

LAÍS TEODORO DA SILVA

**Caracterização das células dendríticas utilizadas
em um ensaio clínico de fase I/II de vacina
terapêutica anti-HIV**

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

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dr^a Telma Miyuki Oshiro

**São Paulo
2017**

LAÍS TEODORO DA SILVA

**Caracterização das células dendríticas utilizadas
em um ensaio clínico de fase I/II de vacina
terapêutica anti-HIV**

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

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dr^a Telma Miyuki Oshiro

**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

Silva, Laís Teodoro da
Caracterização das células dendríticas utilizadas em um ensaio clínico de fase I/II
de vacina terapêutica anti-HIV / Laís Teodoro da Silva. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Telma Miyuki Oshiro.

Descritores: 1.Infecções por HIV 2. Cultura de vírus 3.Técnicas de cultura de
células 4.Células dendríticas 5.Apresentação do antígeno 6.Imunoterapia

USP/FM/DBD-016/17

Dedico esta tese:

*À Deus, por ser meu refúgio quando as águas tornam-se
turbulentas;*

*À meus amados pais Everaldo e Lupes por se doarem diariamente
durante toda a minha vida para que eu conseguisse priorizar
minha formação;*

À minhas irmãs Lupes e Luciméia, pela amizade e carinho;

Ao Gabriel e a Luísa, por tornarem minha vida mais leve e alegre;

*À Erika Fuji, por ter acreditado em meu potencial mais do que eu
mesma fui capaz de acreditar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ser meu melhor amigo e confidente.

À Dra Telma Oshiro, por ser sempre tão paciente, clara e correta e por manter o grupo unido como uma família. Bem mais do que uma orientadora você tem sido uma mãe que me guia pela mão pelos caminhos da ciência, transmitindo conhecimento e contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos que passaram ou ainda estão no grupo “vacina”: Alexandre, Ana Paula, Liã, Marcela e Nathália, por serem sempre tão prestativos. Especialmente à Bruna, por ter tantas qualidades que me faltam (paciência, delicadeza e perfeccionismo), à Wanessa, por ser meu braço esquerdo na bancada e Denise “Dassi”, por me mostrar que é possível ser nerd e descolada ao mesmo tempo.

À Paula e à Sadia, pelas agradáveis conversas (científicas ou não) e pelo auxílio com a citometria e o inglês, respectivamente.

À secretaria da pós-graduação e à todos do LIM-56, especialmente aos setores de citometria de fluxo, cultura celular, carga viral, lavagem, informática e secretaria.

À Katusção e Vanessão, por estarem tão perto, mesmo longe, por serem amigas tão queridas e tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pelo apoio institucional.

Aos membros da banca de qualificação, pela contribuição neste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos pacientes, pela participação no estudo.

À minha amada família, por serem tão iluminados.

Meus sinceros agradecimentos!

"Odes"

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

Ricardo Reis, heterônimo de Fernando Pessoa

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MÉTODOS.....	15
3.1 CASUÍSTICA.....	16
3.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	17
3.3 CULTURA VIRAL.....	18
3.3.1 Expansão de vírus em culturas de células autólogas e alógênicas	18
3.3.2 ELISA para detecção da proteína p24 do HIV	19
3.3.3 Inativação química do HIV	20
3.4 CULTURA CELULAR.....	21
3.4.1 Geração e maturação de MoDCs.....	21
3.4.2 Caracterização morfológica de monócitos e MoDCs	23
3.4.3 Caracterização fenotípica de monócitos e MoDCs.....	23
3.4.4 Análise da capacidade fagocítica das MoDCs imaturas	24
3.4.5 Ensaio de quimiotaxia.....	24

3.4.6	Dosagem das citocinas IL-12p70 e IL-10 em sobrenadante de cultura de MoDCs	25
3.4.7	Resposta linfoproliferativa.....	25
3.4.8	Avaliação da produção de citocinas por linfócitos autólogos estimulados pelas MoDCs	27
3.5	ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	29
3.5.1	Análise de viabilidade celular.....	29
3.5.2	Marcação de moléculas de superfície	29
3.5.3	Marcação de moléculas intracelulares	30
3.5.4	Estratégia de análise das células por citometria de fluxo ...	30
3.5.5	Análise booleana.....	31
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	CULTURA VIRAL.....	35
4.1.1	Comparação entre os sistemas autólogo e alogênico para expansão de isolados de HIV	35
4.1.2	Obtenção de HIV-AT-2 utilizando o sistema autólogo	39
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MONÓCITOS E MoDCs	41
4.2.1	Obtenção de monócitos e MoDCs, monitoramento de viabilidade e rendimento final das culturas	41
4.2.2	Caracterização morfológica e imunofenotípica dos monócitos e MoDCs	42
4.3	ANÁLISE FUNCIONAL DAS MoDCs	50
4.3.1	Avaliação da capacidade fagocítica de MoDCs imaturas.....	50
4.3.2	Capacidade migratória das MoDCs	51
4.3.3	Produção das citocinas IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs.....	52
4.3.4	Resposta proliferativa de linfócitos T autólogos	54

4.3.5 Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ autólogos.....	57
4.3.6 Indução de linfócitos autólogos com atividade citotóxica ...	66
4.3.7 Análise de correlação	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO.....	85
7. ANEXOS.....	87
8. REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
APCs	Células apresentadoras de antígeno (do inglês: <i>Antigen-Presenting Cells</i>)
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
AT-2	Aldrithiol-2
BFA	Brefeldina A
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CAPPesq	Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCR	Receptor para quimiocina CC
CD	Conjunto de diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i>)
cCD	Célula dendrítica convencional (do inglês: <i>conventional Dendritic Cell</i>)
CXCR	Receptor para quimiocina CXC
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CTL	Linfócito T citotóxico (do inglês: <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CVP	Carga Viral Plasmática
DC	Célula Dendrítica (do inglês: <i>Dendritic Cell</i>)
DC-SIGN	Molécula não integrina, que capta a molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidade Óptica

EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
Fas	Proteína membro da superfamília do TNF
FasL	Ligante do Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Fluorescência menos um (do inglês: <i>Fluorescence Minus One</i>)
FSC	Tamanho celular (do inglês: <i>forward scatter</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (do inglês: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GMP	Boas práticas de fabricação (do inglês: <i>Good Manufacturing Practice</i>)
Gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral altamente potente (do inglês: <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês: <i>Hepatitis C Virus</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano de classe II (do inglês <i>Human Leukocyte Antigen class II</i>)
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano (do inglês <i>Human T lymphotropic Virus</i>)
ICAM	Molécula de adesão intercelular (do inglês: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IQR	Varição interquartil (do inglês: <i>interquartile range</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTNP	Progressor lento (do inglês: <i>Long Term Non Progressor</i>)
MDDC	<i>Monocyte-Derived Dendritic Cell</i>

MFI	Intensidade de fluorescência mediana (do inglês: <i>Median Fluorescence Intensity</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIP-1	Proteína-1 inflamatória de macrófagos (do inglês: <i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>)
MoDC	Célula dendrítica derivada de monócito
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	Célula T <i>natural killer</i> (do inglês: <i>Natural Killer T cell</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	Tampão fosfato-salina (do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PD-1	Proteína de morte celular programada 1 (do inglês: <i>programmed cell death protein 1</i>)
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1 (do inglês: <i>Programmed Death-Ligand 1</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês: <i>phycoerythrin</i>)
PE-Cy	Ficoeritrina cianina (do inglês: <i>phycoerythrin-cyanine</i>)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PHA	Fitohemaglutinina (do inglês: <i>Phytohemagglutinin</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
SAB	Soro tipo AB humano
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>
SEB	Enterotoxina estafilocócica tipo B (do inglês: <i>Staphylococcal Enterotoxin B</i>)
SFB	Soro fetal bovino
Siglec-1	Lectina tipo 1 semelhante à Ig ligadora de ácido siálico (do inglês: <i>sialic acid binding Ig-like lectins type-1</i>)
SIV	Vírus da imunodeficiência símia (do inglês: <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>)

SSC	Granulosidade celular (do inglês: <i>side scatter</i>)
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	Linfócito T CD8 ⁺
TCR	Receptor de linfócito T (do inglês: <i>T-Cell Receptor</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i>)
TLR	Receptor tipo toll (do inglês: <i>Toll-Like Receptor</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNE	Tampão Tris/HCl, NaCl e EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Linfócitos T reguladores
TRIM5α	<i>Tripartite motif-containing protein 5</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do HIV.....	2
Figura 2- Curso natural da infecção pelo HIV-1.....	4
Figura 3- Estratégia de gates para análise das células em gráfico de pontos.	31
Figura 4- Estratégia de gates para definição de linfócitos T produtores de citocinas	32
Figura 5- Tempo necessário para as culturas tornarem-se p24 positivas e rendimentos dos isolados virais provenientes dos sistemas autólogo e alogênico.....	37
Figura 6- Perfil imunofenotípico das MoDCs	38
Figura 7- Imunogenicidade das partículas virais produzidas em sistemas autólogo ou alogênico	39
Figura 8- Monitoramento da viabilidade e rendimento celular	42
Figura 9- Perfil morfológico de monócitos e MoDCs	43
Figura 10- Análise imunofenotípica de monócitos e MoDCs	45
Figura 11- Análise imunofenotípica de MoDCs imaturas e MoDCs ativadas ..	48
Figura 12- Fagocitose de partículas de dextran-FITC por MoDCs imaturas ...	51
Figura 13- Habilidade migratória das MoDCs.....	52
Figura 14- Secreção de IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs	54
Figura 15- Proliferação de linfócitos T autólogos estimulados pelas MoDCs ativadas.....	56
Figura 16- Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD4 ⁺ cocultivados com MoDCs.....	59
Figura 17- Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD8 ⁺ cocultivados com MoDCs.....	61
Figura 18- Cinética da produção de citocinas por linfócitos TCD4 ⁺ autólogos estimulados por MoDCs	63
Figura 19- Cinética da produção de citocinas por linfócitos TCD8 ⁺ autólogos estimulados por MoDCs	65
Figura 20- Atividade citotóxica de linfócitos T autólogos após estímulo com MoDCs	67
Figura 21- Correlação entre a contagem de linfócitos TCD4 ⁺ e expressão de HLA-DR por monócitos	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização demográfica e dados laboratoriais dos sujeitos da pesquisa	16
Tabela 2- Rendimento de HIV-AT-2 autólogo	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Painel de anticorpos monoclonais utilizados para caracterização de monócitos e/ou MoDCs	23
Quadro 2- Painel de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da resposta específica em linfócitos autólogos	27
Quadro 3- Caracterização demográfica e dados laboratoriais dos indivíduos utilizados para o isolamento e expansão viral	36

RESUMO

Silva LT. **Caracterização das células dendríticas utilizadas em um ensaio clínico de fase I/II de vacina terapêutica anti-HIV** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

INTRODUÇÃO: A imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) constitui uma estratégia promissora para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV. Devido à sua notória plasticidade, populações heterogêneas de MoDCs podem ser obtidas *in vitro*, dependendo das condições da cultura. Conseqüentemente, a capacidade dessas células em secretar citocinas e expressar moléculas que participam do processo de apresentação antigênica (MHC, moléculas de adesão e coestimuladoras) é variável, podendo interferir no perfil e eficácia da resposta imune induzida pela terapia. Em nosso laboratório foi desenvolvido um protocolo clínico de vacinação terapêutica baseada em MoDCs e HIV autólogo inativado para o tratamento de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, não expostos à terapia antirretroviral. Deste modo tornou-se oportuna uma investigação *in vitro* mais aprofundada sobre a produção viral e as características das MoDCs utilizadas como produto vacinal. **OBJETIVOS:** Caracterizar o produto vacinal constituído por vírus autólogo e MoDCs de indivíduos infectados pelo HIV utilizados em imunoterapia, com relação a aspectos fenotípicos e funcionais. **MÉTODOS:** Foram incluídos no estudo 17 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, participantes de um estudo clínico de fase I/II de imunoterapia com MoDCs. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de leucaférese e parte do material foi utilizada para isolamento e expansão de HIV em sistema de cultura autólogo ou alogênico. Outra parte das PBMCs foi utilizada como fonte de monócitos para diferenciação em MoDCs imaturas que foram pulsadas ou não com o HIV quimicamente inativado pelo aldrithiol-2 (HIV-AT-2), denominadas respectivamente MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras, e posteriormente ativadas com citocinas pró-inflamatórias. MoDCs foram avaliadas fenotípica e funcionalmente quanto à expressão de moléculas de superfície, capacidade fagocítica, potencial migratório, produção de citocinas e habilidade em gerar resposta celular *in vitro*, avaliada por meio da capacidade em induzir proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica em linfócitos T autólogos. **RESULTADOS:** O rendimento de partículas virais foi mais elevado quando a expansão do HIV foi realizada em sistema alogênico em comparação ao sistema autólogo. Após estímulo para maturação, tanto MoDCs maduras quanto MoDCs HIV-AT-2 apresentaram aumento na expressão de moléculas de coestimulação, ativação e migração, comparado às MoDCs imaturas. Com relação à caracterização funcional, observamos que MoDCs foram capazes de fagocitar partículas de dextran-FITC, exibiram baixo potencial migratório e baixa produção de citocina polarizante para Th1. Ainda, observamos reduzida atividade citotóxica induzida tanto por MoDCs HIV-AT-2 quanto por MoDCs maduras. Por outro lado, MoDCs HIV-AT-2 promoveram proliferação de linfócitos T autólogos e maior polifuncionalidade em células TCD4⁺ e TCD8⁺ em comparação às MoDCs maduras. **CONCLUSÃO:** A produção de vírus autólogo através de sistema alogênico resulta em maior rendimento viral e potencial imunogênico. O produto vacinal composto por MoDCs HIV-AT-2 é capaz de induzir resposta polifuncional antígeno específica *in vitro*.

Descritores: infecções por HIV; cultura de vírus; técnicas de cultura de células; células dendríticas; apresentação do antígeno; imunoterapia.

ABSTRACT

Silva LT. **Characterization of dendritic cells used in an anti-HIV therapeutic vaccine phase I/II clinical trial.** [thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

INTRODUCTION: Immunotherapy based on monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) is a promising strategy for the treatment of HIV-infected individuals. Due their plasticity, using different combinations of cytokines cocktail *in vitro* it is possible to obtain a heterogeneous MDDCs population. Consequently the capacity of these cells to secrete cytokines and express molecules that participate in antigen presentation varies (MHC, adhesion and costimulatory molecules) and can interfere in the profile and efficacy of the immune response induced by this therapy. A clinical trial was conducted in our laboratory to evaluate a immunotherapy based on dendritic cells sensitized with autologous inactivated HIV for the treatment of antiretroviral naive chronically HIV-infected individuals. Therefore, it was a good opportunity to study deeply the virus production and expansion *in vitro* and to characterize MDDCs used as a vaccine. **OBJECTIVE.** To characterize MDDCs in context of their phenotype and function as well as investigating viral production and expansion in autologous and allogenic systems. **METHODS:** 17 patients underwent apheresis before vaccination and their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used for autologous virus production and expansion of the virus was carried out in both autologous and allogenic systems. Monocytes were differentiated into immature MDDCs that were pulsed/or not with autologous chemically (aldrithiol-2) inactivated HIV particles (HIV-AT-2). These pulsed (HIV-AT-2 MDDCs) and non-pulsed (mature MDDCs) cells were then activated by proinflammatory cytokines. Phenotypic (cell surface marker) and functional analysis (phagocytosis, transmigration and cytokines production) of MDDCs and their priming and stimulation of lymphocyte (proliferation, polyfunctionality and cytotoxicity) was performed using flow cytometry. **RESULTS.** Viral yield was higher when expanded in allogenic compared to autologous system. After stimulation with proinflammatory cytokines, both HIV-AT-2 MDDCs and mature MDDCs presented increased costimulation expression, activation and migratory molecules compared to immature MDDCs. Regarding to functional characterization, we observed that MDDCs were able to phagocytize FITC-Dextran and exhibited a low migratory potential and low production of Th1 polarizing response cytokines. Moreover we observed reduced cytotoxic activity induced by HIV-AT-2 MDDCs and mature MDDCs. On the other hand we also observed that HIV-AT-2 MDDCs were capable of inducing proliferation and polyfunctionality of autologous CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes compared to mature MDDCs. **CONCLUSION.** Allogenic system was found to be more efficient in increased viral yield in relation to autologous system. Besides, virus expanded in allogenic system showed a more immunogenic profile. Vaccine product (HIV-AT-2 MDDCs) was able to induce antigen specific polyfunctional response.

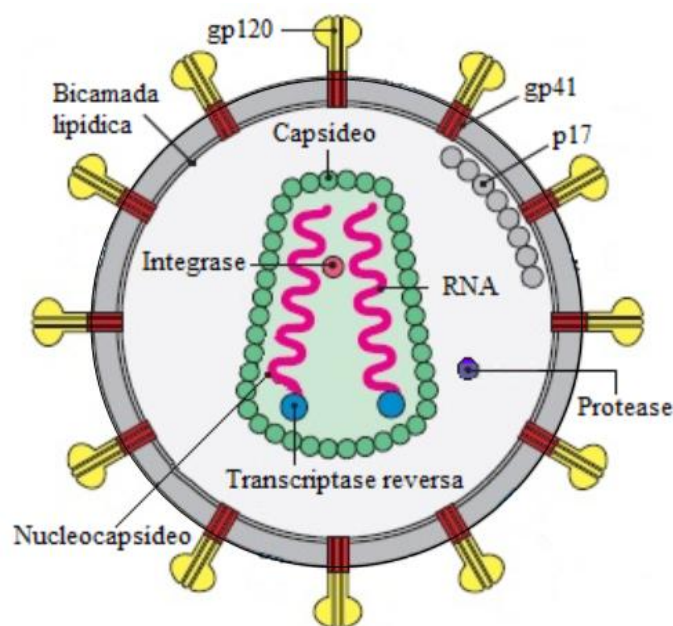
Descriptors: HIV infections; virus cultivation; cell culture techniques; dendritic cells; antigen presentation; immunotherapy.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida ou aids, pertence a família *Retroviridae* e é constituído por duas fitas simples idênticas de RNA.

O genoma completo do HIV consiste em nove genes, sendo três principais: *gag* que codifica proteínas estruturais internas (matriz, capsídeo, nucleocapsídeo e p6); o gene *pol* que codifica enzimas envolvidas na replicação e na integração do vírus (protease, transcriptase reversa e integrase); e o gene *env* que codifica a glicoproteína precursora do envelope gp160 (que será clivada em gp120 e gp41); e mais seis outros genes, são eles: *tat* e *rev*, que têm funções reguladoras essenciais para a replicação viral e *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* que são essenciais à eficiente produção de partículas virais^{1, 2}. A estrutura da partícula viral está representada na figura 1.

Figura 1- Estrutura do HIV



O HIV é constituído de um envelope de membrana fosfolipídica derivada da célula hospedeira. Vinculadas a ele estão as glicoproteínas gp41 e gp120. O envelope envolve a matriz (p17) que circunda o núcleo em forma de cone, composto pela proteína do capsídeo p24, no interior do qual estão localizadas as enzimas associadas, assim como o genoma viral. Fonte: modificado de Murphy, Travers e Walport, 2010².

Uma das estratégias utilizadas pelo HIV para penetrar na célula é por meio da interação da gp120 com a molécula CD4, presente principalmente na superfície de linfócitos T (CD4⁺) e também em células dendríticas e macrófagos. Para que ocorra a fusão e entrada do vírus nestas células, a

gp120 deve sofrer mudanças conformacionais para também ligar-se a receptores de quimiocinas como o CCR5 e o CXCR4. Após esta ligação, a gp41 do HIV medeia a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, permitindo que o genoma e as proteínas virais associadas penetrem no citoplasma da célula hospedeira.

