ela delegada (Bruna Tiaki Tiyo) sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros, para mim, os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos, riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pela pesquisadora.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa/representante legal

Data / /

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO : M  F 

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO : M  F 

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

---

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXO D – Artigos publicados

### Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in outpatients of a large public university hospital in Sao Paulo, Brazil

Luanda Mara da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Bruna Tiaki Tiyo<sup>1</sup>, Lais Teodoro da Silva<sup>1</sup>, Luiz Augusto Marcondes Fonseca<sup>1</sup>, Rosana Coura Rocha<sup>1</sup>, Vera Aparecida dos Santos<sup>2</sup>, Carina Ceneviva<sup>2</sup>, Anderson Aparecido Bedin<sup>2</sup>, Alexandre de Almeida<sup>1</sup>, Alberto José da Silva Duarte<sup>1,2</sup>, Telma Miyuki Oshiro<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Coronavirus disease 19 (COVID-19) is caused by SARS-CoV-2 and the manifestations of this infection range from an absence of symptoms all the way up to severe disease leading to death. To estimate the prevalence of past infection in a population, the most readily available method is the detection of antibodies against the virus. This study has investigated the prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in outpatients of the Hospital das Clínicas, in Sao Paulo city (Brazil), which is a large university hospital belonging to the public health system that cares for patients with complex diseases who need tertiary or quaternary medical care. Our serological inquiry was carried out for 6 weeks, with once-a-week blood sampling and included 439 patients from several outpatient services. Overall, 61 patients tested positive for anti-SARS-CoV-2 IgG (13.9%); 56.1 % of the patients live in Sao Paulo city, with the remaining living in other towns of the metropolitan area; 32.8% of the patients testing positive for IgG antibodies to SARS-CoV-2 were asymptomatic, 55.7% developed mild or moderate disease and 11.5% had to be hospitalized. The prevalence of SARS-CoV-2 positive serology was lower among patients who had received the seasonal influenza vaccine compared to the ones who did not. These findings may indicate that those individuals care more about health issues, and/or that they have a better access to health care and/or a better quality of health care service. The large proportion of patients who were unaware of having had contact with SARS-CoV-2 deserves attention, reflecting the scarcity of tests performed in the population.

**KEYWORDS:** COVID-19. Anti-SARS-CoV-2 antibodies. Serological inquiry.

#### INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the causative agent of the ongoing outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19), that started in Wuhan, China at the end of 2019, and had already killed about 917,000 people worldwide<sup>1</sup>. SARS-CoV-2 are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses belonging to the *Coronaviridae* family<sup>2,3</sup>. Clinical manifestations include a variety of respiratory symptoms, varying from mild to severe, which are associated with high mortality<sup>4,5</sup>.

In Brazil, up to September 12<sup>th</sup> 2020, more than 4 million cases had been registered, including more than 130 thousand deaths<sup>6</sup>. The community transmission of SARS-CoV-2 is widespread in Brazil, with the city of Sao Paulo as the first epicenter of the disease. The city is surrounded by several neighboring towns,

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56), São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Divisão de Laboratório Central, São Paulo, São Paulo, Brazil

**Correspondence to:** Luanda Mara da Silva Oliveira  
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56), Rua Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, CEP 05403000, São Paulo, SP, Brazil

**E-mail:** [luandaoliveira@usp.br](mailto:luandaoliveira@usp.br),  
[luandamaraoliveira@gmail.com](mailto:luandamaraoliveira@gmail.com)

**Received:** 21 September 2020

**Accepted:** 13 October 2020



## SARS-CoV-2 recombinant proteins stimulate distinct cellular and humoral immune response profiles in samples from COVID-19 convalescent patients

Lais Teodoro da Silva <sup>1,\*</sup> Marina Mazzilli Ortega <sup>1</sup> Bruna Tiaki Tiyo <sup>1</sup> Isabelle Freire Tabosa Viana <sup>1,III</sup> Tainá Evily de Lima <sup>III</sup> Tania Regina Tozetto-Mendoza <sup>II</sup> Luanda Mara da Silva Oliveira <sup>1</sup> Franciane Mouradian Emidio Teixeira <sup>1</sup> Roberto Dias Lins <sup>III</sup> Alexandre de Almeida <sup>1</sup> Maria Cassia Mendes-Correa <sup>II</sup> Alberto Jose da Silva Duarte <sup>1,IV</sup> Telma Miyuki Oshiro <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR. <sup>II</sup>Laboratorio de Virologia (LIM-52), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR. <sup>III</sup>Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, BR. <sup>IV</sup>Divisão de Laboratório Central, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

Silva LT, Ortega MM, Tiyo BT, Viana IF, Lima TE, Tozetto-Mendoza TR, et al. SARS-CoV-2 recombinant proteins stimulate distinct cellular and humoral immune response profiles in samples from COVID-19 convalescent patients. *Clinics* (São Paulo). 2021;76:e3548

\*Corresponding author. E-mail: lais.teodoro@usp.br

**OBJECTIVES:** In this preliminary study we investigated cellular and humoral immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antigens in blood samples from 14 recovered coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients and compared them to those in samples from 12 uninfected/unvaccinated volunteers.

