

PRISCILLA RAMOS COSTA

# Avaliação do perfil de ativação de células T nas fases recente e estabelecida de infecções por subtipos C e não C do HIV-1

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

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

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo  
2017

PRISCILLA RAMOS COSTA

# Avaliação do perfil de ativação de células T nas fases recente e estabelecida de infecções por subtipos C e não C do vírus HIV-1

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

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

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo  
2017

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Priscilla Ramos

Avaliação do perfil de ativação de células T nas fases recente e estabelecida de infecções por subtipos C e não C do HIV-1 / Priscilla Ramos Costa. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallas.

Descritores: 1.Subtipos do vírus HIV-1 2.Linfócitos T CD4-positivos  
3.Linfócitos T CD8-positivos 4.Linfócitos T reguladores 5.Ativação linfocitária

USP/FM/DBD-449/16

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu **Deus**, criador de todo o Universo, meu criador e Pai. Tu és a minha inspiração e força pra prosseguir todos os dias.

Aos meus pais **Edvaldo Vieira Costa** (*in memoriam*) e **Floriza Ramos Costa**, por me ensinar que o amor a Deus e à vida humana precisa ser prioridade na minha vida. Por me incentivar sempre na busca pelo conhecimento, pelo apoio em toda e qualquer situação, por iluminar a minha vida e principalmente por serem exemplos de vida pra mim.

Aos meus irmãos **Aline** e **Franklin Ramos Costa** que mesmo de longe me incentiva, e sempre me faz lembrar que existe um porto seguro junto à família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador **Prof. Dr. Esper G. Kallás**, pela confiança, incentivo, competência, sempre me ensinando através de uma ótima convivência, com conselhos preciosos e paciência. Obrigada pelo auxílio fundamental na minha formação profissional todos esses anos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Investigação Médica-60: **Dayane Alves Costa, Cassia, Juliana, Mariana, Alvino, Vinicius, Carla Crude, Lucas, Bianca, Sergio, Helena, Claudia, Angélica, Aline, Nadila, Gisele, Zelinda, Maria Cândida, Renan, Carlos, Keith, Karine, Anne, Suzanne, Ruth, Ederson, Carla, Francoise, Maria Inês** à minha gratidão pelo acolhimento, excelente convívio e por tornar os meus dias mais divertidos.

Aos funcionários **Issler e Eleni** por sempre me ajudar a resolver os problemas burocráticos.

Aos professores **Dra Cristina e Dr. Edécio** pelo carinho recíproco e incentivo.

A **todos os meus familiares**, cunhada, tios, primos e avós pelo apoio e incentivo contínuo a perseverar apesar das dificuldades.

Aos amigos da **Igreja Batista Esperança**, ao qual faço parte, pela amizade e companheirismo em todos os momentos e por ser uma família mais que especial pra mim.

Às amigas e companheiras de casa que eu tive ao longo desses anos, Fernanda, Jéssica, Nathalia e Sintique pela oportunidade de compartilhar a casa e o dia a dia com vocês.

Aos **mestres** que passaram pela minha vida me incentivando e ensinando de que a busca e a transferência do conhecimento devem ser contínua.

Aos **voluntários** por terem aceitado participar do projeto, contribuindo para o desenvolvimento científico do país na área HIV/Aids.

À **Universidade de São Paulo** pelo apoio e participação no crescimento científico do País. **Disciplina de Alergia e Imunopatologia** por permitir o desenvolvimento deste projeto e me agraciado com a bolsa e a matrícula na pós- graduação.

A **todos** aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho científico.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Lista de tabelas anexas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1.Introdução.....	1
1.2 Epidemia HIV/Aids.....	1
1.2 O Vírus HIV .....	2
1.4 Diversidade Viral do HIV-1.....	4
1.4 Patogênese do HIV-1.....	6
2. Justificativa.....	14
3. Hipotese.....	16
4. Objetivo Geral.....	16
4.1 Objetivos específicos:.....	16
5. Casuística e Métodos.....	18
5.1 Desenho do estudo e considerações éticas.....	18
5.2 Métodos.....	18
5.2.1 Separação de CMSP.....	18
5.2.2 Extração de DNA genômico e RNA viral.....	19
5.2.3 Tipagem do HLA ( <i>Human Leucocyte Antigen</i> ) - <i>locis</i> A, B, Cw.....	19
5.2.4 Detecção de polimorfismo de 32 pares de base no gene CCR5.....	20
5.2.5. Detecção de co-infecção por GBV-C .....	21
5.2.6 Carga viral plasmática do HIV-1.....	21

5.2.7 Genotipagem do HIV-1.....	22
5.2.8.1 Contagem de Células T CD4+ e CD8+ (cels/ mm <sup>3</sup> ).....	23
5.2.9 Imunofenotipagem de células T CD4+, CD8+ e Treguladoras.....	23
5.2.10 Marcação de superfície celular.....	25
5.2.11 Marcação intranuclear para FoxP3.....	26
5.2.12 Estratégias de análises dos dados de citometria de fluxo.....	27
5.2.13 Análise estatística.....	29
<b>6. Resultados.....</b>	<b>30</b>
6.1 Coorte do estudo.....	31
6.2 Distribuição dos subtipos virais .....	31
6.3 Análise dos dados demográficos.....	33
6.4 Perfil de diferenciação ontogênica das células T CD4+ e CD8+.....	36
6.5 Perfil de ativação celular através da expressão das moléculas CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ e T CD8+.....	41
6.6 Análise da co-expressão CD38+HLA-DR+ nas células T CD4+ e T CD8+.....	47
6.7 Perfil de células T CD4+ Reguladoras (Tregs).....	53
<b>7. Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>70</b>
<b>9.0 Referências.....</b>	<b>71</b>
<b>10. Anexos.....</b>	<b>86</b>
10. Anexo A- Tabela 1.....	86
10. Anexo B- Tabela 2.....	87
10. Anexo C- Tabela 3.....	88
10. Anexo D- Tabela 4.....	89
10. Anexo E- Tabela 5.....	90

<b>10. Anexo F- Tabela 6.....</b>	<b>91</b>
<b>10. Anexo G- Tabela 7.....</b>	<b>92</b>
<b>11. Aprovações da CAPPesq .....</b>	<b>93</b>
<b>12. Manuscrito.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A <sub>2a</sub> R	<i>Adenosine 2 alfa receptor</i> (Receptor 2 alfa de adenosina)
%	Percentual
ACD	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose
ACK	Solução de Amônia-Cloreto de Potássio, utilizadas para lise de células vermelhas
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AmCyan	Proteína encontrada na <i>Anemonona majano</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
ARV	Antirretroviral
ATP	<i>Adenoside triphosphate</i>
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CAPPesq	Comité de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL 19	<i>Chemokine C-C motif Ligand 19</i> (Ligante da quimiocina tipo19)
CCR5	<i>Chemokine C-C motif Receptor 5</i> (receptor da quimiocina C-C tipo 5)
CCR5Δ32	Deleção de 32 pares de base no gene que codifica a proteína CCR5
CCR7	<i>Chemokine C-C motif Receptor 7</i> (receptor da quimiocina C-C tipo 7)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Diferenciação de grupos)
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle de Doenças)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
cpz	Chimpanzé
CRFs	<i>Circulating Recombinant Forms</i> (Formas Recombinantes Circulantes)
CTL	Linfócitos T CD8 citotóxicos
CXCR4	<i>Chemokine C-X-C motif Receptor 4</i> (receptor da quimiocina C-X-C tipo 4)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetraacético)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunossorbente Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
env	Gene que codifica as glicoproteínas do envelope viral
FACS	<i>Fluorescence- activated cell sorting</i> (Separação de células ativadas através da fluorescência)
FAM	<i>Fluorescein</i> (Fluoresceína) utilizada na biologia Molecular
FITC	<i>Fluorescein</i> (Fluoresceína)
FMO	<i>Fluorescence-minus-one</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FoxP3	<i>Forckhead box P3</i> (Fator de transcrição da família FOX)
FSC-A	<i>Forward Scatter- area</i> (Dispersão frontal-area)

FSC-H <i>gag</i>	<i>Forward Scatter- height</i> (Dispersão frontal-altura) Gene que codifica as glicoproteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral
Galt	<i>Gut- associated lymphoid tissue</i> (Tecido linfóide associado ao intestino)
GBV-C	GB vírus C ou Vírus da hepatite G (HGV)
GE	<i>General Eletrics</i>
gp	Glicoproteína
HANK'S	Solução salina normalmente utilizada em combinação com substâncias corporais (sangue, tecidos, etc.)
HEPES	Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-Piperazin Etanol Sulfônico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus causador da Imunodeficiência Humana)
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HLA-DR	<i>Human Leucocyte Antigen allele DR</i> (Antígeno Leucocitário Humano- Alelo DR)
HSH	Homens que fazem sexo com Homens
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
InCor	Instituto do Coração
Log	Escala logarítmica
LTR	<i>Long terminal repeat</i> (Longas sequências repetidas terminalmente)
M	<i>major</i>
MgCL <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MHC	<i>Major Histcompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
MIP- 1 α	<i>Macrofage inflammatory protein 1- alpha</i> (proteína inflamatória de Macrófago 1 alfa)
MIP-1β	<i>Macrophage Inflammatory Protein betha</i> (Proteína beta inflamatória de macrófago)
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
Mol	Molaridade
N	<i>New</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação e Biotecnologia)
<i>nef</i>	Gene <i>nef</i> codificador de proteínas virais reguladoras (p. ex., p27)
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
ng	Nanogramas
O	<i>Outlier</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Proteína
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate bufer Saline</i> (Tampão de salina e fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PE	<i>Phyeritrin</i> (Molécula de Ficoeritrina)
PECy-7	PE conjugado com 7 moléculas de cianina adicionais
PE-CF594	PE conjugado com CF594
PerCP	<i>Peridinin Chloropyll Protein</i> (Proteína Clorofil Peridina)

PerCP-CY-5.5	PerCP conjugada com 5.5 moléculas de Cianina
PFA	Paraformaldeído
PN-DST/AIDS	Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis-DST/Aids
<i>pol</i>	Gene <i>pol</i> que codifica enzimas virais
q.s.p.	Quantidade suficiente para
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
RANTES	Ligantes 5 da quimiocina C-C
<i>rev</i>	Gene <i>rev</i> codificador de proteínas virais reguladoras (p. ex., p19)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , utilizado na cultura de células (principalmente células linfóides humanas) e de tecidos
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction</i> (Reação da transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase)
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> (Vírus causador da Imunodeficiência Símia)
SSC-A	<i>Side Scatter- area</i> (Dispersão lateral-area)
STARHS	<i>Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion</i> (Algoritmo de teste sorológico para soroconversão recente para HIV-1)
TAMRA	<i>Tetramethylrhodamine</i> (tetrametil rodamina)
TARV	Terapia Antirretroviral
<i>tat</i>	Gene codificador de proteínas virais reguladoras (p. ex., p14)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TGFB	<i>Trasnforming growth factor beta</i>
TNF	<i>Tumor- necrosis factor alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
Tregs	Células T reguladoras
UNAIDS	Programa de Combate a Epidemia HIV/AIDS das Nações
URFs	<i>Unique Recombinant Forms</i> (Formas Recombinantes Únicas)
USA	<i>Unites States of America</i> (Estados Unidos da America)
UV	<i>Ultraviolet</i> (Luz ultravioleta)
<i>vif</i>	Gene codificador de proteínas virais acessórias (p.ex., p23)
<i>vpr</i>	Gene codificador de proteínas virais acessórias (p.ex., p16)
<i>vpu</i>	Gene codificador de proteínas virais acessórias (p.ex., p15)
<i>vpx</i>	Gene codificador de proteínas virais acessórias no subtipo HIV-2
µL	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura proteica do vírus HIV- 1.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura do genoma do vírus HIV-1.....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das variantes do vírus HIV.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Distribuição de subtipos do vírus HIV-1 encontrados no território brasileiro por regiões.....	<b>6</b>
<b>Figura 5.</b> Estratégia de análise para a caracterização do perfil de ativação celular e de T CD4+ reguladoras.....	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> Distribuição de subtipos nos grupos Subtipo-C e Não-C .....	<b>32</b>
<b>Figura 7.</b> Concentração genotípica de subtipos C e não-C na coorte de São Paulo e Rio Grande do Sul.....	<b>33</b>
<b>Figura 8.</b> Análise de dados clínicos dos pacientes infectados pelo HIV-1.....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Caracterização fenotípica dos estágios de diferenciação ontogênica das células T CD4+.....	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Dinâmica da diferenciação ontogênica das células T CD4+.....	<b>38</b>
<b>Figura 11.</b> Caracterização fenotípica dos estágios de diferenciação ontogênica das células T CD8+.....	<b>39</b>
<b>Figura 12.</b> Análise da variação ( $\Delta V_n-V_1$ ) da frequência de subpopulações de células T CD8+.....	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b> Análise do perfil de expressão total das moléculas CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ totais e subpopulações naïve/ memória.....	<b>43</b>
<b>Figura 14.</b> Análise do perfil de expressão total das moléculas CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD8+ totais e subpopulações naïve/ memória.....	<b>44</b>
<b>Figura 15.</b> Análise do perfil de expressão das moléculas CD38 e HLA-DR nas células T CD4+ e CD8+.....	<b>46</b>
<b>Figura 16.</b> Caracterização fenotípica do perfil de ativação de células TCD4+.....	<b>47</b>
<b>Figura 17.</b> Caracterização fenotípica do perfil de ativação nas subpopulações naïve/memória das células T CD4+.....	<b>48</b>

<b>Figura 18.</b> Análise da diferença ( $\Delta$ Vn-V1) do perfil de co-expressão CD38+HLA-DR+ nas células T CD4+.....	<b>49</b>
<b>Figura 19.</b> Caracterização fenotípica do perfil de ativação de Células T CD8+.....	<b>50</b>
<b>Figura 20.</b> Caracterização fenotípica do perfil de ativação nas subpopulações Naive/memória das Células T CD8+.....	<b>51</b>
<b>Figura 21.</b> Análise da variação ( $\Delta$ Vn-V1) do perfil de co-expressão das moléculas CD38+HLA-DR+ nas células T CD8+.....	<b>52</b>
<b>Figura 22.</b> Caracterização fenotípica de células TCD4+ reguladoras.....	<b>53</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de Citometria de Fluxo.....	<b>24</b>
<b>Tabela2.</b> Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de ativação celular.....	<b>26</b>
<b>Tabela 3.</b> Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de superfície de células T reguladoras.....	<b>26</b>
<b>Tabela 4.</b> Informações do anticorpo utilizado no painel intranuclear de células T reguladoras.....	<b>27</b>
<b>Tabela 5.</b> Frequência dos diversos subtipos do vírus HIV-1 encontrados e distribuição dos subtipos nos dois grupos estabelecidos (Subtipo-Não-Cx C).....	<b>32</b>
<b>Tabela 6.</b> Dados demográficos dos pacientes categorizados pelo subtipo viral do HIV-1 (Subtipo Não-C x C).....	<b>34</b>
<b>Tabela 7.</b> Modelo de Regressão Linear para o efeito do grupo do subtipo Não- C (comparado com o grupo do subtipo- C) na ativação das células T CD4 total e nas subpopulações das células T CD4 de naïve/memória. ....	<b>54</b>
<b>Tabela 8.</b> Modelo de regressão linear para o efeito do grupo do subtipo Não- C (comparado com o grupo do subtipo- C) nas células T reguladoras totais e supressoras.....	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS ANEXAS

- 10. Anexo A-** Informações detalhadas das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais da expressão total e combinada de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ totais que apresentaram diferença estatística significativa. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.....**86**
- 10. Anexo B-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C....**87**
- 10. Anexo C-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal expressando as moléculas CD38+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.....**88**
- 10. Anexo D-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal expressando as moléculas HLA-DR+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.....**89**
- 10. Anexo E-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal co-expressando as moléculas CD38+HLA-DR+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.....**90**
- 10. Anexo F-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C....**91**
- 10. Anexo G-** Informações detalhadas das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos da expressão individual e combinada de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD8+ totais e das subpopulações de células T CD8+ (*Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal) que apresentaram diferença estatística significativa. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.....**92**

## Resumo

**Costa PR.** *Avaliação do perfil de ativação de células T nas fases recente e estabelecida de infecções por subtipos C e não C do vírus HIV-1* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A pandemia Hiv/ Aids já resultou em mais de 34 milhões de pessoas infectadas pelo vírus no mundo até o momento. Causada pelo HIV, de caráter crônico que evolui para um quadro clínico de imunodeficiência (Aids), pode tornar o indivíduo susceptível a infecções oportunistas potencialmente letais. Diferentes fatores foram identificados por ativar o sistema imune, incluindo genótipos do hospedeiro (HLAB-27, HLA-B57, CCR5 $\Delta$ 32), co-infecções (GBV-C) e alguns fatores virais como a capacidade de replicação (*fitness*) e tropismo celular. O HIV-1 possui diversidade genética extensa e dinâmica. Considerando a variabilidade genética dentro do cenário da epidemia no Brasil, as *clades* do HIV-1 predominantes são B, F e C, além de formas recombinantes. Contudo, ainda não foi completamente estabelecido se essa diversidade genética possa influenciar o curso clínico da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ativação celular induzido encontrado em indivíduos infectados por subtipos virais C e Não- C do HIV-1, durante o primeiro ano de infecção (analisando as fases recente e estabelecida). A análise comparativa dos dois grupos (subtipos C vs. Não-C), identificou no grupo do subtipo-C uma maior frequência de células T CD4+ totais ativadas, como também uma maior frequência e ativação nas subpopulações de células T CD4+ de memória, principalmente memória efetora e efetora terminal, na fase estabelecida. Em relação às células T CD8+, deparamos na fase estabelecida com uma maior frequência de células T CD8+ de memória efetora e ativação das mesmas no grupo do subtipo-C em relação ao grupo do subtipo Não-C. Investigamos também a presença de células T CD4+ que se diferenciaram em células T reguladoras, e foi encontrada uma frequência diminuída dessas células no grupo do subtipo C em relação ao Não- C tanto na fase recente como na fase estabelecida. Na análise comparativa das fases recente e estabelecida, o grupo do subtipo Não-C apresentou um declínio tanto na quantidade de células T CD4+ como na frequência de células T CD8+ ativadas após um ano de infecção. Com base nos resultados encontrados, os dois grupos apresentaram perfis de ativação e diferenciação celular diferentes no primeiro ano de infecção pelo HIV-1, o que aponta para diferentes histórias naturais quando comparamos infecção por *clades* virais distintas.

Descritores: subtipos do vírus HIV-1; linfócitos T CD4 positivos; linfócitos T CD8 positivos; linfócitos T reguladores; ativação linfocitária.

## ABSTRACT

**Costa PR.** *Evaluation of the T cell activation profile in the recent and established stages of HIV-1 virus C and non-C subtype infections* [PhD Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

The Hiv/ Aids pandemic has affected more than 34 million people worldwide, reaching men, women and children. Caused by the HIV virus, a chronic infection that develops into a clinical picture of immunodeficiency (Aids), it can make the individual susceptible to opportunistic infections and result in death. Different factors were identified by activating the immune system, including host genotypes (HLA-B\*27, HLA-B\*57, CCR5 $\Delta$ 32), co-infections (GBV-C) and some viral factors such as fitness and cellular tropism. The HIV-1 presents an extensive and dynamic genetic diversity, favoring the production of variants with molecular differences. Considering the genetic variability within the scenario of the epidemic in Brazil, the predominant subtypes of HIV-1 are B, F and C. However, it has not yet been completely established if this genetic diversity can impact the clinical course of the disease. The objective of this study was to evaluate the induced cellular activation profile found in HIV-1 C and non-C viral subtypes groups in the first year of infection (analyzing the recent and established phases). The comparative analysis of the two groups (subtypes C vs. Non-C) identified a higher frequency of activated CD4<sup>+</sup> T cells in the C-subtype group, as well as a higher frequency and activation in CD4<sup>+</sup> T-cell subsets of memory, mainly effector memory and terminal effector on the established phase. About CD8<sup>+</sup> T cells, we found in the established phase a higher frequency and activation in the effector memory subset in the C- subtype group compared to the non- C subtype group. We also investigated the presence of CD4<sup>+</sup> T cells differentiated into regulators T cells, and a decreased frequency of these cells was found in the subtype C group over non- C in both the recent and established phases. In the recent and established phase comparative analysis evidenced that the non-C subtype group presented a decline in both the number of CD4<sup>+</sup> T cells and the CD8<sup>+</sup> T-cell activated frequency after 1 year of infection, however, it presented a positive correlation between the viral load and frequency of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in both phases. Based on the results found, the two groups presented different activation and differentiation profiles in the first year of HIV-1 infection, which points to different natural histories when comparing infection with different viral *clades*.

Keywords: subtypes of HIV-1 virus; CD4-positive T lymphocytes; CD8-positive T-lymphocytes; T- lymphocytes, regulatory; lymphocyte activation.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemia HIV/AIDS

A disseminação da epidemia Hiv/Aids em todo o mundo fez dessa infecção um dos maiores problemas de saúde pública, destinando milhares de pessoas ao desenvolvimento de uma Síndrome da Imunodeficiência Adquirida que leva a múltiplas infecções e a uma falência do sistema imune, tendo a morte como sentença. O vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Sida), o HIV (HIV- *Human Immunodeficiency Virus*), até o fim de 2013, estimava-se que mais de 35 milhões (33,2 milhões - 37,2 milhões) de pessoas estivessem infectadas com o vírus HIV em todo o mundo, e que neste mesmo ano, 2,1 milhões (1,9 milhões - 2,4 milhões) de novas infecções aconteceram (OMS/UNAIDS, 2013).

Segundo os dados apresentados pelo Ministério da Saúde, a epidemia Hiv/Aids no Brasil no período entre 1980 e junho de 2014, 757.042 casos de Aids foram registrados, sendo a maioria do sexo masculino (65,0%); destes, 278.306 casos evoluíram para óbito até fim de 2013 (casos registrados como causa básica de morte definida por “doenças pelo vírus HIV”). Com a introdução da terapia antirretroviral (TARV) a partir de 1996, os indivíduos infectados puderam ter expectativas de maior sobrevivência apesar dos efeitos colaterais (Boletim epidemiológico DST/AIDS 2014 ou PN-DST/AIDS, 2013).

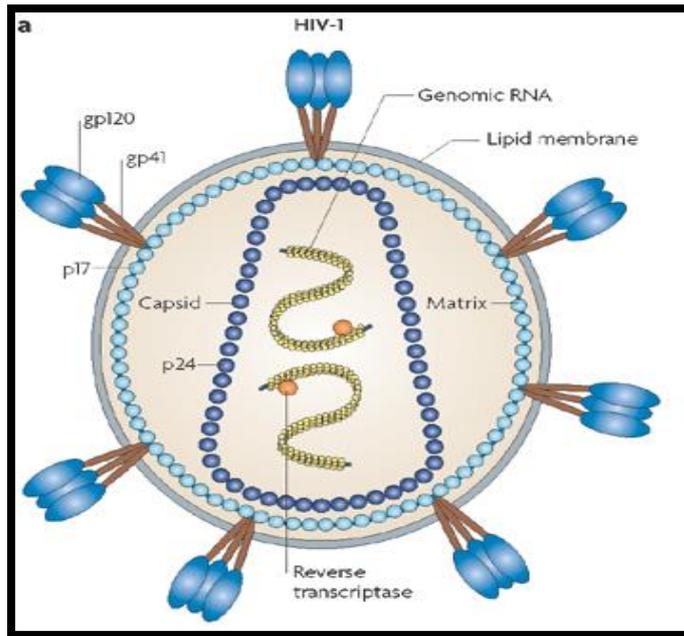
A distribuição da epidemia no território nacional evidencia uma concentração nas regiões Sudeste e Sul com 54,4% e 20,0% dos casos, respectivamente, seguidos de 14,3% na Região Nordeste, 5,8% na Região Centro-Oeste e 5,4% na Região Norte do país. Os grupos mais vulneráveis à infecção pelo HIV-1 continuam sendo o de homens que fazem sexo com homens (HSH que incluem homossexuais e bissexuais), profissionais do sexo e os usuários de drogas injetáveis. No Brasil, nos últimos 10 anos, foi identificada uma redução nas taxas de incidência de casos de Aids, que foi acompanhada por uma descentralização das macros regiões com conseqüente aumento do aparecimento de novos casos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, e de um aumento de cerca de 15% dentro do grupo de risco de comportamento homossexual (HSH) e de 8% no grupo de heterossexuais (Boletim epidemiológico DST/AIDS 2014 ou PN-DST/AIDS, 2013).

Em 2013, o estado do Rio Grande do Sul apresentou a maior taxa de detecção de Aids do país, com 41,3 casos por 100 mil habitantes, e Porto Alegre a maior taxa registrada em 2013, 96,2 casos por cada 100 mil habitantes. Porém, ainda é no estado de São Paulo que se concentra a maior parte da epidemia do Brasil com 33% dos casos no país (Boletim epidemiológico Hiv/Aids- São Paulo 2012).

Muito se tem debatido e investido na criação de estratégias para eliminar a epidemia Hiv/ Aids. Estudos de populações infectadas pelo HIV e de vacinas tem recebido grande importância, pois fornecem informações cruciais sobre os níveis e os tipos de resposta imune necessária para a criação de uma vacina preventiva e/ou terapêutica eficaz, além de permitir a identificação de outros fatores envolvidos na patogênese da doença. O desafio de eliminação da infecção pelo HIV tem sido ampliado pela complexidade e diversidade do vírus HIV; entretanto, o estabelecimento de planos de consenso global até 2020 pelo Programa de Combate a Epidemia Hiv/ Aids das Nações Unidas (UNAIDS) tem direcionado grandes esforços na tentativa de diagnosticar 90% das pessoas que vivem com HIV, proporcionar tratamento a 90% dos indivíduos infectados a fim de que 90% dessas pessoas infectadas apresentem carga viral suprimida. Esse propósito conhecido como 90-90-90 será aplicado em todas as populações, abrangendo adultos e crianças, homens e mulheres, pobres e ricos (OMS/UNAIDS, 2013).

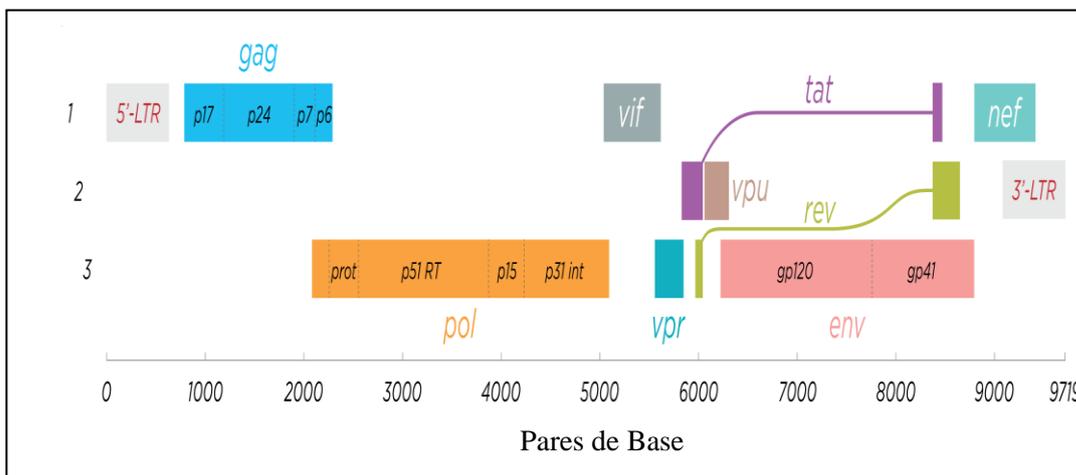
## 1.2 O Vírus HIV

O vírus HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirinae*; trata-se de uma partícula esférica com diâmetro de 100 a 120 nm, contendo duas fitas de RNA envolvidas por uma camada protéica, o capsídeo ou núcleo-capsídeo, seguido de uma matriz proteica, ou *core*, e por fim envelopado por uma camada glicolipídica (Fig. 1). Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O genoma do HIV é constituído por nove genes que são segregados de acordo com sua função: genes *env*, *gag* e *pol* codificam proteínas estruturais do vírus envolvidas, respectivamente, na formação do envelope, capsídeo e síntese de enzimas; *vif*, *vpr* e *vpu* codificam proteínas acessórias; e *rev*, *nef* e *tat* codificam proteínas reguladoras (Fig. 2) (Turner e Summers, 1999; Burger e Poles, 2003).



**Figura 1. Estrutura proteica do vírus HIV- 1.**  
 Fonte: Natue Reviews Microbiology.

Nas regiões terminais 3' e 5' existem longas seqüências repetidas, LTR (*Long terminal repeat sequences*). A similaridade entre os genomas dos vírus HIV-1 e HIV-2, é de aproximadamente 50%. As diferenças residem na presença do gene *vpu* no HIV-1 e do *vpx* no HIV-2. As regiões *gag* e *pol* do genoma viral apresentam maior homologia entre os diferentes tipos virais, ao contrário da região *env*, que apresenta diferenças significativas entre HIV-1 e HIV-2 (Turner e Summers, 1999; Burger e Poles, 2003).



**Figura 2. Estrutura do genoma do vírus HIV-1.** O vírus é constituído por aproximadamente 10.000 pares de base, formado por 9 genes, dos quais alguns se sobrepõem (Adaptado da criação de Thomas Spletstoeser, em [www.scistyle.com](http://www.scistyle.com)).

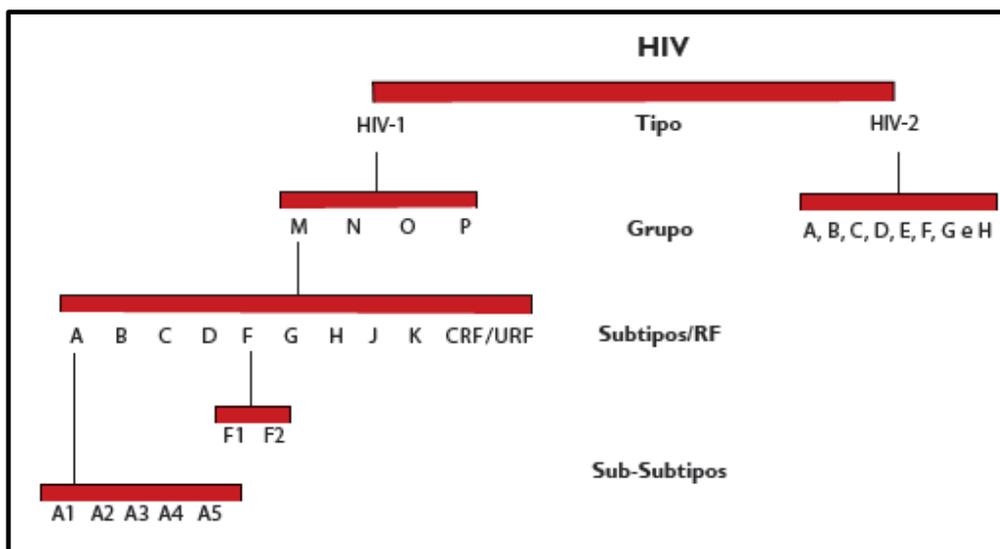
### 1.3 Diversidade Viral do HIV-1

O vírus HIV apresenta uma diversidade genética extensa e alta taxa de replicação, favorecendo a produção de variantes com diferenças moleculares, conhecidas como subtipos ou formas recombinantes (Hemelaar *et al.*, 2006). O HIV se originou durante a passagem do vírus causador da Imunodeficiência Símia (SIV) de primatas para os humanos (transmissão zoonótica). Acredita-se que essa passagem tenha ocorrido em um total de sete eventos, dos quais quatro dessas passagens deram origem aos grupos do HIV-2 e os outros três eventos aos grupos do HIV-1 (Hahn *et al.*, 2000). Entretanto, a partir da análise da estrutura genômica e construção de uma árvore filogenética, foi possível identificar, através das semelhanças genéticas, as cepas dos vírus SIV, de chimpanzés, que originaram cada grupo do vírus HIV (Huet *et al.*, 1990; Hayami *et al.*, 1994).

A variabilidade genética do HIV acomete principalmente o gene *env*, região codificadora das glicoproteínas do envelope. Estima-se que a magnitude da diversidade seja superior a 10% em um único paciente, podendo chegar até 50% entre cepas de diferentes grupos. É essa diversidade o principal fator que dificulta a geração de uma resposta humoral neutralizante eficiente (Loussert-Ajaka *et al.*, 1995). Antigamente, a classificação dos subtipos era realizada com base na análise dos genes *env* ou *gag*; porém, como a alta taxa de recombinação pode levar a uma classificação de subtipos errada, a classificação adotada atualmente se baseia na análise do genoma completo de amostras de HIV-1. Buonaguro *et al.* (Buonaguro *et al.*, 2007) sugerem que a distribuição global dos diferentes subtipos virais do HIV é influenciada pela ação de fatores genéticos, demográficos, sociais e econômicos da população. Particularmente, o HIV-2 é caracterizado pelo baixo potencial de transmissibilidade e patogenicidade reduzida (Reeves e Doms, 2002), é responsável por aproximadamente 2% das infecções. O HIV-1 é responsável pela epidemia Hiv/Aids, 97% das infecções apresentam quatro variantes [grupo M (principal), O (atípico), N (não M e não O) e P] (Kwok *et al.*, 1987; Gao *et al.*, 1999; Reeves e Doms, 2002). Aproximadamente 7% das infecções pelo vírus HIV no mundo são causadas pelos grupos N, O e P. O grupo M é o principal responsável por aproximadamente 90% das infecções em todo o mundo. Neste grupo são encontrados nove subtipos puros (A à D, F, G, H, J e K), como também as formas recombinantes circulantes (CRFs, de *Circulating Recombinant Forms*) e as formas recombinantes únicas (URFs, de *Unique Recombinant Forms*), originadas de infecções

com múltiplos subtipos virais. Os subtipos A e F são subdivididos em A1, A2, A3, A4 e A5 e em F1 e F2, respectivamente. Os subtipo E e I só existem em formas recombinantes (Figura 3) (Robertson *et al.*, 2000).

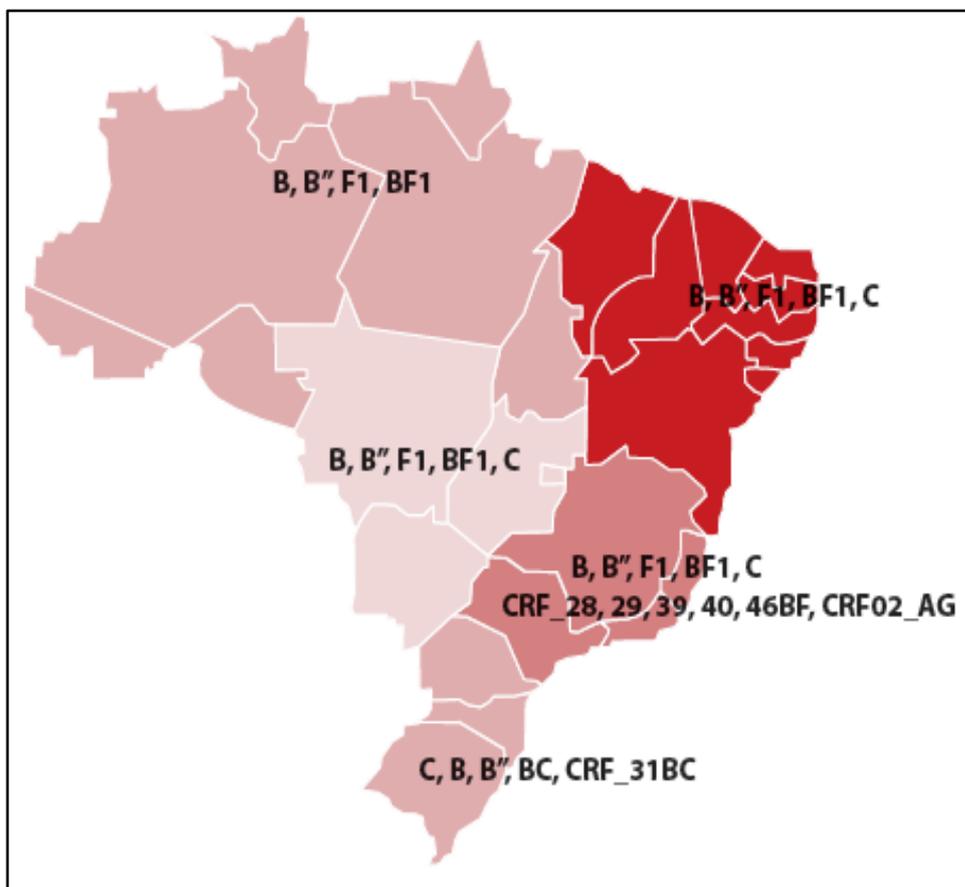
Estudos têm demonstrado, em uma escala global, que as formas genéticas do HIV mais predominantes são os subtipos A, B e C. O subtipo A é responsável por 12% das infecções pelo HIV e predomina nas regiões Central e Leste da África, e nos países do Leste Europeu. O subtipo B acomete aproximadamente 10% das infecções do HIV, sendo mais predominante nas regiões Central e Ocidental da Europa, nas Américas, Austrália e em alguns países Africanos e Asiáticos. O subtipo C é o mais prevalente e corresponde a quase 50% das infecções, é o responsável pelos epicentros da epidemia, pela disseminação descontrolada nos países do Sudoeste Africano, Índia e China. As CRFs tem se destacado por serem responsáveis por quase 20% das infecções (Hemelaar *et al.*; Yu *et al.*, 1998; Osmanov *et al.*, 2002; Hemelaar *et al.*, 2006).



**Figura 3. Representação esquemática das variantes do vírus HIV.** Fonte: Adaptado do Manual de Diagnóstico Clínico.

No Brasil, estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 relataram a predominância do subtipo B, responsável por 80% dos casos, seguida pelos subtipos F e formas recombinantes, como B/F1, nas Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, e do subtipo C e do CRF31\_BC, que apresentam uma alta prevalência na Região Sul (Sabino *et al.*, 1996; Morgado *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2005; Brígido *et al.*, 2007; Muñoz-Nieto *et al.*, 2008; Librelotto *et al.*, 2015). Além desses já foram relatados alguns casos de infecções pelos subtipos A, D, CRF02\_AG e genomas

mosaicos em potencial, envolvendo recombinação ou infecção dupla entre B/F1, B/C e F1/D e pelo menos 5 CRFs\_BF1 (28, 29, 39, 40 e 46) e o CRF31\_BC (Figura 4) (Morgado *et al.*, 2002).



**Figura 4. Distribuição de subtipos do vírus HIV-1 encontrados no território brasileiro por regiões.** Fonte: Adaptado de Morgado MG,2002.

#### 1.4 Patogênese do HIV-1

No Brasil, o subtipo viral B é o mais comum, embora o subtipo-C apresenta uma alta prevalência na região sul (Soares, E. A. *et al.*, 2003; Soares, M. A. *et al.*, 2003). Em 2005, um estudo realizado no Rio Grande do Sul constatou que 90% dos pacientes infectados pelo HIV eram portadores dos subtipos B ou C, e a classificação dos dados clínicos com base no CDC (Centro de Controle de Doenças) revelou que os subtipos pertenceram a grupos de estagiamento clínico diferentes, embora não estatisticamente significativos (Soares *et al.*, 2005). A associação entre os subtipos virais e o risco de transmissão do HIV-1 e progressão para Aids ainda não está totalmente definida, pois

há múltiplos fatores relacionados ao hospedeiro e as condições em que vivem (Vlahov *et al.*, 1998; Alaeus, 2000; Sterling *et al.*, 2001). Entretanto, tem sido demonstrado que a eficiência da replicação do HIV-1 (*fitness* viral) pode fornecer uma forte correlação com a progressão rápida da doença (Blaak *et al.*, 1998; Quinones-Mateu *et al.*, 2000). Segundo Ball *et al.* (Ball *et al.*, 2003) estudos tem relatado que a eficiência de replicação viral pode variar de acordo com o subtipo do HIV. Por exemplo, já foi demonstrado que isolado do subtipo-C pode replicar com menor eficiência do que o do subtipo-B, essa diferença no *fitness* viral entre os subtipos também pode estar relacionada com a eficiência na entrada da célula envolvendo as moléculas CD4 (*CD-cluster of differentiation*) e CCR5 (*Chemokine receptor 5*). Acredita-se também que essa diversidade implique no entendimento da transmissão viral e no surgimento de resistências aos ARVs (Vergne *et al.*, 2000)

O vírus HIV-1 possui propriedades cruciais que o levam a usufruir do sistema imunológico do hospedeiro, tornando-o o ambiente propício à sua perpetuação e transmissão. A infecção viral tem início com a ligação da gp120, uma glicoproteína presente no envelope viral, com a molécula CD4 e subsequente interação com outra molécula, o CCR5 ou CXCR4 (receptores de quimiocinas) presentes na membrana da célula hospedeira. Ocorre em seguida a fusão das membranas viral e celular, seguido de liberação do material genético viral no citoplasma e integração deste no genoma do hospedeiro, tornando esta célula um sítio de multiplicação viral (Huang *et al.*, 1996) (Tscherning *et al.*, 1998)

No estágio inicial da infecção, as interações que ocorrem entre o vírus e a mucosa do hospedeiro passam despercebidas na grande maioria dos pacientes e o quadro sintomático do paciente é inespecífico, adiando o diagnóstico. Nessa fase, o vírus e as células infectadas pelo HIV cruzam a barreira da mucosa e ali se estabelecem para infectar as células T CD4+ em repouso (as células mais abundantes da lamina própria), como também células T CD4+ ativadas, macrófagos e células dendríticas, gerando uma infecção produtiva, persistente e exacerbada que causa a depleção massiva de células T CD4+ CCR5<sup>+</sup> nos órgãos linfóides mais amplos, incluindo o tecido linfóide associado ao intestino (Galt) (Douek *et al.*, 2002; Mehandru *et al.*, 2004). Essa depleção leva a uma translocação de produtos bacterianos do lúmen do trato gastrointestinal para a circulação, contribuindo para uma ativação imune sistêmica (Cassol *et al.*; Nowroozalazadeh *et al.*), quando atinge o ponto crucial da infecção aguda, que é frequentemente acompanhada por sintomas clínicos.