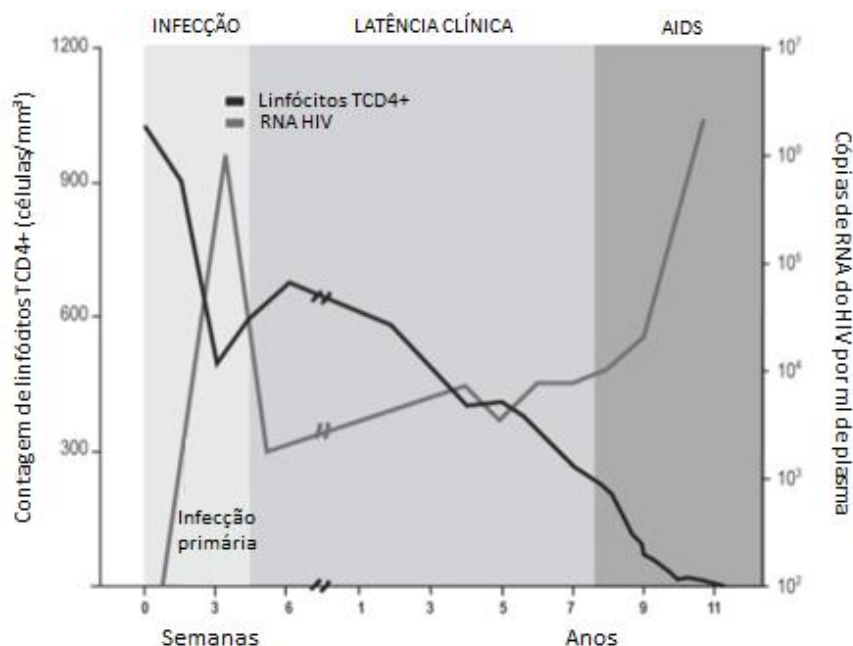
Subsequentemente, o RNA do vírus é convertido em DNA viral pela transcriptase reversa viral, o qual se integra ao genoma da célula devido à ação da integrase. Uma vez que a célula tenha sido ativada, o vírus utiliza a maquinaria celular para sua replicação, deste modo o genoma viral é transcrito em RNA mensageiro (RNAm) o qual propicia a síntese de proteínas e, posteriormente, a produção de novas partículas virais que são liberadas por brotamento através da membrana plasmática da célula.

Para tornarem-se maduras, as partículas virais passam por uma modificação morfológica que consiste na clivagem dos peptídeos precursores Gag e Gag-Pol pela protease viral, produzindo as enzimas e os componentes estruturais do HIV. Em adição, para compor seu envelope, além das glicoproteínas gp41 e gp120, as partículas virais imaturas carregam consigo a membrana lipídica oriunda da membrana plasmática da célula hospedeira e são liberadas da célula através de brotamento. As partículas maduras são então capazes de infectar células adjacentes, completando assim seu ciclo de replicação ^{1,2,3}.

A primeira comunicação oficial sobre casos de imunodeficiência ocorreu em 1981 nos Estados Unidos e foi descrita como sendo uma disfunção da imunidade celular, mas somente após três anos o HIV foi identificado como sendo o agente causador da aids (revisto por Laurindo-Teodorescu e Teixeira⁴ (2015)). Passados mais de 30 anos, o HIV/aids ainda representa um sério problema de saúde pública global, visto que estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵ apontam que até o final de 2015 havia pelo menos 36,7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. No Brasil, o primeiro caso de aids foi descrito em São Paulo em 1983 (revisto por Laurindo-Teodorescu e Teixeira⁴ (2015)) e atualmente somam-se 830.000 indivíduos infectados, com a incidência de novos casos notificados de 19,7 para cada 100.000 habitantes (Boletim Epidemiológico⁶ (2015)).

O curso natural da infecção pelo HIV pode ser dividido em três fases: a fase aguda, que é marcada por uma redução gradual da contagem de linfócitos TCD4⁺ acompanhada pelo aumento da carga viral plasmática (CVP). Esta fase pode ser assintomática ou apresentar sintomas que podem ser confundidos com um resfriado comum. Após três ou quatro semanas inicia-se uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTLs) e o aparecimento de anticorpos que levam à redução da CVP e aumento da contagem de células TCD4⁺, marcando a fase de latência e cronificação da infecção. Na maioria dos pacientes, após alguns anos ocorre a fase de progressão para a aids na qual é observada uma elevação na viremia plasmática, coincidindo com nova queda na contagem de linfócitos TCD4⁺ (na maioria das vezes < 200 células/ μ L) juntamente com o aparecimento de doenças oportunistas que levam o paciente ao óbito⁷. A figura 2 representa os eventos que marcam as diversas fases da infecção pelo HIV.

Figura 2- Curso natural da infecção pelo HIV-1



A linha preta representa a variação na contagem de linfócitos TCD4⁺ durante o curso da infecção pelo HIV-1 enquanto que a linha cinza caracteriza a evolução da carga viral plasmática em cada fase da doença. Modificado de <http://www.cdc.gov/globalaids/Resources/pmtct-care/pmtct-who-hhs-cmpntsM1.html>⁸

Introduzida no Brasil em 1996, a terapia antirretroviral de alta potência (HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), na qual é utilizada uma

combinação de três ou mais drogas destinadas a combater diferentes estágios da replicação viral, promoveu um aumento considerável na sobrevivência dos pacientes⁹. Desde então, a infecção pelo HIV passou a ser considerada uma situação crônica e controlável uma vez que, na maioria dos casos, o tratamento resulta no aumento da contagem de células TCD4⁺ e na redução da viremia plasmática a níveis indetectáveis^{1,10}.

Apesar do inquestionável sucesso obtido com o advento da HAART, obstáculos associados principalmente à sua utilização prolongada ainda precisam ser superados, como por exemplo, a adesão do paciente ao tratamento, que se não ocorrer de forma efetiva pode levar ao surgimento de resistência viral. Além disso, a toxicidade dos medicamentos pode levar ao surgimento de alterações metabólicas que aumentam o risco de doenças cardiovasculares (revisado por Orsega¹¹ (2015)). Adicionalmente, mesmo sob o uso da terapia combinada, a resposta inflamatória e a ativação imune celular persistem¹². Considerando ainda que a utilização do HAART não elimina a infecção, a interrupção do tratamento leva à replicação do HIV e aumento da carga viral plasmática em poucas semanas. Isso se deve à permanência do genoma viral integrado ao DNA de células hospedeiras, como por exemplo, células latentes como linfócitos TCD4⁺ de memória (revisado por Palmer, Josefsson e Coffin¹³ (2011)).

Considerando que uma resposta imune efetiva mediada por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ requer a apresentação antigênica por células apresentadoras de antígeno (APCs)¹⁴, uma abordagem conjunta ao uso da terapia antirretroviral seria a investigação de protocolos imunoterapêuticos baseados em células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*) com o intuito de estimular o sistema imune de indivíduos infectados pelo HIV.

Células dendríticas da pele foram inicialmente descritas por Paul Langerhans em 1868, contudo somente em 1973 os estudos de Ralph Steinman e Zanvil Cohn¹⁵ identificaram as DCs como as mais potentes células apresentadoras de antígenos, com capacidade de induzirem resposta primária permitindo assim o estabelecimento de uma memória imunológica^{16,17}. Essas células representam uma população heterogênea que pode ser encontrada em

múltiplos sítios incluindo o sangue, órgãos linfoides e em tecidos não linfóides^{18,19}.

De forma geral pode-se subdividir as DCs em DCs plasmocitoides e DCs convencionais (cDCs)²⁰. As DCs plasmocitoides são encontradas em zonas de células T de órgãos linfoides, no timo e no sangue²¹. Estas células têm capacidade de produzir grandes quantidades de IFN- α em resposta a infecções virais através da ativação das vias do receptor tipo *Toll* (TLR)²². As DCs convencionais são encontradas em quase todos os tecidos e linfonodos e atuam como sentinelas capazes de integrar múltiplos sinais do ambiente ativando linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺²³.

Em adição, monócitos podem se diferenciar em DCs *in vivo* em resposta à inflamação^{24,25}.

Apesar da diversidade de subtipos, as DCs possuem dois estágios de maturação bem caracterizados: DCs imaturas e DCs maduras. DCs imaturas estão presentes comumente no sangue, linfa, órgãos linfoides secundários e tecidos periféricos e tipicamente possuem alta capacidade de captura e processamento antigênico para formar complexos peptídeo-MHC. Após a internalização do antígeno, as DCs imaturas iniciam a migração para os linfonodos em resposta aos sinais de perigo provenientes dos patógenos por elas capturados. Durante a migração inicia-se o processo de maturação das DCs, caracterizado pelo aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), das moléculas coestimuladoras como a CD80 e CD86 e de adesão como as moléculas de adesão intercelular- 1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2, do inglês *Intercellular Adhesion Molecule- 1 e 2*)². Adicionalmente ocorrem modificações na expressão de quimiocinas e a reorganização de seu citoesqueleto. Assim, as DCs tornam-se eficientes células apresentadoras de antígenos capazes de ativar linfócitos T *naïve*²⁶ e direcionar a expansão clonal destas células, polarizando para os diferentes tipos de resposta T (por exemplo, Th1, Th2, Th17, Treg), dependendo do perfil de citocinas produzido e do microambiente onde se dá a apresentação antigênica²⁷.

No contexto da infecção pelo HIV-1 têm sido investigados indivíduos que, mesmo sem intervenção terapêutica, permanecem clínica e imunologicamente estáveis durante anos, apresentando carga viral baixa (<

5.000 cópias de RNA/mL) (progressores lentos - LTNP, do inglês *Long-Term Nonprogressors*) ou indetectável (controladores de elite)²⁸. Tanto em controladores de elite quanto em LTNPs foi observada atividade de CTLs com ampla reatividade contra epítomos virais (Gag p24)^{29,30}, tendo sido demonstrado que nestes indivíduos, o número de CTLs específicos para o HIV-1 é inversamente correlacionado à carga viral plasmática³¹. Além disso, estudos têm mostrado que em indivíduos HIV⁺ com progressão lenta para a aids a capacidade de linfócitos TCD8⁺ produzir simultaneamente múltiplas citocinas é mais elevada quando comparada a indivíduos que não controlam a infecção³².

Um dos mecanismos para o controle da replicação viral mediado por CTLs ocorre via receptor de células T (TCR). Esses receptores ligam-se aos peptídeos virais associados a moléculas do MHC de classe I na superfície de células infectadas e induzem a liberação de granzima e perforina levando à lise de células infectadas^{1,33}. Outro mecanismo para o controle da viremia que culmina na apoptose da célula infectada ocorre por meio da interação do ligante de Fas (FasL) presente na superfície de CTLs com as moléculas Fas da superfície de células alvo^{1,34}. Além disso, linfócitos TCD8⁺ podem bloquear a infecção de linfócitos TCD4⁺ de variantes virais com tropismo pelo correceptor CCR5 ao produzirem as quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, ligantes naturais do receptor de quimiocina CCR5^{1,35}.

A despeito de todos esses mecanismos a resposta CTL não é capaz de erradicar o HIV. Uma das razões para explicar esse fato é a de que o HIV infecta células estratégicas do sistema imune, prejudicando assim a resposta de linfócitos TCD4⁺ infectados e por consequência, a resposta de linfócitos TCD8⁺, ainda que não infectados. A falha funcional desse último facilita o escape viral e colabora para o colapso do sistema imune como um todo³⁶.

Além do prejuízo na resposta de linfócitos T, vários grupos têm observado alterações nas DCs durante a infecção pelo HIV-1. Schmidt e colaboradores³⁷ (2006) verificaram redução no número destas células na circulação de pacientes não expostos a terapia antirretroviral (*naïve*) e essa diminuição foi inversamente correlacionada à carga viral plasmática dos indivíduos estudados. Dillon e colaboradores³⁸ (2008) observaram fenótipo atípico indicando ativação parcial de DCs provenientes de indivíduos virêmicos. Em adição, as DCs podem apresentar produção espontânea de citocinas

inflamatórias³⁹ e baixa capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos⁴⁰.

As alterações funcionais observadas em DCs podem ser, em parte, explicadas pela infecção direta destas células pelo HIV-1. Apesar de ser um evento raro quando comparada à infecção por linfócitos TCD4⁺, tanto as linhagens do HIV-1 com tropismo para CCR5 como para CXCR4 podem infectar DCs utilizando esses correceptores⁴¹. Além disso, a captação de partículas virais por DCs, principalmente no estágio imaturo, pode ocorrer também por meio da interação da gp120 do HIV-1 com receptores de lectina do tipo C, como a langerina e em particular a molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica de DCs (DC-SIGN, do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) (revisto por Wu e Kewal Ramani⁴² (2006) e por Ahmed et al.²⁷ (2015)). Nesse caso, sem que ocorra a infecção das DCs, partículas virais não degradadas são transferidas via contato célula-a-célula (*trans*-infecção) para outras DCs e para linfócitos TCD4⁺, levando à infecção dessas células devido à interação entre a molécula DC-SIGN e a gp120 do HIV-1^{43,44}. Mais recentemente foi observado que em DCs ativadas a molécula siglec-1 (lectina tipo 1 semelhante a Ig ligadora de ácido siálico, do inglês: *sialic acid binding Ig-like lectins type-1*), reconhece o ácido siálico presente no HIV, internalizando-o e propiciando a transmissão viral a outras células⁴⁵.

A replicação do HIV-1 em diferentes estágios da infecção pode ser bloqueada nas DCs por meio de fatores de restrição do hospedeiro. Atualmente quatro fatores de restrição têm sido principalmente estudados em DCs: APOBEC3F/G, TRIM5 α , teterina e SAMHD1.

O APOBEC3F/G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F/G*) é uma enzima que, se incorporada às partículas em formação, provoca mutações no RNA do HIV-1 impossibilitando a integração proviral no genoma do hospedeiro⁴⁶; TRIM5 α (*tripartite motif-containing protein 5*) liga-se a proteínas do capsídeo inibindo a liberação do genoma viral na célula hospedeira⁴⁷; enquanto que a teterina inibe o processo de brotamento do HIV⁴⁸; e finalmente a molécula SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) bloqueia a transcrição reversa diminuindo a oferta de

dinucleotídeos fosfatados necessários para que ocorra a síntese do DNA viral⁴⁹.

Dada a capacidade das DCs em estimular linfócitos T *naïve*, essas células são cruciais para o sucesso de uma imunoterapia que vise à indução de resposta imune celular. Imunoterapias utilizando DCs têm sido avaliadas há mais de duas décadas em ensaios clínicos, inicialmente para o tratamento do câncer em estudos piloto⁵⁰ e posteriormente em ensaios de fase I, II e III (revisto por Anguille et al.⁵¹ (2014)), tendo se mostrado uma intervenção segura e bem tolerada e, em alguns casos, promovendo resposta imune antitumoral e aumento da sobrevida.

Foi observada regressão na metástase em seis indivíduos de uma coorte de 11 pacientes com melanoma avançado, tratados com DCs pulsadas com antígenos tumorais⁵². Mais recentemente Schreibelt e colaboradores⁵³ (2016) correlacionaram o aumento da reposta de linfócitos T citotóxicos *in vivo* com a não-progressão do melanoma metastático (estágio IV ou estágio IIIC irreversível) em três de 14 pacientes vacinados com DCs.

Em contrapartida, resultados observados no contexto da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) *in vivo* mostraram que DCs induziram uma resposta anti-HCV transitória⁵⁴ ou de baixa magnitude em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺⁵⁵. No contexto da infecção pelo HIV, DCs adequadamente ativadas poderiam melhorar a função deteriorada do sistema imune, regulando importantes funções antivirais, tais como a mediação de anticorpos neutralizantes, citotoxicidade, lise dependente do complemento, entre outras.

O primeiro ensaio clínico utilizando imunoterapia com DCs em indivíduos infectados pelo HIV-1 foi publicado em 1998 (Kundu et al⁵⁶). Desde então, diversos ensaios clínicos utilizando imunoterapia com DCs em indivíduos HIV⁺ foram concluídos⁵⁷⁻⁷⁰ ou estão em andamento⁷¹. Apesar da heterogeneidade dos protocolos utilizados até o presente, que variam quanto à quantidade de células, número de doses que compõem a vacina, tipo de antígeno e estímulo utilizado para pulsar e ativar as DCs, via de administração, assim como o monitoramento das respostas clínicas e imunes, geralmente as vacinas apresentaram-se seguras e bem toleradas, contudo, apenas alguns grupos observaram queda na carga viral plasmática dos pacientes imunizados.

Para sua utilização em imunoterapia, tendo em vista que o número de DCs circulantes é muito baixo, a obtenção de DCs em larga escala pode ser realizada *in vitro* por meio do cultivo de progenitores hematopoiéticos CD34⁺⁷². Outro método alternativo que permite a geração de quantidades consideráveis de DCs envolve sua diferenciação a partir de monócitos CD14⁺ provenientes do sangue periférico²⁴. Foi demonstrado que DCs obtidas a partir de monócitos (MoDCs), do mesmo modo que as DCs CD34⁺, apresentam elevada capacidade de apresentação antigênica e de estimulação de linfócitos T *naïve*⁷³, propiciando seu uso em ensaios clínicos de imunoterapia. De fato, por sua facilidade de obtenção com relação às células CD34⁺, os monócitos são os precursores mais comumente utilizados para a obtenção de células dendríticas.

Para a separação dos monócitos a serem utilizados para a diferenciação em DCs, podem ser empregadas as técnicas de elutriação⁷⁴, purificação positiva por meio de *microbeads* CD14⁺ e a aderência ao plástico⁷⁵, esta última com a vantagem de ser uma técnica de baixo custo.

DCs diferenciadas a partir de monócitos em meio de cultura contendo IL-4 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) podem então ser carregadas com o antígeno de interesse, e em seguida tratadas com estímulos exógenos como lipopolissacarídeos (LPS), CD40 ligante (CD40L) ou coquetel de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (com a adição ou não de prostaglandina E₂), para induzir a completa maturação das células para serem finalmente inoculadas no paciente (revisto por Oshiro, de Almeida e da Silva Duarte⁷⁶ (2009)).

Outro importante aspecto para o desenvolvimento de uma vacina envolve a escolha do antígeno capaz de promover uma melhor resposta imune específica. Neste contexto, diversos tipos de antígenos de HIV têm sido utilizados para pulsar DCs com a finalidade de utilizá-las em uma vacina terapêutica. Alguns imunógenos comumente empregados são: nanopartículas, como por exemplo, dendrímeros de carboxilase carreando peptídeos derivados do HIV-1⁷⁷; vetores virais como o adenovírus⁷⁸; RNAm codificando proteínas do HIV-1 como Gag-p24 e Nef⁷⁹; proteínas do HIV-1 biologicamente ativas, como Tat⁸⁰; peptídeos sintéticos derivados de proteínas estruturais do HIV-1 (Gag,

Pol, Env)⁶⁰; HIV-1 inteiro autólogo inativado pelo calor^{64,81} e HIV-1 inteiro autólogo quimicamente inativado pelo aldrithiol-2⁵⁷.

O uso de vírus inteiro como fonte de antígenos do HIV apresenta como vantagem a disponibilidade de um repertório extenso de antígenos virais. Além disso, por preservar a integridade funcional e conformacional das proteínas da superfície viral, o processo de inativação química do HIV utilizando aldrithiol-2 (AT-2) tem se mostrado interessante⁸². O AT-2 provoca modificações covalentes nas proteínas de dedo de zinco presentes no nucleocapsídeo do HIV, mas mantém íntegra a estrutura do envelope viral, disponibilizando assim um repertório diverso de epítomos à célula apresentadora de antígeno, ao mesmo tempo em que a infectividade do vírus é eliminada⁸³.