**METHODS:** Cellular immunity was assessed by intracellular detection of IFN- $\gamma$  in CD3+ T lymphocytes after stimulation with SARS-CoV-2 spike (S1), nucleocapsid (NC), or receptor-binding domain (RBD) recombinant proteins or overlapping peptide pools covering the sequence of SARS-CoV-2 spike, membrane and nucleocapsid regions. The humoral response was examined by ELISAs and/or chemiluminescence assays for the presence of serum IgG antibodies directed to SARS-CoV-2 proteins.

**RESULTS:** We observed differences between humoral and cellular immune profiles in response to stimulation with the same proteins. Assays of IgG antibodies directed to SARS-CoV-2 NC, RBD and S1/S2 recombinant proteins were able to differentiate convalescent from uninfected/unvaccinated groups. Cellular immune responses to SARS-CoV-2 protein stimuli did not exhibit a specific response, as T cells from both individuals with no history of contact with SARS-CoV-2 and from recovered donors were able to produce IFN- $\gamma$ .

**CONCLUSIONS:** Determination of the cellular immune response to stimulation with a pool of SARS-CoV-2 peptides but not with SARS-CoV-2 proteins is able to distinguish convalescent individuals from unexposed individuals. Regarding the humoral immune response, the screening for serum IgG antibodies directed to SARS-CoV-2 proteins has been shown to be specific for the response of recovered individuals.

**KEYWORDS:** SARS-CoV-2; COVID-19; Antigens; Immune Response.

### INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) emerged as a pandemic in March 2020 once severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) became widespread worldwide. SARS-CoV-2 is a member of the Coronaviridae family and betacoronavirus subfamily, as along with the

already known highly pathogenic viruses severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). These viruses are enveloped and composed of a positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) genome (1) and phosphorylated nucleocapsid protein. The spike (S), membrane (M) and envelope (E) proteins are located on the phospholipid bilayer membrane surrounding the viral particle (2).

Knowledge of the immune status of a population is essential in estimating the number of people who have had contact with the virus and evaluating the effectiveness of vaccines. Additionally, the emergence of new SARS-CoV-2 variants indicates the need to continuously monitor the population's immune status. Moreover, even after the beginning of massive vaccination in some countries, aspects related to the definition of correlates of protection against SARS-CoV-2 infection remain unclear. In this context, it is

Copyright © 2021 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

Received for publication on October 3, 2021. Accepted for publication on October 27, 2021

DOI: 10.6061/clinics/2021/e3548





Review

# What Happens to the Immune System after Vaccination or Recovery from COVID-19?

Bruna T. Tiyo <sup>†</sup>, Gabriela J. H. Schmitz <sup>\*,†</sup>, Marina M. Ortega, Laís T. da Silva, Alexandre de Almeida <sup>†</sup>,  
Telma M. Oshiro and Alberto J. da S. Duarte

Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, BR. Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470. IMT II, 3<sup>o</sup> Andar, São Paulo 05403-000, SP, Brazil; brunatiyo@usp.br (B.T.T.); marina.ortega@usp.br (M.M.O.); lais.teodoro@usp.br (L.T.d.S.); alisalmeida@gmail.com (A.d.A.); telma.oshiro@hc.fm.usp.br (T.M.O.); adjsduar@usp.br (A.J.d.S.D.)

\* Correspondence: author: gabriela.schmitz@usp.br; Tel.: +55-11-3061-7499

† These authors contributed equally to the work.



**Citation:** Tiyo, B.T.; Schmitz, G.J.H.; Ortega, M.M.; da Silva, L.T.; de Almeida, A.; Oshiro, T.M.; Duarte, A.J.d.S. What Happens to the Immune System after Vaccination or Recovery from COVID-19? *Life* **2021**, *11*, 1152. <https://doi.org/10.3390/life11111152>

Academic Editors:  
Theodoros Rampias,  
Apostolos Beloukas and  
Pavlos Pavlidis

Received: 20 September 2021  
Accepted: 26 October 2021  
Published: 29 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Due to its leading role in fighting infections, the human immune system has been the focus of many studies in the context of Coronavirus disease 2019 (COVID-19). In a worldwide effort, the scientific community has transitioned from reporting about the effects of the novel coronavirus on the human body in the early days of the pandemic to exploring the body's many immunopathological and immunoprotecting properties that have improved disease treatment and enabled the development of vaccines. The aim of this review is to explain what happens to the immune system after recovery from COVID-19 and/or vaccination against SARS-CoV-2, the virus that causes the disease. We detail the way in which the immune system responds to a SARS-CoV-2 infection, including innate and adaptive measures. Then, we describe the role of vaccination, the main types of COVID-19 vaccines and how they protect us. Further, we explain the reason why immunity after COVID-19 infection plus a vaccination appears to induce a stronger response compared with virus exposure alone. Additionally, this review reports some correlates of protection from SARS-CoV-2 infection. In conclusion, we reinforce that vaccination is safe and important in achieving herd immunity.