Nessa fase inicial encontra-se também aumento da resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicas (CTL) e uma diminuição nos níveis da carga viral, sugerindo um possível papel dessas células no controle inicial da replicação (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1999). Indivíduos que desenvolvem uma resposta celular imunodominante capaz de reduzir a carga viral na fase inicial da infecção tem sido associada com uma progressão mais lenta da doença e uma preservação nos números de células T CD4+ circulantes (Streeck *et al.*, 2009). Entretanto, a presença de células T CD4+ específicas ao vírus com uma resposta proliferativa fraca ou ausente durante a infecção pelo HIV-1 tem sido associada a um prognóstico de infecção progressiva (Wahren, Morfeldt-Mansson, *et al.*, 1987; Krowka *et al.*, 1989).

Outros parâmetros imunológicos foram identificados e relacionados com o prognóstico da infecção, incluindo o perfil de ativação de células T. Dentre vários marcadores de ativação de células T, um dos que melhor caracteriza esse padrão é a expressão da ectoenzima CD38. De fato, a frequência elevada de células T CD8+ CD38+ e a densidade molecular elevada dessa proteína tem sido correlacionada com progressão clínica para Aids (Giorgi *et al.*, 1993; Liu, Z. *et al.*, 1996). Em contrapartida, células T CD8+ CD38- HLA-DR+ foram correlacionadas com proteção ou progressão lenta (Giorgi *et al.*, 1994). Contudo, com base nos achados da literatura consideramos neste trabalho que a expressão conjunta das moléculas CD38 e HLA-DR nas células T CD8+ de pacientes infectados com HIV-1 um bom indicador de progressão, por refletir o quadro inflamatório desses indivíduos.

O perfil de diferenciação de células também serve como correlação de proteção imune. Letvin *et al.* (Letvin *et al.*, 2006) identificaram uma preservação nos números de células T CD4+ de memória central após um ensaio vacinal em macacos; essa evidência foi indicativa de que, em humanos, essas células poderiam gerar uma proteção contra os altos níveis de carga viral nas primeiras semanas pós infecção pelo HIV, mediando um controle da viremia do HIV e sobrevida (Letvin *et al.*, 2006). Os autores ainda ressaltaram que a quantificação dessas células poderia prever a eficácia de uma vacina anti-HIV (Letvin *et al.*, 2006). Intervenções terapêuticas durante a fase aguda da infecção têm sido considerada como uma forma de evitar a depleção massiva de células CD4+ (Picker e Watkins, 2005).

Em outro estudo, Burgers *et al.* 2009 identificaram um aumento de células CD8+ de memória central (CD27<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) e memória intermediária (CD27<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>-</sup>) em indivíduos infectados pelo HIV-1 (subtipo C) após 1 ano de

infecção com baixa carga viral, e um aumento de células T CD8+ de memória efetora naqueles com carga viral alta (Burgers *et al.*, 2009).

Mattapallil *et al.*, 2005, ao explorar a patogênese do SIV demonstrou que 30% a 60% do total de células T CD4+ de memória já estão acometidas na fase inicial da infecção, e que a maioria dessas células infectadas desaparece nos quatro dias seguintes da infecção (Mattapallil *et al.*, 2005). Essa perda de células T CD4+ e CD8+ pode ser consequência, entre outros fatores, da ativação de vias apoptóticas, de modo espontâneo, consequentes do processo de ativação contínuo desencadeado nessas células (Ameisen e Capron, 1991; Kaplan e Sieg, 1998).

Particularmente, a infecção pelo subtipo C parece desencadear uma resposta imunodominante de células T CD8+ ao HIV-1 levando a uma maior diferenciação de células precursoras em células de memória. De fato, tem sido sugerido que o controle viral na infecção inicial e crônica pelo HIV está associado com células T CD8+ vírus-específicas com perfil de memória efetora diferenciada terminalmente (Addo *et al.*, 2007; Northfield *et al.*, 2007). Assim, os níveis de ativação imune podem ser um dirigente central na geração de uma resposta imune eficaz contra o vírus.

Estudos sugeriram que diferentes subtipos do HIV-1 podem causar infecções com diversos desfechos clínicos: em Uganda, onde os subtipos A e D co-circulam, as infecções do subtipo A apresentaram progressão da doença mais lenta do que infecções mais virulentas do subtipo D (Kaleebu *et al.*, 2001). O subtipo C é responsável pela maioria das infecções por HIV em todo o mundo e há evidências de crescentes epidemias de subtipo C no Sul da Ásia (Wilkinson *et al.*, 2016) e na América do Sul (Brígido *et al.*, 2007). Os dados sugerem que, tal como o subtipo D, o subtipo C pode também ser particularmente virulento. Em um grande estudo de coorte multinacional, os indivíduos infectados com subtipo C exibiram significativamente mais rápida perda de células T CD4+ do que infecções com outros HIV-1 subtipos (Touloumi *et al.*, 2013). Se o subtipo C do HIV-1 estiver se espalhando e for intrinsecamente mais virulento isso poderia influenciar fortemente o curso da pandemia e exigir novas estratégias de prevenção ou combate.

Durante muito tempo, parâmetros utilizados no acompanhamento clínico laboratorial dos pacientes como a carga viral plasmática e a contagem de células T CD4+ foram utilizados como indicadores de progressão (Mellors *et al.*, 1997). Entretanto como a ativação celular sendo um processo desencadeante da inflamação sistêmica, está implícita na imunodeficiência progressiva e no desenvolvimento de

doenças relacionadas com a infecção pelo HIV-1 estando estreitamente relacionada com o estágio da doença (Giorgi *et al.*, 2002; Mahnke *et al.*, 2013).

Diferentes fatores do hospedeiro, principalmente a presença de moléculas específicas HLA- B-57 (Gillespie *et al.*, 2002), a presença do polimorfismo da deleção de 32 pares de base no gene da quimiocina CCR5 (Huang *et al.*, 1996) foram encontrados em pacientes infectados pelo HIV-1 que apresentavam uma história de progressão mais lenta. A presença de infecções bacterianas (por exemplo, o *Mycobacterium tuberculosis*) e virais (como o vírus da Hepatite C- HCV), nos pacientes infectados pelo HIV-1+ tem sido investigada e uma associação com progressão da doença foi encontrada, entretanto outros estudos identificaram que pacientes HIV-1+ co-infectados com GBV-C (conhecido antigamente como vírus da Hepatite G) apresentaram maior sobrevida e menor perfil inflamatório, sendo associado à proteção, os mecanismos exatos envolvidos na interação entre os vírus e o hospedeiro ainda permanece desconhecido (S Rodrigues *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2004; Massanella *et al.*, 2010; Giret *et al.*, 2011). O envolvimento desses fatores na progressão da doença já está bem definido na literatura.

Durante infecções crônicas o sistema imune conta com a participação de outra subpopulação de células T CD4+, que tem como função minimizar os danos teciduais gerados pela ativação excessiva, desencadeada pelo processo infeccioso. Por exercer o papel de regulação, suprimindo a ativação, essas células receberam o nome de células T reguladoras (Tregs). A ação supressora das Tregs acontece por contato célula-célula ou através de fatores supressores solúveis (Yamaguchi *et al.*, 2011). A expressão de moléculas como as ectoenzimas CD39 e CD73 na superfície das células Tregs possibilita observar o status de atividade dessas células, considerando que essas moléculas exercem papéis estratégicos na magnitude do metabolismo celular, através da conversão de moléculas de ADP/ATP (*adenoside diphosphate/ adenoside trifosfate*, respectivamente) em moléculas AMP (*adenoside monophosphate*) e moléculas AMP em adenosina, considerando que a presença de ATP no meio extracelular gera um ambiente inflamatório e consequente ativação celular enquanto as moléculas de adenosina ao se ligar ao receptor (A<sub>2a</sub>R- *Adenosine 2 alfa receptor*) presente nas células suprime a resposta de células T regulando negativamente a ativação celular (Pulte *et al.*, 2007). Essa via CD39/73 é alterada dinamicamente no contexto de doenças inflamatórias como HIV. Estudos tem identificado a participação das células T regs na infecção crônica por Hiv, um ambiente em que a persistência do vírus, o excesso de

ativação leva a uma depleção de células T CD4<sup>+</sup> (Borsellino *et al.*, 2007; Schulze Zur Wiesch *et al.*, 2011).

No estudo da imunopatogênese do HIV-1 existem lacunas que ainda não foram esclarecidas totalmente. A associação entre os subtipos virais e o risco de transmissão do HIV-1 e progressão para Aids ainda não está definida, pois múltiplos fatores relacionados ao hospedeiro e às condições em que vivem podem estar envolvidos na patogênese dessa doença (Vlahov *et al.*, 1998; Alaeus, 2000; Sterling *et al.*, 2001). De fato, os mecanismos envolvidos na infecção pelo HIV-1 podem ser essencialmente virológicos, associados ao tropismo do co-receptor, transmissibilidade, capacidade replicativa ou relacionados à imunidade do hospedeiro.

Estudos evidenciam diferenças entre subtipos e provável alteração na interação vírus- hospedeiro, como é a característica encontrada no subtipo-C ao possuir um sítio extra de ligação no fator NFκB (*factor nuclear kappa B*) celular. Já é sabido que a ativação do fator de transcrição NFκB exerce um dos principais papéis no estímulo da expressão gênica do HIV-1, porém existem outras vias independentes do NFκB também participantes da transcrição do HIV-1. Demarchi *et al.*, demonstraram que a ativação do fator de transcrição NFκB pela proteína viral *Tat* é crítica para ativação transcricional da região promotora do LTR do vírus HIV-1, sugerindo que alguns dos efeitos pleiotrópicos dessa proteína viral nas funções celulares podem ser mediadas pela indução do fator NFκB (Demarchi *et al.*, 1996).

Na tentativa de investigar se a infecção pelo subtipo-C do HIV-1 influencia o curso da doença quando comparada com a infecção por subtipos Não-C, avaliamos duas coortes prospectivas de pacientes com infecção aguda pelo Hiv, acompanhados nos centros de referência das regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde o subtipo C e diversos recombinantes B/C (Santos *et al.*, 2006) estão em co-circulação com o subtipo B previamente dominante (Brígido *et al.*, 2011). Investigamos os perfis de ativação e diferenciação de células T e T reguladoras em pessoas infectadas com vírus do subtipo-C e Não-C do HIV-1, em estágios semelhantes de infecção. Demonstramos que os indivíduos infectados com subtipo C progridem de forma diferente que os pacientes infectados por subtipos Não-C e esse efeito parece envolver principalmente as células T CD4<sup>+</sup> efectoras e T reguladoras.

## *Justificativa*

---

## 2. JUSTIFICATIVA

A cronicidade da ativação do sistema imune do hospedeiro está intimamente relacionada com a patogênese do Hiv/Aids. Diversos estudos têm caracterizado a exaustão imunológica na fase crônica da infecção que conseqüentemente leva a um quadro de Aids (D'souza *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008). Outros trabalhos reconhecem a importância da fase recente na infecção pelo Hiv, considerando esta determinante no curso da infecção e progressão para Aids. De fato, acredita-se que é nessa fase que as chances de contenção da infecção por intervenções terapêuticas e/ou pela resposta imune sejam ótimas.

Considerando a diversidade viral que o cenário da epidemia do Hiv aborda, há uma carência de estudos comparando os diferentes subtipos do Hiv para uma melhor compreensão da patogênese. Atualmente a maioria dos estudos se concentra no subtipo B já que é o subtipo dominante nas infecções notificadas nos países ricos, principais investidores nas pesquisas mundiais no contacto Hiv/Aids, enquanto que a população infectada pelo subtipo-C é a mais predominante mundialmente e se concentra na região subsaariana, países pobres do continente africano.

Além disso, consideramos que a diversidade viral pode não só interferir no prognóstico da doença como também pode ser um dos fatores causais de progressão rápida, em que subtipos virais mais patogênicos direcionam o sistema imune à exaustão e senescência. Essa abordagem se faz extremamente necessária já que se sabe que a diversidade viral está correlacionada com uma susceptibilidade e resistência a antiretrovirais. Assim pretendemos neste estudo investigar se indivíduos infectados por subtipos do vírus HIV-1 (subtipo C vs Não-C) na ausência de tratamento antiretroviral, apresentam diferenças no perfil de ativação das células T CD4+ e T CD8+ e na diferenciação em células de memória sendo acompanhados na fase recente e estabelecida da infecção.

## ***Hipótese e objetivos***

---

### **3. HIPÓTESE**

A hipótese deste projeto é que indivíduos infectados por subtipo-C do HIV-1 apresentam um maior perfil de ativação celular, desenvolvendo conseqüentemente um cenário de progressão mais rápida para o quadro de Aids quando comparado com os indivíduos infectados por subtipos Não-C.

### **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de ativação celular em indivíduos infectados por diferentes subtipos virais do HIV-1, nas fases recente e estabelecida da infecção.

#### **4.1 Objetivos específicos:**

- a) Caracterizar o perfil de ativação de células T CD4+ e CD8+ nos indivíduos infectados por subtipos C e Não-C do HIV-1, em uma análise transversal intergrupos (subtipos C x Não-C) tanto na Fase Recente como na Estabelecida e análise da evolução do grupo ao longo do primeiro ano de infecção pelo HIV-1 (Fases Recente x Estabelecida (Vn-V1)).
- b) Caracterizar o perfil de diferenciação ontogênica das células T CD4+ e CD8+ nos indivíduos infectados por subtipo C e Não- C do HIV-1, em uma análise transversal de intergrupos (subtipos C x Não-C) tanto na Fase Recente como na Estabelecida e análise da evolução do grupo ao longo do primeiro ano de infecção pelo HIV-1 (Fases Recente x Estabelecida (Vn-V1)).
- c) Caracterizar o perfil de células T CD4+ reguladoras em uma análise transversal intergrupos (subtipos C x Não-C) tanto na Fase Recente como na Estabelecida e análise da evolução do grupo ao longo do primeiro ano de infecção pelo HIV-1 (Fases Recente x Estabelecida (Vn-V1)).

## *Casuística e Métodos*

---

## 5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1. Desenho do estudo e considerações éticas

Sessenta e três indivíduos HIV-1 positivos foram selecionados dentro de um grupo de 282 voluntários derivados de duas coortes (UNESCO, n=253; e AMPLIAR 020, n=29) de acordo com os seguintes critérios: **I**) diagnóstico de infecção pelo HIV-1 com sorologia positiva pelo Imunoensaio enzimático (ELISA, de *Enzyme-linked Immunossorbente Assay*) e confirmado por *Western Blot*; **II**) evidência de infecção recente utilizando o algoritmo de teste sorológico para soroconversão recente por HIV-1 (STARHS); **III**) genotipagem do vírus HIV-1; **IV**) ausência de terapia antiretroviral (TARV) no primeiro ano de infecção; e **V**) acesso aos dados clínicos e laboratoriais (contagem absoluta de CD4/CD8, carga viral (CV), genotipagem do HIV-1 e disponibilidade de amostras de soro ou plasma, sangue total e de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas na Fase Recente (V1, visita de entrada no estudo) e Fase Estabelecida (Vn, visita de aproximadamente 1 ano de infecção após a V1).

As amostras utilizadas neste estudo pertencem ao projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética (Nº Processo CONEP 12401; Nº Processo CAPPesq 0458/08). As amostras foram devidamente criopreservadas no banco de amostras do Laboratório de Investigação Médica, LIM-60, FMUSP, sob a supervisão do Prof. Dr. Esper Georges Kallás. Todos os voluntários leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando o uso das amostras em estudos científicos. Particularmente, o presente projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética (Nº Processo CAPPesq 881.658).

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Separação de CMSP

As CMSP foram separadas através do processo de diferença de gradiente de densidade por solução de *Ficoll-Paque Plus* (*GE Healthcare*). Em resumo, amostras de sangue total coletado em tubos de EDTA, HEPARINA ou ACD foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e diluídas em solução de HANK'S na proporção 1: 2. Os homogeneizados foram transferidos para tubos Falcon contendo solução de Ficoll na proporção 1:3 de forma lenta e com a inclinação do tubo contendo a solução de Ficoll em um ângulo de 30º graus. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1035 g, em temperatura de 18 a 23 °C, com aceleração e desaceleração 1. Após a

centrifugação, a fase intermediária, contendo as CMSP, foi coletada e transferida para um único tubo cônico de 50 mL. O conteúdo do tubo foi diluído em solução de HANK'S (q.s.p. 45 mL) e centrifugados por 10 min a 566 g com aceleração e desaceleração 9. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em 45 mL de HANK'S para lavagem. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi submetido à lise das hemácias pela adição de 3 mL de solução de ACK, e incubação de 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, a lise foi bloqueada pela adição de solução de HANK'S (q.s.p. 45 mL) e o tubo foi novamente centrifugado. Após o descarte, o *pellet* de células foi ressuspendido em 5 mL de HANK'S, para a contagem de células. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi misturada em 90 µL de solução de Azul de Tripán 0,4%; 10 µL dessa mistura foi transferida para a Câmara de *Neubauer*, e 4 quadrantes foram contados. Após o cálculo [(Total de células/nº quadrantes) x vol. suspensão x fator de diluição (10) x fator de correção da câmara ( $10^4$ )] obteve-se a quantidade de células viáveis. O tubo contendo as células foi centrifugado novamente, o sobrenadante desprezado e o *pellet* de células ressuspendido em solução de congelamento em uma concentração de  $10 \times 10^6$  de células/mL. Cada alíquota de 1 mL foi armazenada no *freezer* -80°C dentro de um suporte de resfriamento progressivo (*stratacooler*) e após 24 h foram transferidas para o tanque de nitrogênio líquido.

### **5.2.2 Extração de DNA genômico e RNA viral**

Extraímos o DNA genômico (ácido desoxirribonucléico) a partir de 300 µL de sangue total, através do *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi extraído a partir de 140 µL de amostras de plasma utilizando o mini Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN Inc, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **5.2.3 Tipagem do HLA (*Human Leucocyte Antigen*) - *locis* A, B, Cw**

A tipagem do HLA de classe I, nos *locis* A, B e Cw dos pacientes foi realizada utilizando o Kit *Pel-Freez SSP UniTray* (Invitrogen, Life Technologies), de resolução média, no Laboratório de HLA, INCOR. Em resumo, alíquotas de DNA genômico

foram transferidas para placas de 96 poços contendo *primers* de diversos alelos dos *locis* A, B e Cw, bases nucleotídicas e soluções tamponantes. Após a adição da enzima *Taq* DNA polimerase e água, as placas foram incubadas em termociclador (GeneAmp@ PCR System 9700, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 5 ciclos de 96 °C por 25 seg, 70 °C por 50 seg, e 72 °C por 45 seg; 21 ciclos de 96°C por 25 seg, 65 °C por 50 seg, 72 °C por 45 seg; e 4 ciclos de 96 °C por 25 seg, 55 °C por 60 seg, 72 °C por 120 seg. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Life Technologies) imerso em solução tampão TBE (0,045 M Tris-Borato; 1 mM EDTA). A visualização dos fragmentos foi realizada utilizando o *AlphaImager HP Imaging System* (Alpha Innotech) sob luz ultravioleta. As bandas amplificadas foram comparadas a um padrão de peso molecular de 50 pb (Invitrogen, Life Technologies) e relacionadas conforme sua posição na placa e sequência de *primers* naquele poço, correspondendo a um alelo específico.

#### **5.2.4 Detecção do polimorfismo da deleção de 32 pares de base no gene CCR5**

Para a detecção da mutação CCR5 $\Delta$ 32, as alíquotas de 20ng de DNA genômico foram submetidas à PCR, em um mix de reação de 20  $\mu$ L com 0,375 mM de cada um dos *primers*, *sense* ccr5-01 (5'TCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-3') e *anti sense* ccr5-02 (5'-AGCCCAGAAGAGAAAATAACAATC-3'), 1U de Amplitaq Gold (Roche Molecular Systems) e 23,4 mM do mix de dNTP (Roche) e 1.5 mM de Tampão MgCL<sub>2</sub>. As reações foram incubadas em termociclador (*Px2 Thermo Cycler*, Thermo Electron) nas seguintes condições: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 58°C por 45 seg, seguido de uma extensão final de 72°C por 45 seg. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% corado com SYBR *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Life Technologies) imerso em solução tampão TBE (0,045 M Tris-Borato; 1 mM EDTA). A visualização dos fragmentos foi realizada utilizando o *AlphaImager HP Imaging System* (Alpha Innotech) sob luz ultravioleta. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular de 50 pb (Invitrogen, Life Technologies). Os tamanhos dos fragmentos de 241 bp correspondiam ao tipo selvagem e os fragmentos de 209 bp ao alelo CCR5 $\Delta$ 32.(Munerato *et al.*, 2003; Maidana-Giret *et al.*, 2009; Giret *et al.*, 2011).

### 5.2.5 Detecção de co-infecção por GBV-C

A infecção pelo GBV-C é detectada pela presença do RNA viral do GBV-C, logo nesta coorte foi determinada como descrito anteriormente (Maidana-Giret *et al.*, 2009). Foi utilizado uma quantidade de 5 µL de RNA extraído diluído em um mix contendo 150 ng de *primer* randômico (Random Primer, Pharmacia Biotech, Suécia) e 10 mmol/L de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs por Invitrogen Inc., Carlsbad, Califórnia, EUA). A solução foi mantida a 65 °C por 5 min. A síntese de DNA complementar foi realizada pela adição de 200 U (unidades) de transcriptase reversa Super Script III (Invitrogen Inc, CA) numa solução tampão com 10 U de inibidor de ribonuclease (Invitrogen Inc, CA) e colocadas no Termociclador para as reações, a 25 °C por 5 min, 50 °C por 60 min e 70 °C por 15 min a um volume final de 20 µL. Um fragmento de 344 pb da região 5' não codificante (5' NCR) foi amplificado por transcriptase reversa, aninhada utilizando os seguintes *primers* localizados nas posições 108 (5'-AGGTGGTGGATGGGTGAT-3', sentido exterior), 134 (5'-TGGTAGGTCGTAAATCCCGGT-3', sentido, interior), 476 (5'-GGAGCTGGGTGGCCCCATGCAT-3', anti-sentido, interno) e 531 (5'-TGCCACCCGCCCTCACCCGAA-3', anti-sentido, exterior). A amplificação consistiu em 40 ciclos tanto para a primeira como para a segunda rodada de PCR, com os seguintes tempos e temperaturas de incubação: 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg para a primeira rodada e 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, e 72 °C por 30seg para a segunda rodada de PCR. Após a amplificação 5 uL do produto de PCR foi analisado através da eletroforese em gel de agarose a 2%. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada utilizando o *AlphaImager HP Imaging System* (Alpha Innotech) sob luz ultravioleta. Sendo assim foram comparadas a um padrão de peso molecular de 50 pb (Invitrogen, Life Technologies) (Tucker *et al.*, 1999; Maidana-Giret *et al.*, 2009; Giret *et al.*, 2011) e interpretadas de acordo com os controles positivo e negativo para a presença do GBV-C.

### 5.2.6 Carga viral plasmática do HIV-1

Para a carga viral do HIV-1 foi utilizado RNA viral presente no plasma descrito no item 5.2.2. Com o RNA foi realizado um ensaio quantitativo em tempo real de RT-PCR (*reverse transcriptase- PCR*), para isso foi utilizado *primers* específicos para a

região do gene *gag* do HIV-1, o teste *Amplicor HIV-1 Monitor* (Roche) foi utilizado nas amostras coletadas e submetidas ao teste até janeiro de 2007. Após esta data, o ensaio foi substituído por outro mais sensível, o de ramificação do DNA (*Versant@-branched DNA HIV- 3. 0 RNA Assay, Bayer Health Care LLC*).

### 5.2.7 Genotipagem do HIV-1

Para a genotipagem do HIV-1 foi utilizado RNA viral, descrito no item 5.2.2. Em seguida foi realizada a síntese complementar de DNA com *primers* randômicos. A amplificação do material genético viral ocorreu através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), “*nested PCR*” (PCR realizado em duas etapas), com *primers* nested específicos de regiões do gene *pol* codificantes para a protease e transcriptase reversa do vírus HIV-1, estas regiões foram amplificadas e sequenciadas (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Os produtos amplificados foram verificados através de eletroforese em gel de agarose marcada com brometo de etídeo, precauções foram tomadas para evitar riscos de contaminação. Ambas as fitas complementares do DNA foram sequenciadas diretamente do PCR em um fragmento de sobreposição de 1,2 kb de nucleotídeos através do uso de *primers* de sequências variadas como previamente descrito (*ABI3130; Applied Biosystems*). Os dados dos fragmentos sequenciados foram editados, agrupados em sequências contíguas numa sobreposição mínima de 20 pb com uma similaridade mínima de 85-90% e um consenso de ambas as cadeias foi formado pelo programa Sequencher (Gene Code Corp., Ann Arbor, MI). Tais critérios de montagem são necessários para evitar que qualquer fragmento se sobreponha se não for derivado da mesma variante. Todas as sequências foram verificadas quanto á contaminação através da comparação com a base de dados de sequências de HIV-1 e entre si, através da ferramenta de genotipagem do NCBI (*National Center for Biotechnology Information- blast genotyping tool*) (BLAST) (Sa-Filho *et al.*, 2007; Sucupira *et al.*, 2007; Sanabani *et al.*, 2011).

### 5.2.8 Contagem de células T CD4+ e CD8+(cels/ mm<sup>3</sup>)

A contagem das células T CD4+ e CD8+ periféricas foram obtidas por citometria de fluxo utilizando amostras de sangue total fresco. Para obter a contagem em valor absoluto/mm<sup>3</sup> foi necessário à utilização de tubos Trucount (BD Biosciences). Cada tubo *Trucount*, específico para cada paciente, foi adicionado 50 µL de sangue total e 20 µL do coquetel de anticorpos *Multitest* (Kit BD Biosciences), contendo quantidade suficiente dos anticorpos monoclonais anti- CD45-PerCP (Clone 2D1- HLe- 1), anti-CD3-FITC (Clone SK7), Anti- CD4-APC (Clone SK3) e anti- CD8-PE (Clone SK1). Em seguida, cada tubo contendo as amostras dos pacientes foi incubado por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente, logo após as amostras foram lisadas com 450µL de solução de Lise 1x (FACS Lysing- BD Biosciences, solução diluída em água destilada 1: 10) e incubadas por mais 15 minutos. Finalizado o processo de lise as amostras foram adquiridas no citômetro BD FACS Calibur (BD) até 2 horas após a marcação e analisadas em software *Multiset* (BD), onde os valores de células/mm<sup>3</sup> foram calculados com base nas *beads* presentes em cada tubo.

### 5.2.9 Imunofenotipagem de células T CD4+ , CD8+ e células T reguladoras

Para garantir a qualidade e reprodutibilidade dos experimentos, cada lote de experimento foi composto de amostras das duas coortes englobando os dois períodos de análise (V1 e Vn), evitando também o surgimento de variáveis entre as amostras. Os painéis de anticorpos utilizados nestas análises foram definidos considerando as propriedades de cada molécula de anticorpo (Tabela 1). O perfil de ativação celular foi caracterizado com base na expressão das moléculas CD3, CD4 e CD8, para identificar a população de linfócitos T, a ativação foi definida com base na expressão das moléculas CD38 e HLA-DR na superfície celular dos linfócitos T CD4 e CD8 e o perfil ontogênico pela presença ou ausência das moléculas CD27, CD45RA e CCR7 e (ver estratégia na Figura 5 A, B e C; Tabela 2).

A caracterização de linfócitos T reguladores (Tregs) se baseou na expressão da molécula CD3 e CD4, combinada com a expressão aumentada (++) de CD25, ausência de expressão da molécula CD127(-) e expressão do fator de transcrição *FoxP3*, essa população consideramos como Tregs. Em seguida foi também avaliada a presença ou ausência da molécula CD39 na superfície celular (Figura 5 D, Tabela 3).

**Tabela 1.** Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de citometria de fluxo.

<b>Moléculas</b>	<b>Funções</b>	<b>Finalidade no projeto</b>
<b>CD3</b>	Proteína formando um complexo em 3 formas diferentes, estão associadas ao receptor de células T (TCR); auxilia na transdução de sinais.	Caracterização da população de <b>linfócitos T</b> .
<b>CD4</b>	Proteína que participa da sinalização e adesão celular sendo um co-receptor de MHC de classe II.	Caracterização da população de linfócitos <b>T CD4 auxiliares</b> .
<b>CD8</b>	Proteína que participa da sinalização e adesão celular sendo um co-receptor de MHC de classe I;	Caracterização da população de linfócitos <b>T CD8 citotóxicos</b> .
<b>CD27</b>	Proteína ligante do CD70, atua como co- estimulador para ativação de células T e B.	<b>Diferenciação ontogênica*</b>
<b>CD45 RA</b>	Isoforma de CD45 contem o exon A, que é uma Tirosina fosfatase que participa do processo de sinalização celular.	<b>Diferenciação ontogênica*</b>
<b>CCR7 (CD197)</b>	Receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, participando no processo de migração das células para órgãos linfóides secundários.	<b>Diferenciação ontogênica*</b>
<b>CD38</b>	Ectoenzima multifuncional, Glico-hidrolase NAD onde catalisa a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), participa no processo de adesão celular, transdução de sinais e vias de sinalização.	<b>Ativação celular</b>
<b>HLA-DR</b>	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II; Se liga a peptídeos antigênicos de forma estável e apresenta-os na superfície de celular.	<b>Ativação celular</b>
<b>CD25</b>	Receptor da cadeia $\alpha$ da Interleucina-2 (IL-2).	<b>Ativação celular</b>
<b>CD39</b>	Ectonucleotidase, enzima envolvida na produção de adenosina.	<b>Ativação celular</b>
<b>CD127</b>	Receptor da Interleucina -7 (IL-7), envolvida no processo de proliferação celular.	<b>Potencial proliferativo</b>
<b>FoxP3</b>	( <i>Forkhead box P3</i> )- proteína scurfina, é um fator de transcrição que participa no desenvolvimento e na função das células T reguladoras.	Caracterização da população de <b>células Tregs</b> .

\*A expressão combinada desses marcadores permite classificar os estágios de maturação de uma célula *naïve* até se desenvolver em uma célula de memória.(Janeway et a. 2002)

### 5.2.10 Marcação de Superfície celular

As CMSP criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e transferidas para tubos de 15 mL contendo 9 mL de meio RPMI enriquecido (10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 1mM de penicilina/estreptomicina, 55µM de 2-Mercaptoetanol, e 10mM da solução de HEPES), estes foram centrifugados a 600g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 2 mL de RPMI enriquecido para contagem em *azul de tripan* 0,4% (10µL de amostra + 10µL do reagente). Após a contagem, foram separadas  $1 \times 10^6$  células de cada paciente para cada painel de imunofenotipagem (painéis de ativação celular e células T regs), cada painel de imunofenotipagem foi realizado em uma placa.

Alíquotas de 100µL ( $1 \times 10^6$  cels) foram distribuídas nas respectivas placas de 96 poços com fundo “V” (um paciente por poço). Seguida do processo de lavagem pela adição de 100µL de solução Tampão MACS [solução de PBS 1x contendo Albumina do soro bovino (0,5%) e EDTA (2mM)] em cada poço, cada placa foi centrifugada em 600g por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* de células foi submetido à nova rodada de lavagem e centrifugação. Em seguida, em cada poço foi adicionado 100µL da mistura de anticorpos monoclonais referente ao painel de ativação celular (Tabela 2) na respectiva placa, e referente ao painel de células Tregs (Tabela 3), o *pellet* de células foi homogeneizado e as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos, protegidas da luz. Após incubação, foram realizadas duas etapas de lavagem com solução Tampão MACS, conforme descrito anteriormente. As amostras do painel de ativação celular foram fixadas com 200 µL de paraformaldeído (PFA) 1% e armazenadas no escuro a 4°C protegidas da luz até a aquisição no citometro. As amostras do painel de células Tregs também foram fixadas, porém com 200 µL do Tampão A 1x (BD Biosciences), por 10 min, no escuro em temperatura ambiente e seguiram para a marcação intranuclear do fator de transcrição *FoxP3*.

**Tabela 2.** Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de ativação celular.

Anticorpo	Fluorocromo	Catálogo	Clone	Empresa
<b>CD3</b>	PE-CF594	562280	UCHT1	BD
<b>CD4</b>	Pacific Blue	558116	RPA-T4	BD
<b>CD8</b>	AmCyan	339188	SK1	BD
<b>CD27</b>	PE	340425	L128	BD
<b>CD38</b>	PerCP-Cy-5.5	551400	HIT2	BD
<b>CD45 RA</b>	FITC	555488	HI100	BD
<b>CCR7</b>	PECy-7	557648	3D12	BD
<b>HLA-DR</b>	ALEXA 700	560743	G46-6	BD
<b>Viabilidade</b>	UV	L23105	-	Invitrogen

**Tabela 3.** Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de superfície de células T reguladoras.

Anticorpo	Fluorocromo	Catálogo	Clone	Empresa
<b>CD3</b>	PE-CF594	562280	UCHT1	BD
<b>CD4</b>	Pacific Blue	558116	RPA-T4	BD
<b>CD25</b>	PE-Cy7	335807	2A3	BD
<b>CD127</b>	APC	558598	HIL-7R-M21	BD
<b>CD39</b>	FITC	561444	TU66	BD
<b>Viabilidade</b>	UV	L23105	-	Invitrogen

### 5.2.11 Marcação Intranuclear para FoxP3

Após a fixação das células com o Tampão A, a placa foi submetida à centrifugação a 600g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células lavado com 200 µL de Tampão MACS e repetido a centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, para a permeabilização da membrana citoplasmática e da membrana intranuclear, as células foram incubadas com 200 µL de Tampão C (o tampão B (50x) diluído 1: 50 no tampão A), protegidas da luz, em temperatura ambiente durante 30 min. Após esse tempo, a placa foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células lavado com 200 µL de Tampão MACS. Em seguida, procedeu-se a marcação intracelular adicionando 100µL da solução contendo o anticorpo anti-FoxP3 PE e o Tampão MACS (Tabela 4) durante 1h, em temperatura ambiente. Por fim, as células foram novamente submetidas à lavagem com 100 µL de Tampão MACS, e,

posteriormente, fixadas com 200  $\mu$ L de PFA a 1%. As células marcadas e fixadas foram transferidas para microtubos e armazenadas a 4°C, devidamente protegidas da luz, para posterior aquisição em citômetro de fluxo.

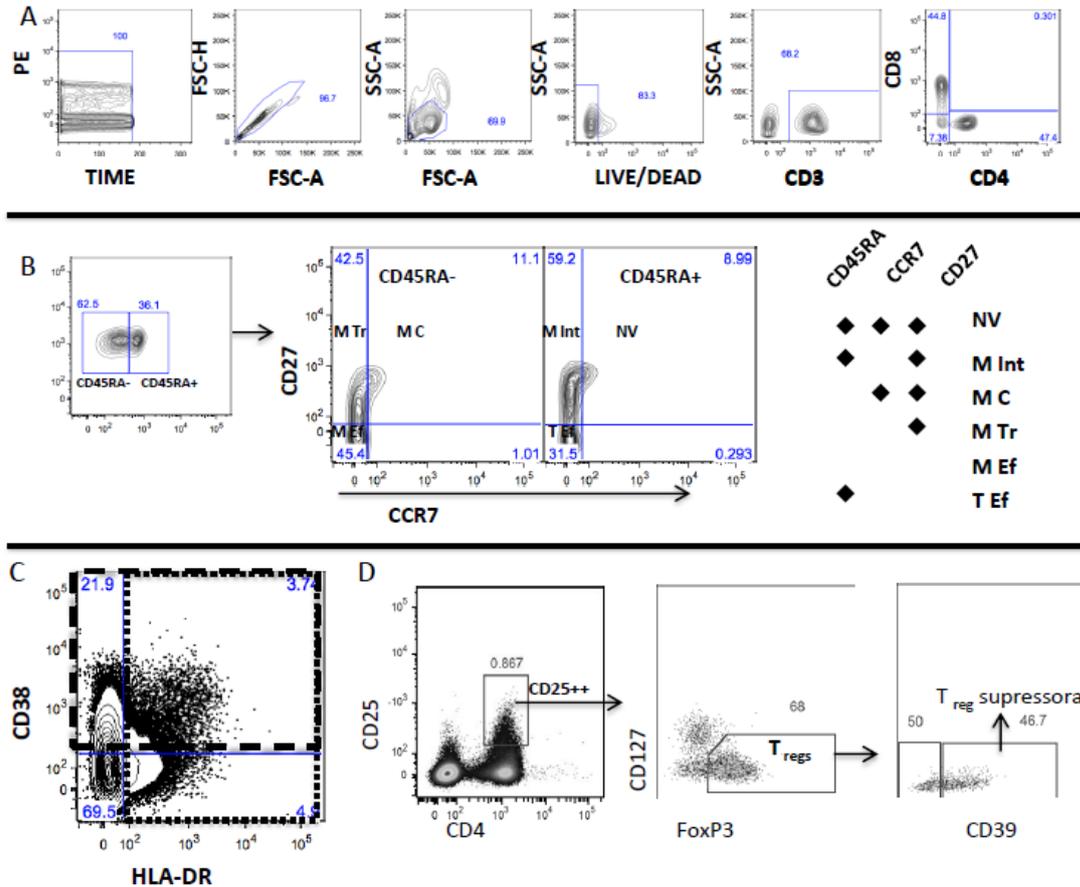
**Tabela 4.** Informações dos reagentes utilizados no painel intranuclear de células T regs.

Anticorpo	Fluorocromo	Catálogo	Clone	Empresa
<b>FoxP3</b>	PE	560046	259D/C7	BD
<b>FoxP3 Tampão comp A (10x)</b>	-	51-9005451	-	BD
<b>FoxP3 Tampão comp B (50x)</b>	-	51-9005450	-	BD

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD LSRII Fortessa (*Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems*, San Jose, CA, EUA). A compensação foi realizada com *compbeads* (positivas- cobertas com anti-Ig- $\kappa$  e negativas- cobertas com soro fetal bovino- BD Biosciences). Tubos específicos para cada fluorocromo foi preparado contendo uma mistura de *compbeads* positivas e negativas marcadas com anticorpos conjugados aos fluorocromos específicos a cada tubo.

### 5.3 Estratégias de análise dos dados de citometria de fluxo

Os dados gerados da aquisição no citômetro de fluxo foram analisados no programa *Flowjo* (TreeStar, San Carlos, California, USA). A definição dos *gates* para análise do painel de ativação foi baseada na análise dos tubos FMO (*Fluorescence Minus One*), onde foram utilizados 6 tubos de FMO (CD27, CD38, CD45RA, HLA-DR, CCR5 e CCR7) e para o painel de células T regs foi utilizado 1 tubo marcado com todos os anticorpos do painel de Treg, porém no lugar do anti-FoxP3-PE foi realizada marcação com isotipo. As estratégias de análise utilizadas para o painel de ativação e diferenciação ontogênica estão apresentadas na Figura 5.



**Figura 5.** Estratégia de análise para a caracterização do perfil de ativação celular e de T CD4+ reguladoras. Os dados foram analisados em gráficos de *counter plot* (A-C) e *pseudocolor plot* (D), seguindo os critérios de qualidade da análise baseados nos seguintes parâmetros: **A)** *Time* x *PE*, para checar o *status* do laser; *FSC-H* x *FSC-A*, para excluir células duplicadas na aquisição (*Singlets*); *SSC-A* x *FSC-A*, para identificação da população de linfócitos; *Live/Dead*, marcador de viabilidade celular, para excluir as células mortas; o *gate* *CD3*, para linfócitos T; *CD4* x *CD8*, para identificação das populações de células T *CD4+* e *CD8+*; **B)** Com base no FMO, os *gates* foram aplicados para identificação da expressão de *CD27*, *CD45RA* e *CCR7*, através da combinação booleana desses marcadores foi possível identificar as seguintes subpopulações: *naïve* (*NV*=*CD45RA+**CD27+**CCR7+*); *Memória Central* (*M C*=*CD45RA-**CD27+**CCR7+*); *Memória Transitória* (*M Tr*=*CD45RA-**CD27-**CCR7-*); *Memória Intermediária* (*M Int*=*CD45RA+**CD27+**CCR7-*); *Memória efetora* (*M Ef*=*CD45RA-**CD27-**CCR7-*) e *Efetora terminal* (*T Ef*=*CD45RA+**CD27-**CCR7-*); **C)** *CD38* x *HLA-DR-* para analisar as possíveis combinações de ativação; **D)** o *gate* *CD4* x *CD25*, para definir células T *CD4+* *CD25++*; *CD127-* x *FoxP3+*, para identificar células T reguladoras e *CD39* x *SSC-A*, para identificar o estado de ativação das células T reguladoras.

#### 5.4 Análise estatística

Para avaliar o efeito da infecção por subtipos do HIV-1 (subtipo C x Não-C) sobre os parâmetros imunológicos ao longo do primeiro ano de infecção, as características da fase recente (V1) foram comparadas entre os grupos utilizando o teste *t* de *Student* ou o teste do qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas. A análise pareada e não pareada entre os grupos foi realizada considerando a diferenciação celular, a expressão individual e co-expressão de CD38 e HLA-DR e população de células T reguladoras total e expressando a molécula CD39 entre os grupos, utilizando os testes de Wilcoxon e Mann Whitney, bicaudal. Para identificar o efeito causado pelo subtipo Não- C na ativação celular comparado com o efeito causado pelo subtipo C, foi criado um modelo de regressão univariada (Tabela 7), considerando o perfil de ativação celular, caracterizado pela co- expressão de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ totais e subpopulações de naïve/ memória. Outro modelo estimou o efeito do subtipo viral nas células T CD4 + reguladoras total (células T CD4+CD25++ CD127- expressando FoxP3 +) e expressando a molécula CD39. Para cada modelo foi também avaliado o delta ou a diferença apresentada ao longo do tempo, definido como marcador de evolução (resultados da  $\Delta V_n - V_1$ ).