Para a expansão viral *in vitro* podem ser utilizadas células oriundas do próprio paciente HIV⁺ ou de indivíduos saudáveis. O HIV obtido a partir de cocultivo com linfócitos TCD4⁺ de doadores saudáveis mostrou-se seguro quando utilizado em imunoterapia para estimular MoDCs⁶⁷. Além disso, em um estudo desenvolvido por nosso grupo, cujos os resultados foram publicados e estão apresentados no presente trabalho, foi observado que o rendimento de partículas virais expandidas em células alogênicas foi mais elevado em comparação ao obtido em células autólogas. Contudo, para serem utilizadas como substrato para replicação viral deve-se garantir a ausência de patógenos nas células dos indivíduos supostamente saudáveis⁸⁴.

No período de maio de 2011 a fevereiro de 2014, foi desenvolvido em nosso laboratório um protocolo de vacinação terapêutica para o tratamento de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, sem uso de terapia antirretroviral, intitulado “Estudo de Fase II de vacina terapêutica para HIV com células dendríticas autólogas primadas com vírus autólogos inativados”, coordenado pelo Prof. Dr. Alberto Duarte, com base no trabalho de Lu et al.⁵⁷ (2004). Lu e colaboradores verificaram uma diminuição prolongada (>90%) da carga viral plasmática em 8 dos 18 indivíduos vacinados e esta redução da CVP foi correlacionada à detecção de resposta específica para o HIV em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺.

As DCs utilizadas em nosso protocolo foram produzidas em condição GMP (do inglês, *Good Manufacturing Practice*) e o controle de qualidade foi

realizado através do perfil fenotípico, viabilidade e controle microbiológico. Os critérios para a liberação do produto foram: percentual de expressão de CD83 ou CD40 acima de 50%, mínimo de 70% de células viáveis e ausência de bactérias ou leveduras.

Embora o perfil fenotípico das MoDCs tenha sido determinado como critério de qualidade para liberação do produto vacinal, antes da administração da vacina, para aprofundar o conhecimento referente às características das DCs utilizadas como produto vacinal consideramos importante que outros parâmetros fossem analisados *in vitro*. Assim este trabalho teve como proposta avaliar o produto vacinal quanto à expressão de moléculas de superfície em monócitos e MoDCs, a capacidade fagocítica, migratória e o perfil de citocinas produzido pelas MoDCs, assim como a habilidade das MoDCs em induzir resposta específica em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autólogos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o produto vacinal constituído por vírus autólogo e as MoDCs provenientes de indivíduos infectados pelo HIV utilizadas em um protocolo de imunoterapia com relação a aspectos fenotípicos e funcionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a produção de partículas virais expandidas em sistema autólogo *versus* sistema alogênico com relação a:

- Eficiência para a expansão viral;
- Rendimento de partículas virais;
- Potencial em induzir resposta imune.

Caracterizar MoDCs HIV-AT-2 (células dendríticas derivadas de monócitos pulsadas com HIV inativado com AT-2 e ativadas com o coquetel de maturação) e MoDCs maduras (células dendríticas derivadas de monócitos ativadas com o coquetel de maturação) com relação a:

- Perfil da expressão de moléculas de superfície
- Capacidade migratória;
- Produção de citocinas;
- Capacidade de induzir resposta específica *in vitro* em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autólogos, avaliada através de linfoproliferação, produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e MIP-1 β e atividade citotóxica, mensurada por meio da expressão do marcador de desgranulação CD107a.

3.MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram incluídas no presente estudo amostras obtidas mediante procedimento de aférese de 17 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1, participantes do protocolo clínico de vacinação terapêutica, registrado e aprovado no Comitê de Ética sob o número 0791/09, de 04 de Novembro de 2009. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).. O presente estudo tem a aprovação da CAPPesq, de acordo com o parecer número 188.165 (APÊNDICE B).

As características demográficas e dados laboratoriais destes indivíduos estão representados na tabela 1.

Tabela 1- Caracterização demográfica e dados laboratoriais dos sujeitos da pesquisa

Código do paciente	Sexo	Idade (anos)	Tempo do diagnóstico (anos)	CVP (cópias/mL)	Subtipo do HIV	Tropismo viral	TCD4 ⁺ (células/ μ L)		Protocolo de ativação
							Basal	Nadir	
1	M	32	11	6.983	B	R5	460	474	TNF- α , IL-6 e IL-1 β
2	M	55	5	27.575	B	R5	473	473	TNF- α , IL-6 e IL-1 β
3	M	42	6	38.505	B	R5	423	423	TNF- α , IL-6 e IL-1 β
4	M	32	6	53.309	BC	R5	306	481	TNF- α , IL-6 e IL-1 β
5	M	40	4	27.564	B	R5	566	648	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
6	F	39	6	2.931	B	R5	395	439	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
7	F	32	12	3.743	C	R5	412	515	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
8	M	27	14	7.280	B	R5	407	707	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
9	M	24	1	23.187	B	R5	351	586	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
10	M	41	1	16.724	B	R5	320	442	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
11	M	22	6	3.538	B	R5X4	544	810	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
12	M	26	1	34.971	B	R5	291	419	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
13	M	35	9	27.418	B	R5	428	583	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
14	F	32	1,5	18.532	BF1	R5	465	584	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
15	M	28	1	40.843	F1	R5	329	427	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
16	F	39	15	1.237	B	R5X4	458	458	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
17	M	40	2	30.654	B	R5	371	427	TNF- α , IL-6, IL-1 β + HIV
Mediana (IQR)		32 (12)	6 (7,5)	23187 (23671)			412 (109)	474 (145)	

IQR: variação interquartil; M: masculino; F: feminino; CVP: carga viral plasmática; R5: CCR5; X4: CXCR4. Os dados basais de TCD4⁺ e CVP referem-se a coletas de sangue efetuadas em datas próximas à aférese.

Com o objetivo de comparar os sistemas de expansão viral autólogo e alogênico, foram utilizadas amostras de sangue coletado em tubos contendo heparina de outros 11 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1.

Foram incluídos no estudo indivíduos com idade mínima de 18 anos; soropositividade para o HIV-1 de pelo menos um ano; *naïve* de tratamento antirretroviral; ausência de sinais clínicos definidores de aids; ausência de gravidez; contagem de linfócitos TCD4⁺ de no mínimo 350 células/ μ L; carga viral plasmática mínima de 1.000 cópias/mL e ausência de outras doenças crônicas, infecções oportunistas ou alguma condição que pudesse induzir disfunção imune.

3.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

O produto de aférese (cerca de 130 mL) foi diluído 1:2 em solução salina fisiológica (0,9% de NaCl) e separado através de gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque Premium (GE Healthcare®). Após centrifugação a 800 x g por 30 min a temperatura de 15 °C, a nuvem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foi removida e submetida a duas lavagens a 600 x g por 10 min a 15 °C.

As PBMCs obtidas foram quantificadas e avaliadas por microscopia óptica para o cálculo da viabilidade celular em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de Trypan 0,4% (Sigma - Aldrich®). Alíquotas contendo 50×10^7 PBMCs foram destinadas à depleção de células CD8⁺, para o início da cultura viral e o restante foi congelado à concentração de 5×10^7 /mL em meio contendo 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO - Sigma®) em soro fetal bovino certificado (SFB - Gibco Life Technologies®) para a diferenciação de monócitos em DCs. As células foram conservadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

3.3 CULTURA VIRAL

3.3.1 Expansão de vírus em culturas de células autólogas e alogênicas

As alíquotas contendo 50×10^7 PBMCs foram submetidas à depleção de células CD8⁺ por meio de seleção positiva com *beads* imunomagnéticas (EasySep - StemCell Technologies®) segundo orientação do fabricante. Brevemente, para cada 10×10^7 PBMCs foram adicionados 1000 µL de tampão para EasySep (EasySep – StemCell Technologies®) e 100 µL do coquetel para seleção positiva de CD8 (EasySep – StemCell Technologies®). Após incubação em temperatura ambiente por 15 min foram adicionados 100 µL das nanopartículas magnéticas EasySep (Magnetic Nanoparticles - StemCell Technologies®) seguidos por nova incubação à temperatura ambiente por 10 min.

Posteriormente, o volume foi completado para 2500 µL com o tampão EasySep, e o tubo de poliestireno foi inserido na base magnética EasySep (EasySep – StemCell Technologies®) e mantido à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, o tubo foi vertido juntamente com o magneto para a captação das células CD8⁻, uma vez que as células CD8⁺ permaneceram aderidas ao tubo devido ao campo magnético criado entre o magneto e as nanopartículas. Em seguida, o tubo foi retirado da base magnética e recebeu mais 2500 µL do tampão EasySep, sendo repetido o procedimento de incubação e obtenção da suspensão celular por mais duas vezes. As células CD8⁻ foram então contadas em câmara de Neubauer para avaliação do rendimento e viabilidade por meio do corante vital azul de Trypan 0,4%.

Todas as etapas de isolamento, expansão e inativação do HIV foram realizadas em laboratório de nível de biossegurança 2+ (Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical – IMT-USP), cujo acesso foi gentilmente autorizado pelo Prof. Dr. Cláudio Sergio Pannuti.

Para o isolamento viral, 1×10^7 da fração de células CD8⁻ foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 10% de

SFB e ativadas com 10^4 UI/mL de IL-2 (Roche®) e 5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA, do inglês *Phytohemagglutinin* -Gibco Life Technologies®). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e semanalmente as culturas foram alimentadas com 1×10^7 PBMCs do próprio indivíduo doador dos vírus (sistema de cultura autólogo), previamente estimuladas por 48 horas com PHA e IL-2.

A cada troca de meio os sobrenadantes provenientes das culturas foram armazenados à - 80 °C para posterior inativação viral e uma alíquota (100 µL) foi utilizada para o monitoramento da expansão viral realizado através da detecção da proteína p24 do HIV pelo método imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

Paralelamente algumas culturas foram expandidas utilizando-se como substrato PBMCs alogênicas (sistema de cultura alogênico), provenientes de indivíduos saudáveis, fornecidas pelo Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, com sorologia negativa para HIV, sífilis, hepatite, doença de Chagas, malária e HTLV.

3.3.2 ELISA para detecção da proteína p24 do HIV

As culturas de vírus foram monitoradas para a detecção da proteína p24 do HIV por meio da técnica de ELISA. Para tanto foi utilizado o *kit* Vironostika® HIV-1 Antigen (BioMérieux®, Holanda) e os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante.

Em resumo, placas previamente sensibilizadas com a proteína p24 do HIV foram tratadas com tampão de ruptura (25 µL/poço) e em seguida foram acrescentados 100 µL da amostra a ser testada. Para o controle negativo da reação foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 com 10% de SFB e para o controle positivo foi utilizado 160 pg/mL de proteína p24. Quando necessário, a curva-padrão foi determinada utilizando a diluição seriada da proteína p24 entre 80 e 5 pg/mL.

Após incubação de 2 h a 37 °C, a placa foi lavada quatro vezes com tampão fosfato e incubada por 1 h a 37 °C com 100 µL de anticorpo de detecção conjugado à peroxidase. Após ciclos de lavagem a placa foi incubada por mais 30 min com o substrato 3,3',5,5', tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M.

A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm no leitor de microplacas de ELISA (VersaMax®Tunable- Molecular Devices®) e a concentração da proteína p24 nas amostras foi determinada utilizando-se o programa SoftMax® Pro (Molecular Devices®).

3.3.3 Inativação química do HIV-1

Os sobrenadantes contendo as partículas virais, previamente armazenados (500 - 1000 mL de volume por paciente) foram descongelados e inativados por meio de tratamento químico com 1 mM (concentração final) de 2,2 ditiodipiridina (Aldrithiol-2; AT-2 – Sigma-Aldrich®) por 1 hora em banho-maria a 37 °C sob agitação, seguindo o protocolo de Rossio et al.⁸² (1998), com modificações. Posteriormente os sobrenadantes inativados foram centrifugados em filtro Centricon 70 (Millipore®) por 20 min a 3500 x g cada ciclo para redução do volume total.

O concentrado recuperado, cerca de 9 mL, foi finalmente purificado por meio de dois ciclos de lavagem a 100.000 x g por 1 h a 4 °C em ultracentrífuga (L80 Beckman®, rotor de ângulo móvel – SW41 Ti) sendo que o primeiro ciclo foi realizado em gradiente de sacarose a 20% em tampão TNE (20 mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e 2,5 mM de EDTA; pH 7,5) na proporção de uma parte de sacarose para nove partes de sobrenadante concentrado. Para a segunda lavagem o *pellet* foi ressuscitado em 9 mL de tampão TNE obtendo-se, após a ultracentrifugação, as partículas virais purificadas.

Subsequentemente, o material foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura AIM-V (Gibco®) e uma alíquota foi obtida para quantificação do RNA utilizando o *kit Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA* (Bayer Corporation, Massachusetts, USA), através do equipamento de leitura *System 340 bDNA*

Analyzer (Siemens, Deerfield, USA). As partículas virais foram então estocadas a - 80 °C até o momento do uso.

Com o objetivo de confirmar se o processo de inativação viral havia sido bem sucedido, 1×10^6 partículas virais foram cultivadas durante 30 dias com 1×10^6 PBMCs de doadores saudáveis previamente ativadas com PHA em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e 10^4 UI/mL de IL-2. Alíquotas de sobrenadantes coletados a cada três dias foram monitoradas quanto à presença da proteína p24 por meio de ELISA.

3.4 CULTURA CELULAR

3.4.1 Geração e maturação de MoDCs

Para a diferenciação de MoDCs, alíquotas de PBMCs previamente obtidas por aférese foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e após duas lavagens com solução salina por 10 min a 15 °C, o material foi quantificado e avaliado quanto à sua viabilidade. Em seguida, alíquotas contendo 5×10^6 /mL foram adicionadas ao meio de cultura RPMI 1640 e as células foram acondicionadas em garrafas de cultura de 25 cm² e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C durante 2 h para a separação de monócitos através da adesão em plástico.

Após esse período, as células não-aderentes (predominantemente linfócitos T, B e células NK) foram removidas por meio de lavagens e utilizadas para os ensaios de cocultivo, enquanto que uma alíquota dos monócitos (células aderentes) foi utilizada para os ensaios de caracterização fenotípica. Os monócitos restantes na garrafa foram mantidos em meio AIM-V (grau terapêutico - Gibco®) a 37 °C em estufa de CO₂ *overnight*.

Posteriormente a cultura foi suplementada com 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF (Cell-Genix®) para diferenciação em MoDCs imaturas e no

quinto dia, uma amostra das MoDCs imaturas foi coletada para caracterização fenotípica e para o ensaio de fagocitose.

Para a maturação das MoDCs foram utilizados dois protocolos: células provenientes de 13 indivíduos foram mantidas durante 4 h a 37 °C com o HIV-1 autólogo inativado pelo AT-2 (HIV-AT-2) em meio AIM-V na proporção de 1×10^9 HIV-AT-2 para cada 3×10^7 MoDCs imaturas. Após a incubação, as partículas de HIV-1 eventualmente não internalizadas foram retiradas por meio de lavagens e as células receberam o coquetel de maturação composto por 50 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL-1 β e 100 ng/mL de IL-6, além das mesmas concentrações dos fatores de crescimento IL-4 e GM-CSF (MoDCs HIV-AT-2). Paralelamente, MoDCs imaturas de outros quatro indivíduos foram estimuladas apenas com o coquetel de maturação detalhado acima (TNF- α , IL-1 β e IL-6), sem receberem o pulso viral (MoDCs maduras).

As células permaneceram em cultura por mais 48 h a fim de completar o processo de maturação e no sétimo dia as MoDCs foram recuperadas com auxílio de banho de gelo para serem utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica, transmigração em câmara de *transwell* e nos ensaios de cocultivo com linfócitos autólogos.

A viabilidade e o rendimento das células foram mensurados em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de Trypan. O cálculo da viabilidade das células foi apresentado em porcentagem pela relação:

$$\frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células recuperadas}} \times 100$$

O rendimento celular foi expresso em porcentagem pela relação:

$$\frac{\text{Número de MoDCs vivas recuperadas no 7º dia}}{\text{Número total de PBMCs plaqueadas no início da cultura}} \times 100$$

3.4.2 Caracterização morfológica de monócitos e MoDCs

Para a análise do perfil morfológico dos monócitos, MoDCs imaturas e MoDCs HIV-AT-2/ maduras as imagens foram capturadas com o auxílio da câmera de microscopia digital Moticam 1000 1.3 M Pixel USB 2.0 conectada a um computador.

3.4.3 Caracterização fenotípica de monócitos e MoDCs

A caracterização fenotípica de monócitos, MoDCs imaturas e MoDCs HIV-AT-2/ maduras foi realizada através da análise de expressão de moléculas de superfície utilizando anticorpos monoclonais previamente titulados, conjugados a diferentes fluorocromos que estão listados no quadro 1.

Quadro 1- Painel de anticorpos monoclonais utilizados para caracterização de monócitos e/ou MoDCs

Painel	Especificidade	Clone	Fluorocromo	Função
MoDCs/ monócitos	CD14	Tuk6	Qdot 605	Ligante do LPS - Marcador de monócitos
MoDCs/ monócitos	CD11c	B-ly6	Alexa Fluor 700 (AF700)	Integrina - Marcador de MoDCs mieloides
MoDCs/ monócitos	HLA-DR	G46-6	V500	Apresentação de antígenos peptídicos
MoDCs/ monócitos	CD86	2331 (FUN-1)	PE-Cy7	Molécula coestimuladora
MoDCs	CD1a	HI149	FITC	Apresentação de antígenos lipídicos
MoDCs	CD80	L307.4	PE-Cy5	Molécula coestimuladora
MoDCs	CD40	5C3	APC-H7	Marcador de maturação
MoDCs	CD83	HB15e	APC	Marcador de maturação
MoDCs	DC-sign (CD209)	eB-h209	PE-Cy7	Receptor para o HIV-1
MoDCs	PD-L1	MIH1	APC	Inibidor da resposta de linfócitos T
MoDCs	CCR5	2D7/CCR5	V450	Receptor de quimiocinas
MoDCs	CXCR4	12G5	PE-CF594	Receptor de quimiocinas

Todos os marcadores utilizados foram provenientes do fabricante BD Biosciences®, exceto os anticorpos CD14 Qdot 605 (Life technologies®), DC-SIGN PE-Cy7 e PD-L1 APC (eBioscience®).

3.4.4 Análise da capacidade fagocítica das MoDCs imaturas

Dextran é um polímero de anidroglicose derivado de linhagens da bactéria *Leuconostoc meserentoides*, que quando incubado com MoDCs imaturas mimetiza a fagocitose mediada por receptor de manose assim como a macropinocitose⁸⁵. Deste modo, a capacidade fagocítica foi avaliada por meio da habilidade das MoDCs imaturas capturarem dextran associado ao fluorocromo FITC (dextran-FITC - FD-40S Sigma-Aldrich®).

Com esse intuito, de acordo com a metodologia utilizada por Sallusto et al.⁸⁵ (1995) e Mucci et al.⁸⁶ (2009), com algumas modificações, 1×10^6 MoDCs imaturas (coletadas no quinto dia de cultura com IL-4 e GM-CSF) foram incubadas por 60 min a 37 °C com o dextran-FITC na concentração final de 1 mg/mL. O controle negativo foi constituído por uma cultura tratada similarmente, mas incubada a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes (600 x g por 10 min a 15 °C) com 400 µL de tampão fosfato salina suplementado com 0,2% de soroalbumina bovina e 0,1% de azida sódica (tampão PBS-BSA) para retirar o excesso das partículas não fagocitadas e foram incubadas com os anticorpos monoclonais CD14 e o CD11c (listados no quadro 1), para a definição da população estudada.

Para a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo, a intensidade de fluorescência mediana (MFI) observada nas MoDCs imaturas incubadas a 37 °C foi subtraída das amostras incubadas a 4 °C (fagocitose inespecífica).