**Keywords:** COVID-19; cellular response; humoral response; vaccines; recovered patients; transmission; correlates of protection; herd immunity

## 1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) forced the world scientific community to find answers to limitless questions about a disease incomprehensible until a short time ago. In recent months, the understanding of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) immunopathogenesis has improved, making possible important advances in patient management to reduce mortality. Likewise, the rapid progress in vaccine development and mass vaccination have had a profound impact on reducing the number of infections, hospitalizations and deaths. The emergence of new variants of concern (VOCs), which have increased viral transmissibility, is posing new challenges due to the possibility of immune evasion and a reduction in the effectiveness of vaccines currently in use.

In this context, the immune system plays an important role not only in the evolution and resolution of the infection but also in protection against the virus. Despite the large amount of knowledge and data already accumulated about COVID-19, questions remain. Therefore, our intention was to review how the immune system handles contact with SARS-CoV-2 by infection or vaccination, mainly if protective immunity is induced and to what degree. Additionally, a description of different types of vaccines and their roles, along with immune correlates of protection from COVID-19 were the gaps we explored.



## OPEN Salivary, serological, and cellular immune response to the CoronaVac vaccine in health care workers with or without previous COVID-19

Marina Mazzilli Ortega<sup>1,8</sup>, Laís Teodoro da Silva<sup>1,8</sup>, Érika Donizetti Candido<sup>2,8</sup>, Yingying Zheng<sup>3</sup>, Bruna Tiaki Tiyo<sup>1</sup>, Arthur Eduardo Fernandes Ferreira<sup>4</sup>, Simone Corrêa-Silva<sup>3</sup>, Guilherme Pereira Scagion<sup>2</sup>, Fabyano Bruno Leal<sup>2</sup>, Vanessa Nascimento Chalup<sup>2</sup>, Camila Araújo Valério<sup>2</sup>, Gabriela Justamante Händel Schmitz<sup>1</sup>, Carina Ceneviva<sup>5</sup>, Aline Pivetta Corá<sup>5</sup>, Alexandre de Almeida<sup>1</sup>, Edison Luiz Durigon<sup>2,6</sup>, Danielle Bruna Leal Oliveira<sup>2,7</sup>, Patricia Palmeira<sup>4</sup>, Alberto José da Silva Duarte<sup>1,5</sup>, Magda Carneiro-Sampaio<sup>3</sup> & Telma Miyuki Oshiro<sup>1,8</sup>

We investigated the anti-SARS-CoV-2 post-vaccine response through serum and salivary antibodies, serum antibody neutralizing activity and cellular immune response in samples from health care workers who were immunized with two doses of an inactivated virus-based vaccine (CoronaVac) who had or did not have COVID-19 previously. IgA and IgG antibodies directed at the spike protein were analysed in samples of saliva and/or serum by ELISA and/or chemiluminescence assays; the neutralizing activity of serum antibodies against reference strain B, Gamma and Delta SARS-CoV-2 variants were evaluated using a virus neutralization test and SARS-CoV-2 reactive interferon-gamma T-cell were analysed by flow cytometry. CoronaVac was able to induce serum and salivary IgG anti-spike antibodies and IFN- $\gamma$  producing T cells in most individuals who had recovered from COVID-19 and/or were vaccinated. Virus neutralizing activity was observed against the ancestral strain, with a reduced response against the variants. Vaccinated individuals who had previous COVID-19 presented higher responses than vaccinated individuals for all variables analysed. Our study provides evidence that the CoronaVac vaccine was able to induce the production of specific serum and saliva antibodies, serum virus neutralizing activity and cellular immune response, which were increased in previously COVID-19-infected individuals compared to uninfected individuals.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first described in the city of Wuhan, Hubei Province, China, from which it spread widely, gaining pandemic status and changing the global lifestyle<sup>1</sup>. The genomic organization of SARS-CoV-2 is composed of an enveloped single positive-stranded RNA genome that encodes four structural proteins: a spike (composed of S1 and S2 portions), membrane (M), envelope (E) and nucleocapsid (N)<sup>2,3</sup>.

As SARS-CoV-2 continues to circulate in the human population, potentially more infectious and transmissible variants may emerge that harbour mutations in the viral S protein, which is considered the major target of neutralizing antibodies (reviewed by Hirabara et al.)<sup>4</sup>. In fact, some mutants have been a matter of concern, such

<sup>1</sup>Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56), Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, 470, Predio 2, 3º andar, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP CEP: 05403-000, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório de Pediatria Clínica (LIM 36), Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>5</sup>Divisão de Laboratório Central, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>6</sup>Plataforma Científica Paster-USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. <sup>7</sup>Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil. <sup>8</sup>These authors contributed equally: Marina Mazzilli Ortega, Laís Teodoro da Silva and Érika Donizetti Candido. ✉email: lais.teodoro@usp.br; telma.oshiro@hc.fm.usp.br