Os marcadores com distribuições fortemente distorcidas em cada visita e todos os valores maiores do que zero foram transformados (escala logarítima) para utilização nos modelos de regressão, os coeficientes do modelo e os intervalos de confiança foram convertidos para exponenciais. Com o intuito de identificar diferenças na ativação celular decorrente apenas da diversidade genética dos vírus presente nos grupos, foi criado um modelo de regressão linear multivariado, de modo a eliminar a influência de alguns fatores na ativação celular, previamente descritos. A construção de modelos multivariados decorreu a partir de modelos com covariáveis *a priori* adicionados individualmente a um modelo completo para cada resultado, além da categoria de subtipo viral as covariáveis fixadas na visita basal foram: carga viral do HIV-1, gênero (masculino x feminino), Fator de risco sexual (homens que fazem sexo com homens versus outros), genótipo CCR5 delta 32, presença ou ausência do vírus GBV-C e contagem de células T CD4+. As diferenças intra- e intergrupos foram consideradas estatisticamente significantes quando apresentaram um valor de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas nos programas Stata versão 12 (StataCorp, College Station, TX, EUA) e Graph Pad Prism 6.0, SPSS e SPICE.

/

## ***Resultados***

---

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Coorte do estudo

Dos 282 pacientes arrolados nos projetos de pesquisa de São Paulo (n=253) e Porto Alegre (n=29), 63 foram selecionados para a investigação do perfil de diferenciação ontogênica e ativação de células T CD4+ e CD8+, juntamente com as células T reguladoras, com o objetivo de encontrar diferenças nos pacientes infectados por diferentes subtipos virais tanto na fase recente (V1) como após ~1 ano de infecção, fase estabelecida (Vn), pelo vírus HIV-1.

Os 63 pacientes apresentaram idade média de 34 anos (intervalo de 18 a 65 anos), 81,0% eram homens e destes 71,4% pertenciam ao grupo de homens que fazem sexo com homens (HSH). Com base nas informações contidas nas fichas dos pacientes foi possível estimar a data da infecção pelo vírus HIV-1 de 55 dos 63 participantes, com essa informação foi calculado que a primeira visita dos pacientes aconteceu em uma mediana de 3,4 meses após infecção pelo HIV-1. Consequentemente os pacientes foram analisados imunologicamente em dois períodos distintos que compreenderam intervalos de 2,4 a 10,9 meses de infecção, os quais foram definidos como fase recente (V1- <3-6 meses após infecção pelo vírus) e fase estabelecida (Vn- aproximadamente seis meses depois do *set point* virológico).

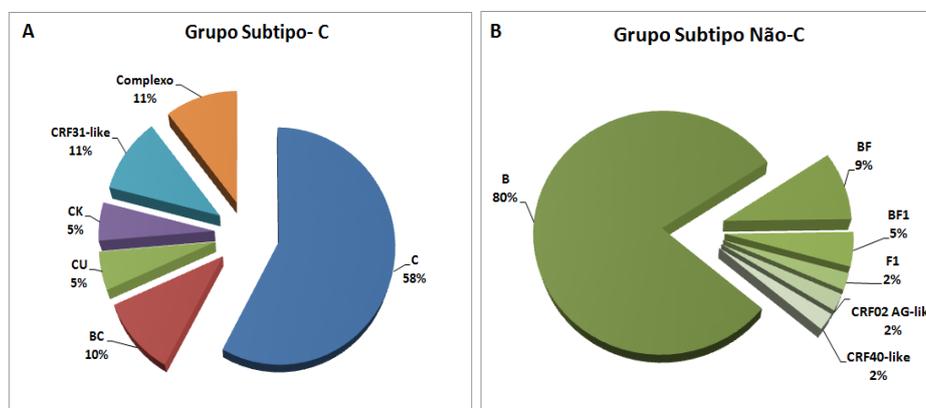
### 6.2 Distribuição dos subtipos virais

De acordo com os critérios de inclusão, o teste de genotipagem do vírus HIV-1 foi realizado nas amostras de sangue coletadas na primeira visita (fase recente-V1). Com base nos resultados, as sequências das regiões da *polimerase* e da *transcriptase reversa* do HIV-1 encontradas nas amostras dos 63 indivíduos, foram analisadas e dois grupos foram então definidos: **a)** grupo “**Subtipo-C**” (n=19), compreendeu indivíduos infectados por vírus HIV-1 do subtipo C e de formas recombinantes com o subtipo C (foram incluídos os subtipos C, BC, CU, CK, CRF31-*like* e um subtipo C-complexo); e **b)** o grupo “**Subtipo Não-C**” (n=44), incluiu indivíduos infectados por subtipos que não fossem o C e que também não possuísse recombinação com o mesmo (incluídos os subtipos B, BF, BF1, F1, CRF02 AG e CRF40-*like*). A distribuição dos subtipos dentro

de cada grupo apresentou dominância de 55% do subtipo C no **Grupo Subtipo-C** e 81,39% do subtipo B no **Grupo Não-C** (Tabela 5 e Fig. 6).

**Tabela 5.** Frequência dos diversos subtipos do HIV-1 encontrado nas coortes e distribuição dos subtipos nos dois grupos estabelecidos (Subtipo-Não-C x C).

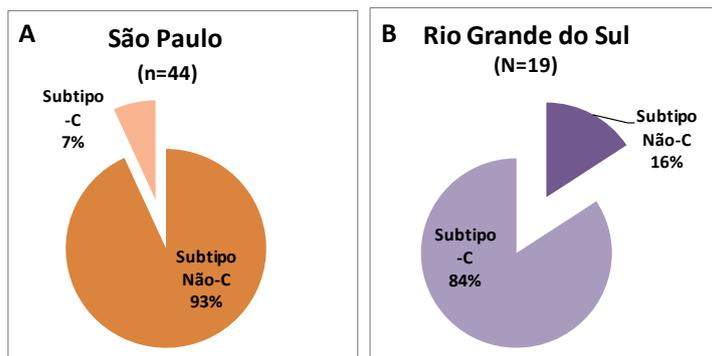
	% (n/N)
<b>Grupo Subtipo-C</b>	
C	57,89 (11/19)
BC	10,53 (2/19)
CU	5,26 (1/19)
CK	5,26(1/19)
CRF31-like	10,53 (2/19)
Complexo	10,53 (2/19)
<b>Grupo Subtipo Não-C</b>	
B	79,54 (35/44)
BF	9,09 (4/44)
BF1	4,54 (2/44)
F1	2,27 (1/44)
CRF02 AG-like	2,27 (1/44)
CRF40-like	2,27 (1/44)



**Figura 6.** Distribuição de subtipos nos grupos Subtipo-C (A) e Não-C (B).

A análise da distribuição dos subtipos virais encontrados nas duas coortes revelou um padrão distinto no quadro de infecção nas cidades de São Paulo e Porto Alegre, com relação a subtipo viral circulante e comportamento sexual de caráter homossexual (Tabela 6). A categorização dos pacientes pelo genótipo demonstrou uma clara concentração genotípica do vírus HIV-1 por região, em que 84,21 % (16/19) dos pacientes selecionados da coorte de Porto Alegre foram infectados pelo vírus do subtipo

C ou por recombinantes com o subtipo C. Enquanto que 93,18% (41/44) dos pacientes selecionados da coorte de São Paulo foram infectados por subtipos Não-C (Fig. 7).



**Figura 7.** Concentração genotípica de subtipos C e não-C na coorte de São Paulo (A) e Rio Grande do Sul (B).

### 6.3 Análise dos dados demográficos

De acordo com a literatura sabe-se que alguns fatores podem contribuir para um melhor ou pior prognóstico nos pacientes infectados pelo HIV-1. Dados laboratoriais como a contagem de células T CD4+, T CD8+ e carga viral, foram analisados incluindo o diagnóstico da infecção por sífilis. Outros fatores também foram analisados durante a realização do projeto, como a tipagem de HLA e a presença da mutação de 32 pares de base no gene do receptor de quimiocina CCR5 (*CCR5Δ32*, fator genético do hospedeiro) e a presença de co-infecção pelo vírus GBV-C. Estes ensaios foram realizados nas amostras da visita V1, os resultados constataram que dos 63 pacientes 23,8% (15/63) apresentaram teste positivo para sífilis, 17,5 % (11/63) apresentavam co-infecção com o vírus GBV-C, e 11,1% (7/63) eram portadores da deleção heterozigótica de 32 pares de base (*CCR5Δ32+*). Com relação à tipagem de HLA, foi verificado que 21,7% (13/60) apresentaram alelos do gene HLA-B associados em outros estudos com progressão mais lenta do HIV-1, incluindo HLA-B\*14, B\*27, ou B\*57. A maioria das características demográficas e da frequência de sífilis, co-infecção por GBV-C, genótipos da deleção *CCR5Δ32* e dos HLAs foram semelhantes nos grupos Subtipo-C e Não-C, embora uma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada no grupo subtipo Não-C por apresentar maior número de pessoas do gênero masculino e com comportamento sexual de caráter homossexual (HSH) comparado com o grupo Subtipo-C (Tabela 6).

Os pacientes infectados pelo HIV-1 são periodicamente avaliados através de parâmetros como a quantidade de células T CD4+ e CD8+/ $\text{mm}^3$  de sangue e carga

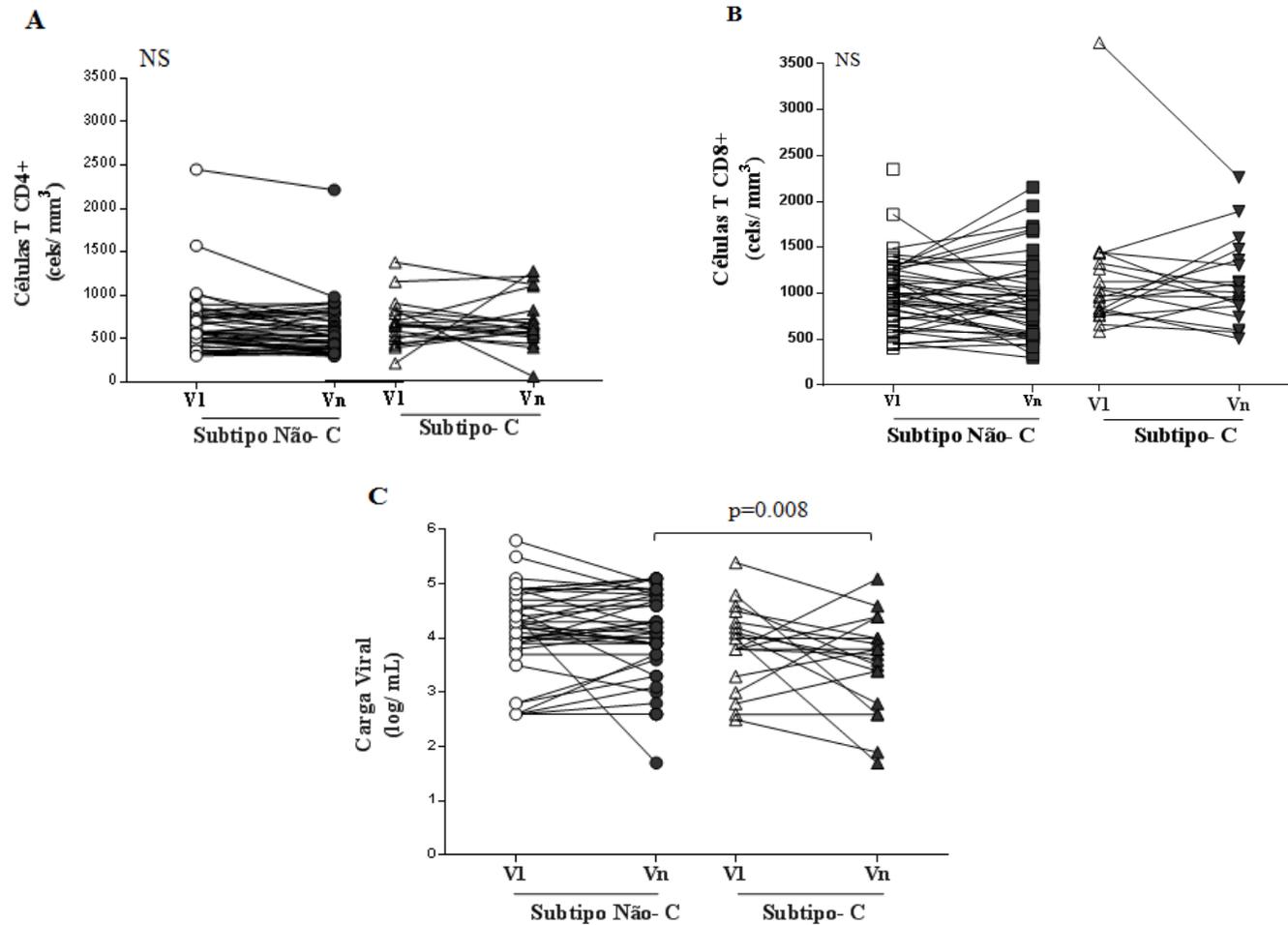
viral/mL de plasma. Esses parâmetros são utilizados como critérios para acompanhamento clínico e durante muito tempo de indicação à terapia antiretroviral. Considerando os 63 pacientes avaliados neste estudo, a contagem de células T CD4+ e T CD8+ / mm<sup>3</sup> em média geométrica na fase recente da infecção foi de 573 e 915 células respectivamente, e a média geométrica da carga viral do HIV-1 apresentada foi de 10,074/ mL. Na fase estabelecida foi encontrado médias geométricas de 522 e 850 para células T CD4+ e T CD8+ / mm<sup>3</sup>, respectivamente, e carga viral de 7594/ mL.

**Tabela 6.** Dados demográficos dos pacientes categorizados pelo subtipo viral do HIV-1 (Subtipo Não-C x C).

<b>Dados Epidemiológicos</b>	<b>Subtipo Não-C (n=44)</b>	<b>Subtipo-C (n=19)</b>	<b>Valor de p (p&lt;0,05)</b>
<b>Idade (anos)</b> (média geom. (95% IC))	32,2 (30,6 a 36,4)	32,53 (28,9 a 40,0)	0,74
<b>Sexo</b> (% de homens (n/N))	90,91 (40/44)	63,15 (11/19)	0,002*
<b>HSH (Homossexual)</b> (% (n/N))	81,81 (36/44)	52,63 (10/19)	0,01*
<b>Sífilis</b> (% (n/N))	29,54 (13/44)	15,79 (3/19)	0,27
<b>GBV-C (Fase Recente)</b> (% de positivos (n/N))	15,90 (7/44)	21,05 (4/19)	0,28
<b>CCR5Δ32</b> (% de heterozigotos (n/N))	6,82 (3/44)	21,05 (4/19)	0,13
<b>HLA-B (14, 27 ou 57)</b> (% (n/N))	19,04 (8/43)	29,41 (5/17)	0,57
<b>Células T CD4</b> (média geom. (95% IC))			
Fase Recente	603 (533 a 683)	509 (414 a 625)	0,06
Fase Estabelecida	539 (474 a 613)	485 (348 a 678)	0,34
<b>Carga Viral</b> (média geom. (95% IC))			
Fase Recente	11627 (6365 a 21239)	7228 (3109 a 16807)	0,44
Fase Estabelecida	10626 (5825 a 19387)	3551 (1313 a 9599)	0,008*

\*P<0,05; HSH, Homens que fazem sexo com homens; IC, intervalo de confiança.

A diferença encontrada entre as fases recente e estabelecida da infecção foi melhor evidenciada com a análise desses parâmetros por subtipo. Não foi encontrado diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de células T CD4+ e CD8+, porém foi observada uma diferença significativa entre os dois grupos na fase estabelecida, em que o grupo subtipo-C (p=0,008) apresentou uma diminuição no número de cópias/mL do HIV-1 comparado com o grupo subtipo Não-C, tanto utilizando valores de média geométrica como escala logarítmica (Fig. 8 C, Tabela 6).

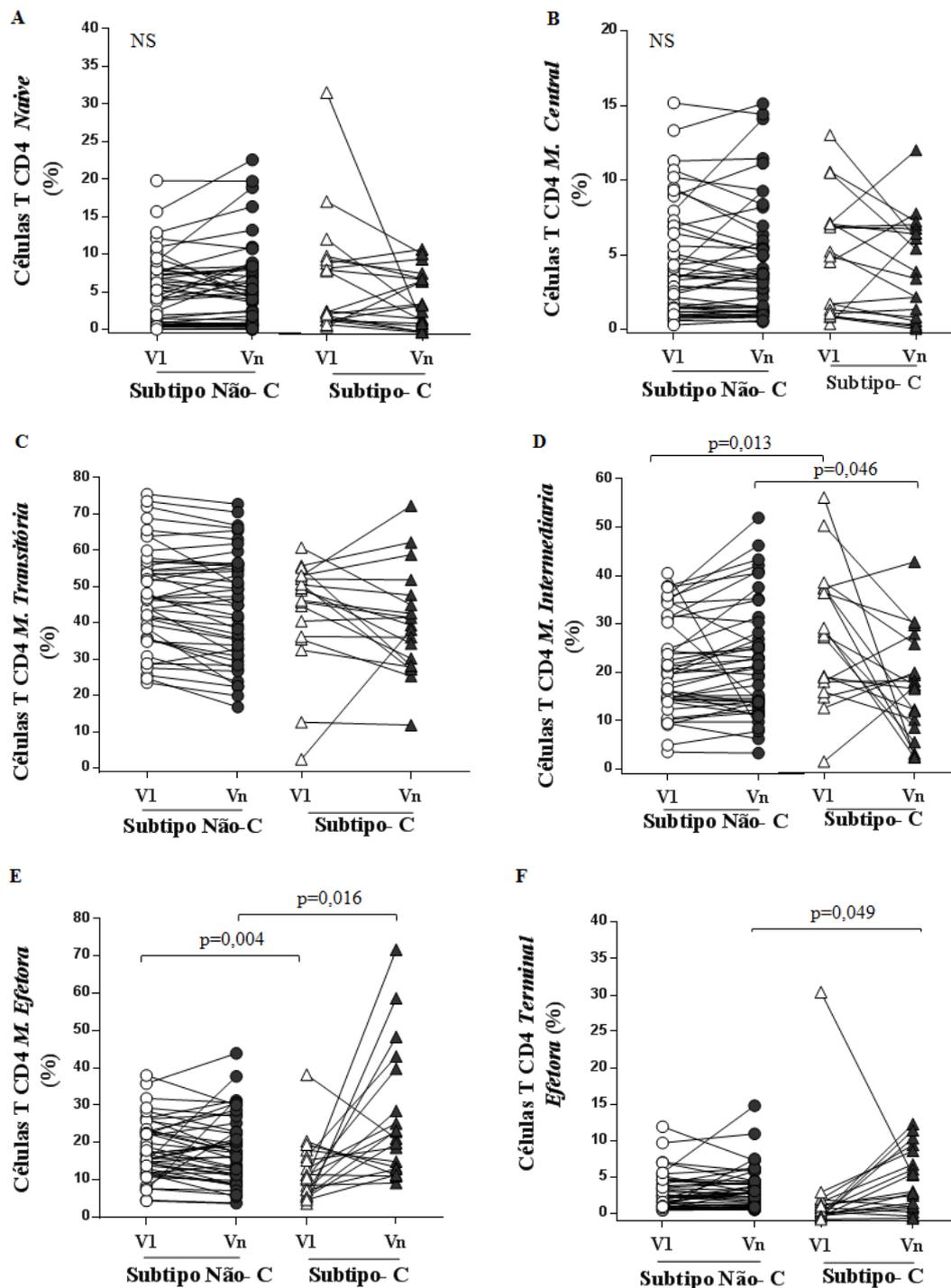


**Figura 8. Análise de dados clínicos dos pacientes infectados pelo HIV-1.** Contagem de células T CD4+/ $\text{mm}^3$  (A) e T CD8+/ $\text{mm}^3$  (B) do sangue periférico e a carga viral do HIV- 1 log/ mL de plasma (C), analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. Todos os gráficos utilizados foram *scatter plot* antes e depois. Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

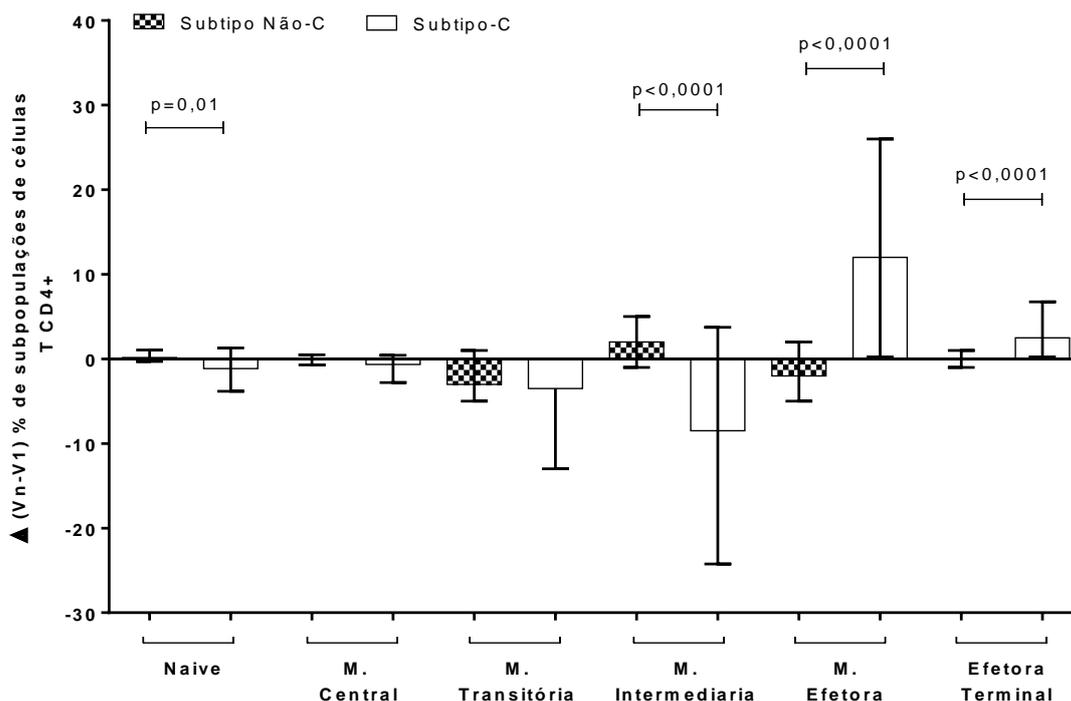
#### **6.4 Perfil de diferenciação ontogênica das células T CD4+ e CD8+.**

Durante uma resposta imune, o processo de geração de células efetoras é essencial para combater um patógeno e/ou reestabelecer um ambiente homeostático. Neste processo, após o reconhecimento antigênico, a célula sofre diferentes estágios de maturação. Neste estudo, os diferentes estágios de maturação das células T CD4+ foram caracterizados, através de imunofenotipagem de superfície (ver estratégia, Fig. 5A e B), nas fases recente e estabelecida da infecção pelo HIV-1 em amostras de indivíduos infectados por subtipos-C e Não-C.

Na fase recente observamos que os pacientes infectados pelo subtipo-C apresentaram uma menor frequência de células T CD4+ de memória efetora ( $p=0,004$ , Fig. 9E), e um maior percentual de células com fenótipo de memória intermediária ( $p=0,013$ , Fig. 9D) quando comparado com os pacientes infectados por subtipos Não-C. Na fase estabelecida, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo tanto na frequência de células T CD4+ com fenótipo de memória efetora ( $p=0,016$ ) como nas células terminal efetora ( $p=0,049$ ) no grupo do subtipo-C comparado com Não-C (Fig. 9F). Outra análise foi realizada calculando a diferença dos resultados encontrados nas duas fases, ( $\Delta V_n-V_1$ ), nessa estratégia evidenciamos de forma clara a evolução de cada grupo durante o primeiro ano de infecção. O grupo subtipo-C apresentou um aumento na diferenciação celular após o primeiro ano de infecção, pois encontramos uma maior frequência de células com fenótipo de memória efetora e terminal efetora (ambos  $p<0,0001$ ), e um declínio concomitante na frequência de células naïve ( $p=0,01$ ) e memória intermediária ( $p<0,0001$ ) comparado com o grupo subtipo Não-C (Fig. 10A).

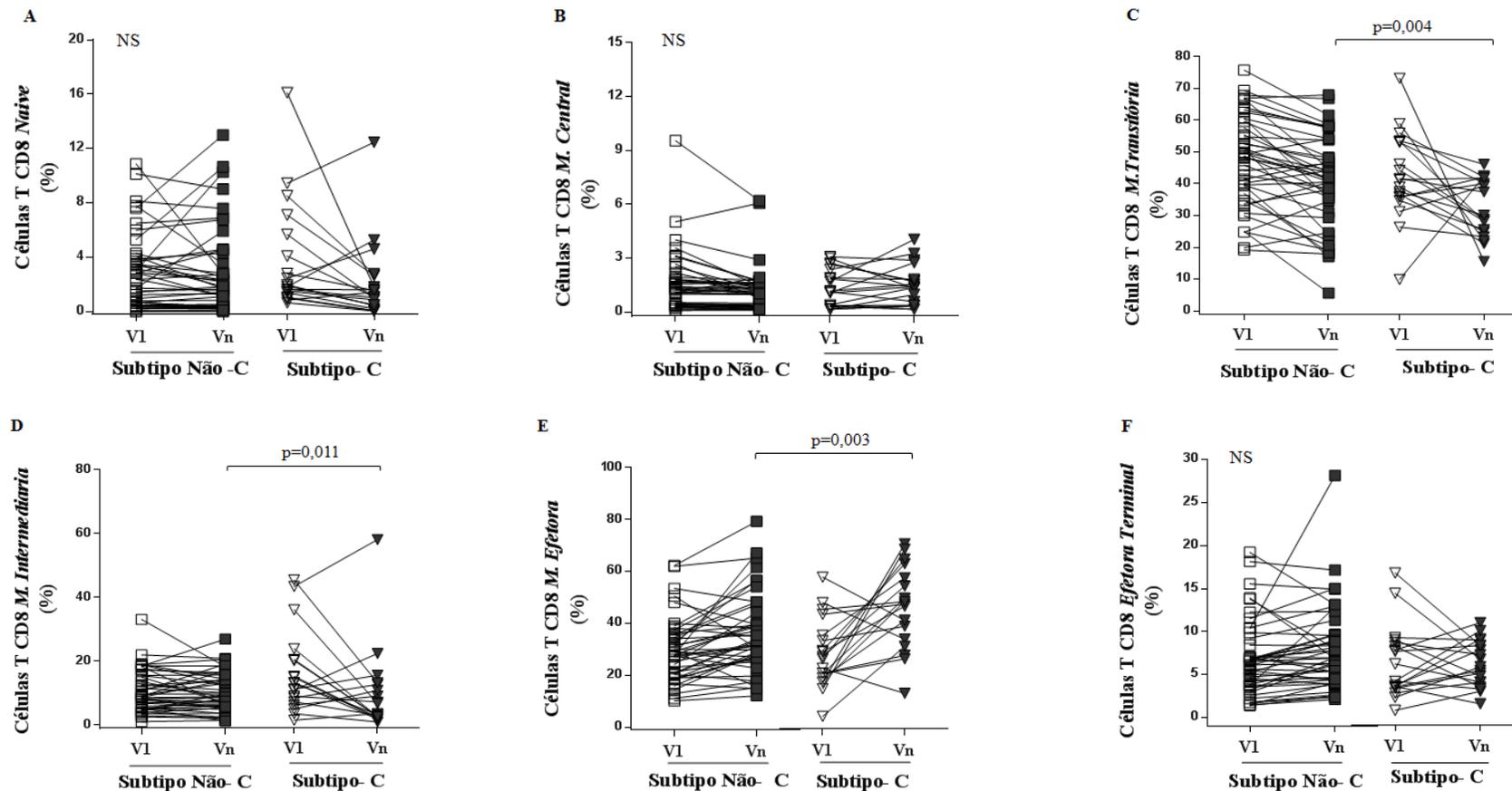


**Figura 9. Caracterização fenotípica dos estágios de diferenciação ontogênica das células T CD4<sup>+</sup>.** Através da imunofenotipagem por citometria de fluxo foi possível identificar 6 subpopulações de células T CD4: Naïve (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) (A); Memória Central (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) (B); Memória Transitória (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) (C); Memória Intermediária (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), (D); Memória Efetora (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), (E); e Efetora Terminal (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), (F). Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção entre os grupos Subtipo Não-C e C. Todos os gráficos utilizados foram *scatter plot* antes e depois. Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).



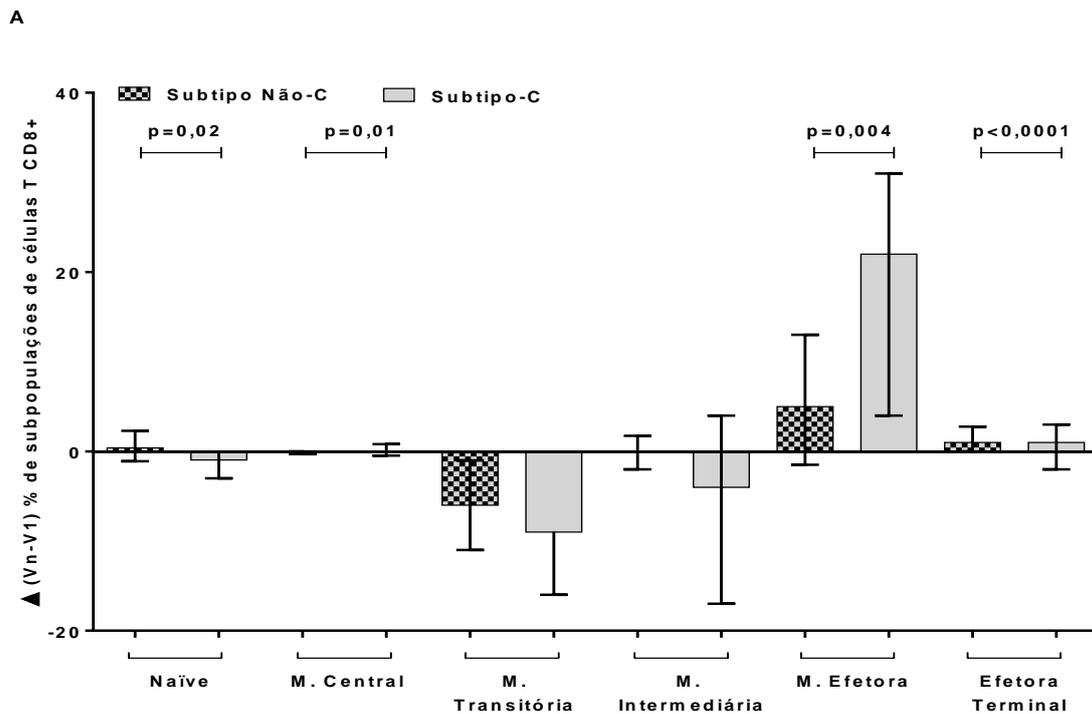
**Figura 10. Dinâmica da diferenciação ontogênica das células T CD4+.** As diferenças ( $\Delta$  Vn-V1) encontradas nas frequências das subpopulações naïve/ memória foram analisadas entre os grupos Subtipo Não-C e C. O gráfico em barras apresentou linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

O perfil de diferenciação das células T CD8+ apresentado por ambos os grupos foi semelhante na fase recente da infecção pelo HIV-1. Entretanto na fase estabelecida o grupo subtipo C mostrou uma menor frequência de células T CD8+ com fenótipos de memória transitória ( $p=0,004$ ) e intermediária ( $p=0,01$ ). Em contra partida uma maior frequência de células T CD8+ de memória efetora ( $p=0,003$ ) foi encontrada quando comparado com o grupo subtipo Não-C (Fig.9). A análise da variação encontrada ao longo do tempo pelo grupo subtipo C evidenciou uma maior perda na frequência de células naïve e memória intermediária (Vn-V1,  $p=0,02$  e  $p<0,0001$ , respectivamente) do que o grupo Não-C e um grande aumento na frequência de células T CD8+ de memória central ( $p=0,01$ ) e memória efetora ( $p=0,004$ ) (Fig. 10A).



**Figura 11. Caracterização fenotípica dos estágios de diferenciação ontogênica das células T CD8+.** Através da imunofenotipagem por citometria de fluxo foi possível identificar 6 subpopulações de células T CD8: Naive (CD45RA+CD27+CCR7+) (A); Memória Central (CD45RA-CD27+CCR7+) (B); Memória Transitória (CD45RA-CD27+CCR7-) (C); Memória Intermediária (CD45RA+CD27+CCR7-) (D); Memória Efetora (CD45RA-CD27-CCR7-) (E); e Efetora Terminal (CD45RA+CD27-CCR7-) (F). Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção entre os grupos Subtipo Não-C e C. Todos os gráficos utilizados foram *scatter plot* antes e depois. Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann-Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).

Na análise das diferenças foram observadas frequências de células T CD8+ com fenótipo naíve e de memória intermediária (Vn-V1,  $p=0,02$  e  $p<0,0001$ , respectivamente) no grupo do subtipo-C comparado com Não-C, seguido por um aumento na frequência de células T CD8+ de memória central e efetora (Vn-V1,  $p=0,016$  e  $p=0,004$ , respectivamente) (Fig. 12). As medianas e os intervalos interquartis de cada análise comparativa estão apresentados em detalhes no Anexo E.

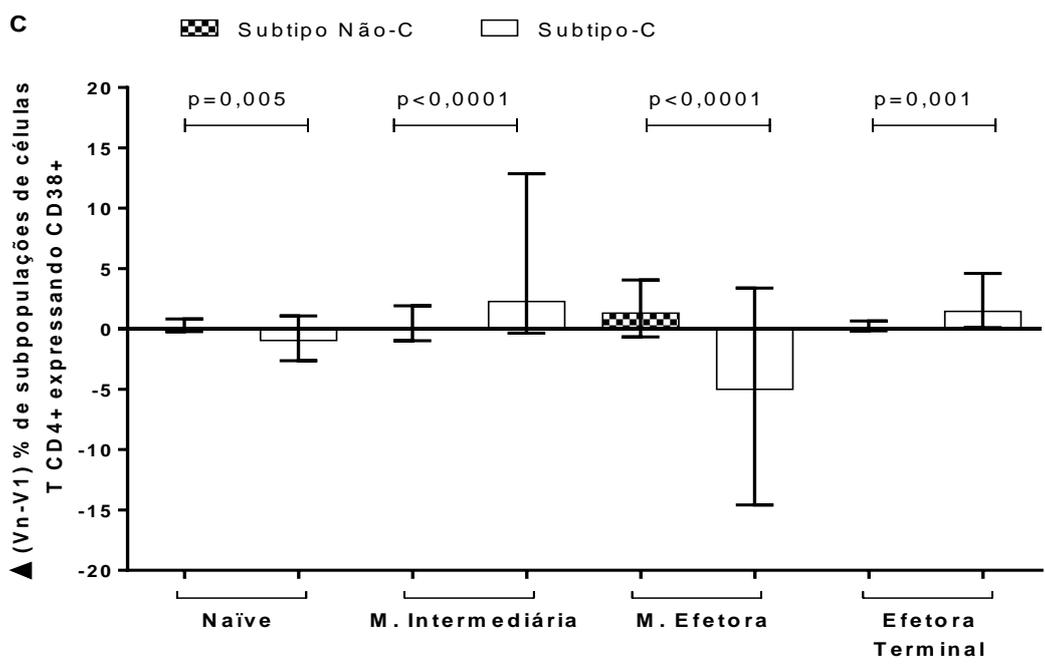
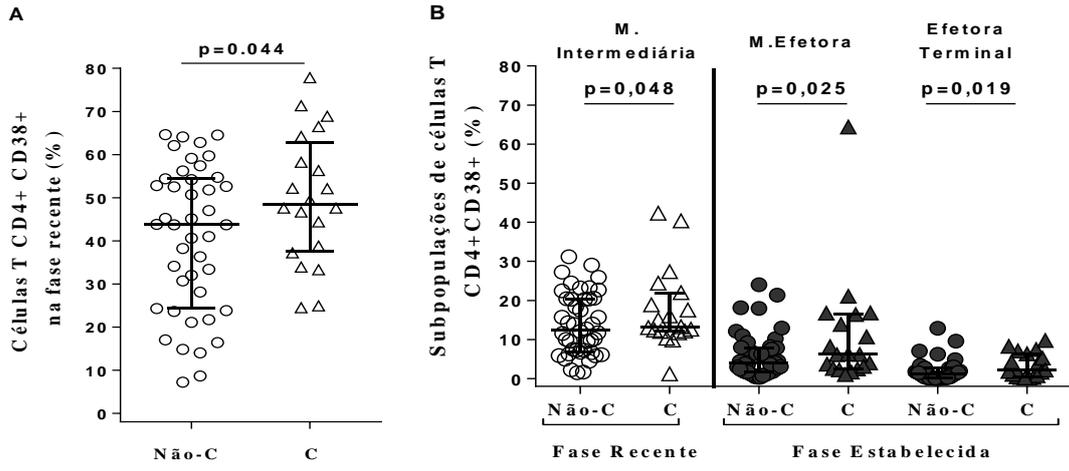


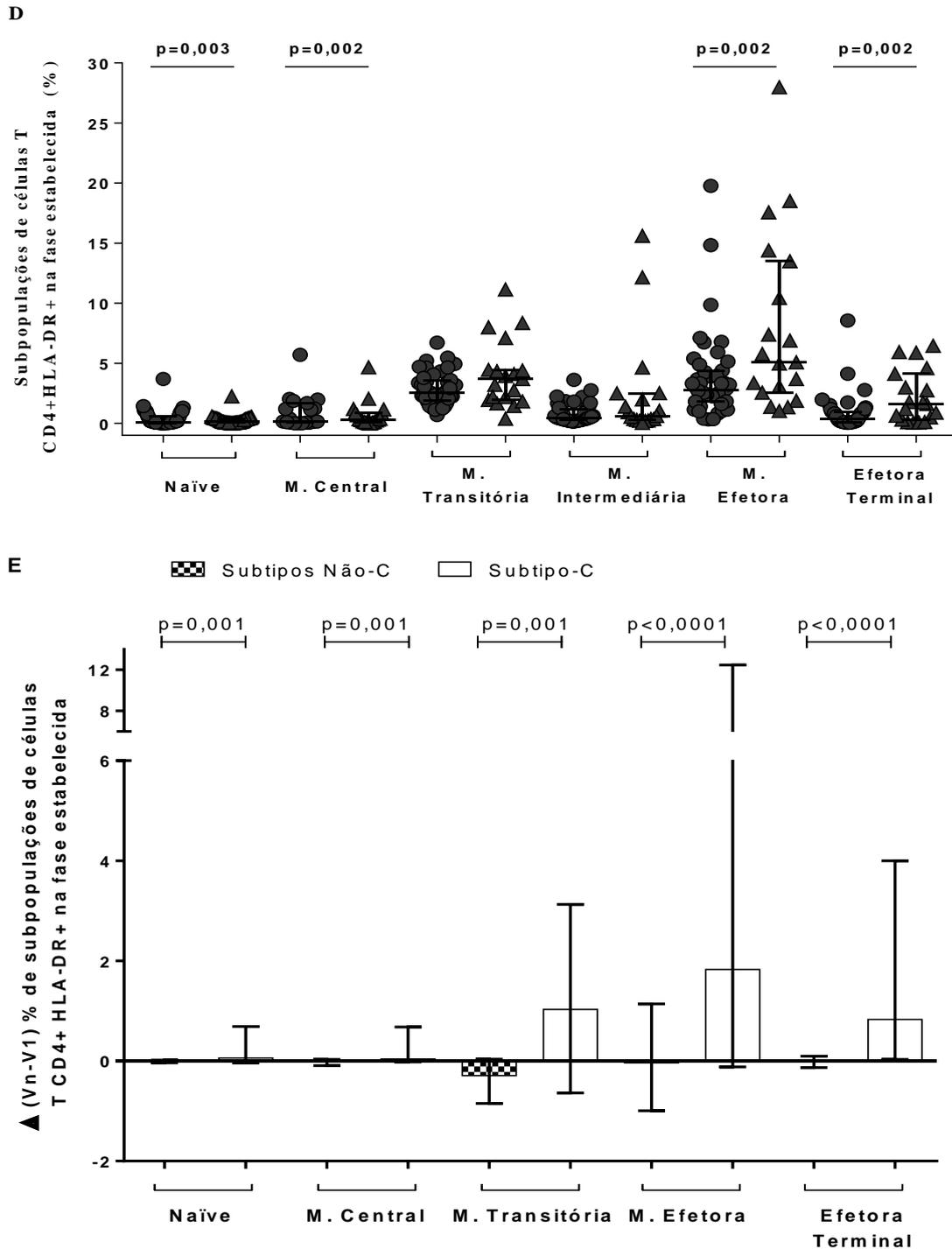
**Figura 12. Análise da variação ( $\Delta$  Vn-V1) da frequência de subpopulações de células T CD8+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. O gráfico em barras apresentou linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

## 6.5 Perfil de ativação celular através da expressão das moléculas CD38+ e HLA-DR+ sobre as células T CD4+ e CD8+.

A expressão de CD38 tem sido há muito tempo correlacionada com um prognóstico ruim na infecção pelo HIV-1 (Giorgi *et al.*, 1993), principalmente quando associada à expressão de HLA-DR (ver estratégia, Fig. 5C). Para um maior entendimento analisamos a expressão total de CD38 e HLA-DR nas células T CD4+ e CD8+ e subpopulações de naïve e memória. Resultados da fase recente mostraram que o grupo subtipo C apresentou um maior percentual de células T CD4+ totais ( $p=0,044$ ) e com fenótipo de memória intermediária expressando CD38+ ( $p=0,048$ ), comparado com os valores encontrados no grupo subtipo Não-C (Fig. 13A e B, respectivamente). No entanto na fase estabelecida o grupo subtipo-C mostrou maior percentual de células T CD4+ de memória efetora ( $p=0,025$ ) e efetora terminal ( $p=0,019$ ) expressando CD38+ comparado com o grupo subtipo Não-C (Fig. 13B). Avaliando a diferença (Vn-V1), foi encontrado no grupo subtipo-C uma maior frequência de células T CD4+ CD38+ com fenótipos naïve ( $p=0,005$ ), memória intermediária ( $p<0,0001$ ), efetora ( $p<0,0001$ ) e efetora terminal expressando CD38+ ( $p=0,001$ ) comparado com grupo subtipo Não-C (Fig. 13D).