3.4.5 Ensaio de quimiotaxia

A capacidade migratória das MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras em resposta aos estímulos quimiotáticos CCL19 e CCL21 (R&D Systems®), ligantes para o receptor CCR7, foi avaliada em ensaio de transmigração utilizando câmara *transwell* de 24 poços (Costar®) com filtro de policarbonato com poros de 5 µm.

Para tanto, 100 μL de uma suspensão contendo 1×10^5 MoDCs em meio AIM-V foram adicionadas na parte superior da câmara e na parte inferior dos poços foram adicionados 600 μL do mesmo meio contendo 100 ng/mL da quimiocina CCL19 ou 200 ng/mL da quimiocina CCL21, além de poços contendo apenas 600 μL de meio AIM-V, controle negativo (C-). Todas as condições foram estudadas em duplicata.

Após 2 h e 30 min de incubação a 37 °C, as MoDCs que migraram para a parte inferior do poço em resposta aos quimioatraentes foram fotografadas com o auxílio da câmera de microscopia digital Moticam 1000 1.3 M Pixel USB 2.0 conectada a um computador. Para as MoDCs serem quantificadas manualmente, todos os campos dos poços foram fotografados nos aumentos de 40 e 100 vezes. O número de células que migraram espontaneamente para o meio sem quimiocinas (C-) foi deduzido da migração específica, ou seja, MoDCs que migraram em respostas às quimiocinas CCL19 e CCL21.

3.4.6 Dosagem das citocinas IL-12p70 e IL-10 em sobrenadante de cultura de MoDCs

Sobrenadantes de cultura obtidos no quinto dia (MoDCs imaturas) e no sétimo dia de cultivo (MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras) foram coletados e armazenados para a dosagem das citocinas IL-12 p70 e IL-10 por meio da técnica de ELISA seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante dos kits (Ready-SET Go! - eBioscience®).

3.4.7 Resposta linfoproliferativa

O potencial das MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras em induzirem a proliferação de linfócitos T autólogos foi avaliado pelo monitoramento de Carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE – Life Technologies®) por citometria de fluxo, visto que o CFSE possui propriedades de excitação e emissão semelhantes ao FITC.

CFSE é um corante que é difundido passivamente nas células e quando seus grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares, passa a produzir fluorescência e perde a capacidade de difundir através da membrana, ficando aprisionado no interior da célula onde permanece durante a divisão celular⁸⁷. Desse modo, através da redução da concentração intracelular de CFSE a cada geração de células filhas é possível analisar a proliferação celular.

Para este ensaio, células não-aderentes autólogas (predominantemente linfócitos) foram primeiramente marcadas com CFSE, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto, 1×10^7 linfócitos foram incubados com 2 μM de CFSE (concentração final) em meio RPMI 1640 aquecido, durante 15 min em banho-maria a 37 °C, sob agitação. A seguir, o excesso do corante não difundido nas células foi retirado por meio de três lavagens (600 x g por 10 min a 15 °C) com meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB.

Finalmente, 2×10^5 linfócitos autólogos marcados com CFSE foram cocultivados com $0,4 \times 10^5$ MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras (proporção de 1 MoDC : 5 linfócitos), em duplicata (placa de 96 poços fundo em U), no volume final de 200 μL de meio AIM-V com 10% de SAB. A cultura foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por até 96 h.

O controle positivo (C+) foi constituído por linfócitos ativados durante as últimas 72 h em cultura com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA e o controle negativo (basal), por linfócitos que não receberam estímulo.

Após o término dos tempos estudados (24 e 96 h) foi realizada a marcação extracelular dos linfócitos utilizando os anticorpos CD3, CD4 e CD8 listados no quadro 2.

A porcentagem de proliferação linfocitária foi calculada por meio da subtração da proliferação basal, ou seja, linfócitos que proliferaram na ausência de MoDCs.

Quadro 2- Painel de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da resposta específica em linfócitos autólogos

Especificidade	Clone	Fluorocromo	Função
CD3	UCHT1	V450	Correceptor de linfócitos T
CD4	RPA-T4	BV605	Correceptor de linfócitos T auxiliares
CD8	SK1	APC-H7	Correceptor de linfócitos T citotóxicos
IL-2	MQ1-17H12	PE	Glicoproteína que estimula o crescimento de linfócitos
TNF- α	MAb11	PECy7	Citocina capaz de mediar a morte de patógenos intracelulares
MIP-1 β	D21-1351	AF700	Quimiocina ligante do CCR5
IFN- γ	B27	PerCP-Cy5.5	Citocina com atividade antiviral
CD107a	H4A3	APC	Marcador de desgranulação citotóxica

Todos os marcadores utilizados foram provenientes do fabricante BD Biosciences®, exceto o anticorpo IL-2 PE (Life technologies®).

3.4.8 Avaliação da produção de citocinas por linfócitos autólogos estimulados pelas MoDCs

Linfócitos autólogos (células não-aderentes obtidas a partir de material de aférese) foram cocultivados com as MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras durante 24 ou 96 h, com o propósito de avaliar a capacidade destas células em estimular uma resposta específica através da produção dos mediadores imunes IL-2, TNF- α , MIP-1 β e IFN- γ , e em induzir atividade citotóxica, mensurada por meio da expressão do marcador de desgranulação CD107a. Com esse intuito, alíquotas de PBMCs foram descongeladas e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C durante 2 h na concentração de 5x10⁶ PBMCs/mL em meio de cultura RPMI 1640. Após esse período, as células não aderentes (predominantemente linfócitos) foram retiradas por meio de lavagens com o próprio meio de cultura e mantidas em meio RPMI 1640 com 10% SFB *overnight* antes de serem utilizadas para os ensaios de linfoestimulação.

Posteriormente, MoDCs HIV-AT-2 assim como as MoDCs maduras anteriormente diferenciadas foram incubadas com os linfócitos autólogos em duplicata na proporção de 1:5 (1 MoDC: 5 linfócitos) em placa de 96 poços

fundo em U, em volume final de 200 μ L de meio AIM-V suplementado com 10% de soro tipo AB humano (SAB - Sigma-Aldrich®).

Com o intuito de avaliar a capacidade das MoDCs em induzirem linfócitos com atividade citotóxica, foi adicionado nas últimas 6 h da cultura, o anticorpo monoclonal CD107a, visto que a expressão deste marcador na membrana celular é transitória⁸⁸.

Seis horas antes do término de cada um dos tempos de cocultivo analisados, as células foram tratadas com 20 μ g/mL de brefeldina A (BFA - Sigma-Aldrich®), um bloqueador do complexo de Golgi, com o intuito de acumular proteínas no retículo endoplasmático da célula e impedir a secreção de citocinas pelos linfócitos.

O controle positivo (C+) dos ensaios foi constituído por linfócitos ativados nas últimas seis horas em cultura com 1 μ g/mL de enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB- Sigma-Aldrich®) sendo que nos poços do controle negativo (basais) os linfócitos permaneceram sem estímulo. Após 24 e 96 h em cultura, as células foram marcadas extra- e intracelularmente com os anticorpos monoclonais listados no quadro 2.

A avaliação da capacidade das MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras em estimular uma resposta T antígeno-específica foi realizada utilizando-se citometria de fluxo e os dados obtidos foram avaliados por meio da análise booleana. Essa análise permitiu estudar de maneira combinada a produção da quimiocina MIP-1 β e das citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺.

A porcentagem de mediadores imunes produzidos pelos linfócitos foi calculada por meio da subtração da produção espontânea, ou seja, linfócitos cultivado na ausência de MoDCs.

3.5 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

3.5.1 Análise de viabilidade celular

Para a exclusão de células mortas, antes de receberem anticorpos monoclonais, os monócitos, MoDCs e linfócitos foram primeiramente incubados com o marcador de viabilidade *Live/Dead Fixable Aqua stain* ou *Fixable Green stain* (Life Technologies®) dependendo do painel estudado. O corante fluorescente *Live/Dead* penetra nas células mortas ligando-se a proteínas celulares (aminas) e permitindo sua distinção das células vivas.

Seguindo as recomendações do fabricante, as células foram incubadas por 30 min a 4 °C com 0,3 µL do reagente *Live/Dead* diluído em 500 µL de PBS por tubo de células. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes (600 x g por 5 min a temperatura ambiente) com 500 µL de PBS. Finalizada esta etapa as células receberam os marcadores direcionados à superfície e/ou intracelulares.

3.5.2 Marcação de moléculas de superfície

Cerca de 2×10^5 monócitos, MoDCs ou linfócitos por tubo foram marcados com os anticorpos específicos direcionados à superfície, nas quantidades previamente determinadas por meio de titulação.

Para isso, as amostras foram incubadas em 100 µL do tampão de PBS-BSA, juntamente com os anticorpos monoclonais para os marcadores de interesse, durante 20 min a 4 °C e ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 600 x g durante 5 min a temperatura ambiente, com 500 µL do mesmo tampão. Finalmente, ao *pellet* obtido foram adicionados 400 µL de solução isotônica.

Foram adquiridos no mínimo 50.000 eventos de cada amostra no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience®) com o auxílio do programa DIVA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas FlowJo

vX 0.7 (Tree Star®, Ashland, OR) e GraphPad Prisma v.6 (GraphPad® Software Inc, USA).

3.5.3 Marcação de moléculas intracelulares

Para a análise de citocinas intracelulares, linfócitos já marcados com anticorpos direcionados a moléculas de superfície foram permeabilizados utilizando-se 300 µL do reagente *Cytofix/Cytoperm* (BD Bioscience®) e incubados por 20 min a 4 °C e no escuro. A seguir, as células foram lavadas duas vezes (600 x g por 5 min a temperatura ambiente) com 400 µL do reagente *Perm/Wash* (BD Bioscience®). Ao *pellet* foram adicionados 25 µL da solução permeabilizante *Perm/Wash* juntamente com os anticorpos específicos para as citocinas intracelulares em quantidades previamente tituladas.

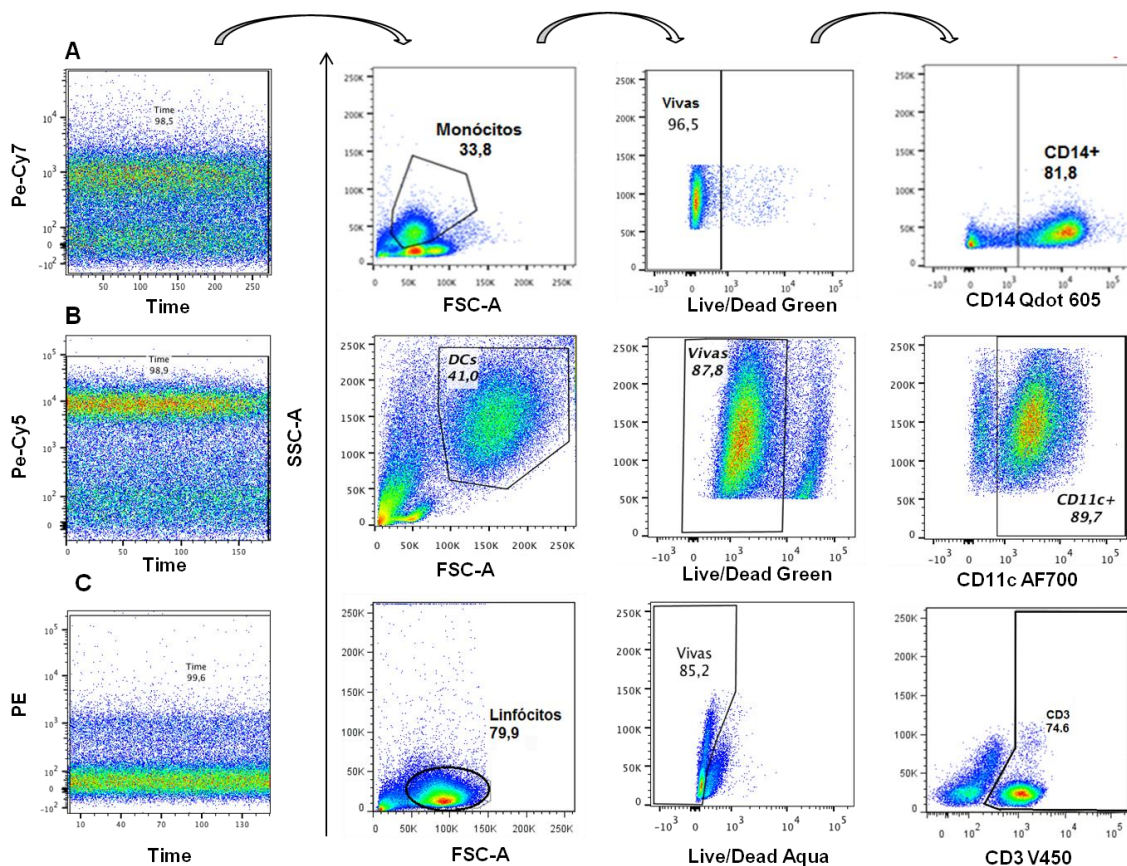
Finalmente, após incubação de 30 min a 4 °C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas mais duas vezes com 200 µL de *Perm/Wash* e receberam 200 µL de tampão para a fixação dos linfócitos.

Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos de cada amostra no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience®) com o auxílio do programa DIVA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas FlowJo 9.7.6 (Tree Star®, Ashland, OR), Pestle v. 1.7 e SPICE v. 5.3, os dois últimos obtidos respectivamente em: <http://www.drmmr.com/pestle.zip> e <http://exon.niaid.nih.gov>.

3.5.4 Estratégia de análise das células por citometria de fluxo

A figura 3 esquematiza a análise dos marcadores de superfície observados em monócitos (A); MoDCs (B) e linfócitos (C), realizada para a definição das porcentagens e intensidade de fluorescência mediana (MFI) dos marcadores imunofenotípicos ou funcionais estudados. Para auxiliar na definição de eventos positivos foi utilizado o controle FMO (fluorescência menos um, do inglês, *Fluorescence Minus One*).

Figura 3- Estratégia de gates para análise das células em gráfico de pontos



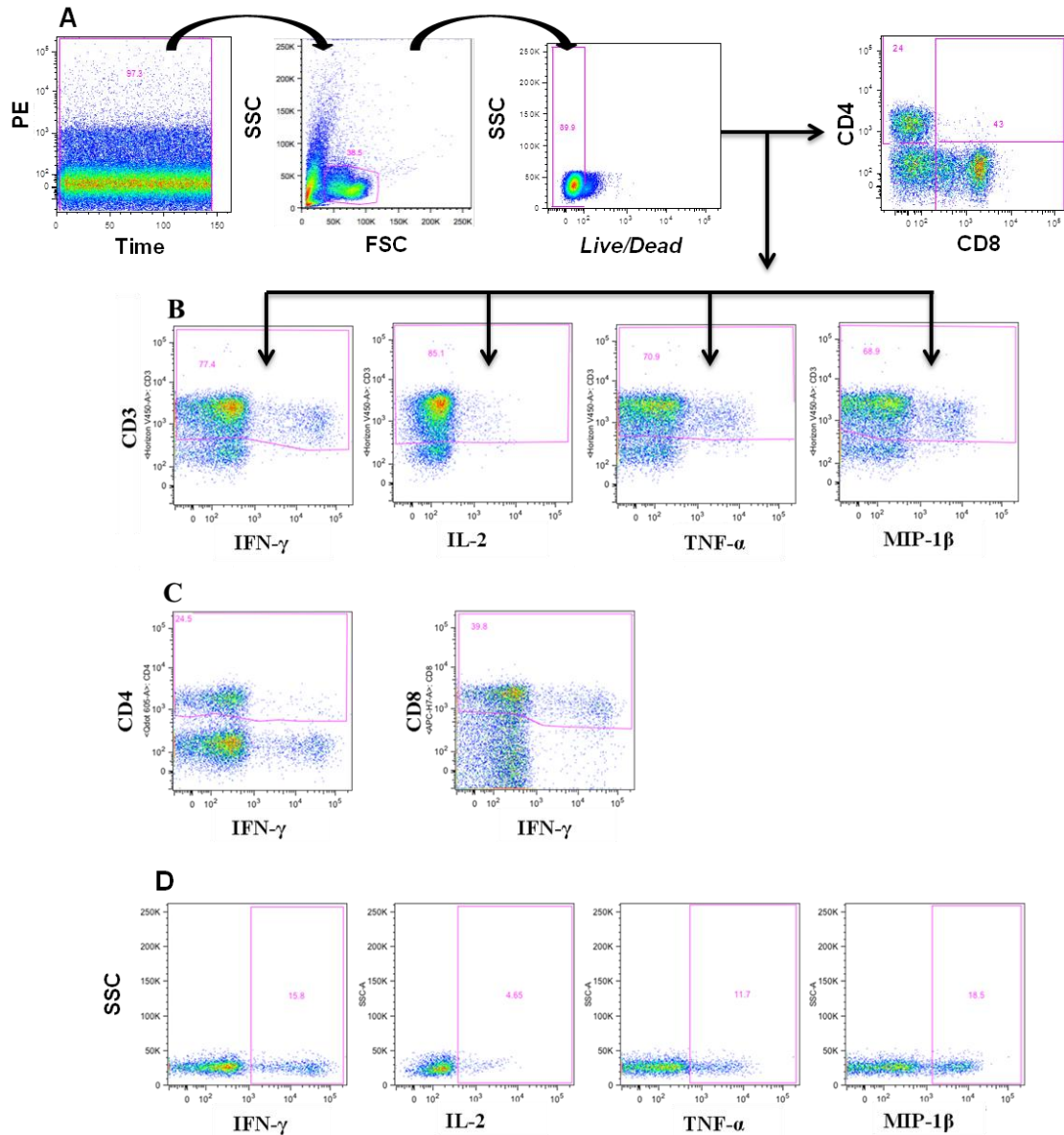
Primeiramente foi utilizada a estratégia de *gate* PE-Cy7/PE-Cy5/PE (em A, B e C, respectivamente) *versus* *Time* a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras. Logo após, considerando granulosidade *versus* tamanho (SSC-A x FSC-A) a população de interesse foi selecionada. Em seguida, um *gate* foi desenhado na população de células vivas utilizando a estratégia SSC x Live/Dead. Finalmente foi selecionado um *gate* de SSC *versus* os marcadores que definem as populações: em (A) CD14⁺ para monócitos; (B) CD11c⁺ para MoDCs e (C) CD3⁺ para linfócitos T. A partir dessa análise foram estudados os marcadores de interesse para cada tipo celular.

3.5.5 Análise booleana

Para mensuração da polifuncionalidade celular, ou seja, a capacidade do linfócito em produzir simultaneamente dois ou mais mediadores imunológicos foi adotada a estratégia de análise booleana exemplificada na figura 4. Esta metodologia possibilita a avaliação, por meio de intersecção de *gates*, de todas as combinações possíveis das funções desempenhadas pelas células analisadas^{89,90,91}. A definição de eventos positivos foi realizada com auxílio do controle FMO (fluorescência menos um, do inglês, *Fluorescence Minus One*).

Para apresentação desses resultados foram utilizados os programas: FlowJo v. 9.7.6, Pestle v. 1.7 e SPICE v. 5.3.

Figura 4- Estratégia de gates para definição de linfócitos T produtores de citocinas



Como representado em (A) inicialmente foi utilizada a estratégia de *gate* PE versus Time a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras. Logo após, os linfócitos foram selecionados considerando granulosidade versus tamanho (SSC-A x FSC-A). Em seguida, um *gate* foi desenhado na população de células vivas utilizando a estratégia SSC x Live/Dead. Logo após, os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foram separados. Em seguida, os linfócitos T foram isolados pela expressão do marcador específico (CD3), positivo para todos os marcadores funcionais (B). As populações seguintes foram analisadas de acordo com a expressão dos marcadores CD4 e CD8. Apenas a citocina IFN- γ está representada, porém a mesma análise foi realizada para os demais mediadores (C). Posteriormente, para cada subpopulação de linfócitos, foram definidas as células produtoras de

IFN- γ , IL-2, TNF- α e MIP-1 β *versus* SSC. Em (D) está representada a produção de citocinas apenas para linfócitos TCD8⁺, apesar da mesma análise ter sido realizada para linfócitos TCD4⁺. Depois dos *gates* para cada citocina terem sido criados, foi utilizada a análise booleana para criar todas as variedades de combinações possíveis de produção de citocinas pelos linfócitos. A delimitação dos *gates* de linfócitos positivos para cada marcador foi feita com base em amostras não-estimuladas, ou seja, cultivadas na ausência de MoDCs, com o auxílio do controle FMO.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística (valor de p) foi calculada utilizando-se a análise de variância one-way ANOVA com teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* para a comparação entre os estágios de diferenciação das MoDCs. A correlação não-paramétrica de Spearman foi realizada para analisar correlações entre as variáveis estudadas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o p obtido foi $< 0,05$.

Todas as análises e representações gráficas foram executadas com auxílio do programa GraphPad Prisma v.6 (GraphPad® Software Inc, USA), exceto os gráficos de setores circulares que foram obtidos com a utilização do programa SPICE v. 5.3, como descrito por Roederer, Nozzi e Nason⁸⁹ (2011).

4. RESULTADOS

4.1 CULTURA VIRAL

4.1.1 Comparação entre os sistemas autólogo e alogênico para expansão de isolados de HIV

Para a composição da vacina é necessária a produção de vírus autólogo inativado a ser utilizado para o pulso das MoDCs. Os ensaios a seguir foram realizados com o objetivo de comparar os dois sistemas de expansão, autólogo e alogênico, em termos de tempo, rendimento e imunogenicidade dos produtos virais. Vale destacar que os resultados apresentados neste item foram anteriormente publicados⁸⁴.

As características demográficas e os dados laboratoriais dos 11 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1, bem como o resultado do processo de isolamento viral estão representados no quadro 3.

Observamos que o processo de isolamento viral foi bem sucedido para todas as amostras isoladas através do sistema alogênico (100% de positividade). Em contrapartida em três das 11 culturas provenientes do sistema autólogo não foi possível a obtenção de partículas virais, mesmo após um mês de cultivo, resultando num percentual de positividade de 73%. Vale ressaltar que estes três pacientes apresentavam os menores níveis de CVP (< 3.000 cópias/mL) dentre os indivíduos estudados.

Quadro 3- Caracterização demográfica e dados laboratoriais dos indivíduos utilizados para o isolamento e expansão viral

Código do paciente	Sexo	Idade (anos)	CVP (cópias/mL)	TCD4 ⁺ (células/ μ L)	Sistema autólogo	Sistema alogênico
20	M	38	46.400	525	+	+
21	M	47	19.472	766	+	+
22	M	40	27.564	648	+	+
23	M	34	51.805	447	+	+
24	F	40	1.000	561	-	+
25	M	32	6.983	474	+	+
26	M	30	2.235	531	-	+
27	M	25	1.591	488	-	+
28	M	24	30.580	503	+	+
29	M	57	15.381	827	+	+
30	M	40	27.781	414	+	+

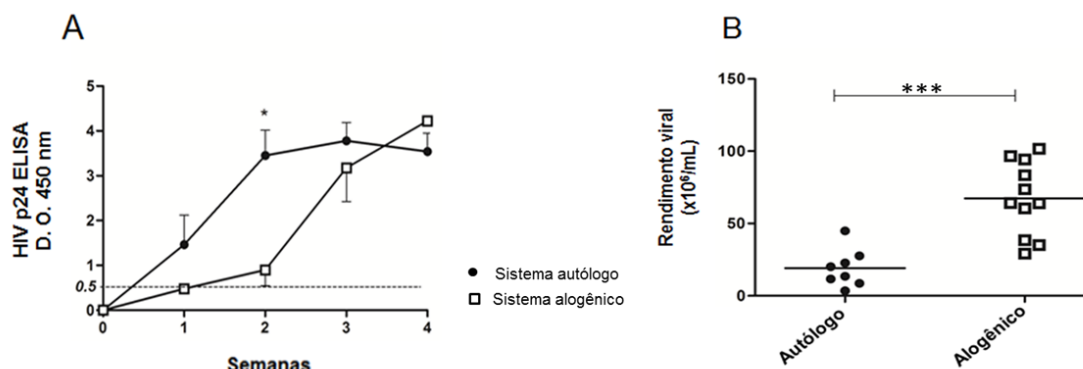
Os dados de TCD4⁺ e CVP referem-se a valores obtidos na data da coleta de sangue. +: amostras p24 positivas; -: amostras p24 negativas; M: masculino; F: feminino.

O tempo decorrido para o isolamento do HIV assim como o rendimento das partículas virais obtidas estão representados na figura 5.

Podemos observar que as amostras cultivadas em sistema autólogo apresentaram positividade para a proteína p24 do HIV mais precocemente (primeira semana de cultivo) com relação às culturas em sistema alogênico. Além disso, os valores de densidade óptica (DO), obtidos pela técnica de ELISA, também se apresentaram mais elevados durante as primeiras semanas de cultivo viral no sistema de cultura autóloga (figura 5 A). Por outro lado, o rendimento final após todo o processo, que inclui inativação com o AT-2, concentração do sobrenadante e purificação dos vírus, foi maior quando o HIV foi expandido em sistema alogênico ($p < 0,001$) (figura 5 B), tendo sido obtida uma média de $19,1 \times 10^6$ partículas virais em culturas provenientes de sistema autólogo, ao passo que foram obtidas três vezes mais partículas virais pelo sistema alogênico (média de $67,4 \times 10^6$) ($p < 0,001$).

Não foi encontrada correlação entre o rendimento viral e os dados de CVP ou a contagem de TCD4⁺ monitorados no momento da coleta de sangue dos pacientes estudados (dados não mostrados).

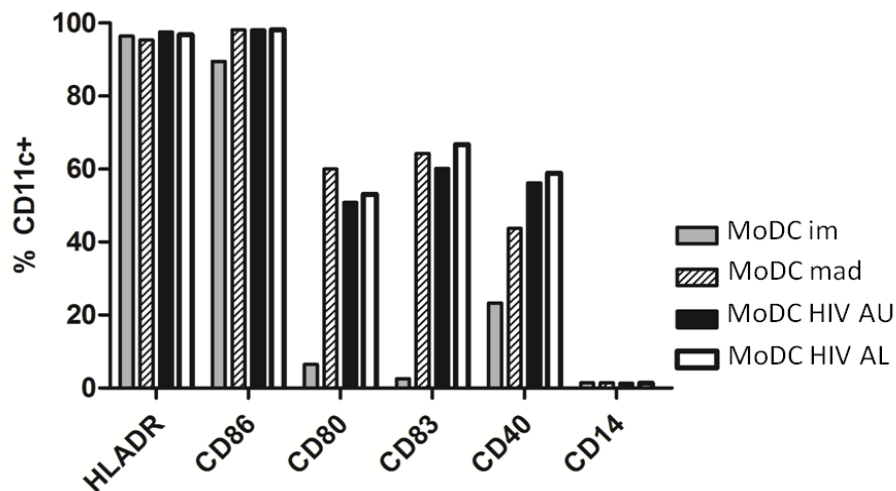
Figura 5- Tempo necessário para as culturas tornarem-se p24 positivas e rendimentos dos isolados virais provenientes dos sistemas autólogo e alogênico



Em (A), representação dos resultados obtidos por ELISA para a proteína p24 do HIV nas primeiras quatro semanas em cultura. As amostras foram consideradas positivas quando os valores da densidade óptica (DO) foram > 0,5 (ponto de corte, linha pontilhada). Os dados referem-se à média com o desvio padrão da DO a 450 nm. *p <0,05. (B) Os sobrenadantes coletados durante a expansão viral foram inativados, concentrados, purificados e quantificados. Os resultados estão apresentados como 10⁶ partículas/mL. ***p <0,001. Sistema autólogo (n: 8) e sistema alogênico (n: 11).

A seguir, avaliamos a expressão dos marcadores HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40 e CD14 pelas MoDCs com o propósito de analisar a influência no perfil imunofenotípico quando estas células foram pulsadas com partículas virais provenientes dos dois sistemas (figura 6).

As MoDCs foram analisadas dentro da população expressando CD11c. Como esperado, observamos reduzida porcentagem de MoDCs expressando o marcador CD14. Além disso, cerca de 90% das MoDCs apresentaram positividade para os marcadores HLA-DR e CD86. Adicionalmente, após o processo de maturação notamos um aumento no percentual de MoDCs positivas para as moléculas CD80, CD83 e CD40 em comparação às MoDCs imaturas. Não foram observadas alterações no perfil fenotípico das células em decorrência do pulso com as partículas virais provenientes do sistema autólogo ou alogênico.

Figura 6- Perfil imunofenotípico das MoDCs

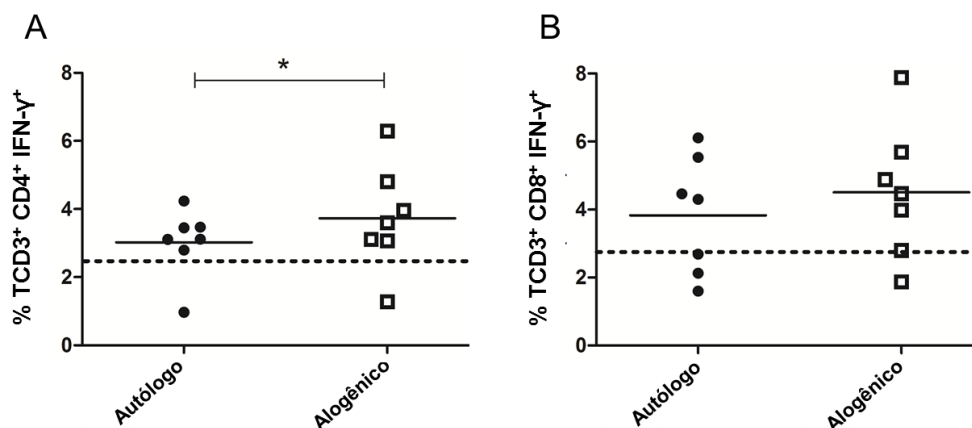
O gráfico de barras representa o percentual de MoDCs (CD11c⁺) expressando os marcadores HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40 e CD14. MoDCs imaturas (MoDC im) foram diferenciadas a partir de monócitos após cinco dias na presença de GM-CSF e IL-4; MoDCs maduras (MoDC mad) foram ativadas por mais dois dias com o coquetel de citocinas inflamatórias; MoDCs pulsadas com HIV proveniente de sistema autólogo (MoDC HIV AU) e MoDCs pulsadas com HIV proveniente de sistema alogênico (MoDC HIV AL) foram incubadas com as partículas virais durante quatro horas e posteriormente, e ativadas por mais dois dias com o coquetel de citocinas. Os dados são representativos de um experimento.

A seguir, analisamos a imunogenicidade dos vírus obtidos nos sistemas autólogo e alogênico. Para tanto MoDCs pulsadas com as partículas virais provenientes dos dois sistemas e ativadas com citocinas pró-inflamatórias foram cultivadas com linfócitos autólogos por 96 horas e em seguida foi avaliada a produção de IFN- γ pelos linfócitos T.

Os resultados obtidos estão representados na figura 7.

Embora tenha sido encontrada uma grande variabilidade interindividual no percentual de células positivas para IFN- γ , observamos que MoDCs pulsadas com HIV derivados de ambos os sistemas foram capazes de estimular a produção da citocina pelos linfócitos. Contudo, foi observada uma maior porcentagem de linfócitos TCD4⁺ produtores de IFN- γ quando estimulados por MoDCs pulsadas com HIV resultante do sistema alogênico, inclusive com significância estatística ($p < 0,05$) (figura 7 A). Resultados similares, mas sem significância estatística foram observados para os linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ (figura 7 B).

Figura 7- Imunogenicidade das partículas virais produzidas em sistemas autólogo ou alogênico



A porcentagem de linfócitos TCD4⁺ IFN-γ⁺ (A) e TCD8⁺ IFN-γ⁺ (B) foi determinada por citometria de fluxo intracelular. A linha pontilhada indica a produção basal de IFN-γ pelos linfócitos autólogos na ausência de MoDCs. A barra horizontal representa a mediana. (n : 7); *p< 0,05.

4.1.2 Obtenção de HIV-AT-2 utilizando o sistema autólogo

Embora tenhamos constatado vantagens no isolamento e expansão viral utilizando sistema alogênico, para os resultados apresentados a seguir a expansão viral foi realizada em sistema autólogo, conforme protocolo clínico que seguiu a metodologia descrita por Lu e colaboradores⁵⁷ (2004). Assim, os isolados virais foram expandidos em PBMCs autólogas, coletadas do próprio paciente e os sobrenadantes foram quantificados com relação à concentração de partículas virais.

A tabela 2 descreve o rendimento das partículas virais provenientes das culturas de expansão de 13 pacientes, após os sobrenadantes serem inativados, concentrados, purificados e quantificados. As partículas virais obtidas foram utilizadas no pulso das MoDCs HIV-AT-2.

Pode-se observar uma grande variabilidade no rendimento das culturas virais, com uma dispersão que variou entre 3,5 e 73,3 x10⁶ partículas/mL, com mediana de 20,7 x10⁶ partículas por mL de sobrenadante. Tal variabilidade pode ser atribuída ao *fitness* viral, particular de cada isolado viral autólogo, e/ou

à qualidade das PBMCs autólogas, que pode variar de acordo com as características individuais de cada paciente.

Tabela 2- Rendimento de HIV-AT-2 autólogo

Código do Paciente	Partículas virais (x10⁶/mL)
5	26,6
6	24,3
7	7,5
8	43,0
9	66,0
10	3,5
11	13,8
12	15,9
13	34,0
14	7,5
15	25,7
16	73,3
17	32,8
Mediana (IQR)	25,7 (20,2)

Sobrenadantes coletados durante a expansão viral foram inativados, concentrados, purificados e quantificados. Os resultados estão apresentados como 10⁶ partículas/mL. IQR: variação interquartil.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MONÓCITOS E MoDCs

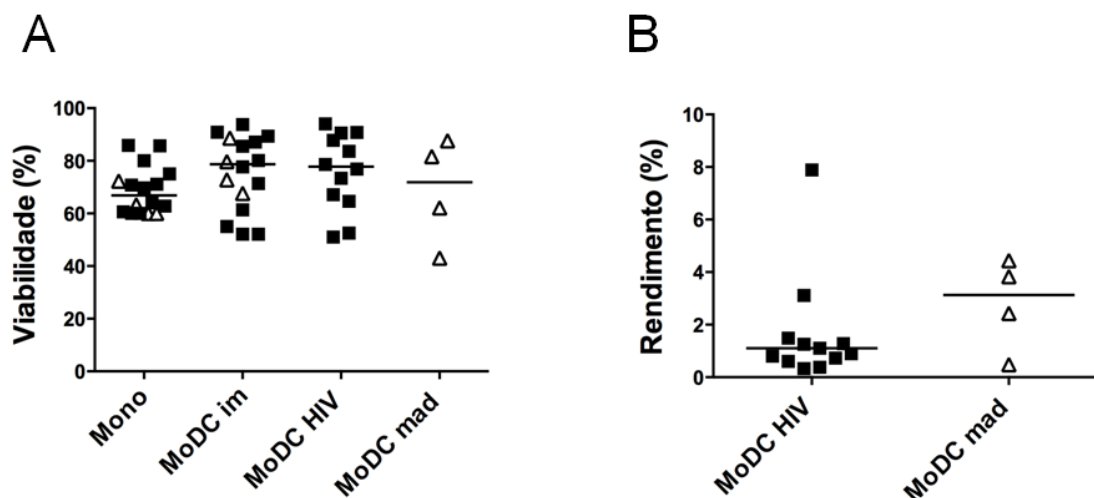
4.2.1 Obtenção de monócitos e MoDCs, monitoramento de viabilidade e rendimento final das culturas

A obtenção de MoDCs constitui um processo que envolve a separação de células precursoras (monócitos) a partir de PBMCs (produto de aférese) e duas etapas de cultura: diferenciação a partir de monócitos e maturação/ativação. Por este motivo o rendimento final obtido é relativamente baixo e há necessidade de quantidade inicial elevada das células primárias precursoras.

Com relação à viabilidade foi observado que 66,8% dos monócitos apresentaram-se viáveis, ao passo que a viabilidade mediana das MoDCs imaturas foi de 78,7%. Após a ativação, a porcentagem obtida de MoDCs HIV-AT-2 viáveis foi de 77,5% e a porcentagem de MoDCs maduras vivas foi 71,8% (figura 8 A). Vale ressaltar que para a obtenção de monócitos foram utilizadas PBMCs conservadas por congelamento em nitrogênio líquido e a viabilidade foi mensurada 6 h após o procedimento de separação por aderência.

Por sua vez, referente ao rendimento de células com base no total de PBMCs iniciais, foram obtidas 1,1% de MoDCs HIV-AT-2 (0,4 – 7,9%) e 3,1% (0,5 – 4,4%) de MoDCs maduras (figura 8 B). Para a obtenção de MoDCs maduras não houve necessidade das lavagens para remover excesso de HIV-AT-2 eventualmente não internalizado, o que pode ter refletido na diferença de rendimento final entre as duas culturas.

Não foi possível calcular o rendimento relativo à quantidade inicial de monócitos uma vez que a separação por aderência não permite definir com precisão a quantidade de monócitos remanescentes na placa, após remoção das células não aderentes. Do mesmo modo, a fim de minimizar a manipulação do produto vacinal e otimizar o rendimento final de células, não quantificamos as MoDCs imaturas, uma vez que tanto a incubação com o HIV-AT-2 como a ativação com o coquetel de citocinas foram realizadas na própria placa de cultura, sem que as células precisassem ser descoladas.

Figura 8- Monitoramento da viabilidade e rendimento celular

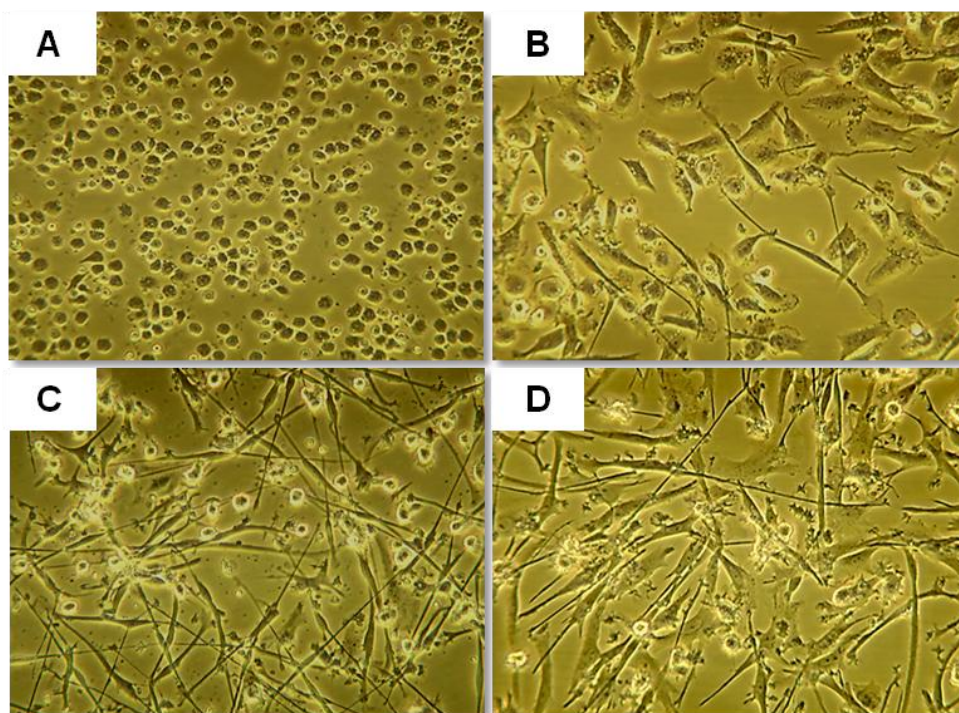
Em (A) representação gráfica da quantificação de monócitos e MoDCs viáveis. Em (B) está representado o rendimento das MoDCs ativadas, com relação à quantidade inicial de PBMCs. Os resultados estão apresentados em porcentagem. A linha horizontal representa a mediana dos dados obtidos. Mono: monócitos (n: 16); MoDC im: MoDCs imaturas (n: 16); MoDC HIV: MoDCs HIV-AT-2 (n: 12) (quadrado); MoDC mad: MoDCs maduras (n: 4) (triângulo).