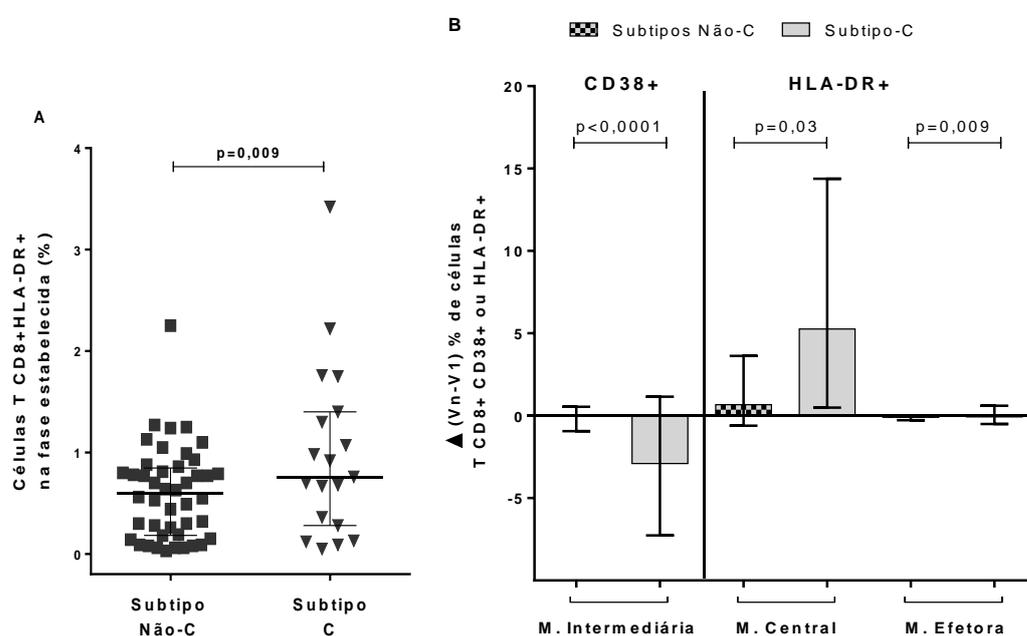
Em relação a expressão da molécula HLA-DR+ o grupo subtipo C comparado com o Não-C, apresentou uma maior frequência de células T CD4+ com fenótipos naïve, memória central, efetora e efetora terminal expressando HLA-DR+ comparado com o grupo subtipo Não-C (todos  $p<0,005$ , Fig. 13C). Quanto a variação da frequência de células expressando HLA-DR+, o grupo subtipo C apresentou uma maior frequência de células T CD4+ HLA-DR+ com fenótipos naïve ( $p=0,001$ ), memória central ( $p=0,001$ ), transitória ( $p=0,001$ ) efetora ( $p<0,0001$ ) e efetora terminal ( $p<0,0001$ ) comparado com grupo subtipo Não-C (Fig. 13E).





**Figura 13.** Análise do perfil de expressão total das moléculas CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ totais e subpopulações naïve/ memória. A análise da frequência de células T CD4+ total e subpopulações CD38+ estão contidas nos gráficos *scatter plot* (A e B, respectivamente), para a análise da diferença ( $\Delta Vn-V1$ ) foi utilizado um gráfico de barras (C). A análise da expressão da molécula HLA-DR+ sobre as subpopulações de células T CD4+ e da diferença encontradas na fase estabelecida foram apresentadas nos gráfico *scatter plot* D e gráfico de barra E, respectivamente. Todos os gráficos apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).

A análise de células T CD8<sup>+</sup> revelou na fase recente, um perfil de expressão total de CD38<sup>+</sup> e HLA-DR semelhante tanto nos pacientes infectados por subtipo C como por Não-C. Na fase estabelecida o grupo infectado pelo subtipo C apresentou uma maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> de memória central HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,009$ , Fig. 14A). Ao longo do tempo (Vn-V1), as variações encontradas mostraram que o grupo subtipo C apresentou um maior percentual de células T CD8<sup>+</sup> de memória intermediária CD38<sup>+</sup> ( $p<0,0001$ ) e maior frequência de células T CD8<sup>+</sup> de memória central e efetora expressando HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,03$  e  $p=0,009$ , respectivamente) (Fig. 14B).



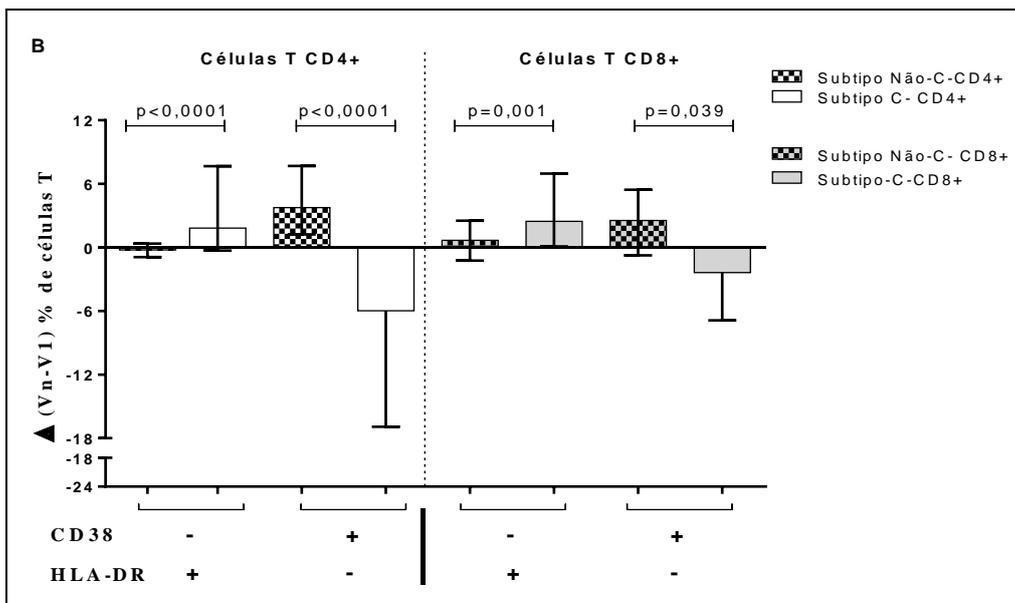
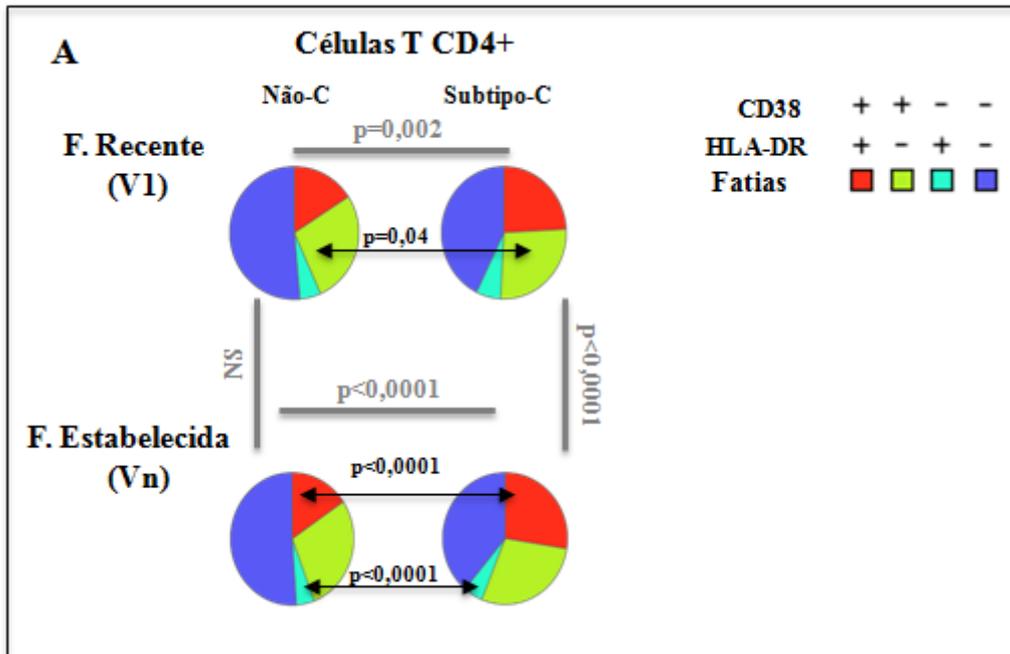
**Figura 14. Análise do perfil de expressão total das moléculas CD38<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> nas células T CD8<sup>+</sup> totais e subpopulações naïve/ memória.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. A análise da frequência de células T CD8<sup>+</sup> total HLA-DR<sup>+</sup> está contida no gráfico *scatter plot* (A); a análise da diferença ( $\Delta Vn-V1$ ) da frequência de subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> no gráfico em barras (B). Todos os gráficos apresentaram linhas representando valores de mediana e interquartil (25% e 75%). Na análise de amostras independentes (V1xV1, VnxVn e ( $\Delta Vn-V1$ )) utilizou-se o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

A expressão combinada e alternada desses marcadores estão associadas às alterações metabólicas nas células T causada pela infecção HIV-1. Analisando o perfil da expressão das moléculas CD38 e HLA-DR nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> encontramos diferenças estatisticamente significantes entre o perfil global de expressão (pizza inteira) observado no grupo subtipo-C comparado com o grupo subtipo Não-C na fase recente (pizza inteira, V1,  $p=0,002$ , Fig. 15A, em cinza) e ainda dentro do grupo subtipo-C entre as fases recente e estabelecida (Vn x V1,  $p<0,0001$ , Fig. 15B, em cinza). Ao

explorarmos cada conjunto de combinações, vimos que as células T CD4+ com fenótipo CD38- HLA-DR+ não apresentou alterações estatisticamente significantes na frequência entre os grupos de subtipos na fase recente, porém na análise da fase estabelecida e da diferença observamos que o grupo subtipo-C apresentou uma maior frequência dessas células (Vn,  $p < 0,0001$ , Fig. 15A; Vn-V1,  $p < 0,0001$ , Fig. 15B, em preto) comparado com o grupo subtipo Não-C.

O grupo subtipo-C apresentou um aumento estatisticamente significativo quando analisamos a diferença da frequência de células T CD8+ CD38- HLA-DR+ (Vn-V1,  $p = 0,001$ , Fig. 15B) comparado com os valores encontrados no grupo subtipo Não-C.

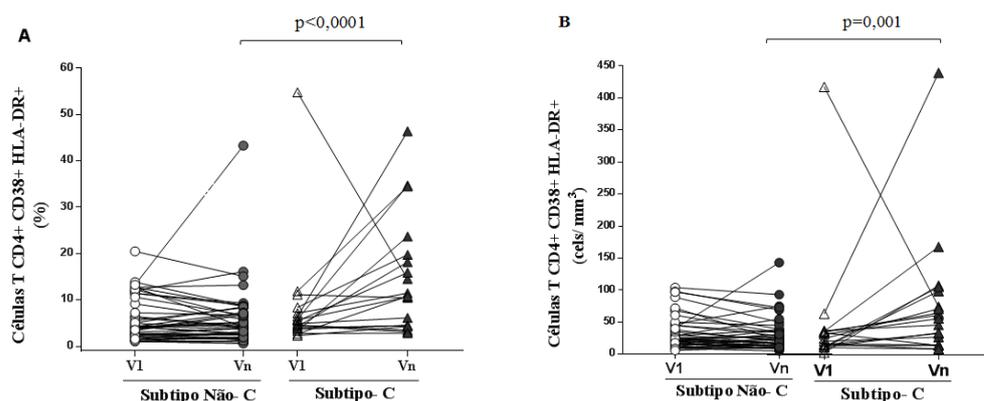
Uma maior frequência de células T CD4+ CD38+HLA-DR- foi encontrada no grupo subtipo-C na fase recente (V1,  $p = 0,04$ , Fig. 15A) quando comparado com o grupo subtipo Não-C. Entretanto observamos que na fase estabelecida e na análise da diferença o grupo subtipo C apresentou menor frequência de células T CD4+ CD38+HLA-DR- comparado com o grupo subtipo Não-C (Vn,  $p < 0,0001$ , Fig. 15A e Vn-V1,  $p < 0,0001$ , Fig. 15B). Ao analisar a diferença (Vn-V1) da frequência de células T CD8+ CD38+ HLA-DR- apresentada pelos grupos, observamos que o grupo subtipo Não-C apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado com o encontrado no grupo subtipo-C (Vn-V1,  $p = 0,039$ , Fig. 15B).



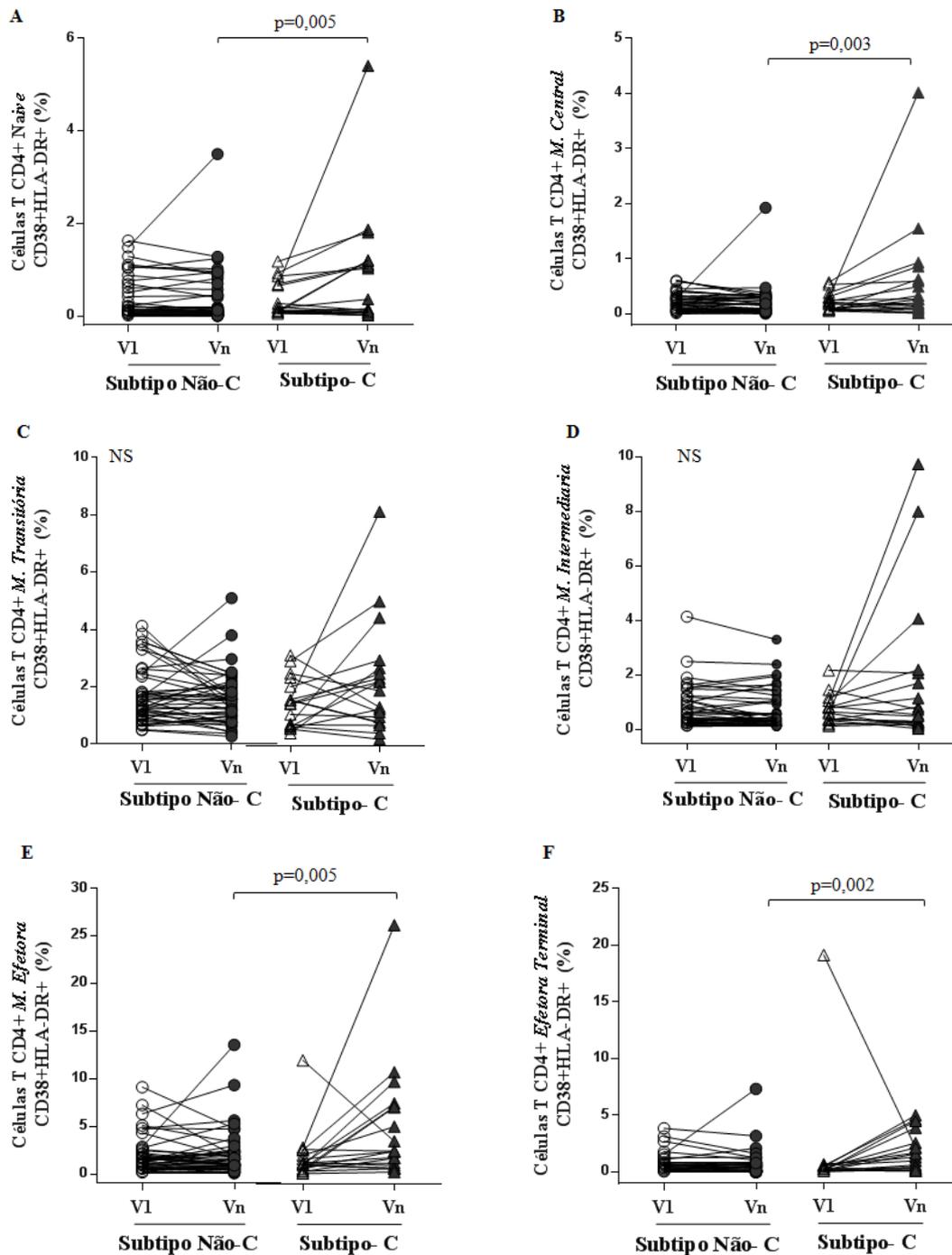
**Figura 15. Análise do perfil de expressão das moléculas CD38 e HLA-DR nas células T CD4+ e CD8+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção entre os grupos Subtipo Não-C e C. Análise da expressão combinada dessas moléculas foi apresentada em gráficos em forma de pizza (A), cada fatia recebeu uma cor específica e correspondeu a um padrão de expressão diferenciado. Fatia com a coloração: ■ representou as células T CD4+ CD38+HLA-DR+ (Vn, Não-C x C  $p<0,0001$ ); ■ CD38+HLA-DR- (V1, Não-C x C  $p=0,04$ ); ■ CD38-HLA-DR+, (Vn, Não-C x C  $p<0,0001$ ); ■ CD38-HLA-DR- (NS). A análise da diferença ( $\Delta$  Vn-V1) da frequência de células TCD4+ e CD8+ com fenótipos CD38-HLA-DR+ e CD38+HLA-DR- foram apresentados em um gráfico de barras (B). Todos os gráficos apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

## 6.6 Análise da co-expressão de CD38+HLA-DR+ nas células T CD4+ e CD8+

Com o objetivo de se encontrar diferenças entre os perfis apresentados por ambos os grupos durante o primeiro ano de infecção (V1, Vn e Vn-V1) foram realizadas análises de regressão linear através de dois modelos, univariado (não ajustado) e multivariado (ajustado). Consideramos principalmente a análise da co-expressão das moléculas CD38+HLA-DR+ em células T CD4+ e CD8+ e nas subpopulações de naïve e memória. No modelo univariado não ajustado, foi calculado o tamanho do efeito de um grupo, o do subtipo Não-C na ativação celular comparado com o grupo do subtipo-C. No modelo ajustado, a análise multivariada considerou dados demográficos (sexo e comportamento sexual) e laboratoriais (incluindo carga viral, contagem de células T CD4/ mm<sup>3</sup>, infecção pelo GBV-C) como também fatores genéticos (presença de polimorfismo de CCR5Δ32) obtidos na fase recente como uma única variável. Em ambos os modelos não houve diferença estatística significativa na ativação de células T CD4+ entre os grupos de subtipos virais na visita de fase recente. Entretanto na fase estabelecida no modelo não ajustado, o grupo subtipo C apresentou uma maior frequência e quantidade de células T CD4+ ativadas (% , p<0.0001, Fig. 16A, e cels/ mm<sup>3</sup> p=0,001, Fig. 16B, respectivamente), além de maior frequência das subpopulações de naïve (p=0,005), memória central (p=0,003), efetora (p=0,005) e efetora terminal (p=0,002) co-expressando CD38+HLA-DR+ comparado com os achados no grupo subtipo Não-C (Tabela 7 e Fig. 17 A-F).



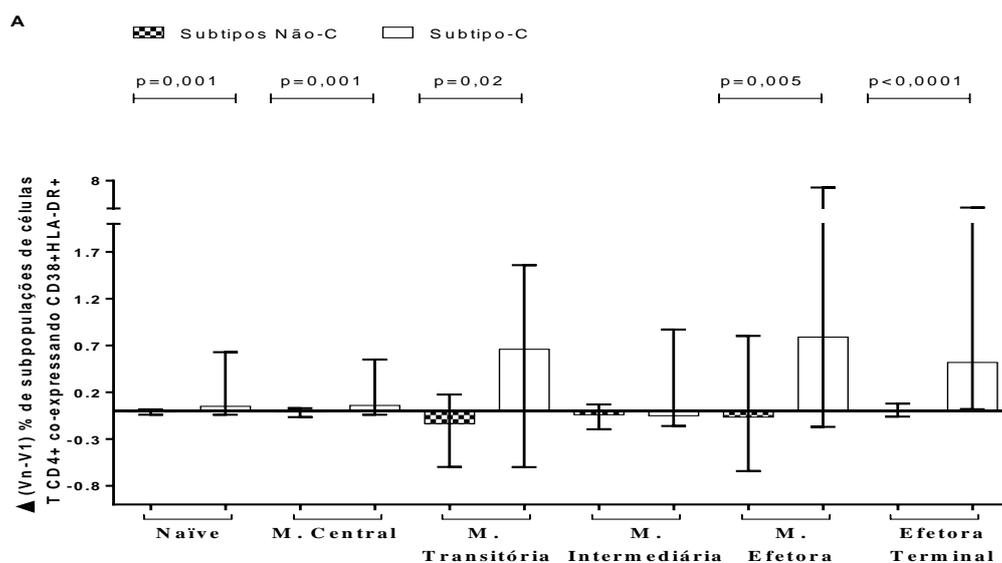
**Figura 16. Caracterização fenotípica do perfil de ativação de Células T CD4+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e rstablecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. (A) % de células T CD4+ CD38+HLA-DR+ e (B) quantidade de células T CD4+CD38+HLA-DR+ (cels/ mm<sup>3</sup>) foi obtida após a conversão dos percentuais em valores absolutos. Todos os gráficos *scatter plot* antes e depois apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).



**Figura 17. Caracterização fenotípica do perfil de ativação nas subpopulações Naive/memória das Células T CD4+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. A co-expressão de CD38+HLA-DR+ foi caracterizada em cada uma das 6 subpopulações de células T CD4+: *Naive* (A); Memória Central (B); Memória Transitória (C); Memória Intermediária (D); Memória Efetora (E) e Efetora Terminal (F). Todos os gráficos *scatter plot* antes e depois apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).

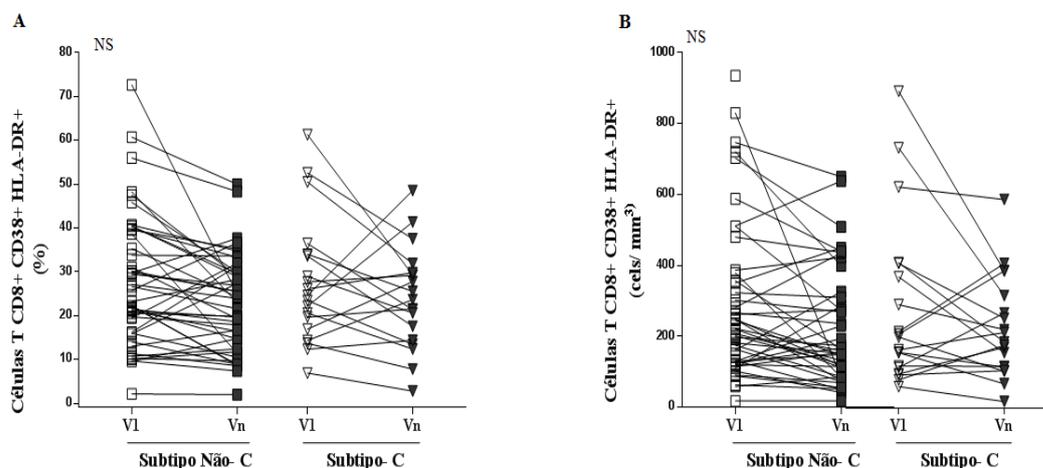
Na fase estabelecida, a análise de regressão multivariada identificou que o perfil de ativação (CD38+ HLA-DR+) das células T CD4+ apresentado pelo grupo Não-C foi 0,375 vezes menor do que o apresentado pelo grupo do subtipo-C (95% IC: 0,237 a 0,594;  $p < 0,0001$ ). Ainda na fase estabelecida, as frequências das células T CD4+ naïve e de memória central CD38+HLA-DR+ foram, respectivamente, 0,724 (95% IC: -1,211 a -0,237;  $p = 0,004$ ) e 0,541 (95% IC: -0,844 a -0,239;  $p = 0,001$ ) vezes menor no grupo Não-C do que no grupo do subtipo-C, ou seja, evidenciando um aumento no perfil de ativação dessas subpopulações no grupo subtipo-C. A frequência das células T CD4+ de memória efetora e efetora terminal ativadas foi respectivamente de 0,357 (95% IC: 0,195 a 0,655;  $p = 0,001$ ) e 0,217 vezes menor no grupo Não-C (95% CI: 0,087 a 0,543;  $p = 0,002$ ) (Tabela 7 e Fig. 17).

Particularmente, na subpopulação de células T CD4+ de memória transitória, a ativação entre os grupos na fase estabelecida apresentou uma diferença estatística de significância *borderline* (0,693; 95% IC: 0,478 a 1,005;  $p = 0,053$ , Tabela 7), porém na análise da variação ( $\Delta Vn-V1$ ) da ativação encontrada entre os grupos foi encontrada uma redução 0,578 vezes de células T CD4+ de memória transitória ativadas no grupo Não-C (95% IC: 0,400 a 0,833;  $p = 0,004$ ) (Tabela 7) em ambos os modelos de análise. Além das diferenças entre os grupos C e Não-C encontradas na visita de fase estabelecida, foram também observadas diferenças significativas na evolução do quadro de ativação ( $\Delta Vn-V1$ , Tabela 7 e Fig.18).

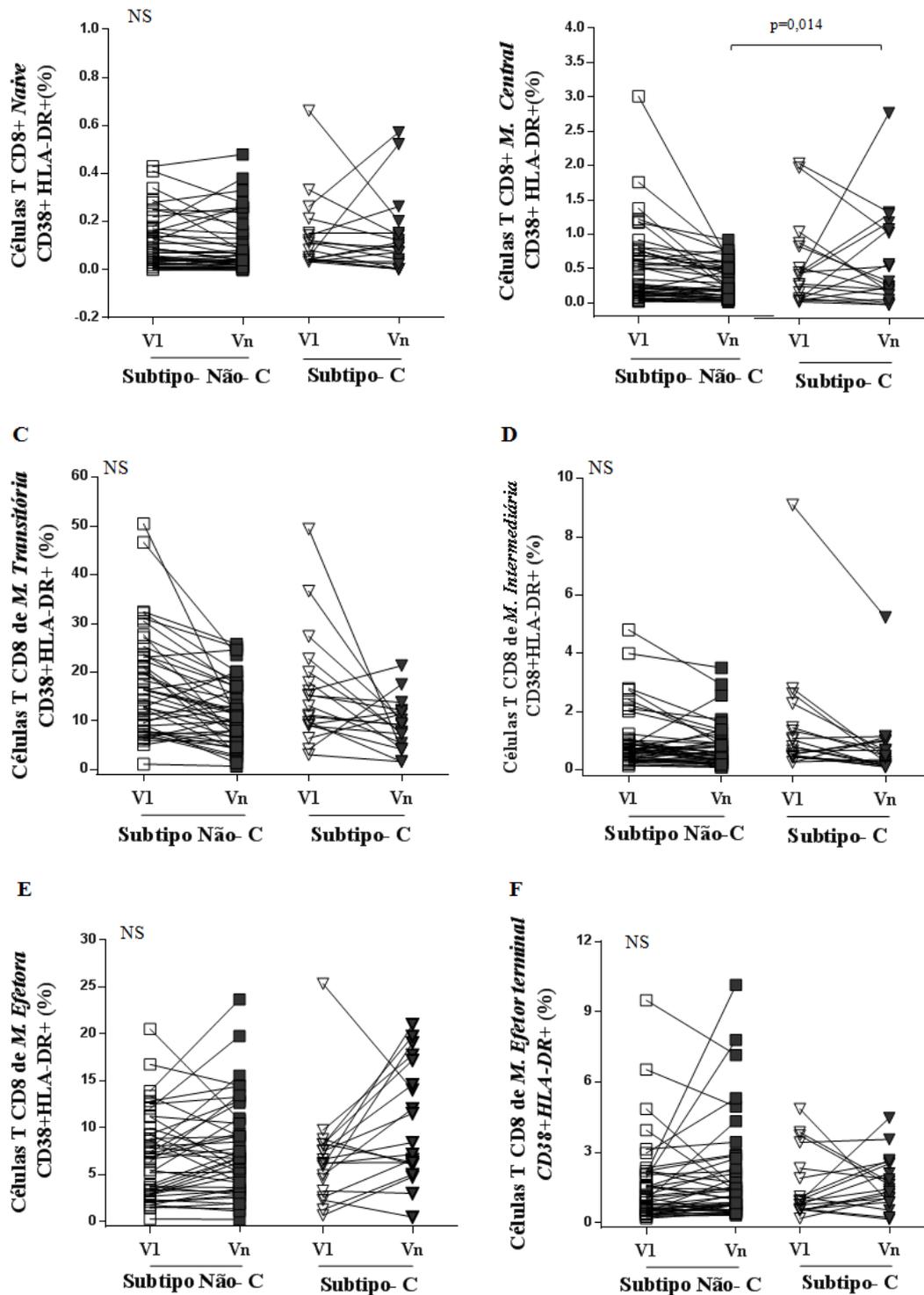


**Figura 18. Análise da diferença ( $\Delta Vn-V1$ ) do perfil de co-expressão CD38+HLA-DR+ nas células T CD4+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. O gráfico em barra apresentou linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).

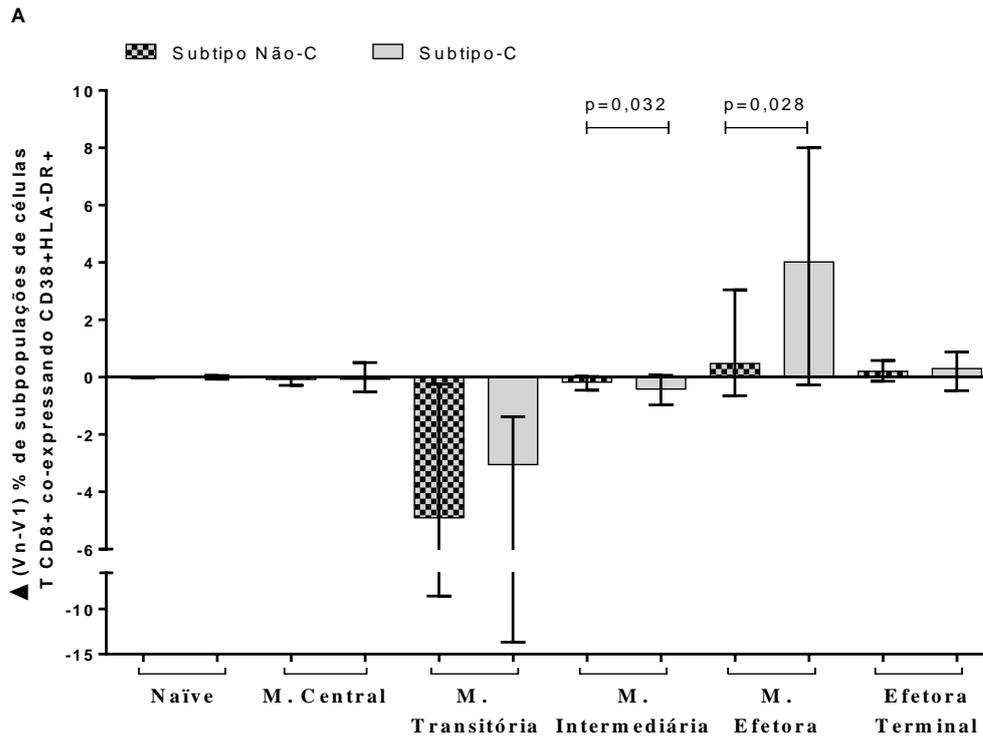
Ao contrário dos achados nas células T CD4+, as diferenças entre os grupos de subtipos C e Não-C na ativação de células T CD8+ totais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 19A e B). A ausência de uma associação entre ativação celular e os grupos de subtipos virais foi observada nas células T CD8+ naïve, efetora terminal e memória transitória (Fig. 20 e 21). Nas células T CD8+ de memória central e efetora, entretanto, o percentual de ativação foi, respectivamente, 0,311 (95% IC: -5,84 a -0,039;  $p=0,026$ ) e 0,564 (95% IC: 0,337 a 0,947; 0,031) vezes menor no grupo subtipo Não-C comparada com o grupo subtipo-C na fase estabelecida (Fig. 21).



**Figura 19. Caracterização fenotípica do perfil de ativação de Células T CD8+.** Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. (A) % de células T CD8+ CD38+HLA-DR+ e (B) quantidade de células T CD8+CD38+HLA-DR+/mm<sup>3</sup> obtida após a conversão dos percentuais em valores absolutos. Todos os gráficos *scatter plot* antes e depois apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).



**Figura 20.** Caracterização fenotípica do perfil de ativação nas subpopulações Naive/memória das Células T CD8+. A co- expressão de CD38+HLA-DR+ foi caracterizada em cada uma das 6 subpopulações de células T CD8+: *Naive* (A); Memória Central (B); Memória Transitória (C); Memória Intermediária (D); Memória Efetora (E) e Efetora Terminal (F). Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. Todos os gráficos *scatter plot* apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum- rank test).

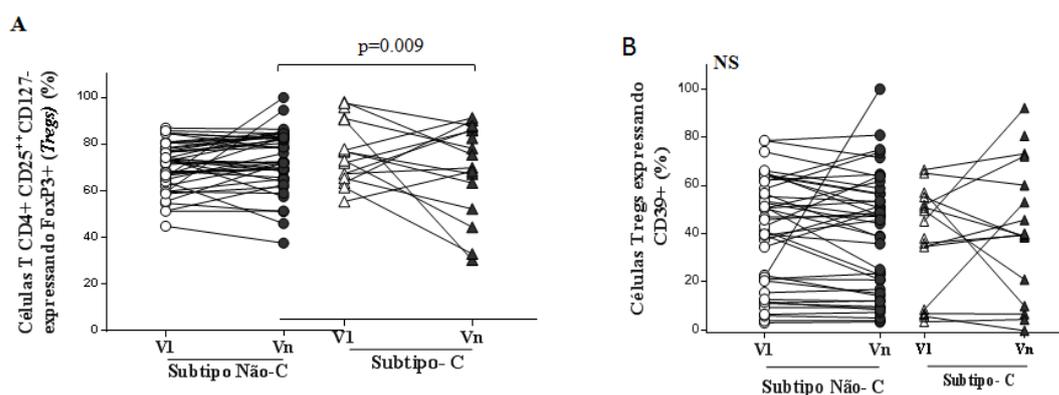


**Figura 21. Análise da variação ( $\Delta Vn-V1$ ) do perfil de co-expressão das moléculas CD38+HLA-DR+ nas células T CD8+. Os resultados foram analisados nas fases recente e estabelecida da infecção, nos grupos Subtipo Não-C e C. O gráfico em barras apresentou linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).**

As análises de regressão linear tanto a univariada como a multivariada confirmaram o resultado do perfil de ativação celular mais pronunciado no grupo do subtipo-C. Todas as análises realizadas com os percentuais encontrados foram reproduzidas com os valores absolutos (ver anexo A-F).

## 6.7 Perfil de células T CD4+ Reguladoras (Treg)

Células T reguladoras têm sido amplamente exploradas em diversos ambientes de doença, principalmente pelo fato de possuir um papel essencial na regulação da resposta imune suprimindo a ativação celular em um ambiente de infecção/doença. Ao analisar a frequência das células T CD4+ reguladoras (T regs- células T CD4+ CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-</sup> expressando FoxP3+) em ambas visitas, observamos que na análise univariada, a frequência dessas células no grupo do subtipo Não-C foi 11,3 vezes maior do que no grupo do subtipo-C na fase estabelecida (Vn, 95%IC: 2.940 a 19.598; p=0.009, Tabela 8, Fig. 22A), sendo que na análise multivariada essa significância é perdida, (95% IC: -1,053 a 18,491; p=0,08). A análise da frequência de células Tregs expressando a molécula CD39+ (Treg supressora) mostrou-se similar entre os grupos mesmo após o primeiro ano de infecção. (Fig. 22 B). As medianas e os intervalos interquartis de cada análise comparativa estão apresentados em detalhes no Anexo G.



**Figura 22. Caracterização fenotípica de outras subpopulações de Células T CD4+.** A frequência de células T CD4+ reguladoras- Treg (CD4+CD25<sup>++</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3+) (A) e % das células T Reguladoras supressoras definidas através da expressão de CD39 nas células T regs (B). Todos os gráficos *scatter plot* antes e depois apresentaram linhas referentes aos valores de mediana e interquartil (50%; 25% e 75%). Na análise foi utilizado o teste estatístico *Mann Whitney* (Teste Wilcoxon: sum-rank test).

**Tabela 7.** Modelo de Regressão Linear para o efeito do grupo do subtipo Não- C (comparado com o grupo do subtipo- C) na ativação de células T CD4+ total e nas subpopulações naïve e memória. Os coeficientes ou efeito dobrado (foram exponenciados após utilizar a escala logarítmica) são apresentados com 95 %, Intervalo de Confiança e valor de p.

Variável	Período <sup>2</sup>	Escala <sup>3</sup>	Tamanho do Efeito Não- C Univariado			Tamanho do Efeito Não- C Ajustado Multivariado <sup>1</sup>		
			Coeficiente ou Efeito relativo (95%IC) (valor p)			Coeficiente ou Efeito relativo (95%IC) (valor p)		
<b>% Células T CD4+ CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Log	0.952	(0.609 a 1.488)	(p=0.83)	0.924	(0.563 a 1.516)	(p=0.75)
	Fase Estabelecida	Log	0.422	(0.264 a 0.674)	<b>(p&lt;0.001)</b>	0.375	(0.237 a 0.594)	<b>(p&lt;0.0001)</b>
	Variação (Vn- V1)	Log	0.443	(0.313 a 0.628)	<b>(p&lt;0.0001)</b>	0.406	(0.266 a 0.618)	<b>(p&lt;0.0001)</b>
<b>% Células T CD4+ Naïve CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Linear	-0.060	(-0.292 a 0.172)	(p=0.61)	-0.009	(-0.281 a 0.263)	(p=0.95)
	Fase Estabelecida	Linear	-0.656	(-1.108 a -0.195)	<b>(p=0.005)</b>	-0.724	(-1.211 a -0.237)	<b>(p=0.004)</b>
	Variação (Vn- V1)	Linear	-0.596	(-0.943 a -0.249)	<b>(p=0.001)</b>	-0.715	(-1.072 a -0.358)	<b>(p&lt;0.001)</b>
<b>% Células T CD4+ Memória Central CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Linear	0.004	(-0.087 a 0.094)	(p=0.93)	0.019	(-0.084 a 0.125)	(p=0.70)
	Fase Estabelecida	Linear	-0.460	(-0.753 a -0.168)	<b>(p=0.003)</b>	-0.541	(-0.844 a -0.239)	<b>(p=0.001)</b>
	Variação (Vn- V1)	Linear	-0.464	(-0.735 a -0.193)	<b>(p=0.001)</b>	-0.562	(-0.835 a -0.288)	<b>(p&lt;0.001)</b>
<b>% Células T CD4+ Memória Transitória CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Log	1.136	(0.829 a 1.558)	(p=0.42)	1.190	(0.862 a 1.670)	(p=0.27)
	Fase Estabelecida	Log	0.758	(0.519 a 1.105)	(p=0.15)	0.693	(0.478 a 1.005)	(p=0.053)
	Variação (Vn- V1)	Log	0.667	(0.475 a 0.935)	<b>(p=0.02)</b>	0.578	(0.400 a 0.833)	<b>(p=0.004)</b>
<b>% Células T CD4+ Memória Intermediária CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Log	0.773	(0.487 a 1.227)	(p=0.27)	0.717	(0.424 a 1.213)	(p=0.21)
	Fase Estabelecida	Log	0.584	(0.319 a 1.067)	(p=0.08)	0.529	(0.263 a 1.065)	(p=0.07)
	Variação (Vn- V1)	Log	0.756	(0.496 a 1.150)	(p=0.19)	0.738	(0.441 a 1.235)	(p=0.24)
<b>% Células T CD4+ Memória Efetora CD38+ HLA-DR+</b>								
	Fase Recente	Log	1.125	(0.645 a 1.964)	(p=0.67)	1.129	(0.613 a 2.077)	(p=0.69)
	Fase Estabelecida	Log	0.419	(0.233 a 0.759)	<b>(p=0.005)</b>	0.357	(0.195 a 0.655)	<b>(p=0.001)</b>
	Variação (Vn- V1)	Log	0.374	(0.241 a 0.580)	<b>(p&lt;0.0001)</b>	0.316	(0.185 a 0.542)	<b>(p&lt;0.0001)</b>

% Células T CD4+ <i>Efetora Terminal</i> CD38+ HLA-DR+							
Fase Recente	Log	1.119	(0.486 a 2.576)	(p=0.79)	0.982	(0.371 a 2.597)	(p=0.97)
Fase Estabelecida	Log	0.276	(0.122 a 0.621)	<b>(p=0.002)</b>	0.217	(0.087 a 0.543)	<b>(p=0.002)</b>
Varição (Vn- V1)	Log	0.246	(0.137 a 0.442)	<b>(p&lt;0.0001)</b>	0.221	(0.109 a 0.450)	<b>(p&lt;0.0001)</b>

<sup>1</sup> Modelos multivariados incluíram as co-variáveis: Carga viral do HIV-1, contagem de CD4+/ mm<sup>3</sup>L e infecção por GBV-C na Fase Recente, sexo (macho x fêmea), fator de risco sexual (HSH) e CCR5Δ32.

<sup>2</sup> Período: Amostras foram linearizadas nas visitas de fase recente e estabelecida. A variação foi calculada com base nos resultados da fase estabelecida (Vn) menos da recente (V1).

<sup>3</sup> Escala: a transformação dos dados em log foi necessário para suavizar uma distribuição enviesada, os coeficientes encontrados foram depois exponenciados para recuperar o efeito dobrado do grupo do subtipo Não-C no desfecho comparado com o grupo do subtipo-C. Por outro lado a escala linear onde os dados não transformados foram modelados e os coeficientes apresentados foram interpretados como diferenças lineares no desfecho do grupo do subtipo Não-C comparado com o Subtipo-C.