4.2.2 Caracterização morfológica e imunofenotípica dos monócitos e MoDCs

Para análise do aspecto morfológico, as populações celulares estudadas, quais sejam: monócitos, MoDCs imaturas, MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras, foram visualizadas por meio de microscopia óptica. A figura 9 exemplifica imagens representativas obtidas a partir do cultivo celular.

Como ilustrado, os monócitos, células precursoras, apresentaram-se como células de formato arredondado (figura 9 A). Após cinco dias de estímulo com IL-4 e GM-CSF para diferenciação, as MoDCs imaturas passaram a apresentar perfil espreado, sendo possível também visualizar alguns dendritos (figura 9 B) e finalmente, após estímulo com coquetel de citocinas (IL-6, IL-1 β e TNF- α) (figura 9 C) ou pulso com o HIV-AT-2 e a adição do coquetel de maturação (figura 9 D) as células tornaram-se mais delgadas e fusiformes, mostrando a morfologia característica de uma célula dendrítica madura, que constitui nosso produto vacinal.

Figura 9- Perfil morfológico de monócitos e MoDCs



Aspecto morfológico de culturas celulares obtidas através de microscopia óptica. Em (A), monócitos, (B), MoDCs imaturas, (C), MoDCs maduras e (D) MoDCs HIV-AT-2. Aumento de 200x.

Em seguida analisamos o perfil imunofenotípico das populações celulares estudadas. Os resultados obtidos estão representados em diagrama de caixas com as medianas das porcentagens e das MFIs (figura 10).

A população de monócitos foi selecionada a partir da expressão da molécula CD14 e as MoDCs foram analisadas dentro da população expressando CD11c. Para a análise dos monócitos foram utilizados os marcadores CD11c, HLA-DR e CD86.

De modo geral, foi observado percentual elevado de monócitos expressando as moléculas CD11c e CD86, com percentual de positividade mediana de 98,7% e 94,6%, respectivamente. Por sua vez, a expressão da molécula HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II) variou entre 33,3 e 92,5%, com mediana de 71,5%, sendo menor e mais heterogênea quando comparada à porcentagem e MFI das MoDCs ativadas.

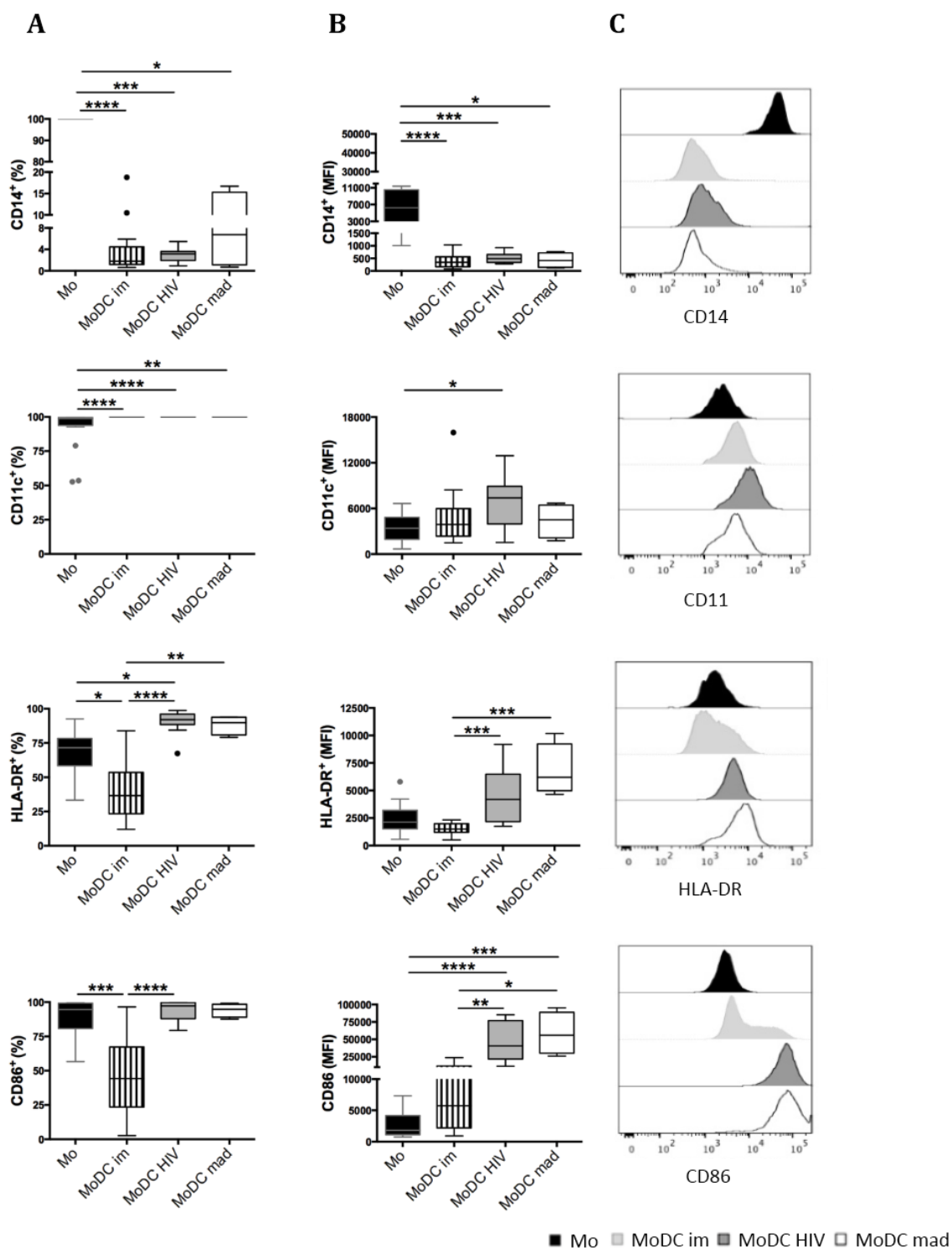
Em comparação aos monócitos, níveis mais baixos de células CD14⁺ foram encontrados nas populações de MoDCs imaturas, MoDCs HIV-AT-2 e

MoDCs maduras ($p < 0,05$), mostrando que, como esperado, as MoDCs perderam a expressão de CD14 ao longo do processo de diferenciação.

O processo de maturação induziu aumento na expressão da molécula HLA-DR em MoDCs HIV-AT-2, MFI igual a 4188,5 e em MoDCs maduras, MFI de 6203,5 em comparação as MoDCs imaturas (MFI de 1496,5) ($p < 0,001$).

Com relação à expressão de CD86, a porcentagem e a MFI de MoDCs HIV-AT-2 positivas para este marcador tornaram-se mais elevadas (97,3% e MFI de 40652,5), quando comparadas à porcentagem e MFI de MoDCs imaturas (44,3% e 5734,5, respectivamente), com $p < 0,05$, enquanto que a MFI das MoDCs maduras apresentou-se mais elevada (55958,5) em comparação a MFI das MoDCs imaturas ($p < 0,05$), mostrando que o processo de maturação em ambas as MoDCs estudadas foi bem sucedido. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as MoDCs HIV-AT-2 e as MoDCs maduras com relação aos marcadores apresentados na figura 10.

Figura 10- Análise imunofenotípica de monócitos e MoDCs



Expressão de CD14, CD11c, HLA-DR e CD86 por monócitos (Mo) (n: 17), obtidos no primeiro dia de cultura; MoDCs imaturas (MoDC im) (n: 17), diferenciadas após cinco dias na presença de GM-CSF e IL-4; MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) (n: 13), ativadas por mais dois dias com HIV e o coquetel de citocinas inflamatórias; e MoDCs maduras (MoDC mad) (n: 4), ativadas com o coquetel de citocinas inflamatórias. Os diagramas de caixas com *outliers* representam em (A) a porcentagem e (B) a MFI (mediana da intensidade de fluorescência) dos marcadores

estudados. Em (A) e (B) estão demonstrados os valores dos percentis 25 e 75, sendo que, a linha horizontal representa o valor mediano e as linhas verticais correspondem aos valores adjacentes superiores e inferiores. Histogramas representativos de um indivíduo estão demonstrados em (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Em seguida, realizamos uma análise mais aprofundada acerca de algumas moléculas expressas pelas MoDCs. Através da análise de marcadores de maturação, coestimulação, adesão e migração, comparamos o perfil fenotípico das MoDCs imaturas com o perfil das MoDCs HIV-AT-2 e das MoDCs maduras (figura 11).

Como esperado, após a maturação observou-se um aumento na porcentagem e na MFI de células CD83⁺, de 27,2% e 1119 em MoDCs imaturas, para 94,4% e 3847 nas MoDCs HIV-AT-2 e 95,5% e 4284,5 nas MoDCs maduras, respectivamente ($p < 0,05$).

A análise das moléculas coestimuladoras CD40 e CD80 também corroboram o estágio de ativação alcançado pelas MoDCs após estímulo. Enquanto que 21,6% das MoDCs imaturas expressaram a molécula CD40, 66,7% das MoDCs HIV-AT-2 e 83,8% das MoDCs maduras foram positivas para este marcador. A molécula CD80 foi expressa por 42,9% das células no estágio imaturo e após o estímulo para a maturação, 94,3% das MoDCs HIV-AT-2 e 82,8% das MoDCs maduras tornaram-se CD80⁺ ($p < 0,05$).

Com relação à expressão da molécula CD1a, foi observada uma grande variabilidade interindividual, com percentuais de MoDCs imaturas CD1a⁺ variando entre 0,25 e 84,3% (mediana de 55%). Em contrapartida, houve redução no percentual de MoDCs HIV-AT-2 CD1a⁺ (9,6%) em comparação as MoDCs imaturas ($p < 0,01$).

Referente à molécula DC-SIGN observamos que, em geral, o estímulo para maturação levou à redução na expressão deste marcador, tendo sido observada diferença estatística na comparação entre MFIs de MoDCs imaturas e MoDCs maduras.

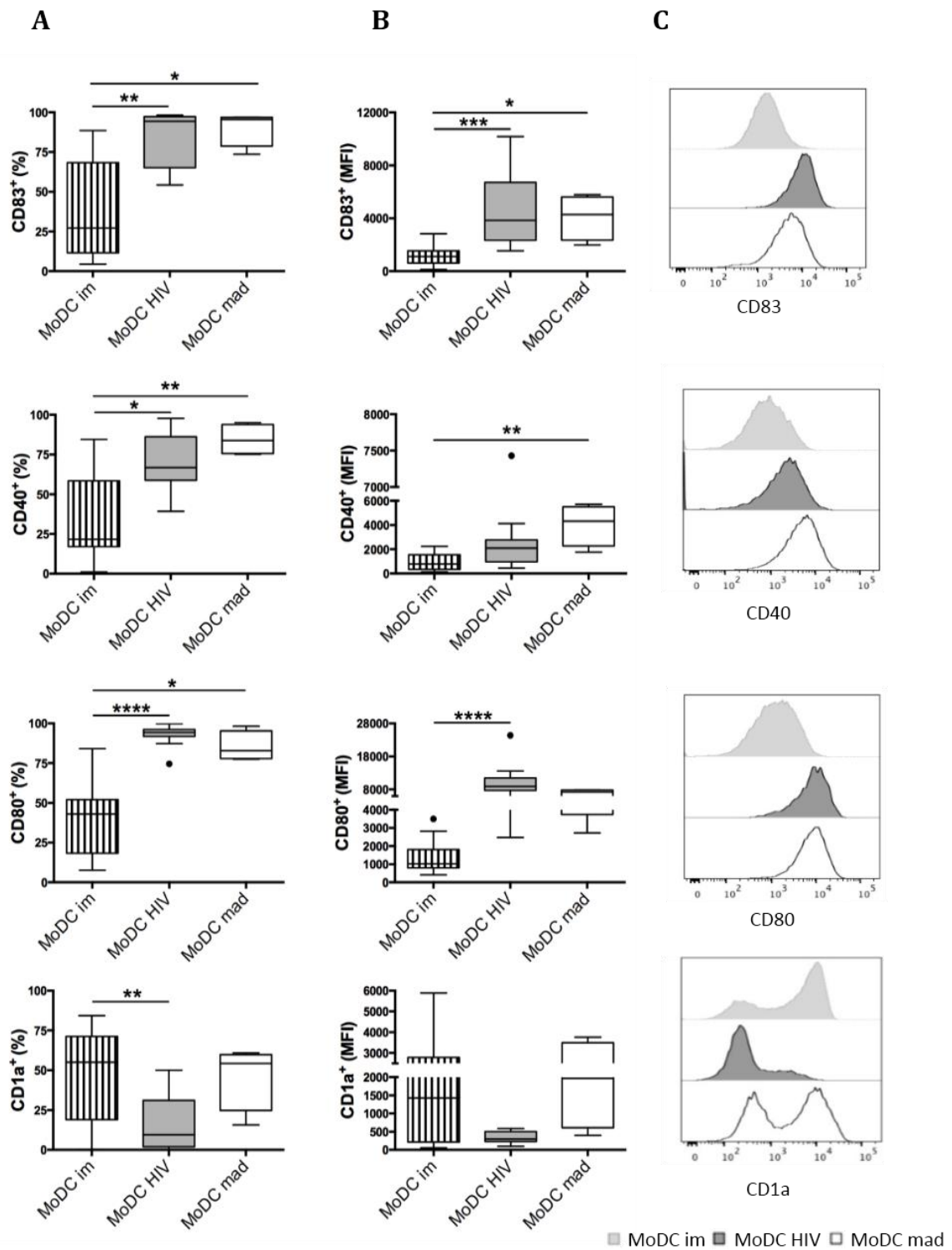
Após a maturação das células notamos aumento significativo na porcentagem e expressão do marcador PD-L1 (ligante de morte celular programada 1, do inglês, *programmed death-ligand 1*). A proteína inibitória PD-L1 é expressa principalmente por APCs e regula negativamente a ativação de células T após sua ligação com o receptor PD-1 (proteína de morte celular

programada 1, do inglês, *programmed cell death protein 1*)⁹². Com relação a esse marcador, 19,1% das MoDCs imaturas mostraram-se positivas para a PD-L1 (MFI de 1044), enquanto que, após a maturação, 78,7% das MoDCs HIV-AT-2 e 75,7% das MoDCs maduras apresentaram a molécula PD-L1 (com MFI de 4512 e 6859, respectivamente) ($p < 0,05$).

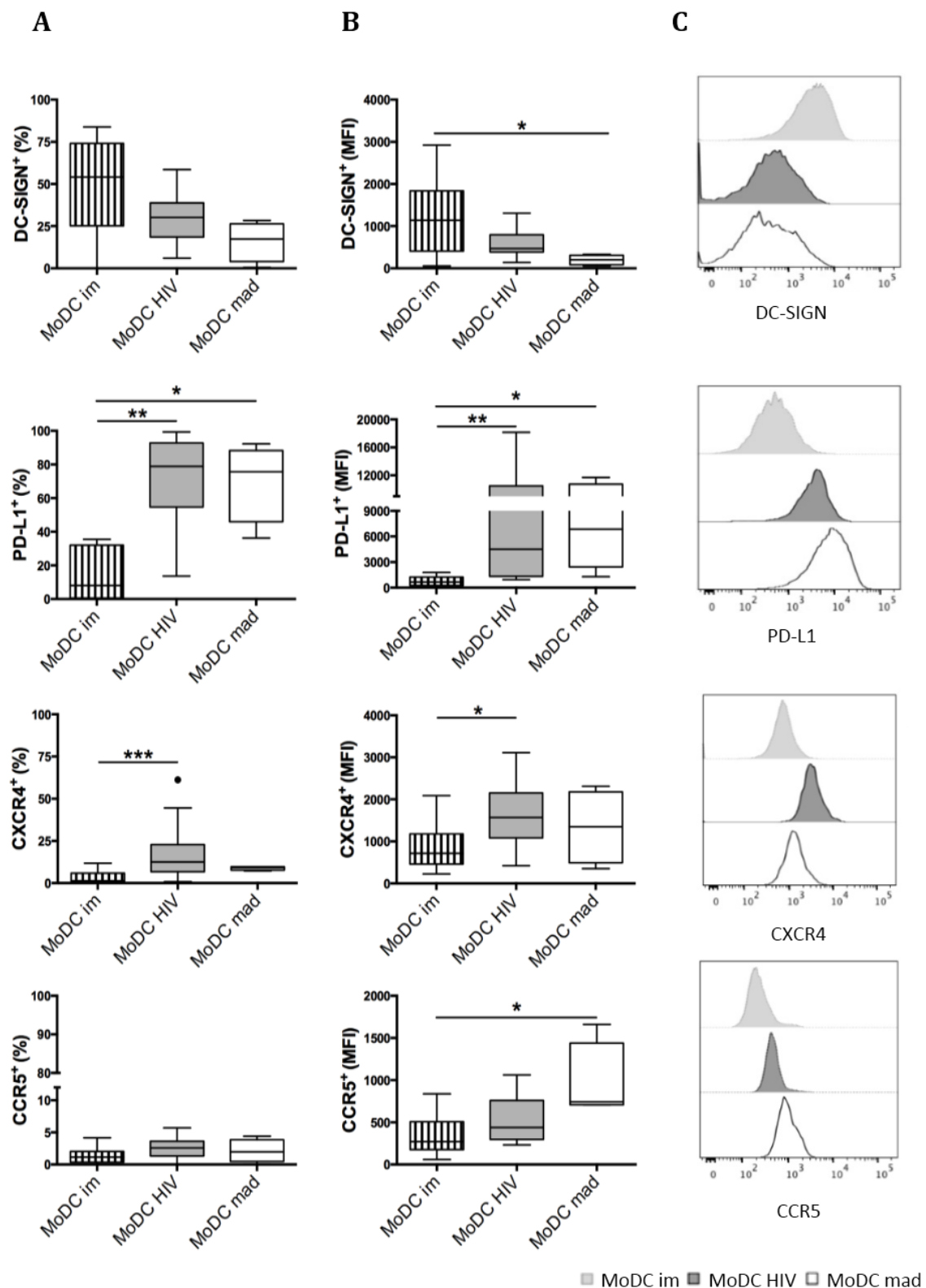
A análise dos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR5, utilizados como correceptores para a entrada do HIV nas células, mostrou que as MoDCs HIV-AT-2 apresentaram expressão aumentada do marcador CXCR4, com relação às células no estágio imaturo (12,5% versus 1,4% e MFI de 1567 e 715, respectivamente) ($p < 0,05$), enquanto que a molécula CCR5 foi mais expressa pelas MoDCs maduras (1567) quando comparada a MFI das MoDCs imaturas (715) ($p < 0,05$).

De modo geral, notamos que o processo de diferenciação dos monócitos em MoDCs imaturas foi bem sucedido assim como a ativação das MoDCs, que resultou em um perfil fenotípico característico de DCs maduras, com aumento na expressão das moléculas de coestimulação (CD86 e CD80), ativação (CD83 e CD40) e também da molécula inibitória (PD-L1). Além disso, em comparação às MoDCs imaturas foi observada redução no percentual de células CD1a positivas apenas com relação às MoDCs HIV-AT-2. De forma semelhante, notamos redução na expressão do marcador DC-SIGN somente quando comparamos as MoDCs imaturas com as MoDCs maduras. Adicionalmente, quando confrontados os dados obtidos com as MoDCs imaturas, foi possível averiguar um aumento na porcentagem de MoDCs HIV-AT-2 CXCR4 positivas, ao passo que as MoDCs maduras elevaram a expressão da molécula CCR5.