**Tabela 8.** Modelo de Regressão Linear para o efeito do grupo do subtipo Não-C (comparado com o grupo do subtipo-C) nas células T reguladoras totais e supressoras. Os coeficientes ou Efeito dobrado (foram exponenciados após utilizar a escala logarítmica) são apresentados com 95 %, Intervalo de Confiança e valor de p.

Variável	Período <sup>2</sup>	Escala <sup>3</sup>	Tamanho do Efeito Não- C Univariado			Tamanho do Efeito Não- C Ajustado Multivariado <sup>1</sup>		
			Coeficiente ou Efeito relativo (95%IC) (valor p)			Coeficiente ou Efeito relativo (95%IC) (valor p)		
<b>% Células T reguladoras (CD4+ CD25<sup>+</sup>+CD127 expressando FoxP3+)</b>								
	Fase Recente	log	5.241	(-0.878 a 11.360)	(p=0.09)	5.770	(-2.292 a 13.832)	(p=0.16)
	Fase Estabelecida	log	11.269	(2.940 a 19.598)	<b>(p=0.009)</b>	8.719	(-1.053 a 18.491)	(p=0.08)
	Variação (Vn- V1)	log	6.485	(-1.814 a 14.785)	(p=0.12)	2.819	(-7.168 a 12.806)	(p=0.57)
<b>% Células Treg supressoras (Treg expressando CD39+)</b>								
	Fase Recente	Linear	0.685	(-12.271 a 13.642)	(p=0.92)	5.165	(-11.113 a 21.442)	(p=0.53)
	Fase Estabelecida	Linear	-6.538	(-21.181 a 8.105)	(p=0.38)	-12.854	(-28.919 a 3.210)	(p=0.11)
	Variação (Vn- V1)	Linear	-2.500	(-13.677 a 8.678)	(p=0.66)	-11.338	(-25.323 a 2.646)	(p=0.11)

<sup>1</sup> Modelos multivariados incluíram as co- variáveis: Carga viral do HIV-1, contagem de CD4/mm<sup>3</sup> e infecção por GBV-C na fase recente, sexo (macho x fêmea), fator de risco sexual (HSH) e CCR5Δ32.

<sup>2</sup> Período: Amostras foram linearizadas nas visitas de fase recente e estabelecida. A variação foi calculada com base nos resultados da fase estabelecida (Vn) menos da recente (V1).

<sup>3</sup> Escala: a transformação dos dados em log foi necessário para suavizar uma distribuição enviesada, os coeficientes encontrados foram depois exponenciados para recuperar o efeito dobrado do grupo do subtipo Não-C no desfecho comparado com o grupo do subtipo-C. Por outro lado a escala linear onde os dados não transformados foram modelados e os coeficientes apresentados foram interpretados como diferenças lineares no desfecho do grupo do subtipo Não-C comparado com o Subtipo-C.

## *Discussão*

---

## 7.DISCUSSÃO

A ativação immune presente na infecção pelo HIV-1 pode ser considerada uma das principais forças propulsoras para a progressão e falência da resposta immune gerando um quadro de imunodeficiência (Klatt *et al.*, 2013). Essa ativação celular é característica chave da inflamação sistêmica que altera de forma permanente a dinâmica das células T CD4+ e CD8+ na infecção pelo HIV-1. Muitos trabalhos identificaram e validaram a mensuração da expressão de moléculas CD38 e HLA-DR nas células T CD8+ como uma forma de avaliação do perfil de ativação immune dos indivíduos infectados, a co-expressão desses parâmetros tem sido utilizado como marcador preditivo para a progressão da Aids e morte (Giorgi *et al.*, 1994; Ganesan *et al.*, 2010). Diferentes fatores incluindo a genética do hospedeiro (presença de alelos HLA-B27, -B57 e/ou CCR5  $\Delta$ 32) e co-infecção (GBV-C) (Meyerhans *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1998; Tillmann *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2001; Den Uyl *et al.*, 2004; Leszczyszyn-Pynka *et al.*, 2015) tem sido associados com progressão mais lenta a Aids, influenciando favoravelmente a resposta imune. Entretanto, fatores virais como o tropismo do vírus para células expressando quimiorreceptor CCR5 e /ou CXCR4 foram associados com progressão mais lenta ou mais rápida para AIDS, respectivamente. Uma análise comparativa entre os dois tipos de vírus HIV-1 e 2 encontrou um perfil de ativação celular e inflamação maior e mais sistêmica na infecção causada pelo vírus HIV-1 comparado com o HIV-2 (Marlink *et al.*, 1994; Koblavi-Dème *et al.*, 2004; Machuca *et al.*, 2004). Embora poucos estudos considerem que diferentes subtipos do HIV-1 possam desencadear diferentes cursos clínicos, somente uma análise longitudinal pode revelar se isso é verdade. Neste estudo avaliamos o perfil de diferenciação e expressão dos marcadores de ativação apresentados pelos pacientes infectados por subtipos virais dos *clades* C e não-C do HIV-1.

Considerando o desenvolvimento dos compartimentos de células naïve e memória ao longo do tempo, indivíduos infectados por subtipo-C apresentaram um rápido aumento na geração de subpopulações de memória de células T CD4+ e CD8+ com elevada expressão de marcadores de ativação em células T CD4+ quando comparado com o grupo subtipo Não-C. A diferença entre a infecção por subtipos Não-C vs C não foi evidente durante a infecção aguda mas se desenvolveu ao longo do primeiro ano de infecção, com um efeito independente da quantidade de células T CD4+, carga viral do HIV-1, gênero e via de transmissão. Nós também observamos um percentual aumentado de células T CD8+ CD38+HLA-DR+ de memória efetora ao longo do tempo e maior ativação de células T CD4+ nos indivíduos infectados com subtipo-C, também caracterizado por uma troca para um fenótipo de

proliferação rápida e frequência diminuída de células T reguladoras. Essas células tem sido extensivamente exploradas em muitos ambientes de doença primeiramente por exercer um papel chave na regulação da resposta immune através da supressão da ativação celular em um ambiente de infecção/doença (Belkaid e Rouse, 2005).

Um dos maiores obstáculos na luta contra a epidemia HIV/Aids continua sendo a diversidade genética do vírus HIV-1, sendo que o aumento de formas recombinantes circulantes do vírus tem agravado ainda mais o problema. Estudos têm encontrado diferenças nos perfis de resistência e resposta a esquemas de TARV de indivíduos infectados por diferentes subtipos e submetidos a mesmo esquema antiretroviral. Entretanto a diversidade viral ou subtipo específico ainda não é considerado fator de associação à progressão para a Aids. Em 2005, um estudo realizado no Brasil e Rio Grande do Sul, constatou que 90 % dos pacientes infectados pelo HIV portavam vírus dos subtipos B ou C, e observou que, ao classificar os dados clínicos com base no Centro de Controle de Doenças (CDC), os subtipos pertenceram a grupos de estagiamento clínico diferentes, mas não foram estatisticamente significantes (Soares *et al.*, 2005). Os resultados encontrados neste trabalho também apontam para a mesma conclusão.

O cenário da epidemia HIV/AIDS no mundo tem o subtipo C como responsável por mais de 45% da infecção e o subtipo B mais de 10% (Buonaguro *et al.*, 2007). Nos últimos tempos o Brasil tem sofrido alterações no cenário da epidemia, Santos *et al.* (Santos *et al.*, 2006) observaram que a região sul, principalmente o estado do Rio Grande do Sul tem sido considerado sítio endêmico do subtipo-C, juntamente com algumas formas recombinantes do vírus HIV-1. Nas outras regiões do país encontra-se uma maior concentração de subtipos B e BF, seguido de outras formas recombinantes (Sanabani *et al.*, 2006; Stefani *et al.*, 2007). Acredita-se que apesar das diferenças iniciais nas taxas de crescimento de algumas variantes na epidemia do HIV-1, os subtipos C e CRF31\_BC na região sul do Brasil parecem seguir a mesma logística de crescimento do subtipo B e F1 na região sudeste (Bello *et al.*, 2009).

Não se sabe ainda se existe uma correlação entre a diversidade viral e as vias de transmissão, no entanto o aumento de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) em pacientes infectados com HIV tem sido explicado principalmente pelo comportamento de risco, destacando-se a prática do sexo desprotegido aumentando o risco de contrair outras infecções, como Sífilis, Gonorreia, Clamídia e outras DSTs, conseqüentemente podendo impactar na evolução clínica dos pacientes. Analisando outras características dos pacientes avaliados neste trabalho, encontramos que 23,8 % dos 63 pacientes infectados apresentavam co-infecção por Sífilis, sendo 80% destes pertencentes ao grupo infectado por subtipo Não-C.

e todos os 23,8% foram em homens pertencentes ao grupo de risco HSH, sendo a maioria deles residentes em São Paulo. Provavelmente esse perfil de resultados esteja relacionado com o perfil de comportamento de risco de cada região, considerando que na região Sul alguns estudos identificaram que na população infectada pelo HIV-1 existe um predomínio de comportamento heterossexual e aumento de infecção em mulheres (Soares *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Librelotto *et al.*, 2015).

Sabe-se que a distribuição do HIV é amplamente determinada pelo comportamento sexual, e que a taxa de co- infecção HIV/Sífilis varia de acordo com a comunidade analisada. A presença de co- infecção HIV/Sífilis tem sido descrita interferindo na resposta imune dos indivíduos levando a redução do número de células T CD4+ e ao aumento da carga viral (Kotsafti *et al.*, 2015). Essa influência, entretanto, parece ser eliminada logo após o tratamento da sífilis quando os níveis de células T CD4+ tendem a voltar ao quadro anterior à sífilis ou a se restaurar em presença adicional de tratamento com TARV (Kotsafti *et al.*, 2015). Outro estudo relatou que a co-infecção com vírus herpes simples 2, HIV/HSV2, em indivíduos naïve de tratamento apresentou uma maior quantidade de células T CD4+ e um efeito independente da carga viral sugerindo um possível efeito modulador benéfico nas células T CD4+ durante a fase inicial da infecção pelo HIV-1 (Barbour *et al.*, 2007). Vários outros modelos de infecção já foram investigados na co-infecção por HIV, porém a co-infecção HIV/GBVC tem sido bem explorada por estar associada com uma progressão mais lenta para AIDS, uma vez que indivíduos co-infectados apresentaram uma menor ativação celular comparado com os não infectados, particularmente, a frequência da co-infecção com o vírus GBV-C encontrada no presente estudo foi um pouco menor em relação à população de homossexuais nos Estados Unidos que apresentou entre 24 e 37 % (Lau *et al.*, 1999) e também em relação ao encontrado no estudo realizado na mesma coorte (UNESCO-São Paulo) utilizada neste trabalho (Giret *et al.*, 2011). A diferença encontrada provavelmente tenha sido influenciada pelo reduzido tamanho amostral.

Os fatores genéticos analisados neste estudo como a frequência do polimorfismo do CCR5Δ32 obteve resultados semelhantes àqueles encontrados na literatura em indivíduos saudáveis, porém com valores um pouco mais elevados em relação aos indivíduos infectados por HIV-1, embora nenhum resultado fora estatisticamente significativo. Considerando que as coortes comparadas são bastante heterogêneas, é possível que essa diferença seja pelo menos em parte, um reflexo do fato dessa mutação estar associada a grupos étnicos (Liu, R. *et al.*, 1996; Martinson *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 2001; Mikawa *et al.*, 2002; Sathar *et al.*, 2004; Supapol *et al.*, 2008; Giret *et al.*, 2011). Com relação às moléculas de HLA, estudos

observaram que indivíduos que possuem *locis* HLA B\*14, B\*27 e B\*57, possuem células T CD8+ restritas a essas moléculas de HLAs mais responsivas, gerando respostas mais imunodominantes que as células restritas a outras moléculas de HLA e capazes de induzir resposta à proteína *Gag* do HIV-1, auxiliando no controle imune da infecção (Goulder *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Gillespie *et al.*, 2002; Pereyra *et al.*, 2010). Em 2007 Fellay *et al.* e Frahm *et al.* afirmaram que a influência dessas moléculas de HLA na resposta imune antiviral tende a ser impactada pela possibilidade de epítopos virais se ligarem de forma promíscua a diferentes alelos de HLA de classe I e em 2009 Kawashima *et al.* confirmaram essa influência, ao correlacionar a frequência de mutações de escape do vírus na presença de alguns alelos relevantes de HLA, demonstrando uma forte evidência da adaptação do vírus HIV ao HLA populacional (Kawashima *et al.*, 2009). Embora nenhuma diferença quanto à frequência dos genótipos de HLA tenha sido encontrada nos pacientes do presente trabalho, não podemos descartar a possibilidade desses fatores influenciarem conjuntamente em algum momento o curso da infecção.

Quanto aos parâmetros clínicos, foi encontrada diferença estatisticamente entre os grupos de subtipos com relação à carga viral na fase estabelecida da infecção, em que o grupo de subtipos Não-C (ou seja, indivíduos infectados por subtipos B, BF, BF1, F1, CR40-like e CRF02 AG) apresentaram valores de carga viral maiores que o grupo de subtipo-C. Sabe-se que na fase aguda (2 a 4 semanas após infecção) acontece o pico de explosão de carga viral, fenômeno esse seguido por um declínio até atingir níveis estáveis de um pouco mais de 10-20.000 cópias /mL (Rich *et al.*, 1999; Goujard *et al.*, 2006).

A viremia apresentada em média geométrica pelos grupos de subtipos Não-C e C na fase recente e pelo grupo Não-C na fase estabelecida estão de acordo com esses valores. É provável que a diminuição da carga viral encontrada na fase estabelecida no grupo de subtipo-C esteja sendo influenciada pela presença de 40% de indivíduos do sexo feminino, visto que foi demonstrado por Sterling *et al.*, (2001) que indivíduos do sexo feminino apresentam menor viremia do que indivíduos do sexo masculino após soroconversão do HIV-1, embora nenhuma associação do gênero com a progressão para AIDS tenha sido observada (Sterling *et al.*, 2001). Nos nossos resultados encontramos que no grupo do subtipo-C as mulheres apresentaram menor ativação celular (baseado no perfil global de expressão combinada de CD38+ e HLA-DR+) do que os homens. Contudo a ativação celular observada após o primeiro ano no grupo do subtipo-C (resultados da Vn e da diferença ( $\Delta Vn-V1$ )) permaneceu maior e estatisticamente significativa quando comparada com a ativação celular apresentada

pelo grupo subtipo Não-C, tanto na análise univariada como na multivariada (onde se elimina a influência do gênero no desfecho, ativação celular, (dados não mostrados)).

Particularmente, no presente estudo, indivíduos infectados por subtipo Não-C, apesar de apresentar carga viral estável em ambas visitas (fase recente e estabelecida) no primeiro ano de infecção, esse grupo de pacientes apresentou uma diminuição significativa na contagem de células T CD4+. Tarosso *et al.*, (2014), identificou indivíduos infectados pelo subtipo BF apresentando redução mais rápida de células T CD4/ mm<sup>3</sup> em comparação com os pacientes infectados pelo subtipo B (Tarosso *et al.*, 2014). Touloumi *et al.*, (2013), ao analisar várias coortes européias observaram que o grupo de indivíduos infectados com o subtipo B do HIV-1 apresentou maior contagem de células T CD4+ na soroconversão quando comparado com o grupo infectado pelo subtipo C, porém ao acompanhar esses indivíduos, constatou que a perda de células T CD4+ no grupo de subtipo-C foi marginalmente menor quando comparado com o grupo do subtipo B, e que a carga viral foi menor no subtipo-C em relação ao grupo do subtipo-B (Touloumi *et al.*, 2013). Juntamente, esses achados sugerem que a introdução de diferentes subtipos virais dentro de uma população pode levar a diferentes resoluções da infecção.

Referente ao perfil de ativação celular encontrado (CD38+HLA-DR+), a análise de regressão revelou nitidamente uma associação do subtipo viral com a ativação celular apresentada pelo grupo subtipo-C comparado com o encontrado no grupo subtipo Não-C. As diferenças entre os subtipos se expressaram mais na fase estabelecida, sendo mais perceptíveis ao analisar as diferenças que aconteceram em cada grupo ao longo de um ano de infecção.

Com a análise de regressão linear, em um modelo ajustado multivariado, considerando a influência de algumas variáveis como carga viral do HIV-1, contagem de CD4/ mm<sup>3</sup> e infecção por GBV-C na fase recente, gênero (macho x fêmea), fator de risco sexual (HSH) e CCR5Δ32, ainda assim identificamos uma diferença significativa ainda maior na ativação celular na população de células T CD4+ induzida no grupo subtipo-C em relação ao Não-C. Ao contrário do aumento do perfil de ativação celular encontrado no grupo subtipo-C, identificamos uma diminuição na quantidade de células T CD4+ totais e ativadas e também na frequência e na quantidade de células T CD8+ CD38+HLA-DR+/ mm<sup>3</sup> no grupo subtipo Não-C ao longo de um ano de infecção. A frequência das células T CD4 e T CD8 ativadas encontrados neste trabalho correspondem em média os valores encontrados na literatura (Kestens *et al.*, 1994; Cossarizza *et al.*, 2012).

De acordo com alguns estudos, o nível de expressão de CD38 nas células T CD8+ se correlaciona melhor com a progressão da doença quando comparado com a contagem de

células T CD4+ e viremia plasmática (Bofill *et al.*, 1996; Mocroft *et al.*, 1997). Considerando que o ciclo replicativo do vírus HIV-1 está intimamente relacionado com o estado de ativação celular, já que o vírus, após adentrar a célula do hospedeiro, precisa da maquinaria da célula ativada para se replicar, porém nossos resultados encontraram uma relação inversa no grupo do subtipo Não-C e C, provavelmente outros fatores estejam envolvidos na indução da ativação celular independente de viremia.

De fato, Giorgi J.V., *et al.*, 1993, mostraram que o nível de ativação de células T CD4+ e CD8+ durante a fase aguda da infecção é capaz de influenciar os níveis de viremia do HIV-1 e que os níveis de células T CD8+ CD38+ pode prever a perda de células T CD4+ (Giorgi *et al.*, 1993). Além disso, acredita-se que parte dessas células sejam específicas a epítomos do HIV-1, e que essas células específicas possuem um papel importante na resposta imune contra o vírus. Com efeito, Wilson, J. *et al.*, 2000 observaram que, em indivíduos HIV positivos, a queda dos níveis de viremia ocorre logo após o pico de células T específicas ao HIV, sugerindo a relevância dessas células no controle da infecção (Wilson *et al.*, 2000). Em adição, Cossariza, *et al.*, 2012, demonstraram que indivíduos com menor frequência de células T CD4+ e CD8+ ativadas nos primeiros meses de infecção podiam permanecer mais tempo sem terapia antirretroviral (Cossarizza *et al.*, 2012). Com base na literatura a ativação celular específica ao vírus é essencial na resposta antiviral, porém uma ativação exacerbada se torna prejudicial ao paciente.

Explorando o fenótipo das células T CD4+ ativadas encontramos um aumento na frequência de células T CD4+ de memória efetora e efetora terminal em detrimento de uma diminuição na frequência de células T CD4+ de memória intermediária após o primeiro ano de infecção por subtipo-C. Enquanto que no grupo subtipo Não-C uma pequena e significativa diminuição foi encontrada na frequência de células T CD4+ de memória transitória e um aumento na frequência de células de memória intermediária. O potencial preditivo da frequência de células T CD8+ ativadas (CD38+) pode ser aumentado pela análise desse marcador nas subpopulações de memória (Bofill *et al.*, 1996). A análise das células T CD8+ identificou que o grupo subtipo-C apresentou um aumento na frequência de células T CD8+ de memória efetora, e também uma diminuição de células naïve e memória transitória. Enquanto que no grupo subtipo Não-C, obteve uma diminuição na frequência de células T CD8+ de memória central e transitória seguida de um aumento de células memória efetora e efetora terminal.

Com a análise da frequência das subpopulações percebe-se que o grupo subtipo-C apresenta um nível de maturação e expansão celular das células T CD4+ e T CD8+ mais

desenvolvido, desencadeado precocemente no primeiro ano da infecção, comparado com o grupo do subtipo Não-C. Essas alterações nas frequências podem estar relacionadas com o perfil distinto de ativação encontrado em cada subpopulação celular uma vez que a ativação celular é responsável pelo processo de maturação das células em efetoras no combate a infecção. Assim, é provável que o perfil de ativação elevado encontrado no grupo do subtipo-C esteja associado ao aumento da frequência de subpopulações de células T CD4+ ativadas com fenótipo naïve, memória central, memória efetora e efetora terminal, e à diminuição nas células T de memória intermediária. Considerando o grupo do subtipo Não-C, não houve diferença na ativação celular das subpopulações de células T CD4+ mesmo apresentando alterações na frequência dessas subpopulações. A diferença da ativação apresentada pelo subtipo-C foi constatada na frequência de células T CD4+ ativadas de memória central, memória efetora e efetora terminal, quando comparada com o Não-C.

Apesar de acreditarmos que uma maior e mais rápida indução da resposta imune não seja um bom cenário para os pacientes com doenças inflamatórias de caráter crônico como a infecção pelo HIV-1, os resultados observados no grupo do subtipo-C podem receber outra interpretação. Podemos considerar que a ativação celular encontrada e o perfil de expansão e ativação das células T CD4+ e T CD8+ de memória efetora podem estar envolvidas na geração de uma resposta imune eficiente e, por isso, uma consequente redução na carga viral. Particularmente, as alterações nas frequências das células T de memória podem ser devido a uma redistribuição de células T CD4+ de memória que podem estar retidas nos tecidos críticos onde a replicação acontece (Kestens *et al.*, 1994). Esses dados de viremia encontrados apontam também para propriedades específicas do vírus subtipo-C, como a capacidade de *fitness* viral, ou infectividade do vírus, que por sua vez se sabe que é menor que a do grupo subtipo Não-C. Como não investigamos a especificidade da expansão e ativação celular encontrada não podemos inferir que a ativação encontrada no subtipo-C é benéfica ou não para o indivíduo.

Segundo a literatura, a persistência de antígenos do HIV-1 mantém a expansão de células T em níveis altos, mas na ausência de antígenos essas células tendem a sofrer apoptose. Pode ser esse fenômeno que esteja acontecendo com as células do grupo subtipo Não-C. Alguns estudos relataram que o número aumentado de células T CD8+ observados na infecção aguda do HIV-1 implica em uma expansão inicial massiva de células T CD8 vírus-específicas, embora já tenha sido observado que em modelos animais a frequência dessas células declina rapidamente quando o vírus é eliminado (Butz e Bevan, 1998; Kuroda *et al.*, 1999). Relatos anteriores apresentaram resultados semelhantes, ausência de correlação da

carga viral, com declínio da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a ativação generalizada e expansão de células T CD8<sup>+</sup> relacionada com o declínio da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, esta ativação tem sido associada a maior declínio de células T CD4<sup>+</sup> e progressão clínica independente dos níveis plasmáticos de carga viral do HIV (Giorgi *et al.*, 1993; Mellors *et al.*, 1997; Leng *et al.*, 2001).

A frequência de células T CD8<sup>+</sup> ativadas na ausência de TARV excede em muito a frequência de células T específicas ao HIV-1 sendo que a ativação e expansão de células T não específicas tem sido documentada claramente durante a infecção aguda pelo HIV-1. Apesar desta resposta celular, a maioria dos doentes infectados com HIV-1 apresenta progressão clínica na ausência de terapia antirretroviral, conseqüente da inflamação sistêmica. No entanto, indivíduos infectados pelo HIV-1 por longo tempo, que permaneceram assintomáticos por mais de 10 anos (conhecidos como LTNP-*long term non progressors*) sugerem que a qualidade da resposta imune celular é um dos principais fatores relacionados ao controle espontâneo da replicação viral, embora outras características da resposta imune celular como a capacidade de expansão de células T específicas do vírus, também poderia estar relacionado com o controle da replicação viral (Migueles *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2006; López *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, uma inflamação persistente e sistêmica na infecção pelo HIV-1 tem sido associada também à depleção de células T CD4<sup>+</sup> de memória no trato gastrointestinal e conseqüente liberação de produtos bacterianos na circulação, causando translocação microbiana, desencadeando numa progressão da infecção pelo HIV. Estudos tem identificado que a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> é impulsionada por uma combinação da resposta homeostática e da estimulação antigenica, em contraste, a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> é impulsionada principalmente pela presença do vírus (Catalfamo *et al.*, 2008). A diminuição das células T CD4<sup>+</sup> no grupo do subtipo Não-C deste estudo pode ser resultado da presença de co-infecções ou da persistência de carga viral. Sabe-se que a resposta de células T CD4<sup>+</sup> específicas ao vírus encontra-se enfraquecida no curso inicial da infecção. Assim, uma resposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> específicas ao HIV-1 fraca ou ausente pode ser um ponto chave de uma infecção progressiva do HIV-1 (Wahren, Morfeldt-Månsson, *et al.*, 1987).

De fato, um estudo em pacientes não-respondedores imunológicos (CD4<sup>+</sup> menor de 300 células/mm<sup>3</sup> e mais de 1 ano fazedo uso de TARV), demonstrou que a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> pode ser direcionada tanto por pressão homeostática como virológica, enquanto que nas células T CD8<sup>+</sup> a proliferação é direcionada primeiramente pela carga viral.

Constatou também que a carga viral estava fracamente associada com células T CD4+ de memória central, não relacionada com a proliferação de células T CD8+ de memória central, porém fortemente associada com a proliferação de células T CD4+ e CD8+ de memória efetora (Srinivasula *et al.*, 2011).

Ainda com relação à perda de células T CD4+ na infecção pelo HIV-1, outros mecanismos que poderiam ser responsáveis por esse fenômeno na ausência de alterações na carga viral têm sido investigados. Uma hipótese consistente argumenta que tanto células T CD4+ infectadas pelo HIV-1 como aquelas não-infectadas podem ter seu mecanismo de autofagia (autodigestão) acionado a partir da interação da molécula CXCR4 com a proteína gp 120 expressa em algumas células efectoras, essa interação pode desencadear a formação de sincício (células gigantes multinucleadas), demonstrando assim que a autofagia também pode preceder a apoptose em algumas ocasiões. Outros estudos também demonstraram que a indução da via apoptótica mediada pela proteína *Env* pode ser acionada pelo mesmo mecanismo (Perfettini *et al.*, 2005; Espert *et al.*, 2006). Porém sabe-se que o vírus do subtipo-C não consegue alterar seu tropismo da molécula CCR5 para CXCR4 na fase avançada da infecção, e é nessa fase onde se observa vírus com tropismo para CXCR4 (Cecilia *et al.*, 2000).

Investigações direcionadas às propriedades do vírus do subtipo C identificaram que isolados desse subtipo podem se replicar com menor eficiência que os isolados do subtipo B, sugerindo que o *fitness* do HIV-1 pode estar fortemente associado com a progressão rápida da doença (Blaak *et al.*, 1998; Quinones-Mateu *et al.*, 2000). Segundo Ball *et al.*, essa diferença de *fitness* viral entre os subtipos do HIV-1 pode estar relacionada com a eficiência na entrada da célula do hospedeiro, processo este que envolve a participação das moléculas CD4+ e CCR5 (Ball *et al.*, 2003).

Velasquez-Campoy *et al.* sugeriram que o subtipo viral C pode ser mais estável e que os genes que codificam a protease podem ter uma atividade catalítica aumentada em relação aos outros subtipos (Velazquez-Campoy *et al.*, 2001), favorecendo o seu ingresso dentro das células. Outra característica verificada no subtipo-C é a presença de um sítio extra na região gênica do LTR (*Long Terminal Repeat*) viral de ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B o que pode levar a um aumento na expressão gênica viral e alteração da transmissibilidade e patogênese do vírus do subtipo-C (Tatt *et al.*, 2001). Estas informações sugerem que a ativação das células T CD4+ observada na infecção HIV-1 pode ser fortemente influenciada por genes virais que diferem entre *clades* virais. Diferenças genéticas nos genes LTR, *nef*, *tat* e *vpu* tem sido identificados no subtipo-C e pode influenciar na virulência (Bachu *et al.*, 2012).

O HIV-1 tem desenvolvido muitas vias para diminuir a resposta antiviral de células T CD4+ incluindo deleção por apoptose (Chaves e Kallas, 2004), infecção de células T auxiliares específicas, apresentação ineficiente de antígenos virais por moléculas de MHC II (Polyak *et al.*, 1997), inibição da transcrição de moléculas de MHC de classe II (Kanazawa *et al.*, 2000) e uma capacidade reduzida em ativar as células T em um modo restrito a HLA-DR específico a peptídeos observadas em células expressando proteína *nef* (Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001). Se genes específicos podem ser identificados se estão associados com diferenças na imunopatogênese, isso poderia sugerir estratégias em reduzir a destruição imune associada a infecção.

Em relação aos achados de células T reguladoras (Tregs), foi identificada neste estudo uma diminuição na frequência dessas células no grupo do subtipo C. Já está bem estabelecido na literatura que as células Tregs CD4+ possuem a capacidade de regular negativamente as respostas de células T auto-reativas (Kuniyasu *et al.*, 2000). Estudo com modelo animal observou que após a remoção das células Tregs há uma exacerbação da ativação celular e desenvolvimento de autoimunidade (Asano *et al.*, 1996). A grande maioria dos trabalhos compararam os níveis de células Tregs encontrados nos indivíduos infectados por HIV com controles saudáveis. Aandahl *et al.*, 2004, realizaram ensaio *in vitro* retirando células T CD4+ CD25+ do total de CMSP e observaram que a ausência dessas células T regs resultaram em um aumento na resposta de células T CD4 contra o vírus HIV-1 (Aandahl *et al.*, 2004). As células T reguladoras por expressar a molécula CD4, podem ser infectadas pelo vírus e ter sua população depletada ao longo do tempo na infecção progressiva pelo HIV-1, correlacionando também com a ativação imune (Jiao *et al.*, 2009).

Na infecção crônica pelo HIV-1, Eggena *et al.* (2005) apesar de caracterizar células Tregs de forma diferente do que utilizamos neste trabalho, encontraram resultados semelhantes aos nossos e consideraram que uma hiperativação celular esteja associada com uma depleção das células T regs (Eggena *et al.*, 2005). Outros trabalhos identificaram um aumento na frequência de células Tregs nos indivíduos infectados por HIV na fase crônica e na ausência de tratamento comparado com controles saudáveis, eles não encontraram relação da frequência de Tregs com viremia do HIV-1, porém ao analisar a função dessas células percebeu-se diminuída nos indivíduos infectados (Tsunemi *et al.*, 2005). Thorborn *et al.*, (2010), porém, observaram um aumento da atividade supressora das células Tregs na infecção crônica (Thorborn *et al.*, 2010). Neste trabalho analisamos a atividade supressora das células T regs através da frequência de células Tregs expressando a molécula CD39+, os resultados mostraram ausência de diferença entre os grupos de subtipos Não-C e C, porém não

analisamos a densidade da expressão (através da média de intensidade de fluorescência, quanto maior a intensidade mais proteínas tem na superfície e mais anticorpos se ligaram a essa proteína) dessas moléculas nas células Tregs, pois segundo Schulze *et al.* (Schulze Zur Wiesch *et al.*, 2011) o nível de expressão de CD39+ correlacionou positivamente com a viremia do HIV-1 e ativação celular. Vários outros mecanismos que não foram explorados neste trabalho podem ainda estar envolvidos na resposta imune gerada por cada grupo de subtipos virais do HIV-1.

Com base nos achados deste trabalho, acreditamos que o perfil de ativação celular encontrado nos pacientes infectados pelo subtipo-C do HIV-1, esteja associado a uma progressão mais rápida para AIDS. Isto com base em parâmetros inflamatórios, como as alterações encontradas na dinâmica de diferenciação de células efectoras, no aumento da frequência de células T ativadas e na diminuição de células T regs,

comparando com os achados encontrados nos pacientes infectados por subtipos Não-C. Futuras pesquisas são necessárias para confirmar se a infecção por subtipo-C no Brasil está associada com mais gravidade e progressão mais rápida. Esse estudo possuiu algumas limitações como pequeno número amostral, curto tempo de seguimento (devido ao início da terapia antiretroviral), que nos impediu de tirar conclusões firmes sobre a progressão da doença. No entanto, estas são combatidas por fortes pontos-chave, como a única população de estudo em que as infecções dos subtipos B e C realmente co-circulam, a capacidade de estudar os indivíduos a partir da infecção precoce, a coorte longitudinal prospectiva e o rigoroso desenho experimental enriqueceram os achados e garantem a contribuição do estudo ao seguimento clínico de todos os indivíduos. Compreender o papel do subtipo viral na patogênese e transmissão do HIV-1 é fundamental para a compreensão da pandemia atual.

## ***Conclusão***

---

## 8. CONCLUSÃO

A conclusão desse estudo foi centrada na comparação do grupo de indivíduos infectados por subtipo C ou contendo partes do subtipo C comparado com o grupo de indivíduos infectados por subtipos Não-C após um ano de infecção pelo HIV-1.

- O grupo de indivíduos infectados por subtipo C apresentou maior frequência e quantidade de células T CD4+ ativadas (CD38+HLA-DR+) (cels/ mm<sup>3</sup>) de sangue comparado aos indivíduos infectados por subtipos Não-C que apresentaram uma diminuição na quantidade de células T CD4+ ativadas (cels/ mm<sup>3</sup>) de sangue;
- O grupo de indivíduos infectados por subtipo C apresentou maior expansão de células T CD4+ de memória efetora e efetora terminal e maior frequência de células T CD8+ de memória efetora comparada aos indivíduos infectados por subtipos Não-C;
- O grupo de indivíduos infectados por subtipo-C apresentou maior frequência de células T CD4+ com fenótipo de memória efetora e efetora terminal ativadas (CD38+ HLA-DR+), e maior frequência de células T CD8+ de memória efetora ativadas comparando com os indivíduos infectados por subtipos Não-C;
- O grupo de indivíduos infectados por subtipo-C apresentou menor frequência de células T CD4+ Tregs comparado aos indivíduos infectados por subtipos Não-C.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\_\_\_\_UNAIDS. Joint United Nations programme on HIV/AIDS. 2014

\_\_\_\_PN-DST/AIDS. Boletim epidemiológico- Aids e DST.2009

\_\_\_\_Janeway et al, Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença. Editora ARTMED, 5ª ed. 2002.

AANDAHL, E. M. et al. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2454-9, Mar 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963140> >.

ADDO, M. M. et al. Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 2, n. 3, p. e321, 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17389912](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17389912) >.

ALAEUS, A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. **Scand J Infect Dis**, v. 32, n. 5, p. 455-63, 2000. ISSN 0036-5548 (Print) 0036-5548 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11055646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11055646) >.

AMEISEN, J. C.; CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. **Immunol Today**, v. 12, n. 4, p. 102-5, Apr 1991. ISSN 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1676268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1676268) >.

ANTONI, B. A. et al. NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 684-94, Aug 1994. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913275> >.

ASANO, M. et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 387-96, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760792> >.

BACHU, M. et al. Multiple NF-κB sites in HIV-1 subtype C long terminal repeat confer superior magnitude of transcription and thereby the enhanced viral predominance. **J Biol Chem**, v. 287, n. 53, p. 44714-35, Dec 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132857> >.

BALL, S. C. et al. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. **J Virol**, v. 77, n. 2, p. 1021-38, Jan 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12502818](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12502818) >.

BARBOUR, J. D. et al. HIV-1/HSV-2 co-infected adults in early HIV-1 infection have elevated CD4+ T cell counts. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e1080, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957262> >.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 353-60, Apr 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785761> >.

BELLO, G. et al. Short communication: Evidences of recent decline in the expansion rate of the HIV type 1 subtype C and CRF31\_BC epidemics in southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 11, p. 1065-9, Nov 2009. ISSN 1931-8405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895209> >.

BLAAK, H. et al. In vitro replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in relation to virus load in long-term survivors of HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 177, n. 3, p. 600-10, Mar 1998. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9498438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9498438) >.

BOFILL, M. et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 10, n. 8, p. 827-34, Jul 1996. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828739> >.

BORROW, P. et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 68, n. 9, p. 6103-10, Sep 1994. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8057491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8057491) >.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225-32, Aug 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449799> >.

BRÍGIDO, L. F. et al. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, n. 3, p. 339-44, Mar 2011. ISSN 1931-8405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950149> >.

\_\_\_\_\_. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1579-86, Dec 2007. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160017> >.

BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. **J Virol**, v. 81, n. 19, p. 10209-19, Oct 2007. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17634242](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17634242) >.

BURGER, S.; POLES, M. A. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 2, p. 115-24, May 2003. ISSN 0272-8087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12800065> >.

BURGERS, W. A. et al. Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point. **J Immunol**, v. 182, n. 8, p. 4751-61, Apr 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19342652](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19342652) >.

BUTZ, E. A.; BEVAN, M. J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. **Immunity**, v. 8, n. 2, p. 167-75, Feb 1998. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491998> >.

CASSOL, E. et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. **J Infect Dis**, v. 202, n. 5, p. 723-33, Sep 1 ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20629534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20629534) >.

CATALFAMO, M. et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19851-6, Dec 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060209> >.

CECILIA, D. et al. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. **Virology**, v. 271, n. 2, p. 253-8, Jun 2000. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860879> >.

CHAVES, M. M.; KALLAS, E. G. Cell cycle distribution of CD4+ lymphocytes in HIV-1-infected subjects. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 62, n. 1, p. 46-51, Nov 2004. ISSN 1552-4949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476192> >.

COSSARIZZA, A. et al. T cell activation but not polyfunctionality after primary HIV infection predicts control of viral load and length of the time without therapy. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50728, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236388> >.

D'SOUZA, M. et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1979-87, Aug 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17641065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17641065) >.

DEMARCHI, F. et al. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 70, n. 7, p. 4427-37, Jul 1996. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676466> >.

DEN UYL, D.; VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E.; VAN AGTMAEL, M. Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27? **AIDS Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-96, 2004 Apr-Jun 2004. ISSN 1139-6121. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15332431> >.

DOUEK, D. C. et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 95-8, May 2 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11986671](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11986671) >.

EGGENA, M. P. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4407-14, Apr 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778406> >.

ESPERT, L. et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2161-72, Aug 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886061> >.

GANESAN, A. et al. Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. **J Infect Dis**, v. 201, n. 2, p. 272-84, Jan 2010. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001854> >.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-41, Feb 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989410> >.

GILLESPIE, G. M. et al. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B\*57. **AIDS**, v. 16, n. 7, p. 961-72, May 2002. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953462> >.

GIORGI, J. V. et al. CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. **J Infect Dis**, v. 170, n. 4, p. 775-81, Oct 1994. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7930717> >.

\_\_\_\_\_. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 6, n. 8, p. 904-12, Aug 1993. ISSN 0894-9255 (Print) 0894-9255 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7686224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7686224) >.

\_\_\_\_\_. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 4, p. 346-55, Apr 2002. ISSN 1525-4135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917238> >.

GIRET, M. T. et al. Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18407, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483671> >.

GOUJARD, C. et al. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 5, p. 709-15, Mar 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447119> >.

GOULDER, P. J. et al. Identification of a novel HLA-B\*2705-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope within a conserved region of HIV-1 Nef. **AIDS**, v. 11, n. 4, p. 536-8, Mar 1997. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084804> >.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-14, Jan 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649986> >.

HAYAMI, M.; IDO, E.; MIURA, T. Survey of simian immunodeficiency virus among nonhuman primate populations. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 188, p. 1-20, 1994. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924421> >.

HEMELAAR, J. et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS**, v. 25, n. 5, p. 679-89, Mar 13 ISSN 1473-5571 (Electronic) 0269-9370 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21297424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21297424) >.

\_\_\_\_\_. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. W13-23, Oct 24 2006. ISSN 0269-9370 (Print) 0269-9370 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17053344](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17053344) >.

HORTON, H. et al. Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7406-15, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082660> >.

HUANG, Y. et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1240-3, Nov 1996. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898752> >.

HUET, T. et al. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 356-9, May 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188136> >.

JIAO, Y. et al. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e366-75, Sep 2009. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016904> >.

JIN, X. et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J Exp Med**, v. 189, n. 6, p. 991-8, Mar 15 1999. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10075982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10075982) >.

JONES, R. B. et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. **J Exp Med**, v. 205, n. 12, p. 2763-79, Nov 24 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19001139](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19001139) >.

KALEEBU, P. et al. Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease progression in a rural Ugandan cohort. **AIDS**, v. 15, n. 3, p. 293-9, Feb 2001. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273208> >.

KANAZAWA, S.; OKAMOTO, T.; PETERLIN, B. M. Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. **Immunity**, v. 12, n. 1, p. 61-70, Jan 2000. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661406> >.

KAPLAN, D.; SIEG, S. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. **J Virol**, v. 72, n. 8, p. 6279-82, Aug 1998. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9658065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9658065) >.

KAWASHIMA, Y. et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 641-5, Apr 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242411> >.

KESTENS, L. et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. **Clin Exp Immunol**, v. 95, n. 3, p. 436-41, Mar 1994. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907956> >.

KLATT, N. R.; FUNDERBURG, N. T.; BRENCHLEY, J. M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 6-13, Jan 2013. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23062765> >.

KLEIN, M. R. et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. **J Gen Virol**, v. 79 ( Pt 9), p. 2191-201, Sep 1998. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747728> >.

KOBLAVI-DÈME, S. et al. Differences in HIV-2 plasma viral load and immune activation in HIV-1 and HIV-2 dually infected persons and those infected with HIV-2 only in Abidjan, Côte D'Ivoire. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 413-9, Feb 2004. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090792> >.

KOTSAFTI, O. et al. Early syphilis affects markers of HIV infection. **Int J STD AIDS**, Jun 2015. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113517> >.

KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **J Virol**, v. 68, n. 7, p. 4650-5, Jul 1994. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8207839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8207839)>.

KROWKA, J. F. et al. Lymphocyte proliferative responses to human immunodeficiency virus antigens in vitro. **J Clin Invest**, v. 83, n. 4, p. 1198-203, Apr 1989. ISSN 0021-9738 (Print)  
0021-9738 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2703528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2703528)>.