Figura 11- Análise imunofenotípica de MoDCs imaturas e MoDCs ativadas



(continuação)



Expressão de CD83, CD40, CD80, CD1a, DC-SIGN, PD-L1, CXCR4 e CCR5 por MoDCs imaturas (MoDC im) (n: 17), diferenciadas após cinco dias na presença de GM-CSF e IL-4; MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) (n: 13), ativadas por mais dois dias com HIV e o coquetel de

citocinas inflamatórias; e MoDCs maduras (MoDC mad) (n: 4), ativadas com o coquetel de citocinas inflamatórias. Os diagramas de caixas com *outliers* representam em (A) a porcentagem e (B) a MFI (mediana da intensidade de fluorescência) dos marcadores estudados. Em (A) e (B) estão demonstrados os valores dos percentis 25 e 75, sendo que, a linha horizontal representa o valor mediano e as linhas verticais correspondem aos valores adjacentes superiores e inferiores. Histogramas representativos de um indivíduo estão demonstrados em (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.3 ANÁLISE FUNCIONAL DAS MoDCs

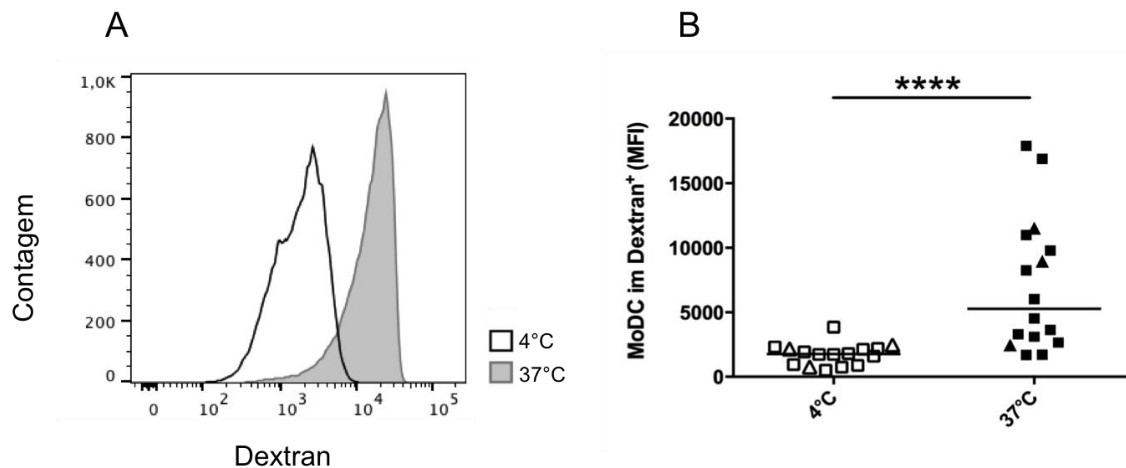
4.3.1 Avaliação da capacidade fagocítica de MoDCs imaturas

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade fagocítica das MoDCs por meio da captação de partículas de dextran-FITC. Para isso foram utilizadas MoDCs imaturas visto que a maior capacidade de internalização antigênica dá-se quando as DCs estão nesse estágio de diferenciação⁸⁶.

Os resultados obtidos estão representados na figura 12 como a mediana da intensidade de fluorescência (MFI). Em (A), histogramas representativos de um indivíduo ilustra a fagocitose em condições ótimas (37 °C) em comparação a incubação a 4 °C (fagocitose inespecífica). A figura 12 (B) refere-se a MFI da fagocitose de dextran-FITC, realizada em culturas mantidas a 37 °C em comparação a células incubadas a 4 °C.

De fato, as MoDCs imaturas incubadas em condições ótimas internalizaram eficientemente partículas de dextran-FITC, haja vista a elevada MFI encontrada (5274,2), ao passo que a MFI de partículas fagocitadas quando as culturas foram mantidas a 4 °C foi de 1755 ($p < 0,0001$).

Ademais, as análises não mostraram diferença significativa na capacidade fagocítica (porcentagem ou MFI) quando foram comparadas as MoDCs imaturas que posteriormente receberam o pulso com HIV e o coquetel de maturação (MoDCs HIV-AT-2) (representadas na figura 12 (B) por quadrados), e as MoDCs que receberam o coquetel de ativação (MoDCs maduras), representadas na figura 12 (B) por triângulos.

Figura 12- Fagocitose de partículas de dextran-FITC por MoDCs imaturas

Em (A), histograma da fagocitose inespecífica (4°C) em comparação à captação de partículas de dextran-FITC a 37°C. Resultado representativo de um indivíduo. Em (B) estão representadas as MFIs das MoDCs imaturas quando incubadas a 4°C e a 37°C (n: 16). As linhas horizontais indicam as medianas das condições estudadas. Os quadrados representam as MoDCs imaturas que foram posteriormente diferenciadas em MoDCs HIV-AT-2 e os triângulos indicam as MoDCs imaturas que foram diferenciadas em MoDCs maduras. MoDCs imaturas (MoDC im); MFI (mediana da intensidade de fluorescência). **** $p < 0,0001$.

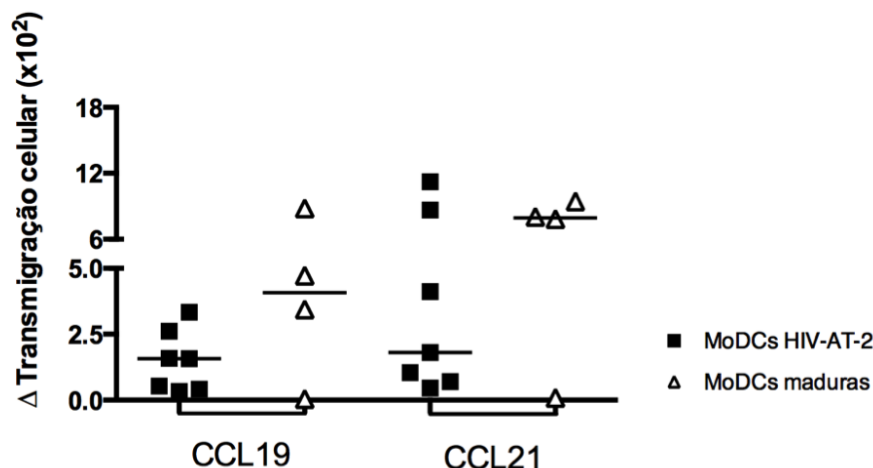
4.3.2 Capacidade migratória das MoDCs

A habilidade migratória das MoDCs em resposta às quimiocinas CCL19 e CCL21 foi avaliada por meio de ensaio em câmara de transmigração. Os dados obtidos com as MoDCs que migraram espontaneamente, ou seja, quando incubadas apenas com meio de cultura (condição basal), foram utilizados para normalizar a contagem de MoDCs que migraram em resposta às quimiocinas (delta). Os resultados obtidos estão representados na figura 13.

A análise dos resultados apresentados mostra que uma reduzida quantidade tanto de MoDCs HIV-AT-2 quanto de MoDCs maduras foram capazes de transmigrar em resposta aos quimioatraentes CCL19 e CCL21. A porcentagem mediana das MoDCs HIV-AT-2 que migraram em resposta a quimiocina CCL19 foi de 0,2% (variação de $0,33 \times 10^2$ – $3,3 \times 10^2$ células) e a porcentagem de migração das MoDCs maduras foi de 0,4% ($0,05 \times 10^2$ – $8,8 \times 10^2$ células). Além disso, somente cerca de 0,2% das MoDCs HIV-AT-2 ($0,5 \times 10^2$ –

8,7x10² células) e 0,8% das MoDCs maduras (0,09x10² – 9,4x10² células) responderam à quimiocina CCL21.

Figura 13- Habilidade migratória das MoDCs



Estão representadas as MoDCs HIV-AT-2 (quadrado) (n: 7) e as MoDCs maduras (triângulo) (n: 4) que migraram em resposta aos quimioatraentes CCL19 e CCL21. Os resultados representam os deltas (Δ) x 10² da contagem de células. As linhas horizontais indicam as medianas das condições estudadas.

4.3.3 Produção das citocinas IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs

Considerando que as citocinas IL-12 e IL-10 são essenciais na interação entre células apresentadoras e efetoras durante a resposta imune, analisamos a seguir a funcionalidade das MoDCs por meio da secreção de IL-12p70 e IL-10. As citocinas foram mensuradas no sobrenadante de culturas de MoDCs imaturas, MoDCs HIV-AT-2 e MoDCs maduras por meio da técnica de ELISA.

Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 14.

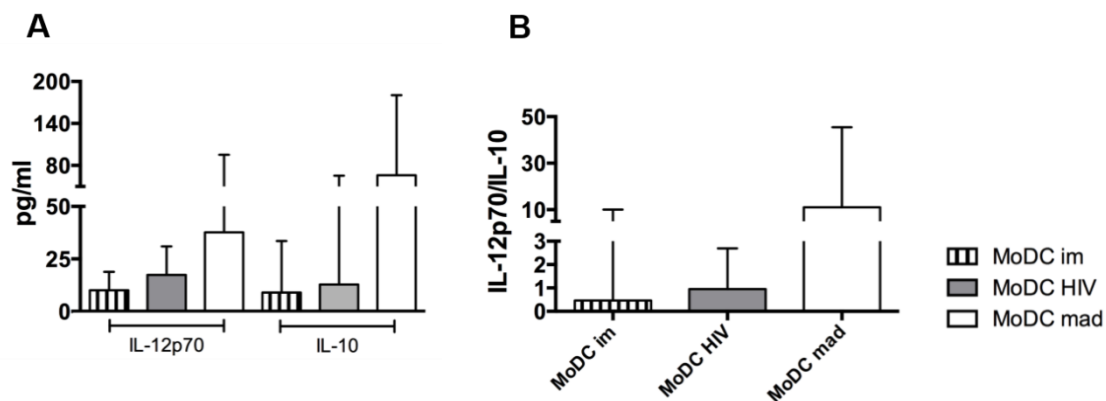
Foi observado que MoDCs HIV-AT-2 secretaram uma mediana de 17,4 pg/mL da citocina IL-12p70, com intervalo de 0 – 738 pg/mL, níveis cerca de 1,7 vezes mais elevados do que os secretados pelas MoDCs imaturas. A mediana de produção de IL-12p70 pelas MoDCs maduras foi de 37,6 pg/mL (16 – 109 pg/mL), 3,7 vezes mais elevado em comparação às MoDCs imaturas.

Com relação à citocina IL-10, as MoDCs HIV-AT-2 secretaram níveis medianos semelhantes aos observados pelas MoDCs imaturas (12,8 e 9 pg/mL, respectivamente). Em contrapartida, as MoDCs maduras produziram cerca de sete vezes mais IL-10 em comparação às MoDCs imaturas (66 pg/mL).

Apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas na secreção das citocinas entre as células estudadas, a mediana da produção tanto de IL-12p70 quanto de IL-10 foi mais elevada nas MoDCs maduras (figura 14 A).

Devido ao fato de serem consideradas citocinas com funções mutualmente antagônicas, foi analisado a seguir o balanço intraindividual entre a produção de IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs (razão IL12p70: IL-10). Foi verificado que MoDCs maduras apresentaram uma tendência a um balanço mais elevado para a produção de IL-12p70 em detrimento a IL-10, em comparação as MoDCs imaturas e as MoDCs HIV-AT-2, isto é, enquanto que a razão IL-12p70: IL-10 obtida pelas MoDCs imaturas foi de 0,46, a razão obtida com as MoDCs HIV-AT-2 foi de 0,95, ao passo que as MoDCs maduras produziram 11 vezes mais IL-12p70 do que IL-10 (figura 14 B).

Com base nos dados obtidos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados quanto à produção das citocinas IL-12p70 e IL-10, não obstante, foi notada uma grande variabilidade interindividual nos resultados analisados, além do que, as MoDCs maduras mostram uma tendência a produzirem mais IL-12p70 e IL-10 em comparação as MoDCs imaturas e as MoDCs HIV-AT-2.

Figura 14- Secreção de IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs

Sobrenadantes do 5º dia (MoDCs imaturas) (n: 17) e do 7º dia em cultura, MoDC HIV (n: 13) e MoDC mad, (n: 4) foram coletados e utilizados para a dosagem das citocinas IL12p70 e IL-10 pela técnica de ELISA (A). Os resultados estão representados em pg/mL. Em (B), balanço entre os níveis de IL-12p70 e IL-10. Os gráficos de barras mostram as concentrações medianas com a variação interquartil dos valores obtidos. MoDC HIV: MoDCs HIV-AT-2; MoDC mad: MoDCs maduras.

4.3.4 Resposta proliferativa de linfócitos T autólogos

A capacidade de MoDCs ativadas em estimular a proliferação de linfócitos T autólogos foi mensurada utilizando ensaio para monitoramento de CFSE, no qual as moléculas fluorescentes internalizadas pelos linfócitos são divididas entre a progênie e assim o sinal fluorescente reduz gradualmente (CFSE^{low}), como representado na figura 15 (A) (controle positivo PHA).

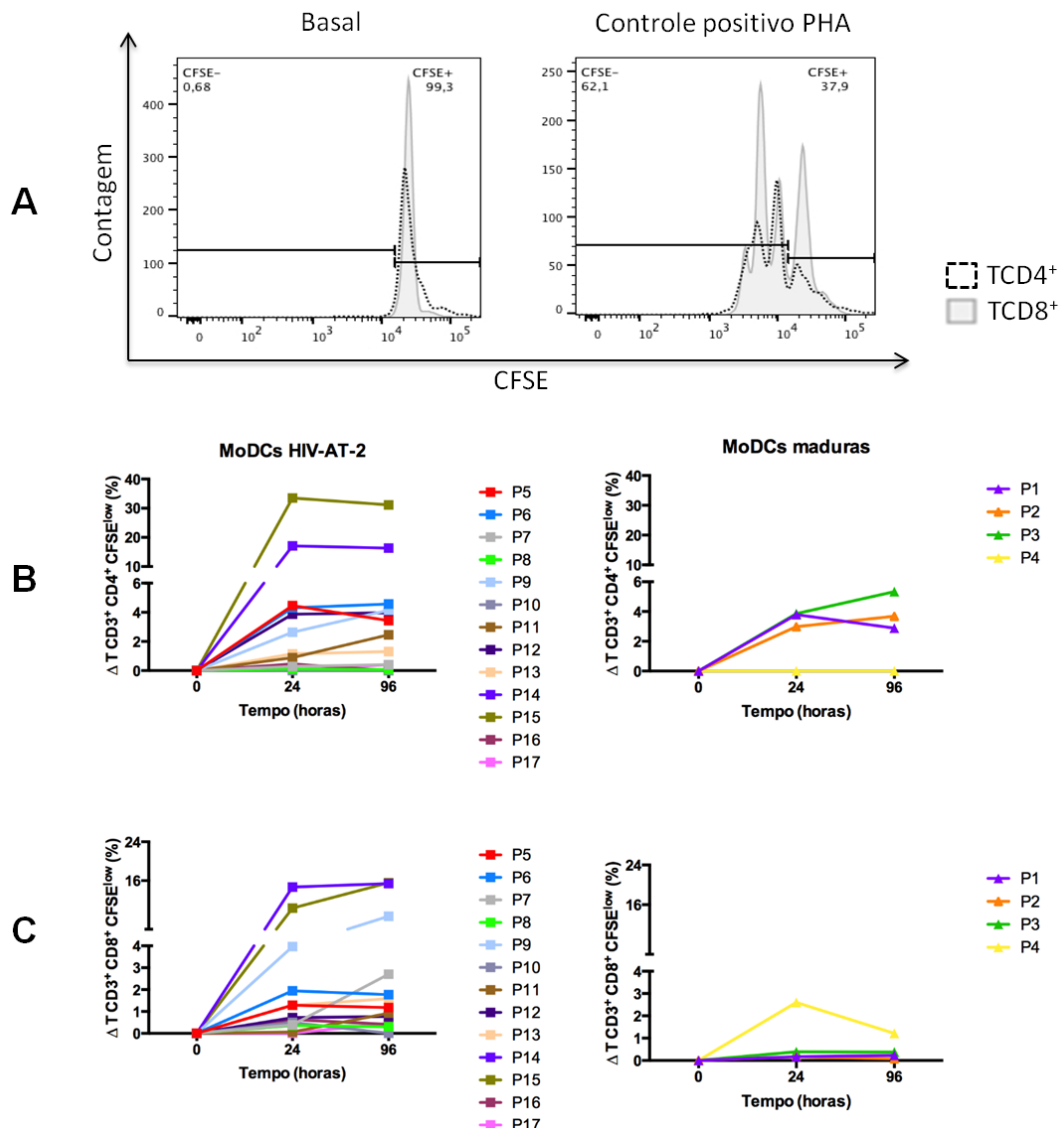
O índice de proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, após serem estimulados durante 24 e 96 horas por MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras, foi calculado por meio da subtração da proliferação basal, ou seja, linfócitos que proliferaram na ausência das MoDCs (delta).

De modo geral, apesar da grande variabilidade interindividual na proliferação das células dentro dos grupos estudados, é possível observar maior percentual de resposta proliferativa em linfócitos TCD4⁺ em comparação aos linfócitos TCD8⁺ e isto ocorreu principalmente nas culturas estimuladas com MoDCs HIV-AT-2 comparadas às culturas estimuladas com MoDCs maduras. Além disso, quando estimulados pelas MoDCs HIV-AT-2 os linfócitos TCD4⁺ proliferaram mais após 24 horas de cultura, enquanto que o pico de proliferação das células TCD8⁺ ocorreu após 96 horas de cultura (figura 15 B e

C). Não observamos diferença estatisticamente significativa com relação à proliferação obtida nos dois tempos estudados, a saber, após 24 e 96 horas de cocultivo com as MoDCs.

Quando realizamos uma análise interindividual dos dados obtidos notamos que, mesmo em níveis reduzidos, seis dos 13 indivíduos estimulados com as MoDCs HIV-AT-2 apresentaram proliferação de linfócitos TCD4⁺ em 24 horas de cocultivo, enquanto que as células de três em quatro indivíduos proliferaram frente ao estímulo com as MoDCs maduras. De forma semelhante, MoDCs HIV-AT-2 levaram à proliferação de linfócitos TCD8⁺ provenientes de sete dos 13 indivíduos e as MoDCs maduras, um em quatro indivíduos estudados.

Figura 15- Proliferação de linfócitos T autólogos estimulados pelas MoDCs ativadas



Em (A), histogramas representativos de um indivíduo da proliferação de linfócitos TCD4⁺ (linha pontilhada) e TCD8⁺ (em cinza), quando incubados na ausência de estímulo (Basal) ou ativados com fitohemaglutinina (Controle positivo PHA). Em (B) linfócitos TCD4⁺ e em (C) TCD8⁺ CFSE^{low}. Os gráficos de linhas representam os deltas (Δ) da porcentagem de proliferação dos linfócitos de cada paciente após 24 e 96 horas em cultura com as MoDCs. Os gráficos a esquerda demonstram a proliferação induzida pelas MoDCs HIV-AT-2 (n: 13) e a direita, MoDCs maduras (n: 4).

4.3.5 Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autólogos

Com o objetivo de avaliar a capacidade das MoDCs em estimular uma resposta imune específica *in vitro*, linfócitos autólogos foram cocultivados com MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras para avaliação individual ou multiparamétrica da expressão das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α e da quimiocina MIP-1 β .