KUNIYASU, Y. et al. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. **Int Immunol**, v. 12, n. 8, p. 1145-55, Aug 2000. ISSN 0953-8178. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10917889>>.

KURODA, M. J. et al. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5127-33, May 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227983>>.

KWOK, S. et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. **J Virol**, v. 61, n. 5, p. 1690-4, May 1987. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2437321](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2437321)>.

LAU, D. T. et al. Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus coinfection: response to interferon-alpha therapy. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1334-7, Oct 1999. ISSN 0022-1899. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479167>>.

LENG, Q. et al. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 27, n. 4, p. 389-97, Aug 2001. ISSN 1525-4135. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468428>>.

LESZCZYSZYN-PYNKA, M. et al. Protective Effect of HLA-B\*5701 and HLA-C -35 Genetic Variants in HIV-Positive Caucasians from Northern Poland. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127867, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068923>>.

LETVIN, N. L. et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1530-3, Jun 9 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16763152](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763152)>.

LIBRELOTTO, C. S. et al. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 249-257, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1678-9849. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108001>>.

LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-77, Aug 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756719>>.

LIU, Z. et al. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. **Cytometry**, v. 26, n. 1, p. 1-7, Mar 15 1996. ISSN 0196-4763 (Print) 0196-4763 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8809474](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8809474) >.

LOUSSERT-AJAKA, I. et al. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. **J Virol**, v. 69, n. 9, p. 5640-9, Sep 1995. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637010> >.

LÓPEZ, M. et al. Suppression of viral replication with highly active antiretroviral therapy has no impact on the functional profile of HIV-specific CD8(+) T cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 6, p. 1548-58, Jun 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421792> >.

MACHUCA, A. et al. HIV type 2 primary isolates induce a lower degree of apoptosis "in vitro" compared with HIV type 1 primary isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 5, p. 507-12, May 2004. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186525> >.

MAHNKE, Y. D. et al. Early immunologic and virologic predictors of clinical HIV-1 disease progression. **AIDS**, v. 27, n. 5, p. 697-706, Mar 2013. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211771> >.

MAIDANA-GIRET, M. T. et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. **AIDS**, v. 23, n. 17, p. 2277-87, Nov 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773635> >.

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, v. 265, n. 5178, p. 1587-90, Sep 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915856> >.

MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 100-3, May 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140404> >.

MATTAPALLIL, J. J. et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1093-7, Apr 28 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15793563](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15793563) >.

MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 761-70, Sep 20 2004. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15365095](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15365095) >.

MELLORS, J. W. et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. **Ann Intern Med**, v. 126, n. 12, p. 946-54, Jun 1997. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182471> >.

MEYERHANS, A. et al. In vivo persistence of a HIV-1-encoded HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope despite specific in vitro reactivity. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 10, p. 2637-40, Oct 1991. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717289> >.

MIGUELES, S. A. et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 1061-8, Nov 2002. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368910> >.

MIKAWA, A. Y.; TAGLIAVINI, S. A.; COSTA, P. I. CCR5 genotype and plasma beta-chemokine concentration of Brazilian HIV-infected individuals. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1333-7, Nov 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426633> >.

MOCROFT, A. et al. CD8+,CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 14, n. 2, p. 158-62, Feb 1997. ISSN 1077-9450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052725> >.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 143-50, Mar 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12016434> >.

MUÑOZ-NIETO, M. et al. HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual infection with subtypes B and G. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, n. 2, p. 337-43, Feb 2008. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284328> >.

NORTHFIELD, J. W. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the subsequent viral load set point. **J Virol**, v. 81, n. 11, p. 5759-65, Jun 2007. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17376902](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17376902) >.

NOWROOZALIZADEH, S. et al. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections. **J Infect Dis**, v. 201, n. 8, p. 1150-4, Apr 15 ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20199244](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20199244) >.

OSMANOV, S. et al. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 2, p. 184-90, Feb 1 2002. ISSN 1525-4135 (Print) 1525-4135 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11832690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11832690) >.

OU, C. Y. et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. **Science**, v. 239, n. 4837, p. 295-7, Jan 15 1988. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3336784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3336784)>.

PEREYRA, F. et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. **Science**, v. 330, n. 6010, p. 1551-7, Dec 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051598>>.

PERFETTINI, J. L. et al. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 1, p. 916-23, Aug 2005. ISSN 1350-9047. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719026>>.

PICKER, L. J.; WATKINS, D. I. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. **Nat Immunol**, v. 6, n. 5, p. 430-2, May 2005. ISSN 1529-2908 (Print)  
(Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15843796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15843796)>.

PLANTIER, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 871-2, Aug 2009. ISSN 1546-170X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648927>>.

POLYAK, S. et al. Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection. **J Immunol**, v. 159, n. 5, p. 2177-88, Sep 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278305>>.

PULTE, E. D. et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. **Thromb Res**, v. 121, n. 3, p. 309-17, 2007. ISSN 0049-3848. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555802>>.

QUINONES-MATEU, M. E. et al. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. **J Virol**, v. 74, n. 19, p. 9222-33, Oct 2000. ISSN 0022-538X (Print)  
0022-538X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10982369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10982369)>.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 6, p. 1253-65, Jun 2002. ISSN 0022-1317 (Print)  
0022-1317 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12029140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12029140)>.

RICH, J. D. et al. Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series. **Ann Intern Med**, v. 130, n. 1, p. 37-9, Jan 1999. ISSN 0003-4819. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890848>>.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr 7 2000. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10766634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766634)>.

SABINO, E. C. et al. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. **AIDS**, v. 10, n. 13, p. 1579-84, Nov 1996. ISSN 0269-9370. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931795>>.

SANABANI, S. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 368-77, Sep 2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522378>>.

SANABANI, S. S. et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25869, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022460>>.

SANTOS, A. F. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. 2011-9, Oct 2006. ISSN 0269-9370. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053347>>.

SATHAR, M. A. et al. GB virus type C coinfection in HIV-infected African mothers and their infants, KwaZulu Natal, South Africa. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 3, p. 405-9, Feb 2004. ISSN 1537-6591. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14727212>>.

SCHULZE ZUR WIESCH, J. et al. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1287-97, Feb 2011. ISSN 1098-5514. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047964>>.

SOARES, E. A. et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**, v. 19 Suppl 4, p. S81-6, Oct 2005. ISSN 0269-9370 (Print)  
0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16249660](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16249660)>.

\_\_\_\_\_. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 520-6, Dec 15 2003. ISSN 1525-4135 (Print)  
1525-4135 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14657764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14657764)>.

SOARES, M. A. et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **AIDS**, v. 17, n. 1, p. 11-21, Jan 3 2003. ISSN 0269-9370 (Print)  
0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12478065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12478065)>.

SRINIVASULA, S. et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 262-70, Jul 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562041> >.

STEFANI, M. M. et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 39, n. 3, p. 205-9, Jul 2007. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537671> >.

STERLING, T. R. et al. Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and men. **N Engl J Med**, v. 344, n. 10, p. 720-5, Mar 8 2001. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11236775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11236775) >.

STREECK, H. et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. **J Virol**, v. 83, n. 15, p. 7641-8, Aug 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19458000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19458000) >.

STUMPTNER-CUVELETTE, P. et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12144-9, Oct 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593029> >.

SUPAPOL, W. B. et al. Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but not maternal GB virus C infection. **J Infect Dis**, v. 197, n. 10, p. 1369-77, May 2008. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419578> >.

TAROSSO, L. F. et al. Short communication: HIV type 1 subtype BF leads to faster CD4+ T cell loss compared to subtype B. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 2, p. 190-4, Feb 2014. ISSN 1931-8405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906381> >.

TATT, I. D. et al. The public health significance of HIV-1 subtypes. **AIDS**, v. 15 Suppl 5, p. S59-71, 2001. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816176> >.

THORBORN, G. et al. Increased sensitivity of CD4+ T-effector cells to CD4+CD25+ Treg suppression compensates for reduced Treg number in asymptomatic HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9254, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174666> >.

TILLMANN, H. L. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. **N Engl J Med**, v. 345, n. 10, p. 715-24, Sep 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547740> >.

TOULOUMI, G. et al. Impact of HIV-1 subtype on CD4 count at HIV seroconversion, rate of decline, and viral load set point in European seroconverter cohorts. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 6, p. 888-97, Mar 2013. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223594> >.

TSUNEMI, S. et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. **AIDS**, v. 19, n. 9, p. 879-86, Jun 2005. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905668> >.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32, Jan 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878383> >.

VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1403-7, Feb 2011. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084486> >.

VELAZQUEZ-CAMPOY, A. et al. Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from African viral subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6062-7, May 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11353856> >.

VERGNE, L. et al. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 3919-25, Nov 2000. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11060045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11060045) >.

VLAHOV, D. et al. Prognostic indicators for AIDS and infectious disease death in HIV-infected injection drug users: plasma viral load and CD4+ cell count. **JAMA**, v. 279, n. 1, p. 35-40, Jan 7 1998. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9424041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9424041) >.

WAHREN, B. et al. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 61, n. 6, p. 2017-23, Jun 1987. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3033328](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3033328) >.

\_\_\_\_\_. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 61, n. 6, p. 2017-23, Jun 1987. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3033328> >.

WEISS, L. et al. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3249-56, Nov 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271794> >.

WILKINSON, E. et al. Origin, imports and exports of HIV-1 subtype C in South Africa: A historical perspective. **Infect Genet Evol**, Jul 2016. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27421210> >.

WILSON, J. D. et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. **AIDS**, v. 14, n. 3, p. 225-33, Feb 2000. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716497> >.

XIANG, J. et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. **N Engl J Med**, v. 345, n. 10, p. 707-14, Sep 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547739>>.

YAMAGUCHI, T.; WING, J. B.; SAKAGUCHI, S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. **Semin Immunol**, v. 23, n. 6, p. 424-30, Dec 2011. ISSN 1096-3618. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055883>>.

YU, X. F. et al. Two subtypes of HIV-1 among injection-drug users in southern China. **Lancet**, v. 351, n. 9111, p. 1250, Apr 25 1998. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9643749](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9643749)>.

## *Anexos*

---

## 10. Anexos

**10. Anexo A-** Informações detalhadas das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais da expressão total e combinada de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ totais que apresentaram diferença estatística significativa. A análise comparativa entre os grupos Subtipo –Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>Expressão total e combinada de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ total</b>							
CD4_38p%	Linear	V1	-9,100	-17,931	-0,269	<b>0,04362</b>	-0,544
CD4_38pDRn%	Linear	V1	-7,707	-15,168	-0,246	<b>0,04312</b>	-0,545
CD4_38pDRn%	Linear	Vn-V1	12,633	7,160	18,106	<b>0,00002</b>	0,893
CD4_38pDRp%	Log	Vn	0,422	0,264	0,674	<b>0,00050</b>	-1,054
CD4_38pDRp%	Log	Vn-V1	0,443	0,313	0,628	<b>0,00002</b>	-0,993
CD4_DRp%	Log	Vn	0,468	0,317	0,691	<b>0,00024</b>	-1,143
CD4_DRp%	Log	Vn-V1	0,437	0,320	0,598	<b>0,00000</b>	-1,246
CD4_38nDRp%	Log	Vn	0,545	0,382	0,776	<b>0,00107</b>	-1,044
CD4_38nDRp%	Log	Vn-V1	0,452	0,333	0,612	<b>0,00000</b>	-1,366

**10.Anexo B-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>Diferenciação ontogênica de células T CD4+</b>							
CD4_NV%	Linear	Vn-V1	3,429	0,868	5,990	<b>0,00951</b>	0,601
CD4_EM%	Log	V1	1,540	1,155	2,052	<b>0,00386</b>	0,765
CD4_EM%	Log	Vn	0,672	0,488	0,926	<b>0,01580</b>	-0,704
CD4_EM%	Log	Vn-V1	0,437	0,315	0,604	<b>0,00000</b>	-1,469
CD4_ET%	Log	Vn	0,599	0,360	0,998	<b>0,04911</b>	-0,505
CD4_ET%	Log	Vn-V1	0,398	0,245	0,646	<b>0,00033</b>	-0,907
CD4_INT%	Linear	V1	-7,533	-13,417	-1,648	<b>0,01297</b>	-0,664
CD4_INT%	Linear	Vn	6,355	0,125	12,586	<b>0,04572</b>	0,560
CD4_INT%	Linear	Vn-V1	13,888	8,047	19,729	<b>0,00001</b>	1,224
<b>VALORES ABSOLUTOS (Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
<b>Diferenciação ontogênica de células T CD4+</b>							
CD4_NV_c	Linear	Vn-V1	18,523	1,129	35,917	<b>0,03728</b>	0,510
CD4_EM_c	Log	V1	1,904	1,412	2,567	<b>0,00006</b>	1,030
CD4_EM_c	Log	Vn-V1	0,389	0,266	0,571	<b>0,00001</b>	-1,509
CD4_ET_c	Log	V1	1,860	1,040	3,329	<b>0,03692</b>	0,562
CD4_ET_c	Log	Vn-V1	0,349	0,199	0,610	<b>0,00038</b>	-0,954
CD4_TM_c	Log	V1	1,551	1,104	2,179	<b>0,01233</b>	0,668
CD4_INT_c	Log	Vn	1,816	1,103	2,989	<b>0,01977</b>	0,805
CD4_INT_c	Log	Vn-V1	1,890	1,145	3,121	<b>0,01373</b>	0,859

**10.Anexo C-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal expressando as moléculas CD38+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>Expressão total de CD38+ nas subpopulações de células T CD4+</b>							
<b>CD38+</b>							
CD4_NV38p%	Linear	Vn-V1	2,010	0,636	3,384	<b>0,00482</b>	0,539
CD4_EM38p%	Log	Vn	0,522	0,296	0,919	<b>0,02506</b>	-0,666
CD4_EM38p%	Log	Vn-V1	0,446	0,300	0,663	<b>0,00013</b>	-0,826
CD4_ET38p%	Log	Vn	0,386	0,175	0,853	<b>0,01936</b>	-0,674
CD4_ET38p%	Log	Vn-V1	0,344	0,192	0,618	<b>0,00055</b>	-0,756
CD4_INT38p%	Linear	V1	-4,677	-9,307	-0,047	<b>0,04780</b>	-0,534
CD4_INT38p%	Linear	Vn-V1	9,106	4,721	13,490	<b>0,00010</b>	1,039
<b>VALORES ABSOLUTOS (Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
<b>CD38+</b>							
CD4_NV38p_c	Linear	Vn-V1	9,979	1,047	18,910	<b>0,02916</b>	0,443
CD4_EM38p_c	Log	Vn	0,574	0,345	0,957	<b>0,03393</b>	-0,596
CD4_EM38p_c	Log	Vn-V1	0,394	0,257	0,605	<b>0,00005</b>	-1,001
CD4_ET38p_c	Log	Vn	0,419	0,196	0,893	<b>0,02493</b>	-0,632
CD4_ET38p_c	Log	Vn-V1	0,297	0,159	0,555	<b>0,00026</b>	-0,881
CD4_INT38p_c	Log	Vn	1,756	1,008	3,056	<b>0,04671</b>	0,702
CD4_INT38p_c	Log	Vn-V1	1,977	1,184	3,300	<b>0,00997</b>	0,850

**Anexo D-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal expressando as moléculas HLA-DR+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>Expressão total de HLA-DR+ nas subpopulações de células T CD4+</b>							
<b>HLA-DR+</b>							
CD4_NVDRp%	Linear	Vn	-0,759	-1,245	-0,274	<b>0,00270</b>	-1,619
CD4_NVDRp%	Linear	Vn-V1	-0,686	-1,061	-0,310	<b>0,00054</b>	-1,462
CD4_CMDRp%	Linear	Vn	-0,565	-0,912	-0,217	<b>0,00189</b>	-2,528
CD4_CMDRp%	Linear	Vn-V1	-0,565	-0,878	-0,252	<b>0,00061</b>	-2,531
CD4_EMDRp%	Log	Vn	0,458	0,285	0,737	<b>0,00169</b>	-0,927
CD4_EMDRp%	Log	Vn-V1	0,371	0,252	0,547	<b>0,00000</b>	-1,178
CD4_ETDRp%	Log	Vn	0,316	0,152	0,654	<b>0,00244</b>	-0,844
CD4_ETDRp%	Log	Vn-V1	0,248	0,143	0,431	<b>0,00000</b>	-1,019
CD4_TMDRp%	Log	Vn-V1	0,627	0,473	0,830	<b>0,00149</b>	-0,948
<b>VALORES ABSOLUTOS (Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
<b>HLA-DR+</b>							
CD4_NVDRp_c	Linear	Vn	-4,433	-8,111	-0,754	<b>0,01902</b>	-1,675
CD4_NVDRp_c	Linear	Vn-V1	-4,359	-7,450	-1,268	<b>0,00648</b>	-1,647
CD4_CMDRp_c	Linear	Vn	-3,403	-6,316	-0,490	<b>0,02280</b>	-2,479
CD4_CMDRp_c	Linear	Vn-V1	-3,670	-6,300	-1,040	<b>0,00703</b>	-2,673
CD4_EMDRp_c	Log	Vn	0,517	0,326	0,819	<b>0,00569</b>	-0,790
CD4_EMDRp_c	Log	Vn-V1	0,338	0,212	0,536	<b>0,00002</b>	-1,299
CD4_ETDRp_c	Log	Vn	0,356	0,171	0,742	<b>0,00664</b>	-0,768
CD4_ETDRp_c	Log	Vn-V1	0,223	0,117	0,424	<b>0,00002</b>	-1,116
CD4_TMDRp_c	Log	V1	1,477	1,116	1,953	<b>0,00709</b>	0,716
CD4_TMDRp_c	Log	Vn-V1	0,579	0,406	0,827	<b>0,00325</b>	-1,002

**10. Anexo E-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal co-expressando as moléculas CD38+HLA-DR+. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>CO-EXPRESSION CD38+HLA-DR+</b>							
CD4_NV38pDRp%	Linear	Vn	-0,656	-1,108	-0,205	<b>0,00511</b>	-1,539
CD4_NV38pDRp%	Linear	Vn-V1	-0,596	-0,943	-0,249	<b>0,00106</b>	-1,398
CD4_CM38pDRp%	Linear	Vn	-0,460	-0,753	-0,168	<b>0,00256</b>	-2,777
CD4_CM38pDRp%	Linear	Vn-V1	-0,464	-0,735	-0,193	<b>0,00112</b>	-2,801
CD4_EM38pDRp%	Log	Vn	0,420	0,233	0,759	<b>0,00472</b>	-0,848
CD4_EM38pDRp%	Log	Vn-V1	0,374	0,241	0,580	<b>0,00003</b>	-0,963
CD4_ET38pDRp%	Log	Vn	0,276	0,122	0,621	<b>0,00237</b>	-0,843
CD4_ET38pDRp%	Log	Vn-V1	0,246	0,137	0,442	<b>0,00001</b>	-0,916
CD4_TM38pDRp%	Log	Vn-V1	0,667	0,475	0,935	<b>0,01961</b>	-0,697
<b>VALORES ABSOLUTOS (Cels/mm3)</b>							
CD4_NV38pDRp_c	Linear	Vn	-3,898	-7,357	-0,439	<b>0,02786</b>	-1,636
CD4_NV38pDRp_c	Linear	Vn-V1	-3,847	-6,756	-0,938	<b>0,01040</b>	-1,615
CD4_CM38pDRp_c	Linear	Vn	-2,810	-5,295	-0,325	<b>0,02734</b>	-2,873
CD4_CM38pDRp_c	Linear	Vn-V1	-3,014	-5,321	-0,707	<b>0,01131</b>	-3,081
CD4_EM38pDRp_c	Log	Vn	0,468	0,269	0,813	<b>0,00784</b>	-0,774
CD4_EM38pDRp_c	Log	Vn-V1	0,336	0,206	0,549	<b>0,00004</b>	-1,111
CD4_ET38pDRp_c	Log	Vn	0,309	0,137	0,694	<b>0,00519</b>	-0,784
CD4_ET38pDRp_c	Log	Vn-V1	0,221	0,112	0,435	<b>0,00004</b>	-1,007
CD4_TM38pDRp_c	Log	V1	1,405	1,040	1,897	<b>0,02731</b>	0,593

**10. Anexo F-** Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ com fenótipos *Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>PERCENTUAL</b>							
<b>Diferenciação ontogênica de células T CD8+</b>							
CD8_NV%	Linear	Vn-V1	1,769	0,214	3,325	<b>0,0264</b>	0,552
CD8_CM%	log	Vn-V1	0,722	0,555	0,939	<b>0,0161</b>	-0,322
CD8_EM%	Linear	Vn	-12,359	-20,335	-4,383	<b>0,0029</b>	-0,993
CD8_EM%	Linear	Vn-V1	-11,683	-19,402	-3,963	<b>0,0036</b>	-0,939
CD8_TM%	Linear	Vn	10,360	3,420	17,299	<b>0,0041</b>	0,720
CD8_INT%	log	Vn	1,807	1,154	2,829	<b>0,0106</b>	0,791
CD8_INT%	log	Vn-V1	2,269	1,533	3,357	<b>0,0001</b>	1,095
<b>VALORES ABSOLUTOS</b>							
<b>Diferenciação ontogênica de células T CD8+</b>							
CD8_NV_c	Linear	Vn-V1	17,864	2,815	32,913	<b>0,0208</b>	0,420
CD8_CM_c	log	Vn-V1	0,701	0,505	0,972	<b>0,0336</b>	-0,321
CD8_EM_c	log	Vn	0,699	0,493	0,992	<b>0,0451</b>	-0,538
CD8_EM_c	log	Vn-V1	0,653	0,481	0,887	<b>0,0071</b>	-0,640
CD8_INT_c	log	Vn	1,763	1,103	2,817	<b>0,0187</b>	0,730
CD8_INT_c	log	Vn-V1	2,202	1,429	3,393	<b>0,0005</b>	1,017

**10. Anexo G-** Informações detalhadas das análises estatísticas dos parâmetros: percentuais e valores absolutos da expressão individual e combinada de CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD8+ totais e das subpopulações de células T CD8+ (*Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal) que apresentaram diferença estatística significativa. A análise comparativa entre os grupos Subtipo Não-C e subtipo-C.

População celular	Escala	Visita	Coefficiente Não-C	Valor mínimo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor máximo (Intervalo de Confiança 95%)	Valor de p	Coefficiente de padronização
<b>(%) CD38+</b>							
CD8_INT38p%	Log	Vn-V1	2,152	1,462	3,166	<b>0,0002</b>	0,926
<b>CD38+ (cel/mm<sup>3</sup>)</b>							
CD8_INT38p_c	Log	Vn-V1	2,076	1,315	3,276	<b>0,0022</b>	0,819
<b>(%) HLA-DR+</b>							
CD8_CMDRp%	Linear	Vn	-0,362	-0,633	-0,092	<b>0,0094</b>	-0,618
CD8_CMDRp%	Linear	Vn-V1	-0,348	-0,665	-0,030	<b>0,0326</b>	-0,593
CD8_EMDRp%	Log	Vn-V1	0,659	0,483	0,898	<b>0,0091</b>	-0,608
<b>HLA-DR+ (Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
CD8_CMDRp_c	Linear	Vn	-3,292	-6,164	-0,420	<b>0,0254</b>	-0,425
CD8_EMDRp_c	Log	Vn-V1	0,617	0,425	0,895	<b>0,0119</b>	-0,557
<b>Expressão total e combinada de CD38+ e HLA-DR+</b>							
<b>(%)</b>							
CD8_38pDRn%	Linear	V1	-6,552	-12,858	-0,246	<b>0,0419</b>	-0,548
CD8_38pDRn%	Linear	Vn-V1	4,774	0,250	9,298	<b>0,0390</b>	0,399
CD8_38nDRp%	Linear	Vn-V1	-2,958	-4,621	-1,295	<b>0,0007</b>	-0,777
<b>(Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
CD8_CM38pDRp_c	Linear	Vn	-2,660	-5,175	-0,146	<b>0,0385</b>	-0,351
<b>(%) CD38+HLA-DR+</b>							
CD8_CM38pDRp%	Linear	Vn	-0,300	-0,537	-0,063	<b>0,0141</b>	-0,524
CD8_EM38pDRp%	Log	Vn-V1	0,706	0,518	0,963	<b>0,0283</b>	-0,427
CD8_INT38pDRp%	Log	Vn-V1	1,574	1,042	2,378	<b>0,0318</b>	0,531
<b>CD38+HLA-DR+ (Cels/mm<sup>3</sup>)</b>							
CD8_CM38pDRp_c	Linear	Vn	-2,660	-5,175	-0,146	<b>0,0385</b>	-0,351
CD8_EM38pDRp_c	Log	Vn-V1	0,662	0,451	0,974	<b>0,0365</b>	-0,415



**Hospital das Clínicas da FMUSP**  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

**PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T NAS FASES RECENTE E ESTABELECIDADA DE INFECÇÕES POR SUBTIPOS C E NÃO C DO VÍRUS HIV-1  
**Pesquisador Responsável:** Esper Georges Kallás **Versão:** 1  
**Pesquisador Executante:** Priscilla Ramos Costa **CAAE:** 38525314.2.0000.0068  
**Finalidade Acadêmica:** Doutorado  
**Orientador:** Prof. Dr. Esper Georges Kallás  
**Instituição:** HCFMUSP  
**Departamento:** CLÍNICA MÉDICA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Registro on-line:** 10941  
**Número do Parecer:** 881.658  
**Data da Relatoria:** 19/11/2014  
**Apresentação do Projeto:** Adequada  
**Objetivo da Pesquisa:** Avaliar o perfil de ativação celular em indivíduos infectados por diferentes subtipos virais do HIV, nas fases recente e crônica da infecção.  
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** Não há riscos. Benefício científico.  
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** A pesquisa tem relevância científica e acadêmica.  
**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Adequados. O pesquisador apresentou todos os termos já aprovados e justificativas consistentes.  
**Recomendações:** Não há.  
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Aprovado.  
**Situação do Parecer:** Aprovado  
**Necessita Apreciação da CONEP:** Não  
**Considerações Finais a critério do CEP:** Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 19 de Novembro de 2014

**Prof. Dr. JOEL FAINTUCH**  
Vice - Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

*Manuscrito*

---

1 Infection with Subtype C HIV-1 Results in Higher T Cell Activation than Infection with  
2 Non-C Subtypes in Brazil.

3

4 Priscilla R. Costa<sup>1</sup>, Wendy Hartogensis<sup>2</sup>, Peter Bacchetti<sup>2</sup>, Bianca A. Santos<sup>1</sup>, Frederick  
5 M. Hecht<sup>2</sup>, Natalia Cerqueira<sup>1</sup>, Zelinda Nakagawa<sup>1</sup>, Cecilia Sucupira<sup>3</sup>, Michelle  
6 Camargo<sup>3</sup>, Ricardo S. Diaz<sup>3</sup>, Cecília Salete<sup>4</sup>, Breno R. Santos<sup>5</sup>, Esper G. Kallas\*<sup>1</sup>,  
7 Christopher D. Pilcher\*<sup>2</sup>

8

9 Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São  
10 Paulo, Brazil<sup>1</sup>, University of California, San Francisco, USA<sup>2</sup>, Federal University of  
11 São Paulo, Brazil<sup>3</sup>, Faculty of Medicine Foundation - University of São Paulo<sup>4</sup>, Hospital  
12 Nossa Senhora da Conceição/GHC, Porto Alegre, Brazil<sup>5</sup>.

13

14 \*Corresponding authors who contributed equally to this work: Esper G. Kallas,  
15 esper.kallas@gmail.com, Christopher D. Pilcher, cpilcher@php.ucsf.edu.

16

17 Running Header: T Cell Activation in Subtype C HIV-1

18

19 Presented in part: Conference for Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, 3-  
20 6 march, 1914 [abstract 1926].

21

22 **Keywords:** HIV-1 subtypes; 2. CD4+ T lymphocytes; 3. CD8+ T lymphocytes; 4.  
23 Regulatory T cells; 5. T cell activation.

24

25 **ABSTRACT (190-words)**

26 **Background:** Cellular activation relates to the pace of HIV-1 immunodeficiency.  
27 However, HIV genetic diversity and its relation with disease progression is less clear.  
28 This study compared cellular activation among subtype C versus non-C HIV-1 infected  
29 individuals during the first infection year.

30 **Methods:** Samples from 63 antiretroviral naïve HIV-1 infected individuals from two  
31 Brazilian cohorts, had their differentiation and activation T cell-parameters analyzed  
32 during acute infection and after virologic set point.

33 **Results:** No changes of differentiation and activation of CD4+ and CD8+ T cells profile  
34 between patients' groups were detected on baseline visit, but higher frequency of  
35 CD38+HLA-DR+ CD4+ T cells, and both higher frequency of activated effector and  
36 terminal effector memory CD4+ T-cells was detected in the subtype C-containing group  
37 at follow up visit. Higher activated effector memory CD8+ T cells among C-containing  
38 compared to non-C group at follow up visit was detected. Regulators CD4+ T cells  
39 revealed decreased frequency among subtype C-containing group compared to non-C in  
40 both visits.

41 **Conclusion:** Subtype C-containing group presented and evolves to a different activation  
42 profile during first year of infection, which may related to different course of disease  
43 progression, levels of cell and tissue deterioration related to microinflammation, and  
44 infectivity during HIV transmission.

45

46

1 **INTRODUCTION (3,344 words)**

2 Cellular activation is implicated in immunodeficiency progression and the development  
3 of HIV-1-infection related end-organ disease. Different host factors that influence this  
4 disease progression including presence of HLA-B27 (Meyerhans *et al.*, 1991; Den Uyl  
5 *et al.*, 2004), -B57 (Klein *et al.*, 1998; Leszczyszyn-Pynka *et al.*, 2015) and CCR5  $\Delta$ 32  
6 alleles (Huang *et al.*, 1996); GBV-C co-infection (Tillmann *et al.*, 2001; Xiang *et al.*,  
7 2001) is also associated with slower disease progression. It is less clear whether specific  
8 HIV-1 viral features drive the evolution of more aggressive or less aggressive clinical  
9 disease. HIV-1 infection is associated with greater systemic inflammation and cellular  
10 activation than infection by HIV-2 (Marlink *et al.*, 1994; Koblavi-Dème *et al.*, 2004;  
11 Machuca *et al.*, 2004), though HIV-2 strains with duplication of peri-kappa-B and NF-  
12 kappa-B sites may have greater virulence (Fusuma *et al.*, 2005). Among HIV-1 strains,  
13 tropism to CCR5+ or CXCR4+ co-receptors have been associated with slow and faster  
14 disease progression, respectively (Koot *et al.*, 1993; Casper *et al.*, 2002; Sucupira *et al.*,  
15 2012), but it is also possible that different HIV-1 subtypes may have fundamentally  
16 different pathogenic properties. For instance, infection with HIV-1 subtype A has been  
17 associated with slower progression than infection with subtype D (Kaleebu *et al.*, 2001).  
18 Subtype C is responsible for the majority of HIV infections worldwide, and there is  
19 evidence of growing subtype C epidemics in South Asia (Wilkinson *et al.*, 2015) and  
20 South America (Brígido *et al.*, 2007). Some observers have conjectured that subtype C  
21 might be more pathogenic or more transmissible due to particular viral features (which  
22 may include, interestingly, a higher number of NF- $\kappa$ B site repetitions in the LTR  
23 genomic region) (Bachu *et al.*, 2012). However it has been difficult to determine  
24 whether subtype C viral factors influence immunopathogenesis, disease progression or  
25 transmissibility. Different studies have shown faster (Kanki *et al.*, 1999; Amornkul *et al.*, 2013) or  
26 slower (Venner *et al.*, 2016) progression in subtype C infected than non-C infected

27 patients, however the patients with C and non-C subtype infections were typically from  
28 distinct sociodemographic groups (Amornkul *et al.*, 2013; Touloumi *et al.*, 2013). If  
29 subtype C HIV-1 is spreading and intrinsically present a more virulent profile, this could  
30 strongly influence the course of the pandemic and call for new prevention strategies.

31 In this study, we sought to determine whether infection with subtype C HIV-1  
32 influenced the course of HIV disease, focusing on early events of immunopathogenesis  
33 in a prospective cohort of acutely HIV-infected patients studied in South and Southeast  
34 Brazil. We investigated the activation and differentiation profiles of T- and regulatory  
35 T-cells in persons who were infected with different HIV-1 subtypes but were at similar  
36 stages of infection. We demonstrated that individuals infected with subtype C had  
37 higher levels of activation of CD4+ and CD8+ T cells and a more mature T cell  
38 differentiation profile than individual infected with non-C subtypes in Brazil.

39

## 40 **METHODS**

### 41 *Study participants*

42 Sixty-three participants from two larger cohorts established at the *Universidade Federal*  
43 *de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo* and the *Hospital Nossa Senhora*  
44 *da Conceição/GHC, Porto Alegre, Brazil* were selected. All subjects were recently  
45 diagnosed HIV-1-infected (Kallas *et al.*, 2004); clade was determined by HIV-1  
46 genotyping and samples were collected prior to antiretroviral treatment initiation.  
47 Informed consent was obtained at recruitment, and project was approved by the  
48 Institutional Review Board of *Universidade de São Paulo, CAPPesq #0458/08*.

49

### 50 *Study design*

51 Participants were evaluated for clinical and virological status as well as for the presence  
52 of GBV-C co-infection at baseline visit, presence of CCR5  $\Delta$ 32 mutation, CD4+ and

53 CD8+ T cell counts as well as plasma HIV-1 viral load (VL). All sixty-three subjects  
54 were grouped through genotyping into two groups: a “C- Containing Subtypes” group  
55 (n=19) included subtypes C (55%, 11/ 19), BC (10%, 2/ 19), CU (5%, 1/ 19), CK  
56 (5%,1/ 19), CRF31-like (10%, 2/ 19), CRF40-like (5%, 1/ 19), and other C-containing  
57 complex strains (10%, 2/ 19); and a “Non-C viral subtype” group (n=43) infected by  
58 subtypes B (81.39%, 35/ 43), BF (9.30%, 4/ 43), BF1 (4.65%, 2/ 43), F1 (2.32%, 1/ 43),  
59 and CRF02 AG-like (2.32%, 1/ 43). Plasma and PBMCs were used from acute infection  
60 (<3-6 months) and after virologic set point (approximately six months later), prior to  
61 ART.

62

### 63 ***HIV-1 subtyping***

64 As previously described (Sa-Filho *et al.*, 2007; Sanabani *et al.*, 2011) viral RNA was  
65 extracted from plasma and complementary DNA synthesis was immediately carried out  
66 with random primers. The protease and reverse transcriptase of *pol* gene were nested  
67 PCR amplified and PCR products were bi-directionally sequenced generating a 1.2 kb  
68 fragment ,as previously described (Sucupira *et al.*, 2007).

69

### 70 **CCR5 polymorphism and detection of GB virus type C RNA**

71 The presence of CCR5 $\Delta$ 32 allele was determined by PCR and subsequent gel  
72 electrophoresis as previously described (Munerato *et al.*, 2003). The detection of GBV-  
73 C RNA in this cohort as previously described (Maidana-Giret *et al.*, 2009; Giret *et al.*,  
74 2011), using plasma samples (Jarvis *et al.*, 1996; Tucker *et al.*, 1999).

75

### 76 ***Flow Cytometry***

77 Data acquisition was performed with a LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences)  
78 and processed using FlowJo (Tree Star Inc., v9.8.3), Pestle (from M.R.) and SPICE  
79 (Version v5.3). Evaluation of T cells were analysed from cryopreserved PBMCs that  
80 were stained with anti- CD3, CD4, CD8, CD38, HLA-DR, CD27, CCR7, CD45RA and  
81 live/dead. To characterize regulatory T cells (Tregs) were used anti-CD3, CD4, CD39,  
82 CD25, CD127, live/dead and through intranuclear staining anti-FoxP3 performed using  
83 the protocol recommended by the manufacture. Figure 1 shows representative dot plots  
84 with the strategies of analysis used to gate the different populations of T cells described  
85 in this study.

86

### 87 ***Statistical analysis***

88 Baseline characteristics were compared between groups using Student's *t* test, or  
89 Pearson Chi Square. Changes found after the first year, at follow up visit, considered the  
90 cellular differentiation and individual expression of CD38 and HLA-DR showed by the  
91 groups, used Mann Whitney test. Linear regression models were used to estimate the  
92 effect of viral subtype category on immune activation markers, Regulatory CD4+ T  
93 cells, and TRegs Suppressors. For each outcome, models were run with results from  
94 specimens drawn at baseline, and again with results from the follow up visit, and a third  
95 set of models was run using the delta or change over time, defined as the value of the  
96 outcome marker at the follow up visit minus the value of the outcome marker at the  
97 baseline visit ( $V_n - V_1$ ). Markers with heavily skewed distributions at either visit and all  
98 values greater than zero were *log* transformed for use in regression models. Where *log*  
99 scale outcomes were used, model coefficients and confidence intervals were converted  
100 to exponential to yield fold-effects. Fold-effects are interpreted as the fold-difference in  
101 the outcome between groups. Where raw (untransformed) data were modeled, model  
102 coefficients are interpreted as the raw difference in the mean outcome (percent of T

103 cells with the outcome marker) rather than the fold-change. Multivariate model building  
104 proceeded from models with *a priori* covariates added singly, to a full model for each  
105 outcome including the following list of *a priori* covariates in addition to viral subtype  
106 category: HIV-1 RNA Viral Load (VL) at baseline, gender, sexual risk factor,  
107 CCR5Δ32 profile, GBV-C status, and CD4+ T cell count at baseline. Analyses were  
108 done using Stata version 12 (StataCorp) and Graph Pad Prism 6.0, SPSS and SPICE.

109

## 110 **RESULTS**

111

### 112 **Patient cohort**

113 The 63 patients presented an average age of 34 years-old (range, 18 to 65), with 81.0%  
114 men and 71.4% MSM. Among the 55 patients for whom an infection date could be  
115 estimated, the baseline visit occurred a median of 3.4 months after infection (range: 2.4  
116 to 10.9 months). At baseline, 25.4% (16/63) tested positive for syphilis, and 17.5%  
117 (11/63) were GBV-C positive. 11.1% (7 individuals) presented heterozygosis CCR5Δ32  
118 genotype, and ten with at least one HLA-B allele previously associated with slower  
119 HIV-1 disease progression, including HLA-B\*14, B\*27, or B\*57 (15.9%). At baseline,  
120 patients had a geometric mean HIV-1 VL of 10,074 copies/ml and CD4 count of 572  
121 cells/μl. Overall characteristics are depicted in Table 1.

122

### 123 **Higher differentiation of CD4+ and CD8+ T cells in effectors subsets in clade C-** 124 **containing group**

125 At baseline (during acute infection, at the “V1” visit), CD4+ T cell differentiation  
126 profiles differed somewhat between the two groups. Patients in the C- group had a  
127 significantly lower percentage of effector memory (p=0.003), but a greater percentage  
128 of intermediate memory (p=0.02) CD4+ T cells when compared to the non-C group

129 (data not shown). By one year later, however (at the follow-up or “Vn” visit), patients in  
130 the C group had a significantly higher percentage of CD4+ T cells in effector memory  
131 ( $p=0.04$ ) and terminal effector ( $p=0.03$ ) cells, when compared to patients in the non-C  
132 group (Figure 2A). These changes were also significant when considered longitudinally,  
133 as change from baseline (Vn-V1, Figure 2C). Compared with the non-C group, the C  
134 group saw an increase in the percentages of effector memory and terminal effector  
135 (both,  $p<0.0001$ ) CD4+ T cells over time (Figure 2 C). They also showed a concomitant  
136 decline in the frequency of naïve ( $p=0.01$ ) and intermediate memory ( $p<0.0001$ ) CD4+  
137 T cells over time.

138 The differentiation profiles of CD8+ T cells were more similar between non-C  
139 and C-containing groups overall, with no significant differences seen at baseline.  
140 However, at follow-up visit, the C group developed a lower percentages of CD8+ T cell  
141 transitory ( $p=0.004$ ) and intermediary memory ( $p=0.01$ ) cells, and higher percentages of  
142 CD8+ T cell effector memory ( $p=0.003$ ), when compared to non-C group (Figure 2 B).  
143 Analyzed longitudinally over time, the C group showed more loss of naïve and  
144 intermediate memory CD8+ T cells over time (Vn-V1,  $p=0.02$  and  $p<0.0001$ ,  
145 respectively) than the non-C group, and a greater increase in central memory ( $p=0.01$ )  
146 and effector memory ( $p=0.004$ ) CD8+ T cells (Figure. 2 D).

147

148 **Higher expression of CD38 and HLA-DR activation markers on CD4+ T cells were**  
149 **observed in C-containing HIV-1 infected patients**

150 T cell activation profiles are depicted in Figure 1B. At baseline there was a statistically  
151 significant difference in CD38 expression but not in HLA-DR expression. A higher  
152 percentage of CD38+ expression was seen on total ( $p=0.044$ ) and intermediate memory  
153 CD4+ T cells ( $p=0.048$ ) in the C group at baseline, (Figure 3 A). At the follow up  
154 comparison, the C group showed higher percentages of CD38+ expressing effector

155 memory and terminal effector CD4<sup>+</sup> T cells ( $p=0.025$  and  $p=0.019$ , respectively, Figure  
156 3 A) compared to non-C group, and higher percentages of HLA-DR<sup>+</sup> on naïve, central,  
157 effector memory and terminal effector CD4<sup>+</sup> T cells than in the non-C group ( $p<0.005$   
158 for all, Figure 3B).

159 Measured as changes over time, (Vn-V1) found higher percentages of CD38<sup>+</sup> on  
160 naïve ( $p=0.005$ ), intermediate ( $p<0.0001$ ), effector memory ( $p<0.0001$ ) and terminal  
161 effector ( $p=0.001$ ) CD4<sup>+</sup> T cells in the C-containing group compared non-C group (data  
162 not shown). Analyzing the changes overtime related to HLA-DR<sup>+</sup> expressing CD4<sup>+</sup> T  
163 cells, the C group had higher percentages of HLA-DR<sup>+</sup> on naïve ( $p=0.001$ ), central  
164 ( $p=0.001$ ), transitional ( $p=0.001$ ), effector memory ( $p<0.0001$ ) and terminal effector  
165 ( $p<0.0001$ ) CD4<sup>+</sup> T cells compared to non-C groups (data not shown).

166 At baseline, no statistically significant difference was found between the groups  
167 in regard to CD8<sup>+</sup> T cells individually expressing CD38 and HLA-DR. At follow up  
168 visit, the C group had higher percentages of HLA-DR<sup>+</sup> expressing central memory  
169 CD8<sup>+</sup> T cells ( $p=0.009$ ). Over time, C- containing group patients developed higher  
170 percentages of CD38<sup>+</sup> on intermediate memory CD8<sup>+</sup> T cells ( $p<0.0001$ ) and higher  
171 percentages of HLA-DR<sup>+</sup> on central and effector memory CD8<sup>+</sup> T cells ( $p=0.03$  and  
172  $p=0.009$ , respectively) (data not shown).

173 In the subtype C group, we observed an expansion of the percentage of CD8<sup>+</sup> T  
174 cells that were CD38-HLA-DR<sup>+</sup> over the first year of infection; however no such  
175 change over time among patients infected with non-C virus was detected. This  
176 difference was significant between C and non-C groups (Vn-V1,  $p=0.001$ , data not  
177 shown). CD4<sup>+</sup> T cells expressing this phenotype, CD38-HLA-DR<sup>+</sup>, at baseline visit  
178 were similar between groups, although we also observed a higher frequency of CD38-  
179 HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the C-containing group at the follow up visit, and they also  
180 had larger changes over time ( $p<0.0001$ , Figure 3 C; Vn-V1,  $p=0.001$ , data not shown).

181 CD4+ T cells expressing different phenotype, CD38+HLA-DR-, though C-  
182 containing group showed higher frequency than non-C at the baseline visit (p=0.04,  
183 Figure 3 C), and when difference over time was calculated, higher percentage of this  
184 subset on C-containing group was observed (p<0.0001, data not shown). Preservation of  
185 the percentage of CD8+ T cells expressing this phenotype was detected on non-C group  
186 in contrast with a slight decrease observed on C-containing group during the first year  
187 of infection (Vn-V1, p=0.039, data not shown).

188

### 189 **Higher CD4+ T cell activation was observed on C-containing than Non- C group**

190 In both unadjusted (Table 2, Figure 3 C, 4 C) and adjusted (Table 2, Figure 4 A and B)  
191 linear regression models, there were no statistically significant differences in CD4+ T  
192 cell activation between viral subtype groups at the baseline visit. However, in an  
193 unadjusted model, CD4+ T cell activation (% CD38+ HLA-DR+) was lower at the  
194 follow-up visit in the non-C group compared with C- containing group in the total  
195 CD4+ T cells as well as in central memory, effector memory and terminal effector T  
196 cells (p<0.05; Figure. 3 C). In a regression model adjusted for baseline VL and CD4+ T  
197 counts, gender, MSM behavior, CCR5Δ32 genotype, and GBV-C status at baseline,  
198 CD4+ T cell activation in the non-C viral subtype group was 0.38-fold lower than in the  
199 C group (95%CI: 0.24 to 0.59; p<0.0001). The percentages of CD38+ HLA-DR+ Naïve  
200 CD4+ T cells were 0.72 units lower in the non-C group in the adjusted model at follow  
201 up (95%CI: -1.21 to -0.24; p=0.004). Among central memory CD4+ T cells, the %  
202 CD38+ HLA-DR+ was 0.54 units lower among non-C group at follow up in the  
203 adjusted model, compared with C-containing group (95%CI: -0.84 to -0.24; p=0.001).  
204 Among effector memory CD4+ T cells, activation was 0.36-fold lower in non-C group  
205 (95%CI: 0.19 to 0.65; p=0.001), and among terminal effector cells, the % CD38+ HLA-

206 DR+ at follow up was 0.217-fold lower in non-C group in the adjusted model (95% CI:  
207 0.08 to 0.54; p=0.002).

208 Where these differences between the non-C and C subtype groups were found at  
209 follow up, there were also differences between groups in the change over time (Figure 4  
210 C). In one additional T cell subset for which the difference between groups at follow up  
211 were only borderline statistically significant (transitional memory CD4+ T cells) we  
212 could see a statistically significant difference in the change over time (fold change at  
213 follow up= 0.69; 95%CI: 0.48 to 1.005; p=0.05; fold-effect comparing the change over  
214 time between groups=0.58; 95%CI: 0.40 to 0.83; p=0.004).

215 CD8+ T cell activation (CD38+HLA-DR+) in total T cells were not statistically  
216 significant between groups at either time point (Figure 4 C). However, the C group had  
217 an increased percentage of CD38+HLA-DR+ Central memory CD8+ T cells, at follow-  
218 up (0.31 units lower; 95%CI: -5.84 to -0.03; p=0.02). The percentage of activated  
219 Effector memory CD8+ T cells was 0.56-fold lower in the non-C group at follow up  
220 compared with the C group (95%CI: 0.34 to 0.95; p= 0.03) (Figure 4 B).

221

## 222 **Regulators T cells (Tregs)**

223 When we looked at the percentages of T cells that were Tregs (FoxP3+ expressing  
224 CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> CD4+ T cells, Figure 1 C) between groups, we found that was  
225 similar at baseline, but became dramatically different after the first year: at the follow-  
226 up visit, Tregs were 11.3-fold higher in the non-C group (p=0.009, Table 3, see Figure 4  
227 D). In an adjusted model, the differences between groups remained large: 8.72-fold  
228 difference (95%CI: -1.05 to 18.5; p=0.08, Table 3). There were no statistically  
229 significant differences between groups in the percentage of suppressor Tregs cells  
230 (CD39+ Tregs) (Figure 4 D).

231 **DISCUSSION**

232 Infection with HIV-1 induces a state of systemic immune activation, which is a main  
233 driver of progressive immune failure and immunodeficiency in HIV disease (Klatt *et al.*,  
234 2013). The dynamics of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are altered during acute infection,  
235 persisting through to the chronic phase; biomarkers of immune activation (*e.g.*,  
236 expression of CD38 and HLA-DR molecules on CD8<sup>+</sup> T cells) predict progression to  
237 AIDS and death (Giorgi *et al.*, 1994; Ganesan *et al.*, 2010). In this study, patients  
238 infected with subtype C (or subtype C recombinant) viruses developed different patterns  
239 of T cell differentiation and activation over time than patients in the non-C group, T cell  
240 patterns of the individuals infected with subtype C displayed greater expansion of  
241 memory subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and a relative decrease in immature,  
242 proliferative (transitional) T cell forms. These differences were independent of gender,  
243 infection route CD4<sup>+</sup> T cell counts and HIV-1 VL. In the patients infected with subtype  
244 C, these shifts were accompanied over time by greater expression of CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>  
245 on CD4<sup>+</sup> T cells and effectors memory CD8<sup>+</sup> T cells. Interestingly, subtype C infected  
246 patients also showed markedly lower frequencies of Tregs. These cells play an  
247 important immunomodulatory role, primarily by suppressing cellular activation in  
248 several conditions (Belkaid e Rouse, 2005).

249 Finding differences in the patterns of immune pathogenesis between HIV-1  
250 subtype C and non-C subtypes could be important for several reasons. It is conceivable  
251 that viral factors may help in driving the excess burden of subtype C HIV-1 epidemics  
252 in places like southern Africa, South Asia and the South of Brazil. It is also conceivable  
253 that higher immune activation in subtype C infections might facilitate HIV transmission.

254 These data also suggest that the development of HIV-1 related CD4<sup>+</sup> T cell  
255 activation following acute HIV infection may be strongly influenced by specific viral  
256 genes that differ between viral clades. Genetic differences in LTR, *nef*, *tat*, and *vpu*

257 genes and NF- $\kappa$ B duplication have been identified in subtype C that might influence  
258 virulence (Bachu *et al.*, 2012). HIV-1 has developed several ways to lower the CD4+ T  
259 cell antiviral response including deletion by apoptosis (Chaves e Kallas, 2004),  
260 infection of specific T helper cells, an inefficient presentation of viral antigens by MHC  
261 II molecules (Polyak *et al.*, 1997), inhibition of MHC II transcription (Kanazawa *et al.*,  
262 2000) and a reduced capacity to activate T cells in a peptide-specific and HLA-DR  
263 restrict manner observed in cells expressing *nef* protein (Stumptner-Cuvelette *et al.*,  
264 2001). If specific genes can be identified which are associated with differences in  
265 immunopathogenesis, this could suggest strategies to mitigate the immune deterioration  
266 caused by HIV.

267 Interpreting this study data is not entirely straightforward. First, the proximate causes of  
268 differences in T cell dynamics and immune activation are unknown. In chronic HIV  
269 infection, it is known that the CD4+ T cell loss has been associated with persistent  
270 antigenic stimulation by depletion of gastrointestinal memory CD4+ T cells and release  
271 of bacterial products in the circulation, resulting in disease progression (Mehandru *et al.*,  
272 2004; Khaitan e Unutmaz, 2011). With regard to the changes we saw in the distribution  
273 of T cell phenotypes over time, it is not possible to infer the dynamics of T cell subset  
274 proliferation (or function) from these types of data.

275         The frequency of activated CD8+ T cells in untreated HIV-1 disease far exceeds  
276 the frequency of HIV-specific T cells, and activation and expansion of non-HIV specific  
277 T cells has been clearly documented during early HIV infection (Khaitan e Unutmaz,  
278 2011). Despite this cellular immune response most HIV infected patients show clinical  
279 disease progression associated with systemic inflammation. Additional limitations to  
280 consider in interpreting this study are a small number of subjects (n=63) and the  
281 relatively short follow-up time, related to the uptake of antirretroviral therapy. We also  
282 recognize that the absence of detailed genetic characterization (e.g., the number of

283 NFκB repetitions in LTR) precludes any definitive conclusions about mechanism.  
284 However, these are countered by key strengths such as ability to study individuals  
285 beginning in early infection, a prospective longitudinal cohort and rigorous  
286 experimental design; the unique study population in South Brazil is a key feature of the  
287 study, since there are few (if any) other places in the world in which subtype B and C  
288 infections truly co-circulate in sociodemographically similar groups.

289         Previous searches presented an absence of correlation between VL and CD4+ T  
290 cells counts decline, others considered the generalized activation and expansion of  
291 CD8+ T more related with the decline of CD4+ T cells counts, and clinical progression  
292 (Giorgi *et al.*, 1993; Mellors *et al.*, 1997; Leng *et al.*, 2001). It has been suggested that  
293 CD4+ T cell proliferation is driven by a combination of the homeostatic response and  
294 antigen stimulation, in contrast CD8+ T cell proliferation may be mainly driven by  
295 presence of HIV (Catalfamo *et al.*, 2008). Regulatory T cells express the CD4 molecule  
296 and with progressive HIV-1 infection these cells are infected and decline in number  
297 causing immune activation (Jiao *et al.*, 2009).

298         In summary, subtype C now dominates HIV-1 infection in areas of the world  
299 with the greatest HIV burden, and it has now established a foothold in the Americas;  
300 understanding its role in pathogenesis and transmission of infection is critical to  
301 understanding and forecasting the current pandemic.

302

303 **Funding:** This work was supported by the São Paulo City Health Department (grant  
304 number 1904-0.168.922-7 to E.G.K.) and FAPESP (grant number 04/15856-9 to R.S.D);  
305 the Funding bodies had no role in study design, data collection and analysis, decision to  
306 publish, or preparation of the manuscript.

307

308 **Acknowledgements**

309 We are grateful for Teresa Maidana Giret for CCR5 $\Delta$ 32 genotyping and GBV-C RT-  
310 PCR assays results of the most of the samples; Claudia Tomiyama and Helena  
311 Tomiyama for support in constituting the sample repository.

312

313 **Authorship:** C.D.P., P.R.C. and E.G.K. developed the study concept/ P.R.C., C.S., M.  
314 C., C.C., and B.A.S. for experimental design/ N.C., Z.N., F.M.H. and B.R.S were  
315 responsible for clinical supervision of patients and PBMC sampling/ Statistical analyses  
316 were done by P.R.C., P.B. and W. H./ P.R.C., C.D.P. and W. H. analyzed all data and  
317 wrote the manuscript/ All authors were involved in manuscript review and editing.

318

### 319 **Conflicts of interest**

320 The authors declare no competing financial interests.

321

### 322 **References**

323 AANDAHL, E. M. et al. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to  
324 human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2454-9,  
325 Mar 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963140> >.  
326

327 ADDO, M. M. et al. Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently  
328 detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 2, n. 3, p. e321,  
329 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
330 1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
331 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17389912](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17389912) >.  
332  
333

334 ALAEUS, A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. **Scand J Infect Dis**, v. 32, n. 5, p. 455-63,  
335 2000. ISSN 0036-5548 (Print)  
336 0036-5548 (Linking). Disponível em: <  
337 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11055646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11055646) >.  
338  
339

340 AMEISEN, J. C.; CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell  
341 death hypothesis. **Immunol Today**, v. 12, n. 4, p. 102-5, Apr 1991. ISSN 0167-5699 (Print)  
342 0167-5699 (Linking). Disponível em: <  
343 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1676268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1676268) >.  
344  
345

- 346 AMORNKUL, P. N. et al. Disease progression by infecting HIV-1 subtype in a seroconverter  
347 cohort in sub-Saharan Africa. **AIDS**, v. 27, n. 17, p. 2775-86, Nov 2013. ISSN 1473-5571.  
348 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113395> >.  
349
- 350 ASANO, M. et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T  
351 cell subpopulation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 387-96, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível  
352 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760792> >.  
353
- 354 BACHU, M. et al. Multiple NF- $\kappa$ B sites in HIV-1 subtype C long terminal repeat confer superior  
355 magnitude of transcription and thereby the enhanced viral predominance. **J Biol Chem**, v. 287,  
356 n. 53, p. 44714-35, Dec 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: <  
357 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132857> >.  
358
- 359 BALL, S. C. et al. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus  
360 type 1 isolates of subtypes B and C. **J Virol**, v. 77, n. 2, p. 1021-38, Jan 2003. ISSN 0022-538X  
361 (Print)  
362 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
363 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12502818](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12502818) >.  
364  
365
- 366 BARBOUR, J. D. et al. HIV-1/HSV-2 co-infected adults in early HIV-1 infection have elevated  
367 CD4+ T cell counts. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e1080, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
368 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957262> >.  
369
- 370 BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6,  
371 n. 4, p. 353-60, Apr 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: <  
372 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785761> >.  
373
- 374 BELLO, G. et al. Short communication: Evidences of recent decline in the expansion rate of the  
375 HIV type 1 subtype C and CRF31\_BC epidemics in southern Brazil. **AIDS Res Hum**  
376 **Retroviruses**, v. 25, n. 11, p. 1065-9, Nov 2009. ISSN 1931-8405. Disponível em: <  
377 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895209> >.  
378
- 379 BLAAK, H. et al. In vitro replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)  
380 variants in relation to virus load in long-term survivors of HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 177, n.  
381 3, p. 600-10, Mar 1998. ISSN 0022-1899 (Print)  
382 0022-1899 (Linking). Disponível em: <  
383 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9498438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9498438) >.  
384  
385
- 386 BOFILL, M. et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict  
387 the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 10, n. 8, p. 827-34, Jul 1996.  
388 ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828739> >.  
389
- 390 BORROW, P. et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control  
391 of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 68, n. 9, p.  
392 6103-10, Sep 1994. ISSN 0022-538X (Print)  
393 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
394 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8057491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8057491) >.  
395  
396

397 BRÍGIDO, L. F. et al. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil.  
398 **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, n. 3, p. 339-44, Mar 2011. ISSN 1931-8405. Disponível  
399 em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950149> >.  
400

401 \_\_\_\_\_. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest  
402 AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1579-86, Dec  
403 2007. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160017> >.  
404

405 BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Human immunodeficiency virus  
406 type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications.  
407 **J Virol**, v. 81, n. 19, p. 10209-19, Oct 2007. ISSN 0022-538X (Print)  
408 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
409 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17634242](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17634242) >.  
410  
411

412 BURGER, S.; POLES, M. A. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency  
413 virus infection. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 2, p. 115-24, May 2003. ISSN 0272-8087. Disponível  
414 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12800065> >.  
415

416 BURGERS, W. A. et al. Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in  
417 subtype C HIV-1 infection with viral set point. **J Immunol**, v. 182, n. 8, p. 4751-61, Apr 15 2009.  
418 ISSN 1550-6606 (Electronic)  
419 0022-1767 (Linking). Disponível em: <  
420 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19342652](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19342652) >.  
421  
422

423 BUTZ, E. A.; BEVAN, M. J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute  
424 virus infection. **Immunity**, v. 8, n. 2, p. 167-75, Feb 1998. ISSN 1074-7613. Disponível em: <  
425 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491998> >.  
426

427 CASPER, C. et al. Coreceptor change appears after immune deficiency is established in  
428 children infected with different HIV-1 subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 5, p.  
429 343-52, Mar 2002. ISSN 0889-2229. Disponível em: <  
430 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897036> >.  
431

432 CASSOL, E. et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected  
433 South Africans receiving combination antiretroviral therapy. **J Infect Dis**, v. 202, n. 5, p. 723-33,  
434 Sep 1 ISSN 1537-6613 (Electronic)  
435 0022-1899 (Linking). Disponível em: <  
436 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20629534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20629534) >.  
437  
438

439 CATALFAMO, M. et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct  
440 pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n.  
441 50, p. 19851-6, Dec 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <  
442 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060209> >.  
443

444 CECILIA, D. et al. Absence of coreceptor switch with disease progression in human  
445 immunodeficiency virus infections in India. **Virology**, v. 271, n. 2, p. 253-8, Jun 2000. ISSN  
446 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860879> >.  
447

448 CHAVES, M. M.; KALLAS, E. G. Cell cycle distribution of CD4+ lymphocytes in HIV-1-infected  
449 subjects. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 62, n. 1, p. 46-51, Nov 2004. ISSN 1552-4949.  
450 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476192> >.  
451

452 COSSARIZZA, A. et al. T cell activation but not polyfunctionality after primary HIV infection  
453 predicts control of viral load and length of the time without therapy. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p.  
454 e50728, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
455 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236388> >.  
456

457 D'SOUZA, M. et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by  
458 viral replication and associated with T cell dysfunction. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1979-87, Aug  
459 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)  
460 0022-1767 (Linking). Disponível em: <  
461 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17641065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17641065) >.  
462  
463

464 DEMARCHI, F. et al. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human  
465 immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 70, n. 7, p. 4427-37, Jul 1996. ISSN 0022-538X.  
466 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676466> >.  
467

468 DEN UYL, D.; VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E.; VAN AGTMAEL, M. Progression of HIV to  
469 AIDS: a protective role for HLA-B27? **AIDS Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-96, 2004 Apr-Jun 2004. ISSN  
470 1139-6121. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15332431> >.  
471

472 DOUEK, D. C. et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**, v. 417, n.  
473 6884, p. 95-8, May 2 2002. ISSN 0028-0836 (Print)  
474 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
475 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11986671](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11986671) >.  
476  
477

478 EGGENA, M. P. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune  
479 activation. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4407-14, Apr 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
480 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778406> >.  
481

482 ESPERT, L. et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope  
483 proteins to CXCR4. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2161-72, Aug 2006. ISSN 0021-9738.  
484 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886061> >.  
485

486 FUSUMA, E. E. et al. Duplication of peri-kappaB and NF-kappab sites of the first human  
487 immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) transmission in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.  
488 21, n. 11, p. 965-70, Nov 2005. ISSN 0889-2229. Disponível em: <  
489 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386115> >.  
490

491 GANESAN, A. et al. Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent  
492 rate of progression. **J Infect Dis**, v. 201, n. 2, p. 272-84, Jan 2010. ISSN 1537-6613. Disponível  
493 em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001854> >.  
494

495 GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. **Nature**, v. 397, n.  
496 6718, p. 436-41, Feb 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: <  
497 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989410> >.  
498

- 499 GILLESPIE, G. M. et al. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in  
500 slow progressors with B\*57. **AIDS**, v. 16, n. 7, p. 961-72, May 2002. ISSN 0269-9370.  
501 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953462> >.  
502
- 503 GIORGI, J. V. et al. CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1  
504 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent  
505 stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. **J Infect Dis**, v. 170, n. 4, p.  
506 775-81, Oct 1994. ISSN 0022-1899 (Print)  
507 0022-1899 (Linking). Disponível em: <  
508 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7930717](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7930717)  
509 [ds=7930717](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7930717) >.  
510
- 511 \_\_\_\_\_. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of  
512 low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter  
513 AIDS Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 6, n. 8, p. 904-12, Aug 1993. ISSN  
514 0894-9255 (Print)  
515 0894-9255 (Linking). Disponível em: <  
516 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7686224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7686224)  
517 [ds=7686224](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7686224) >.  
518
- 519 \_\_\_\_\_. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of  
520 HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 4, p. 346-55, Apr 2002. ISSN 1525-  
521 4135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917238> >.  
522
- 523 GIRET, M. T. et al. Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C  
524 infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n.  
525 4, p. e18407, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
526 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483671> >.  
527
- 528 GOUJARD, C. et al. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease  
529 progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 5,  
530 p. 709-15, Mar 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: <  
531 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447119> >.  
532
- 533 GOULDER, P. J. et al. Identification of a novel HLA-B\*2705-restricted cytotoxic T-lymphocyte  
534 epitope within a conserved region of HIV-1 Nef. **AIDS**, v. 11, n. 4, p. 536-8, Mar 1997. ISSN  
535 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084804> >.  
536
- 537 GUTIÉRREZ, M. et al. Prevalence of HIV-1 non-B subtypes, syphilis, HTLV, and hepatitis B  
538 and C viruses among immigrant sex workers in Madrid, Spain. **J Med Virol**, v. 74, n. 4, p. 521-7,  
539 Dec 2004. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484270> >.  
540
- 541 HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v.  
542 287, n. 5453, p. 607-14, Jan 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: <  
543 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649986> >.  
544
- 545 HAYAMI, M.; IDO, E.; MIURA, T. Survey of simian immunodeficiency virus among nonhuman  
546 primate populations. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 188, p. 1-20, 1994. ISSN 0070-217X.  
547 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924421> >.  
548
- 549 HEMELAAR, J. et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007.  
550 **AIDS**, v. 25, n. 5, p. 679-89, Mar 13 ISSN 1473-5571 (Electronic)

551 0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
552 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21297424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21297424) >.  
553  
554

555 \_\_\_\_\_. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004.  
556 **AIDS**, v. 20, n. 16, p. W13-23, Oct 24 2006. ISSN 0269-9370 (Print)  
557 0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
558 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17053344](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17053344) >.  
559  
560

561 HORTON, H. et al. Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is  
562 critical for immune control of HIV-1 infection. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7406-15, Nov 2006.  
563 ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082660> >.  
564

565 HUANG, Y. et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease  
566 progression. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1240-3, Nov 1996. ISSN 1078-8956. Disponível em: <  
567 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898752> >.  
568

569 HUET, T. et al. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature**, v. 345,  
570 n. 6273, p. 356-9, May 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: <  
571 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188136> >.  
572

573 JARVIS, L. M. et al. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products.  
574 **Lancet**, v. 348, n. 9038, p. 1352-5, Nov 1996. ISSN 0140-6736. Disponível em: <  
575 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918279> >.  
576

577 JIAO, Y. et al. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and  
578 apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-  
579 progressors. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e366-75, Sep 2009. ISSN 1365-2567.  
580 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016904> >.  
581

582 JIN, X. et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian  
583 immunodeficiency virus-infected macaques. **J Exp Med**, v. 189, n. 6, p. 991-8, Mar 15 1999.  
584 ISSN 0022-1007 (Print)  
585 0022-1007 (Linking). Disponível em: <  
586 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10075982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10075982) >.  
587  
588

589 JONES, R. B. et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with  
590 highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. **J Exp Med**, v. 205, n. 12, p. 2763-79,  
591 Nov 24 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)  
592 0022-1007 (Linking). Disponível em: <  
593 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19001139](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19001139) >.  
594  
595

596 KALEEBU, P. et al. Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease  
597 progression in a rural Ugandan cohort. **AIDS**, v. 15, n. 3, p. 293-9, Feb 2001. ISSN 0269-9370.  
598 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273208> >.  
599

600 KALLAS, E. G. et al. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human  
601 immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of São Paulo, Brazil.

- 602 **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 399-406, Dec 2004. ISSN 1413-8670. Disponível em: <  
603 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880230> >.  
604
- 605 KANAZAWA, S.; OKAMOTO, T.; PETERLIN, B. M. Tat competes with CIITA for the binding to  
606 P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. **Immunity**, v. 12, n. 1,  
607 p. 61-70, Jan 2000. ISSN 1074-7613. Disponível em: <  
608 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661406> >.  
609
- 610 KANKI, P. J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression.  
611 **J Infect Dis**, v. 179, n. 1, p. 68-73, Jan 1999. ISSN 0022-1899. Disponível em: <  
612 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841824> >.  
613
- 614 KAPLAN, D.; SIEG, S. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human  
615 immunodeficiency virus type 1 disease. **J Virol**, v. 72, n. 8, p. 6279-82, Aug 1998. ISSN 0022-  
616 538X (Print)  
617 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
618 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9658065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9658065) >.  
619  
620
- 621 KAWASHIMA, Y. et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. **Nature**, v. 458,  
622 n. 7238, p. 641-5, Apr 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
623 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242411> >.  
624
- 625 KESTENS, L. et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+  
626 CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. **Clin Exp Immunol**, v. 95, n. 3, p. 436-41, Mar  
627 1994. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907956> >.  
628
- 629 KHAITAN, A.; UNUTMAZ, D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. **Curr**  
630 **HIV/AIDS Rep**, v. 8, n. 1, p. 4-11, Mar 2011. ISSN 1548-3576. Disponível em: <  
631 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188556> >.  
632
- 633 KLATT, N. R.; FUNDERBURG, N. T.; BRENCHLEY, J. M. Microbial translocation, immune  
634 activation, and HIV disease. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 6-13, Jan 2013. ISSN 1878-4380.  
635 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23062765> >.  
636
- 637 KLEIN, M. R. et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type  
638 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. **J Gen Virol**, v. 79 ( Pt 9), p. 2191-  
639 201, Sep 1998. ISSN 0022-1317. Disponível em: <  
640 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747728> >.  
641
- 642 KOBLAVI-DÈME, S. et al. Differences in HIV-2 plasma viral load and immune activation in HIV-  
643 1 and HIV-2 dually infected persons and those infected with HIV-2 only in Abidjan, Côte D'Ivoire.  
644 **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 413-9, Feb 2004. ISSN 0269-9370. Disponível em: <  
645 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090792> >.  
646
- 647 KOOT, M. et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell  
648 depletion and progression to AIDS. **Ann Intern Med**, v. 118, n. 9, p. 681-8, May 1993. ISSN  
649 0003-4819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096374> >.  
650
- 651 KOTSAFTI, O. et al. Early syphilis affects markers of HIV infection. **Int J STD AIDS**, Jun 2015.  
652 ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113517> >.

- 654 KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of  
655 viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **J Virol**, v. 68, n. 7, p. 4650-  
656 5, Jul 1994. ISSN 0022-538X (Print)  
657 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
658 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8207839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8207839) >.  
659  
660
- 661 KROWKA, J. F. et al. Lymphocyte proliferative responses to human immunodeficiency virus  
662 antigens in vitro. **J Clin Invest**, v. 83, n. 4, p. 1198-203, Apr 1989. ISSN 0021-9738 (Print)  
663 0021-9738 (Linking). Disponível em: <  
664 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2703528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2703528) >.  
665  
666
- 667 KUNIYASU, Y. et al. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a  
668 functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. **Int Immunol**, v.  
669 12, n. 8, p. 1145-55, Aug 2000. ISSN 0953-8178. Disponível em: <  
670 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10917889> >.  
671
- 672 KURODA, M. J. et al. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary  
673 simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5127-  
674 33, May 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: <  
675 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227983> >.  
676
- 677 KWOK, S. et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro  
678 enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. **J Virol**, v. 61, n. 5, p. 1690-4, May  
679 1987. ISSN 0022-538X (Print)  
680 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
681 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2437321](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2437321) >.  
682  
683
- 684 LAU, D. T. et al. Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus coinfection: response to  
685 interferon-alpha therapy. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1334-7, Oct 1999. ISSN 0022-1899.  
686 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479167> >.  
687
- 688 LENG, Q. et al. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell  
689 decline during HIV infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 27, n. 4, p. 389-97, Aug 2001.  
690 ISSN 1525-4135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468428> >.  
691
- 692 LESZCZYŹYŃ-PYŃKA, M. et al. Protective Effect of HLA-B\*5701 and HLA-C -35 Genetic  
693 Variants in HIV-Positive Caucasians from Northern Poland. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127867,  
694 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068923> >.  
695
- 696 LETVIN, N. L. et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-  
697 challenged monkeys. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1530-3, Jun 9 2006. ISSN 1095-9203  
698 (Electronic)  
699 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
700 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16763152](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763152) >.  
701  
702

- 703 LIBRELOTTO, C. S. et al. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of  
704 South Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 249-257, 2015 May-Jun 2015. ISSN  
705 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108001> >.  
706
- 707 LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-  
708 exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-77, Aug 1996. ISSN 0092-8674.  
709 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756719> >.  
710
- 711 LIU, Z. et al. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T  
712 cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. **Cytometry**, v.  
713 26, n. 1, p. 1-7, Mar 15 1996. ISSN 0196-4763 (Print)  
714 0196-4763 (Linking). Disponível em: <  
715 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8809474](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8809474)  
716 >.  
717
- 718 LOUSSERT-AJAKA, I. et al. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O  
719 strains isolated from Cameroonian patients living in France. **J Virol**, v. 69, n. 9, p. 5640-9, Sep  
720 1995. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637010> >.  
721
- 722 LÓPEZ, M. et al. Suppression of viral replication with highly active antiretroviral therapy has no  
723 impact on the functional profile of HIV-specific CD8(+) T cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 6, p.  
724 1548-58, Jun 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: <  
725 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421792> >.  
726
- 727 MACHUCA, A. et al. HIV type 2 primary isolates induce a lower degree of apoptosis "in vitro"  
728 compared with HIV type 1 primary isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 5, p. 507-12,  
729 May 2004. ISSN 0889-2229. Disponível em: <  
730 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186525> >.  
731
- 732 MAHNKE, Y. D. et al. Early immunologic and virologic predictors of clinical HIV-1 disease  
733 progression. **AIDS**, v. 27, n. 5, p. 697-706, Mar 2013. ISSN 1473-5571. Disponível em: <  
734 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211771> >.  
735
- 736 MAIDANA-GIRET, M. T. et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation  
737 independently of HIV-1 viral load. **AIDS**, v. 23, n. 17, p. 2277-87, Nov 2009. ISSN 1473-5571.  
738 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773635> >.  
739
- 740 MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to  
741 HIV-1. **Science**, v. 265, n. 5178, p. 1587-90, Sep 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: <  
742 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915856> >.  
743
- 744 MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**,  
745 v. 16, n. 1, p. 100-3, May 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: <  
746 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140404> >.  
747
- 748 MASSANELLA, M. et al. Changes in T-cell subsets in HIV-HCV-coinfected patients during  
749 pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. **Antivir Ther**, v. 15, n. 3, p. 333-42, 2010.  
750 ISSN 2040-2058. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516553> >.  
751

- 752 MATTAPALLIL, J. J. et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple  
753 tissues during acute SIV infection. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1093-7, Apr 28 2005. ISSN 1476-  
754 4687 (Electronic)  
755 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
756 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15793563](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15793563) >.  
757  
758
- 759 MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+  
760 T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 761-70,  
761 Sep 20 2004. ISSN 0022-1007 (Print)  
762 0022-1007 (Linking). Disponível em: <  
763 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15365095](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15365095) >.  
764  
765
- 766 MELLORS, J. W. et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-  
767 1 infection. **Ann Intern Med**, v. 126, n. 12, p. 946-54, Jun 1997. ISSN 0003-4819. Disponível  
768 em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182471> >.  
769
- 770 MEYERHANS, A. et al. In vivo persistence of a HIV-1-encoded HLA-B27-restricted cytotoxic T  
771 lymphocyte epitope despite specific in vitro reactivity. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 10, p. 2637-40,  
772 Oct 1991. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717289> >.  
773
- 774 MIGUELES, S. A. et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression  
775 and is maintained in nonprogressors. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 1061-8, Nov 2002. ISSN  
776 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368910> >.  
777
- 778 MIKAWA, A. Y.; TAGLIAVINI, S. A.; COSTA, P. I. CCR5 genotype and plasma beta-chemokine  
779 concentration of Brazilian HIV-infected individuals. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1333-7,  
780 Nov 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426633> >.  
781
- 782 MOCROFT, A. et al. CD8+,CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for  
783 monitoring HIV-1-infected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 14, n. 2,  
784 p. 158-62, Feb 1997. ISSN 1077-9450. Disponível em: <  
785 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052725> >.  
786
- 787 MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a  
788 challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 143-50,  
789 Mar 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12016434> >.  
790
- 791 MUNERATO, P. et al. Frequency of polymorphisms of genes coding for HIV-1 co-receptors  
792 CCR5 and CCR2 in a Brazilian population. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 4, p. 236-40, Aug 2003.  
793 ISSN 1413-8670. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533983> >.  
794
- 795 MUÑOZ-NIETO, M. et al. HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual  
796 infection with subtypes B and G. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, n. 2, p. 337-43, Feb 2008.  
797 ISSN 0889-2229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284328> >.  
798
- 799 NORTHFIELD, J. W. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+  
800 T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the  
801 subsequent viral load set point. **J Virol**, v. 81, n. 11, p. 5759-65, Jun 2007. ISSN 0022-538X  
802 (Print)

803 0022-538X (Linking). Disponible em: <  
804 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17376902](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17376902) >.  
805  
806

807 NOWROOZALIZADEH, S. et al. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-  
808 1 and HIV-2 infections. **J Infect Dis**, v. 201, n. 8, p. 1150-4, Apr 15 ISSN 1537-6613 (Electronic)  
809 0022-1899 (Linking). Disponible em: <  
810 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20199244](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20199244) >.  
811  
812

813 OSMANOV, S. et al. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic  
814 subtypes in the year 2000. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 2, p. 184-90, Feb 1 2002.  
815 ISSN 1525-4135 (Print)  
816 1525-4135 (Linking). Disponible em: <  
817 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11832690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11832690) >.  
818  
819

820 PEREYRA, F. et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide  
821 presentation. **Science**, v. 330, n. 6010, p. 1551-7, Dec 2010. ISSN 1095-9203. Disponible em:  
822 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051598> >.  
823

824 PERFETTINI, J. L. et al. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. **Cell Death**  
825 **Differ**, v. 12 Suppl 1, p. 916-23, Aug 2005. ISSN 1350-9047. Disponible em: <  
826 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719026> >.  
827

828 PICKER, L. J.; WATKINS, D. I. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. **Nat Immunol**, v.  
829 6, n. 5, p. 430-2, May 2005. ISSN 1529-2908 (Print)  
830 1529-2908 (Linking). Disponible em: <  
831 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15843796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15843796) >.  
832  
833

834 POLYAK, S. et al. Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-  
835 1 infection. **J Immunol**, v. 159, n. 5, p. 2177-88, Sep 1997. ISSN 0022-1767. Disponible em: <  
836 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278305> >.  
837

838 PULTE, E. D. et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. **Thromb**  
839 **Res**, v. 121, n. 3, p. 309-17, 2007. ISSN 0049-3848. Disponible em: <  
840 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555802> >.  
841

842 QUINONES-MATEU, M. E. et al. A dual infection/competition assay shows a correlation  
843 between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. **J Virol**,  
844 v. 74, n. 19, p. 9222-33, Oct 2000. ISSN 0022-538X (Print)  
845 0022-538X (Linking). Disponible em: <  
846 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10982369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10982369) >.  
847  
848

849 REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 6,  
850 p. 1253-65, Jun 2002. ISSN 0022-1317 (Print)  
851 0022-1317 (Linking). Disponible em: <  
852 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12029140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12029140) >.  
853  
854

- 855 RICH, J. D. et al. Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series.  
856 **Ann Intern Med**, v. 130, n. 1, p. 37-9, Jan 1999. ISSN 0003-4819. Disponível em: <  
857 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890848> >.  
858
- 859 ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr  
860 7 2000. ISSN 0036-8075 (Print)  
861 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
862 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10766634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766634) >.  
863  
864
- 865 S RODRIGUES, D. O. S. et al. Distribution of naive and memory/effector CD4 + T lymphocytes  
866 and expression of CD38 on CD8 + T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. **Braz J**  
867 **Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 161-5, Apr 2003. ISSN 1413-8670. Disponível em: <  
868 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959688> >.  
869
- 870 SA-FILHO, D. et al. Characterization of the full-length human immunodeficiency virus-1  
871 genome from recently infected subjects in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 9, p.  
872 1087-94, Sep 2007. ISSN 0889-2229. Disponível em: <  
873 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919103> >.  
874
- 875 SABINO, E. C. et al. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City,  
876 Brazil. **AIDS**, v. 10, n. 13, p. 1579-84, Nov 1996. ISSN 0269-9370. Disponível em: <  
877 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931795> >.  
878
- 879 SANABANI, S. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF  
880 recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p.  
881 368-77, Sep 2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: <  
882 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522378> >.  
883
- 884 SANABANI, S. S. et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1  
885 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p.  
886 e25869, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
887 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022460> >.  
888
- 889 SANTOS, A. F. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1  
890 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. 2011-9, Oct 2006. ISSN 0269-9370.  
891 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053347> >.  
892
- 893 SATHAR, M. A. et al. GB virus type C coinfection in HIV-infected African mothers and their  
894 infants, KwaZulu Natal, South Africa. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 3, p. 405-9, Feb 2004. ISSN  
895 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14727212> >.  
896
- 897 SCHULZE ZUR WIESCH, J. et al. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T  
898 regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with  
899 progressive disease. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1287-97, Feb 2011. ISSN 1098-5514. Disponível em:  
900 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047964> >.  
901
- 902 SOARES, E. A. et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**, v. 19 Suppl 4, p.  
903 S81-6, Oct 2005. ISSN 0269-9370 (Print)  
904 0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
905 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16249660](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16249660) >.  
906

907

908 \_\_\_\_\_ . Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1  
909 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 520-6, Dec 15 2003. ISSN  
910 1525-4135 (Print)  
911 1525-4135 (Linking). Disponível em: <  
912 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14657764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14657764) >.  
913  
914

915 SOARES, M. A. et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates  
916 in Brazil. **AIDS**, v. 17, n. 1, p. 11-21, Jan 3 2003. ISSN 0269-9370 (Print)  
917 0269-9370 (Linking). Disponível em: <  
918 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12478065](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12478065) >.  
919  
920

921 SRINIVASULA, S. et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of  
922 naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 262-70, Jul 2011. ISSN  
923 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562041> >.  
924

925 STEFANI, M. M. et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central  
926 West Brazil. **J Clin Virol**, v. 39, n. 3, p. 205-9, Jul 2007. ISSN 1386-6532. Disponível em: <  
927 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537671> >.  
928

929 STERLING, T. R. et al. Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and  
930 men. **N Engl J Med**, v. 344, n. 10, p. 720-5, Mar 8 2001. ISSN 0028-4793 (Print)  
931 0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
932 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11236775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11236775) >.  
933  
934

935 STREECK, H. et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses  
936 during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. **J**  
937 **Virol**, v. 83, n. 15, p. 7641-8, Aug 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)  
938 0022-538X (Linking). Disponível em: <  
939 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19458000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19458000) >.  
940  
941

942 STUMPTNER-CUVELETTE, P. et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and  
943 surface expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12144-9, Oct 2001. ISSN 0027-  
944 8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593029> >.  
945

946 SUCUPIRA, M. C. et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and  
947 B/F recombinants in Santos, Brazil. **AIDS Patient Care STDS**, v. 21, n. 2, p. 116-28, Feb 2007.  
948 ISSN 1087-2914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17328661> >.  
949

950 \_\_\_\_\_ . Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with  
951 CXCR4-utilizing strains. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30292, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível  
952 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291931> >.  
953

954 SUPAPOL, W. B. et al. Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but  
955 not maternal GB virus C infection. **J Infect Dis**, v. 197, n. 10, p. 1369-77, May 2008. ISSN  
956 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419578> >.  
957

- 958 TAROSSO, L. F. et al. Short communication: HIV type 1 subtype BF leads to faster CD4+ T cell  
959 loss compared to subtype B. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 30, n. 2, p. 190-4, Feb 2014.  
960 ISSN 1931-8405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906381> >.  
961
- 962 TATT, I. D. et al. The public health significance of HIV-1 subtypes. **AIDS**, v. 15 Suppl 5, p. S59-  
963 71, 2001. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816176> >.  
964
- 965 THORBORN, G. et al. Increased sensitivity of CD4+ T-effector cells to CD4+CD25+ Treg  
966 suppression compensates for reduced Treg number in asymptomatic HIV-1 infection. **PLoS**  
967 **One**, v. 5, n. 2, p. e9254, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
968 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174666> >.  
969
- 970 TILLMANN, H. L. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected  
971 patients. **N Engl J Med**, v. 345, n. 10, p. 715-24, Sep 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: <  
972 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547740> >.  
973
- 974 TOULOUMI, G. et al. Impact of HIV-1 subtype on CD4 count at HIV seroconversion, rate of  
975 decline, and viral load set point in European seroconverter cohorts. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 6,  
976 p. 888-97, Mar 2013. ISSN 1537-6591. Disponível em: <  
977 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223594> >.  
978
- 979 TSCHERNING, C. et al. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes  
980 of HIV-1. **Virology**, v. 241, n. 2, p. 181-8, Feb 1998. ISSN 0042-6822. Disponível em: <  
981 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9499793> >.  
982
- 983 TSUNEMI, S. et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-  
984 infected patients. **AIDS**, v. 19, n. 9, p. 879-86, Jun 2005. ISSN 0269-9370. Disponível em: <  
985 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905668> >.  
986
- 987 TUCKER, T. J. et al. Molecular characterization of the 5' non-coding region of South African  
988 GBV-C/HGV isolates: major deletion and evidence for a fourth genotype. **J Med Virol**, v. 59, n.  
989 1, p. 52-9, Sep 1999. ISSN 0146-6615. Disponível em: <  
990 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440808> >.  
991
- 992 TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32,  
993 Jan 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878383> >.  
994
- 995 VELAZQUEZ-CAMPOY, A. et al. Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from  
996 African viral subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6062-7, May 2001. ISSN  
997 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11353856> >.  
998
- 999 VENNER, C. M. et al. Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-  
1000 Saharan Africa. **EBioMedicine**, v. 13, p. 305-314, Nov 2016. ISSN 2352-3964. Disponível em:  
1001 < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27751765> >.  
1002
- 1003 VERGNE, L. et al. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-  
1004 subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug  
1005 resistance mutations in treatment-naive patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 3919-25, Nov  
1006 2000. ISSN 0095-1137 (Print)

1007 0095-1137 (Linking). Disponible em: <  
1008 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11060045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11060045) >.  
1009  
1010

1011 VLAHOV, D. et al. Prognostic indicators for AIDS and infectious disease death in HIV-infected  
1012 injection drug users: plasma viral load and CD4+ cell count. **JAMA**, v. 279, n. 1, p. 35-40, Jan 7  
1013 1998. ISSN 0098-7484 (Print)  
1014 0098-7484 (Linking). Disponible em: <  
1015 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9424041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9424041) >.  
1016  
1017

1018 WAHREN, B. et al. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human  
1019 immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 61, n. 6, p. 2017-23, Jun 1987. ISSN 0022-538X  
1020 (Print)  
1021 0022-538X (Linking). Disponible em: <  
1022 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3033328](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3033328) >.  
1023  
1024

1025 \_\_\_\_\_. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human  
1026 immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 61, n. 6, p. 2017-23, Jun 1987. ISSN 0022-538X.  
1027 Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3033328> >.  
1028

1029 WILKINSON, E.; ENGELBRECHT, S.; DE OLIVEIRA, T. History and origin of the HIV-1 subtype  
1030 C epidemic in South Africa and the greater southern African region. **Sci Rep**, v. 5, p. 16897,  
1031 Nov 2015. ISSN 2045-2322. Disponible em: <  
1032 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574165> >.  
1033

1034 WILKINSON, E. et al. Origin, imports and exports of HIV-1 subtype C in South Africa: A  
1035 historical perspective. **Infect Genet Evol**, Jul 2016. ISSN 1567-7257. Disponible em: <  
1036 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27421210> >.  
1037

1038 WILSON, J. D. et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during  
1039 primary infection. **AIDS**, v. 14, n. 3, p. 225-33, Feb 2000. ISSN 0269-9370. Disponible em: <  
1040 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716497> >.  
1041

1042 XIANG, J. et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV  
1043 infection. **N Engl J Med**, v. 345, n. 10, p. 707-14, Sep 2001. ISSN 0028-4793. Disponible em: <  
1044 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547739> >.  
1045

1046 YAMAGUCHI, T.; WING, J. B.; SAKAGUCHI, S. Two modes of immune suppression by  
1047 Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. **Semin  
1048 Immunol**, v. 23, n. 6, p. 424-30, Dec 2011. ISSN 1096-3618. Disponible em: <  
1049 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055883> >.  
1050

1051 YU, X. F. et al. Two subtypes of HIV-1 among injection-drug users in southern China. **Lancet**, v.  
1052 351, n. 9111, p. 1250, Apr 25 1998. ISSN 0140-6736 (Print)  
1053 0140-6736 (Linking). Disponible em: <  
1054 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9643749](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9643749) >.  
1055  
1056  
1057



1 Table 1: Patient characteristics by HIV-1 viral subtype category (Non-C vs. C-containing viral subtype).

<b>Patient Characteristics</b>	<b>Non-C (n=43)</b>	<b>C-containing (n=19)</b>	<b>p-value</b>
Age in years, mean (95% Confidence interval [CI])	33.5 (30.6 to 36.4)	34.4 (28.9 to 40.0)	0.74
Sex, % male (n/N)	90.7% (39/43)	60.0% (12/19)	0.004
HIV risk factor MSM <sup>1</sup> % (n/N)	81.4% (35/43)	50.0% (10/19)	0.01
Syphilis % (n/N)	27.9%(12/43)	15.0%(3/19)	0.27
CCR5 Delta 32 % (n/N)	7.0% (3/43)	19.0% (4/19)	0.13
GBVC + at Baseline, % (n/N)	14.0% (6/43)	25.0% (5/19)	0.28
Viral Load at Baseline, geometric mean <sup>2</sup> (95% CI)	11437 (6178 to 21172)	7669 (3422 to 17187)	0.44
Viral Load at Follow Up, geometric mean (95% CI)	11978 (6926 to 21063)	2866 (1012 to 8119)	0.008
CD4 at Baseline, geometric mean <sup>3</sup> (95% CI)	613 (542 to 694)	496 (405 to 607)	0.06
CD4 at Follow Up, geometric mean* (95% CI)	545 (479 to 621)	476 (346 to 654)	0.34

2 <sup>1</sup> MSM: man who has sex with men

3 <sup>2, 3</sup> Viral Load and CD4 were log transformed for statistical analysis and then exponentiated so that geometric means are presented along with 95% Confidence intervals (CI).

4

5 Table 2: Regression models for the effect of Non-C HIV-1 viral subtype (compared with C-containing subtypes) on activation in total CD4+ T cells and T  
6 cell maturation subsets. Coefficients (exponentiated into fold-effects where log scale was used) are presented with 95% confidence intervals (CI) and p-  
7 values.

Outcome (Marker)	time <sup>2</sup>	Scale <sup>3</sup>	Univariate Non-C Effect Size			Multivariable Adjusted Non-C Effect Size <sup>1</sup>		
			Coefficient or Fold Effect (95%CI) (p-value)			Coefficient or Fold Effect (95%CI) (p-value)		
<b>% CD38+ HLA-DR+ Total CD4+ T cells</b>								
Baseline		log	0.952	(0.609 to 1.488)	(p=0.83)	0.924	(0.563 to 1.516)	(p=0.75)
Follow Up		log	0.422	(0.264 to 0.674)	(p<0.001)	0.375	(0.237 to 0.594)	(p<0.0001)
Change		log	0.443	(0.313 to 0.628)	(p<0.0001)	0.406	(0.266 to 0.618)	(p<0.0001)
<b>% CD38+ HLA-DR+ Naïve CD4+ T cells</b>								
Baseline		raw	-0.060	(-0.292 to 0.172)	(p=0.61)	-0.009	(-0.281 to 0.263)	(p=0.95)
Follow Up		raw	-0.656	(-1.108 to -0.195)	(p=0.005)	-0.724	(-1.211 to -0.237)	(p=0.004)
Change		raw	-0.596	(-0.943 to -0.249)	(p=0.001)	-0.715	(-1.072 to -0.358)	(p<0.001)
<b>% CD38+ HLA-DR+ Central Memory CD4+ T cells</b>								
Baseline		raw	0.004	(-0.087 to 0.094)	(p=0.93)	0.019	(-0.084 to 0.125)	(p=0.70)
Follow Up		raw	-0.460	(-0.753 to -0.168)	(p=0.003)	-0.541	(-0.844 to -0.239)	(p=0.001)
Change		raw	-0.464	(-0.735 to -0.193)	(p=0.001)	-0.562	(-0.835 to -0.288)	(p<0.001)

<b>% CD38+ HLA-DR+ Transitional Memory CD4+ T cells</b>							
Baseline	log	1.136	(0.829 to 1.558)	(p=0.42)	1.190	(0.862 to 1.670)	(p=0.27)
Follow Up	log	0.758	(0.519 to 1.105)	(p=0.15)	0.693	(0.478 to 1.005)	(p=0.053)
Change	log	0.667	(0.475 to 0.935)	(p=0.02)	0.578	(0.400 to 0.833)	(p=0.004)
<b>% CD38+ HLA-DR+ Intermediate Memory CD4+ T cells</b>							
Baseline	log	0.773	(0.487 to 1.227)	(p=0.27)	0.717	(0.424 to 1.213)	(p=0.21)
Follow Up	log	0.584	(0.319 to 1.067)	(p=0.08)	0.529	(0.263 to 1.065)	(p=0.07)
Change	log	0.756	(0.496 to 1.150)	(p=0.19)	0.738	(0.441 to 1.235)	(p=0.24)
<b>% CD38+ HLA-DR+ Effector Memory CD4+ T cells</b>							
Baseline	log	1.125	(0.645 to 1.964)	(p=0.67)	1.129	(0.613 to 2.077)	(p=0.69)
Follow Up	log	0.419	(0.233 to 0.759)	(p=0.005)	0.357	(0.195 to 0.655)	(p=0.001)
Change	log	0.374	(0.241 to 0.580)	(p<0.0001)	0.316	(0.185 to 0.542)	(p<0.0001)
<b>% CD38+ HLA-DR+ Terminal Effector CD4+ T cells</b>							
Baseline	log	1.119	(0.486 to 2.576)	(p=0.79)	0.982	(0.371 to 2.597)	(p=0.97)
Follow Up	log	0.276	(0.122 to 0.621)	(p=0.002)	0.217	(0.087 to 0.543)	(p=0.002)
Change	log	0.246	(0.137 to 0.442)	(p<0.0001)	0.221	(0.109 to 0.450)	(p<0.0001)

8 <sup>1</sup> Multivariate models included the following covariates: HIV-1 RNA Viral Load at baseline, sex (male vs. female), sexual risk factor (men who have sex with men vs. other), CCR5 delta 32 genotype,  
9 GBVC status at baseline, and CD4 count at baseline.  
10 <sup>2</sup> Time: Specimens were drawn at a baseline visit and at a follow up visit, on average 7 months later. Change is the follow up value minus the baseline value.

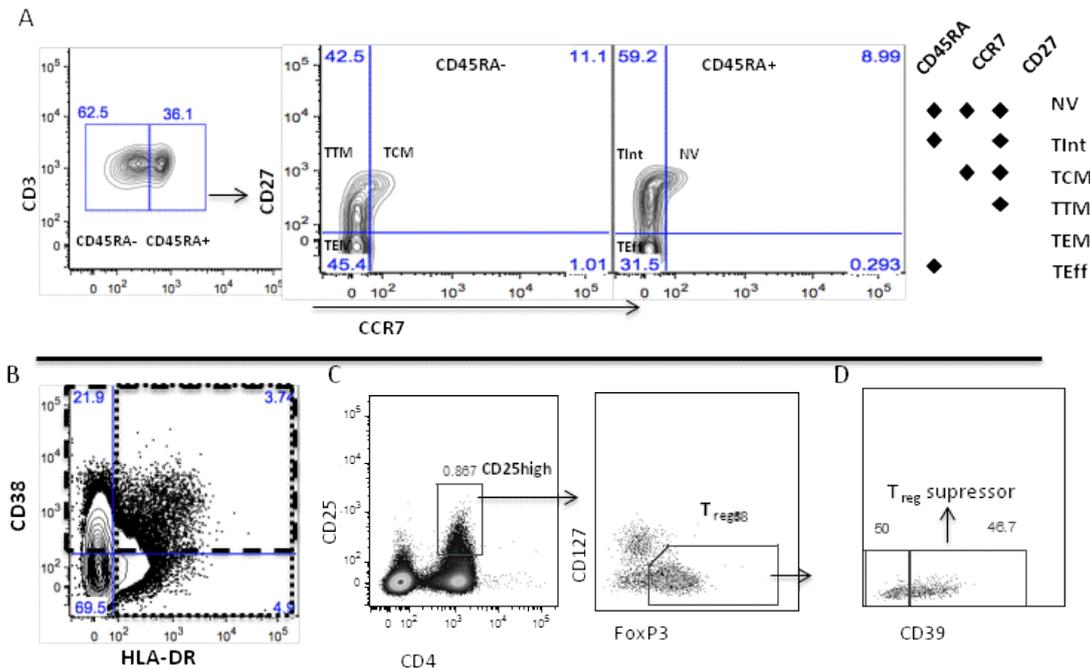
11 <sup>3</sup> Scale: where log transformation of the outcome was needed to ameliorate a skewed distribution (scale=log), coefficients were exponentiated to yield the fold-effect of a Non-C viral subtype on the  
12 outcome compared with C-containing viral subtype. Otherwise, raw, untransformed data were modeled (scale=raw), and the presented coefficients are interpreted as the raw difference in the outcome for  
13 Non-C viral subtype compared with C-containing viral subtype.  
14  
15  
16

17 Table 3: Regression models for the effect of Non-C HIV-1 viral subtype (compared with C-containing subtypes) on Regulatory CD4+ T cells.  
 18 Coefficients (exponentiated into fold-effects where log scale was used) are presented with 95% confidence intervals (CI) and p-values.  
 19

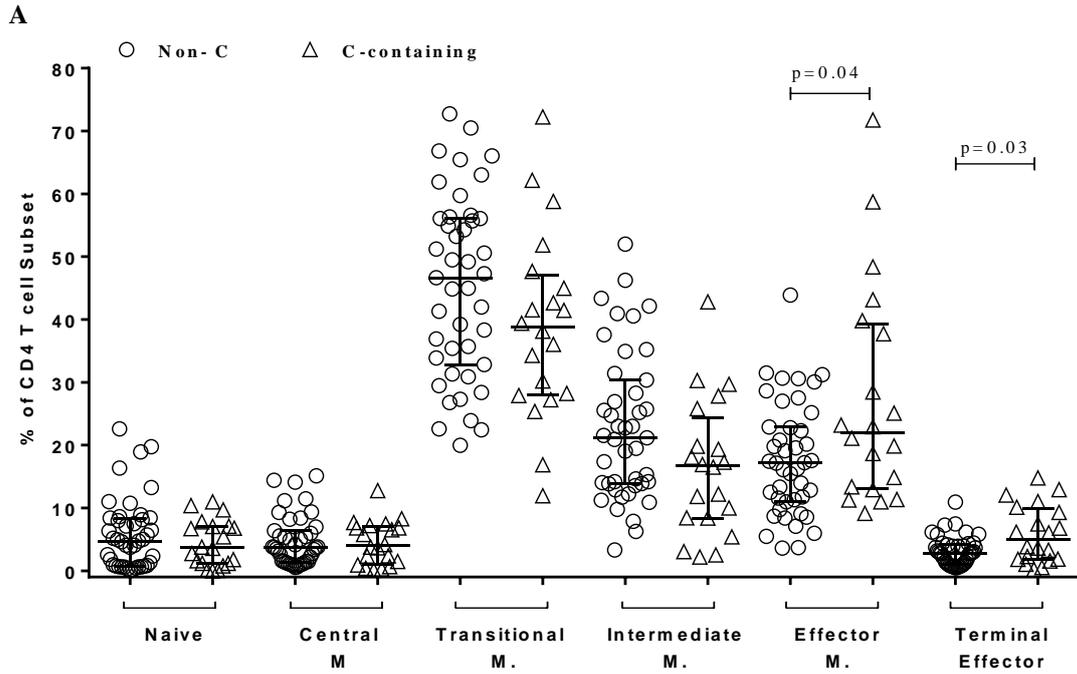
Outcome (Marker)	Time <sup>2</sup>	Scale <sup>3</sup>	Univariate Non-C Effect Size			Multivariable Adjusted Non-C Effect Size <sup>1</sup>		
			Coefficient or Fold Effect (95%CI) (p-value)			Coefficient or Fold Effect (95%CI) (p-value)		
<b>% CD4+ CD25high FoxP3+ Regulatory T cells</b>								
Baseline		log	5.241	(-0.878 to 11.360)	(p=0.09)	5.770	(-2.292 to 13.832)	(p=0.16)
Follow Up		log	11.269	(2.940 to 19.598)	(p=0.009)	8.719	(-1.053 to 18.491)	(p=0.08)
Change		log	6.485	(-1.814 to 14.785)	(p=0.12)	2.819	(-7.168 to 12.806)	(p=0.57)
<b>% CD4+ CD25high FoxP3+ CD39+ Suppressor T cells</b>								
Baseline		raw	0.685	(-12.271 to 13.642)	(p=0.92)	5.165	(-11.113 to 21.442)	(p=0.53)
Follow Up		raw	-6.538	(-21.181 to 8.105)	(p=0.38)	-12.854	(-28.919 to 3.210)	(p=0.11)
Change		raw	-2.500	(-13.677 to 8.678)	(p=0.66)	-11.338	(-25.323 to 2.646)	(p=0.11)

20 <sup>1</sup> Multivariate models included the following covariates: HIV-1 RNA Viral Load at baseline, sex (male vs. female), sexual risk factor (men who have sex with men vs. other), CCR5 delta 32 genotype,  
 21 GBVC status at baseline, and CD4 count at baseline.  
 22 <sup>2</sup> Time: Specimens were drawn at a baseline visit and at a follow up visit, on average 7 months later. Change is the follow up value minus the baseline value.  
 23 <sup>3</sup> Scale: where log transformation of the outcome was needed to ameliorate a skewed distribution (scale=log), coefficients were exponentiated to yield the fold-effect of a Non-C viral subtype on the  
 24 outcome compared with C-containing viral subtype. Otherwise, raw, untransformed data were modeled (scale=raw), and the presented coefficients are interpreted as the raw difference in the outcome for  
 25 Non-C viral subtype compared with C-containing viral subtype

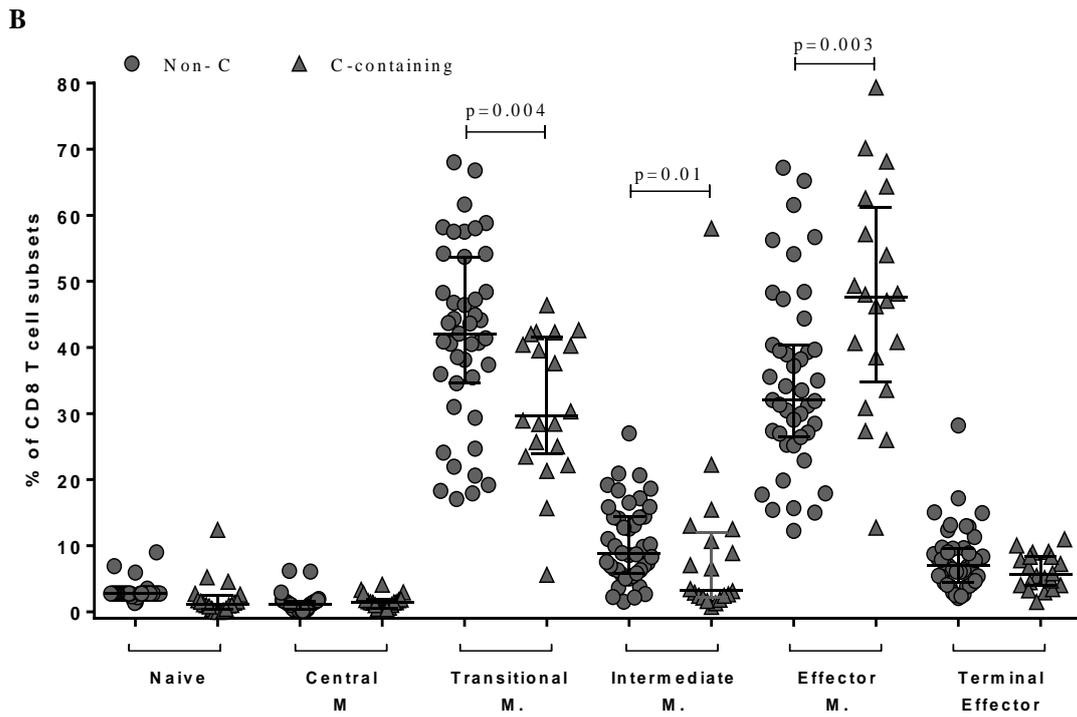
26 **Figure 1**  
 27



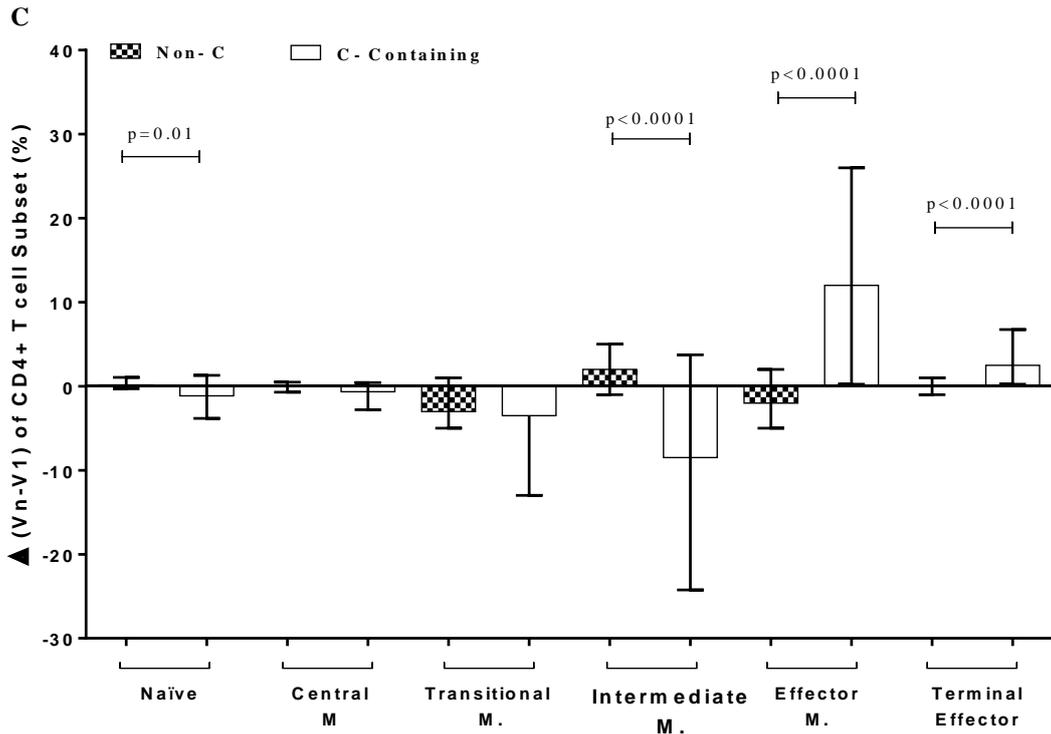
28  
 29 **Figure 1.** Representation and characterization of CD4+ and CD8+ T cells subsets. (A) After  
 30 defined the gates (Time x PE; Singlets, SSC x FSC, Lymphocytes subset; Live/Dead and the  
 31 gate SSCxCD3 and CD4+xCD8+T Cells) we analysed the expression of differentiation markers  
 32 including CD27. CD45RA and CCR7, through boolean combination, were considered the  
 33 following subsets: *Naive* (NV=CD45RA+CD27+CCR7+); *Central Memory* (TCM=CD45RA-CD27+CCR7+);  
 34 *Transitional Memory* (TTM=CD45RA-CD27+CCR7-); *Intermediate Memory* (TInt=CD45RA+CD27+CCR7-);  
 35 *Effector Memory* (TEM=CD45RA-CD27-CCR7-); *Terminal Effector* (TEff=CD45RA+CD27-CCR7-). total CD4+  
 36 and CD8+ T cells using flow cytometer. (B) Individual expression for total CD38 expression  
 37 ( ) and for total HLA-DR expression. (----). (C) Regulatory T Cells (T<sub>regs</sub>) were considered  
 38 Foxp3+ expressing on CD127<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> CD4+ T cells and (D) Treg cells expressing CD39  
 39 molecule (Treg suppressors).  
 40



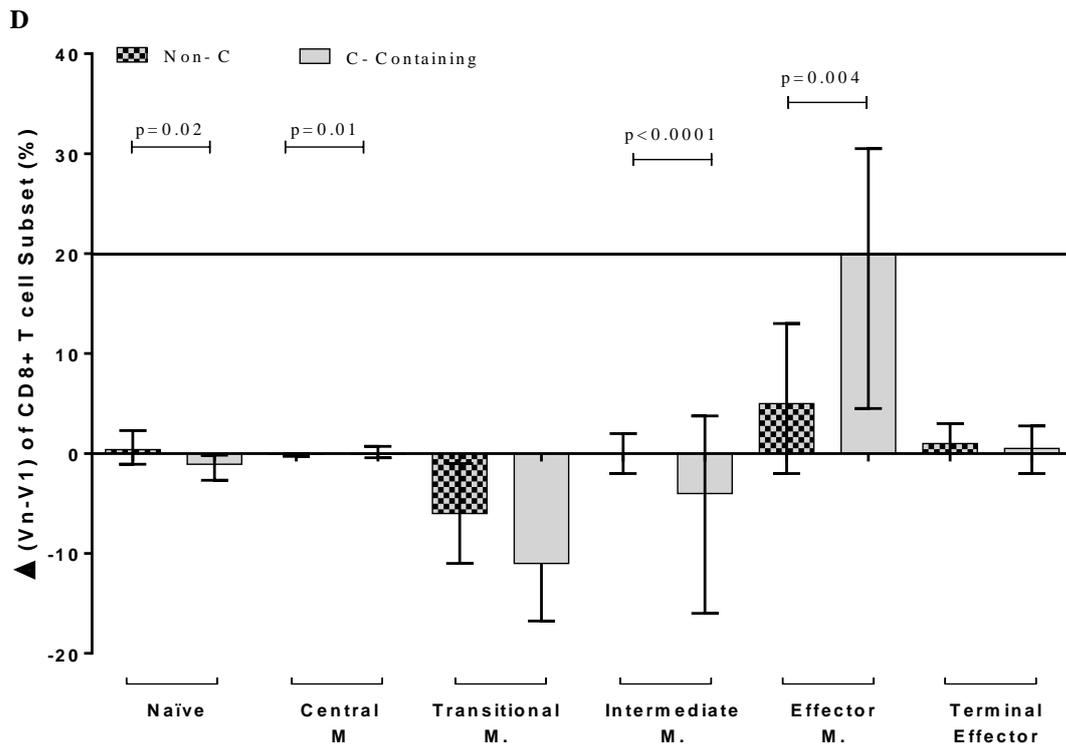
41



42

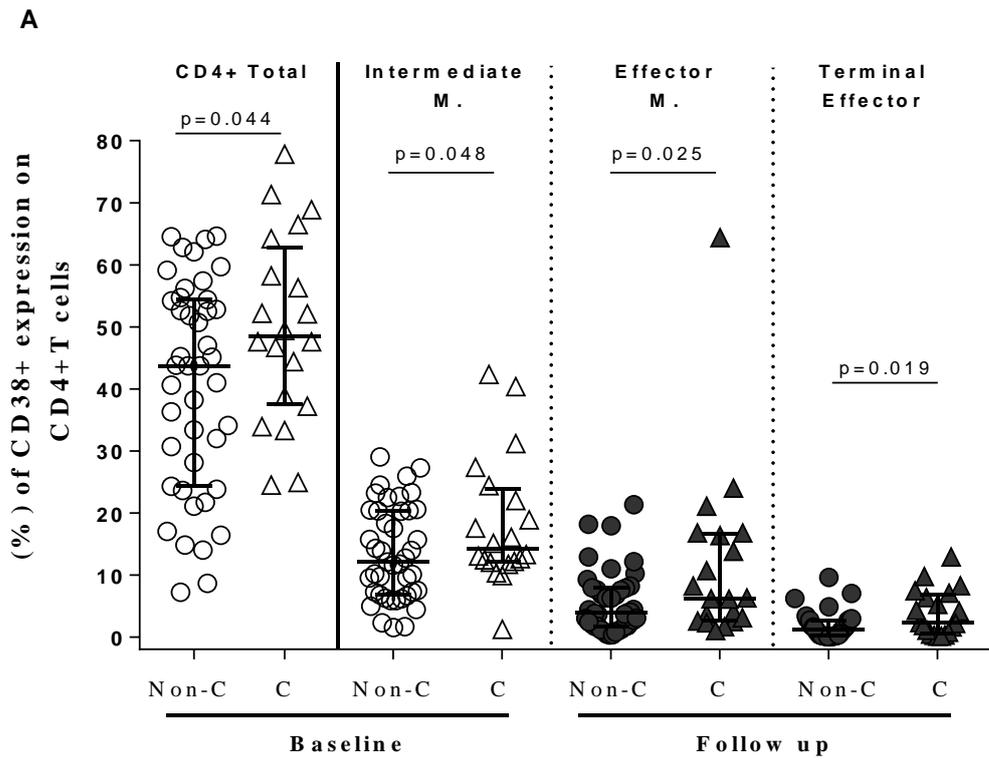


43

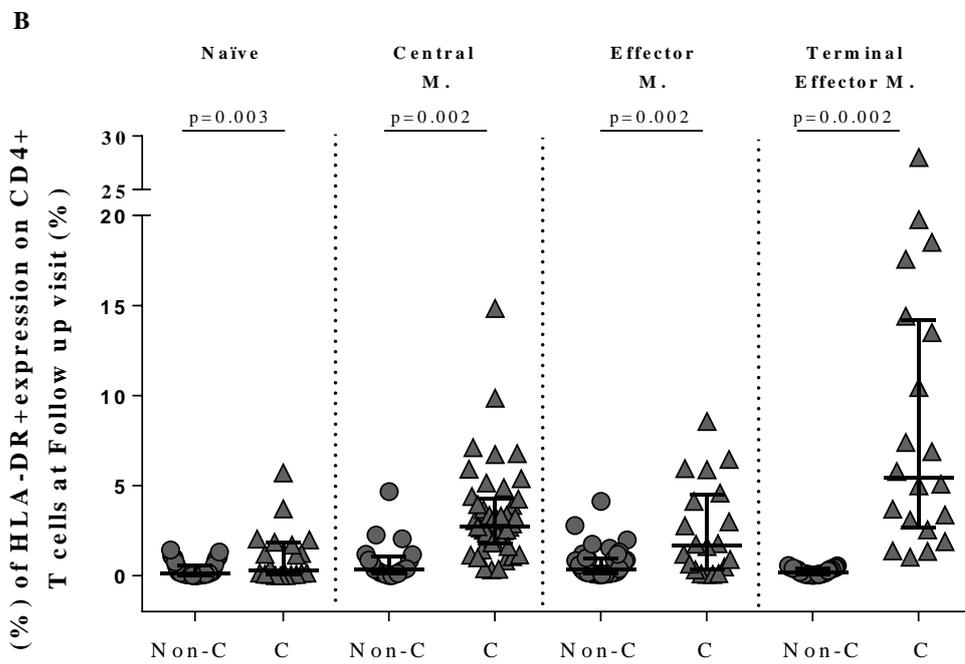


44

45 **Figure 2.** Profile of CD4+ and CD8 T cell maturation subsets. (A) % of CD4+ T cells subsets on  
 46 follow up visit comparing Non-C vs C- containing subtypes; (B) % of CD8+ T cells subsets on  
 47 follow up visit comparing Non-C vs C- containing subtypes; (C e D) % of delta (changes  
 48 overtime, Vn-V1) presented during the first year of infection by each group, comparing Non-C  
 49 vs C- containing subtypes, on CD4+ and CD8 +T cells, respectively. Graphics scatter dot plot  
 50 (A and B) and bars (C and D) showed lines as median and whiskers as interquartile (25-75%)  
 51 values.



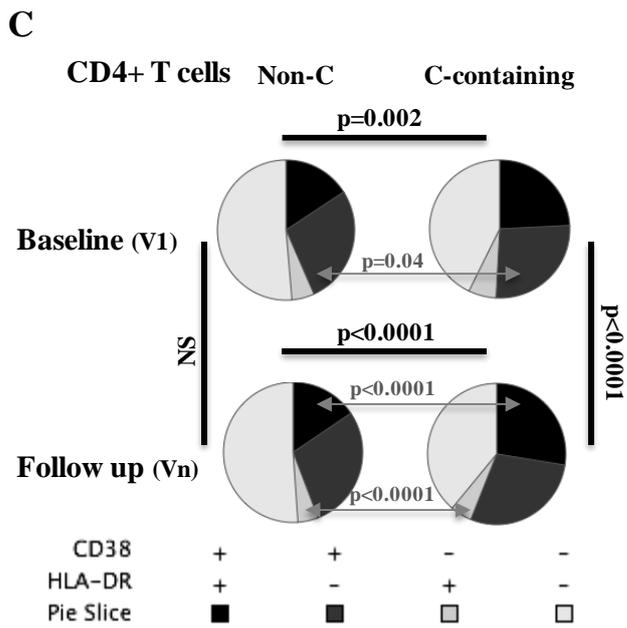
53



54

55

56 **Figure 3**

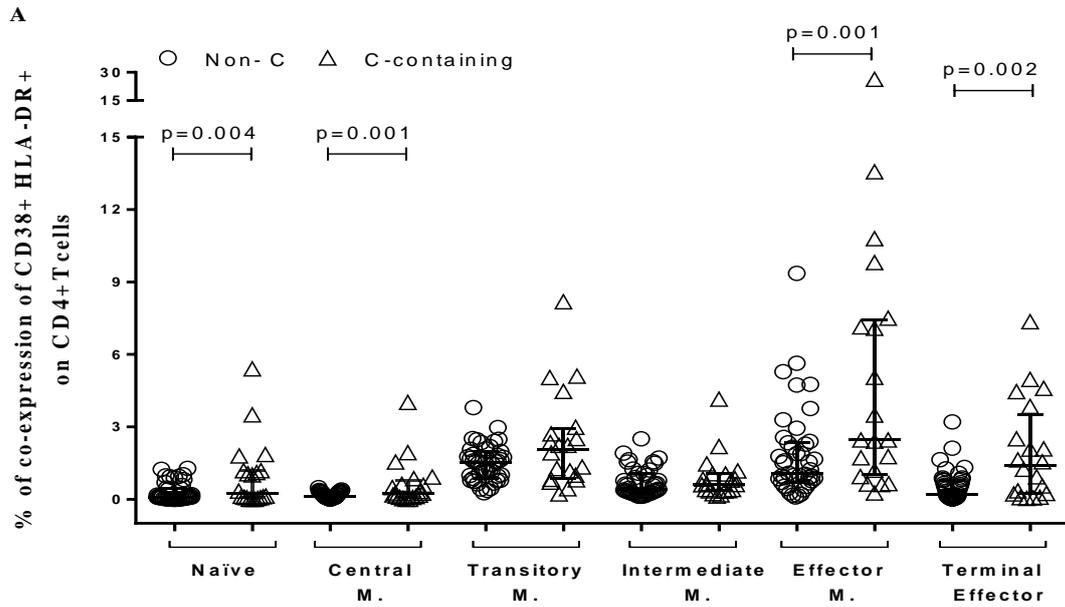


57

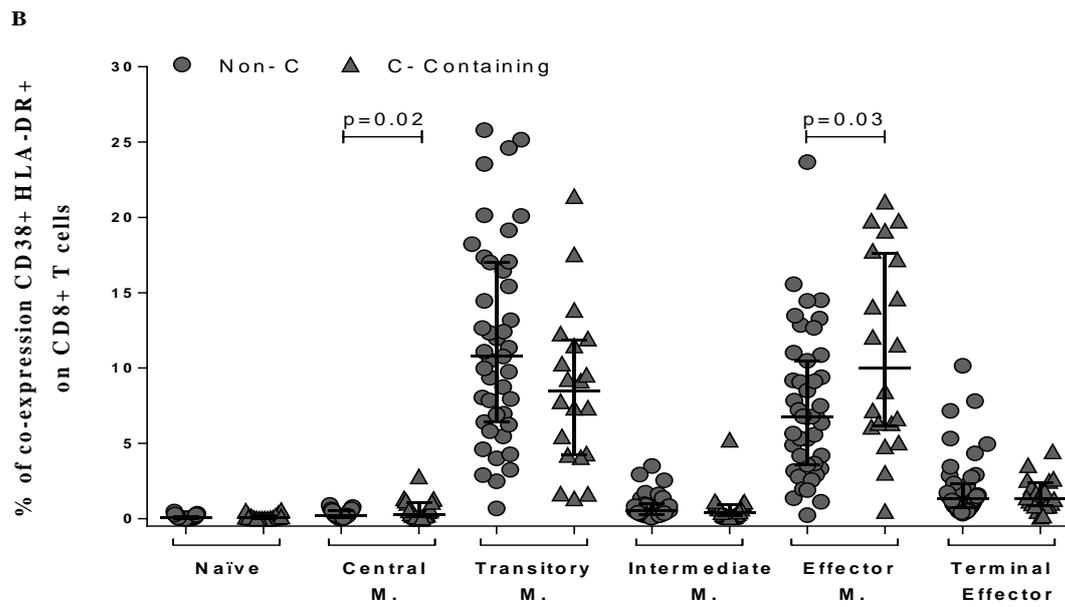
58 **Figure 3.** Profile of CD38+ and HLA-DR+ expression combined on CD4+ and CD8+ T cells.  
 59 Graphics scatter dot plot (A and B) showed lines as median and whiskers as interquartile (25-  
 60 75%) values. (A) % of CD38 expressing CD4+ T cells total and memory subsets and (B) % of  
 61 HLA-DR expressing CD4+ T cells naïve and memory subsets, only of those showed statistically  
 62 significant difference when comparing Non-C vs C- containing subtypes. (C) Pie charts  
 63 showing the different combinations of CD38 and HLA-DR expression on whole CD4+ T cells,  
 64 grey “P” values are for comparison among each combination of these markers and black “P”  
 65 values are for comparison among pie charts.

66

67 **Figure 4**

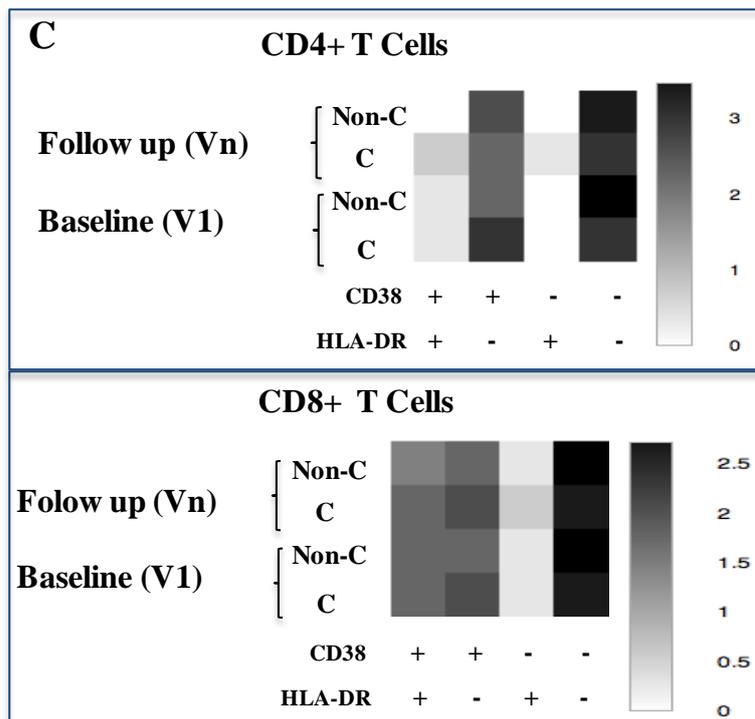


68

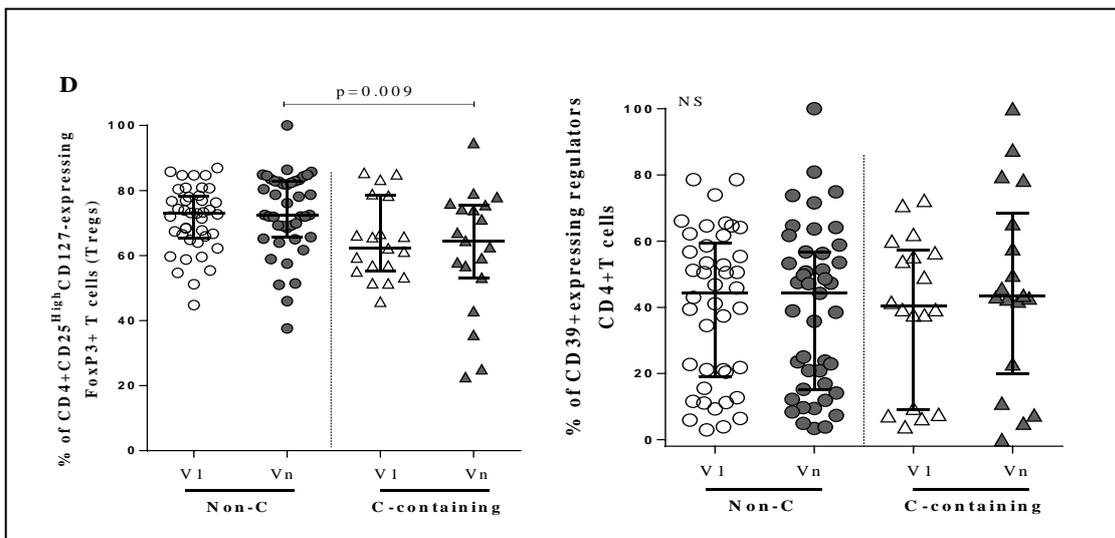


69

70



72



73

74 **Figure 4.** Co-expression of CD38+HLA-DR+ on CD4 and CD8 T cells and Regulators CD4+ T  
 75 cell. (A and B) % of co-expression of CD38+HLA-DR+ on different naïve and memory  
 76 compartments presented by CD4+ and CD8+ T cells, respectively, on follow up visit comparing  
 77 Non-C vs C- containing subtypes, adjusted linear regression model. (C) Pattern of CD38+ and  
 78 HLA-DR+ expression on CD4+ and CD8+ T cells showed by Non-C and C- containing groups.  
 79 (D) % of Regulators T cells (Foxp3+ expressing CD127<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> CD4+ T cells) and  
 80 expression of CD39+ Tregs (Tregs suppressors). Graphics scatter dot plot (A, B, and D) showed  
 81 lines as median and whiskers as interquartile (25-75%) values.