Considerando que cada citocina possui uma cinética de produção particular, foi realizado previamente um ensaio para análise individual da cinética de expressão de cada uma das citocinas, as quais foram detectadas após 6, 24, 48 e 96 horas de cocultivo com as MoDCs (ANEXO A). Tomados em conjunto, os dados obtidos mostraram que os tempos ideais para o monitoramento dos ensaios de cocultivo eram 24 e 96 horas, pois permitiam a detecção de todos os mediadores propostos.

Assim os ensaios de cocultivo foram realizados nos tempos de 24 e 96h. Para todos os resultados apresentados, as porcentagens encontradas foram subtraídas do controle basal não estimulado (linfócitos cultivados na ausência de MoDCs).

A detecção de IFN- γ , IL-2, MIP-1 β e TNF- α foi normalizada com a produção basal de mediadores imunes observada em linfócitos autólogos. Essa produção basal foi determinada após cada um dos tempos estudados, na ausência de estímulo e presença de brefeldina A.

Primeiramente foi realizada a análise multiparamétrica dos dados obtidos. No contexto da infecção pelo HIV, a produção simultânea de mediadores imunes vem sendo associada com um bom prognóstico e um melhor controle da infecção, como observado em controladores de elite e progressores lentos, cujos linfócitos TCD8⁺ mostraram-se capazes de produzir de forma simultânea duas ou mais citocinas³².

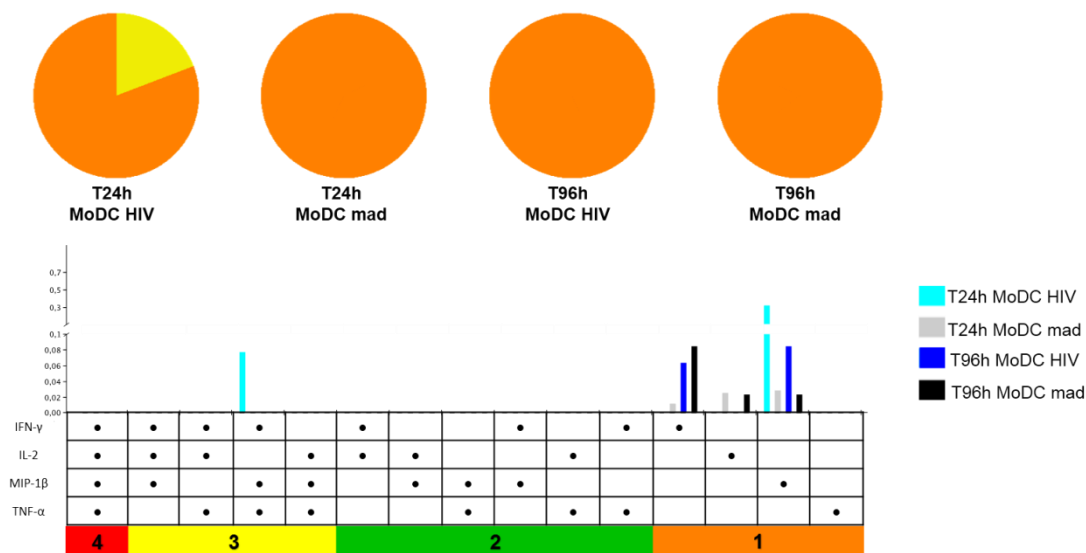
No presente estudo a análise multiparamétrica consistiu na determinação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ que expressaram de forma combinada dois ou mais mediadores imunes, após 24 e 96 horas de cocultivo com as MoDCs.

Deste modo os diagramas de setores circulares, representados nas figuras 16 e 17, mostram a proporção de citocinas/quimiocina expressas isolada (um mediador imune) ou simultaneamente (dois ou mais mediadores imunes) pelos linfócitos autólogos após serem estimulados durante 24 e 96 horas pelas MoDCs. Os mediadores imunes estão combinados em grupos de um a quatro, sendo que a cor laranja representa uma resposta, ou seja, apenas um tipo de citocina expressa, enquanto que a cor verde, duas citocinas expressas, a cor amarela, três citocinas e a cor vermelha representa quatro citocinas expressas simultaneamente pelas células analisadas.

Os gráficos de barras exibem a porcentagem de linfócitos que estão expressando as citocinas e os pontos no quadro inferior representam quais combinações dos mediadores imunológicos foram expressos pelas subpopulações linfocitárias estudadas.

Com relação aos linfócitos TCD4⁺ (figura 16), após 24 horas de cocultivo com MoDCs HIV-AT-2, mas não com MoDCs maduras, foi verificada expressão simultânea de três mediadores imunes, a saber, IFN- γ , MIP-1 β e TNF- α , por 19,3% dos linfócitos que produziram citocinas (figura 16 - diagrama de setores circulares). Após 96 horas de cocultivo não foi observada polifuncionalidade para quaisquer das culturas estimuladas com MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras.

Figura 16- Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD4⁺ cocultivados com MoDCs



O diagrama de setores circulares mostra a proporção de mediadores imunes expressos isolada ou simultaneamente por células TCD4⁺ após 24 (T24h) e 96 horas (T96h) de cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) ou as MoDCs maduras (MoDC mad). A expressão de quatro mediadores simultaneamente está representada pela cor vermelha; três, em amarelo; dois, em verde ou uma função, em alaranjado. Os gráficos de barras representam a porcentagem mediana de células TCD4⁺ expressando cada um dos mediadores imunológicos, de forma combinada (atividade polifuncional) ou isolada (atividade monofuncional), nos tempos estudados (em azul claro, 24, e azul escuro, 96 horas após cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2) (n: 13); em cinza (T24h) e preto (T96h) após cocultivo com as MoDCs maduras (n: 4).

A figura 17 representa a expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD8⁺.

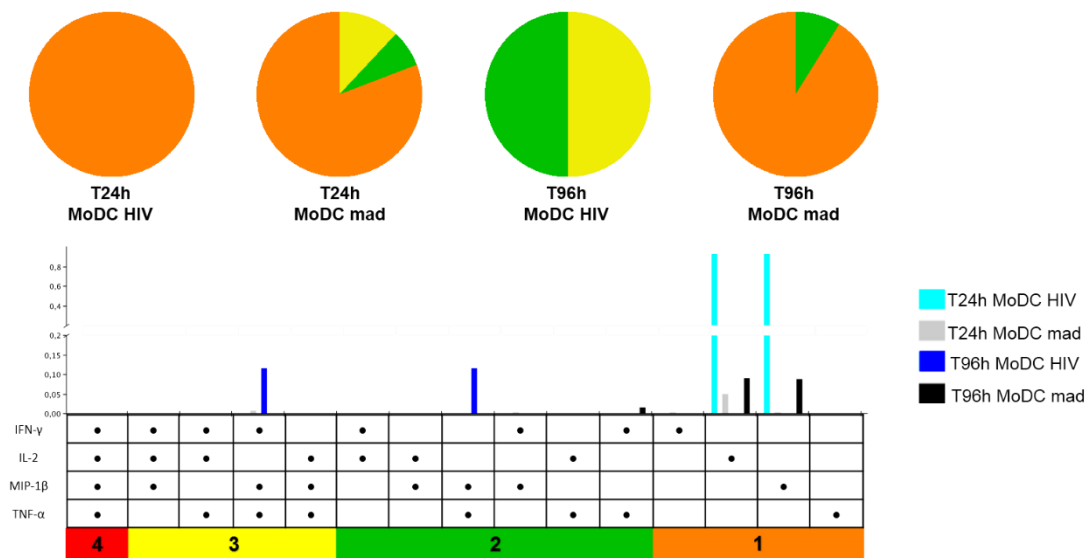
Os resultados mostram que MoDCs HIV-AT-2 foram capazes de induzir atividade polifuncional após 96 horas de cocultivo, com a expressão simultânea de dois ou três mediadores imunes. Observamos que 50% das células TCD8⁺ que produziram simultaneamente MIP-1β e TNF-α. Outros 50% das células expressaram IFN-γ, MIP-1β e TNF-α simultaneamente.

Por sua vez, MoDCs maduras induziram atividade polifuncional em aproximadamente 19% dos linfócitos TCD8⁺ após 24 horas de cocultivo, principalmente com a expressão de IFN-γ, MIP-1β e TNF-α ou IFN-γ e MIP-1β, entretanto, após 96 horas em cultura a polifuncionalidade induzida por MoDCs maduras foi reduzida para 9% (IFN-γ, TNF-α).

Apesar das MoDCs não terem levado à expressão simultânea de quatro citocinas/quimiocina pelas células T, quando os linfócitos autólogos foram incubados com o controle positivo SEB, além das MoDCs, foi observada uma resposta funcional de maior intensidade (ANEXO B) confirmando que as células T estavam viáveis e exibiam potencial para produção de uma resposta polifuncional mais potente.

Não obstante, foi averiguado que as MoDCs HIV-AT-2 foram capazes de estimular algum grau de resposta antígeno-específica em ambas as subpopulações de linfócitos T estudadas, sendo que, o pico de produção simultânea dos mediadores imunes estudados parece ocorrer após 24 horas para os linfócitos TCD4⁺ e 96 horas para os linfócitos TCD8⁺.

Figura 17- Expressão de mediadores imunes por linfócitos TCD8⁺ cocultivados com MoDCs



O diagrama de setores circulares mostra a proporção de mediadores imunes expressos isolada ou simultaneamente por células TCD8⁺ após 24 (T24h) e 96 horas (T96h) de cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) ou MoDCs maduras (MoDC mad). A expressão de quatro mediadores simultaneamente está representada pela cor vermelha; três, em amarelo; dois, em verde ou uma função, em alaranjado. Os gráficos de barras representam a porcentagem mediana de células TCD8⁺ expressando cada um dos mediadores imunológicos, de forma combinada (atividade polifuncional) ou isolada (atividade monofuncional), nos tempos estudados (em azul claro, 24, e azul escuro, 96 horas após cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2) (n: 13); em cinza (T24h) e preto (T96h) após cocultivo com as MoDCs maduras (n: 4).

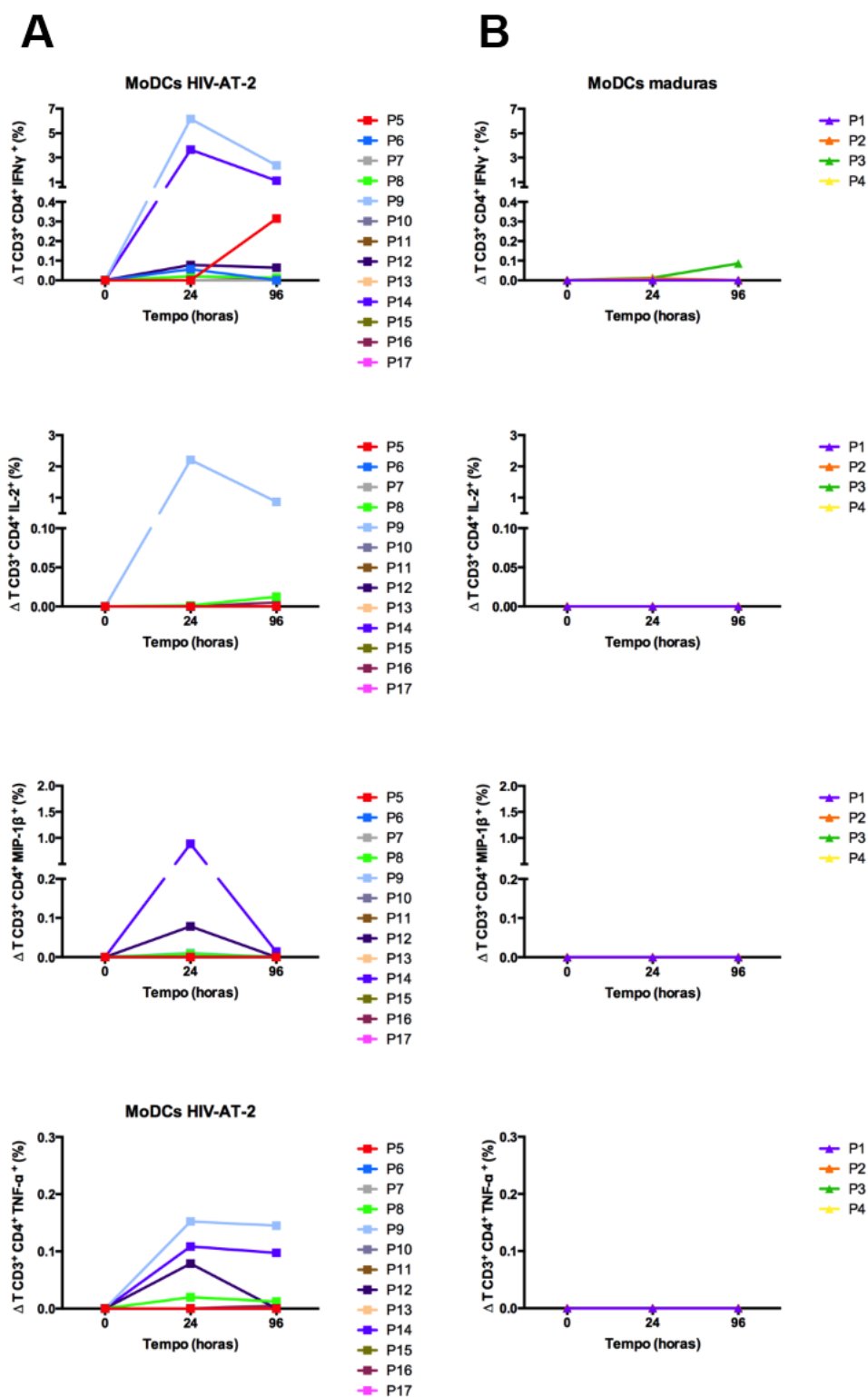
A seguir foi realizada uma análise individual dos dados obtidos com o intuito de avaliar a cinética de detecção intracelular de cada um dos mediadores imunológicos produzidos por linfócitos provenientes de cada indivíduo.

Os resultados de produção de citocinas estão representados como o delta (subtração do controle basal não estimulado) das porcentagens de expressão de citocinas por linfócitos TCD4⁺ (figura 18) e linfócitos TCD8⁺ (figura 19), provenientes de cada indivíduo estudado, após cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2 (A) ou MoDCs maduras (B).

De modo geral foi observada uma grande variabilidade interindividual na detecção intracelular dos mediadores imunes para as duas subpopulações linfocitárias estudadas.

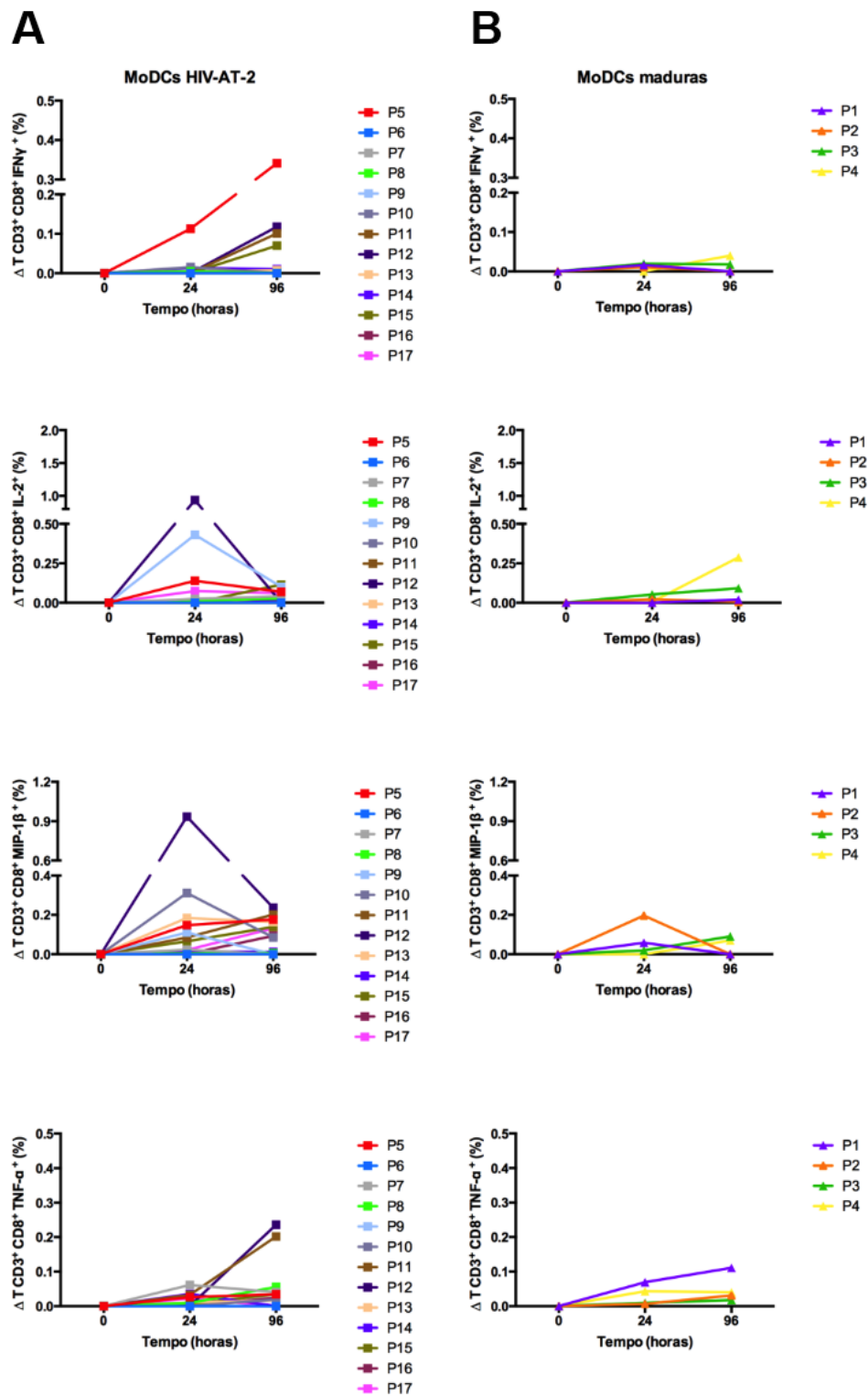
Com relação às células TCD4⁺ foi notado que o pico de produção dos mediadores imunes ocorreu após 24 horas em cultura com as MoDCs. É possível observar que o estímulo com MoDCs HIV-AT-2 levou à produção de citocinas em níveis mais elevados, comparado ao estímulo com MoDCs maduras, sugerindo especificidade da resposta estimulada pelo HIV-AT-2.

Figura 18- Cinética da produção de citocinas por linfócitos TCD4⁺ autólogos estimulados por MoDCs



Por sua vez, a cinética de produção de citocinas por linfócitos TCD8⁺ apresentou um padrão mais variado, no qual IL-2 e MIP-1 β foram mais expressos com 24 horas de cocultivo, ao passo que IFN- γ e TNF- α foram produzidos em maiores níveis após 96 horas de incubação com as MoDCs. Da mesma forma que para os linfócitos TCD4⁺, observamos que as células TCD8⁺ estimuladas com MoDCs HIV-AT-2 apresentaram níveis maiores de resposta comparadas às culturas estimuladas com MoDCs maduras, sem pulso com HIV-AT-2.

Figura 19- Cinética da produção de citocinas por linfócitos TCD8⁺ autólogos estimulados por MoDCs



(A) (n: 13) ou MoDCs maduras em (B) (n: 4). Os resultados representam os deltas (Δ) da porcentagem de expressão de citocinas/quimiocina obtida de cada paciente.

Os resultados mostraram que a porcentagem de detecção de mediadores imunes foi em geral baixa sendo que células de sete dos 13 indivíduos do grupo MoDCs HIV-AT-2 mostraram expressão de pelo menos uma das quatro citocinas estudadas. Ainda, as MoDCs HIV-AT-2 pareceram induzir uma resposta TCD8⁺ em maior número de indivíduos comparada à resposta TCD4⁺.

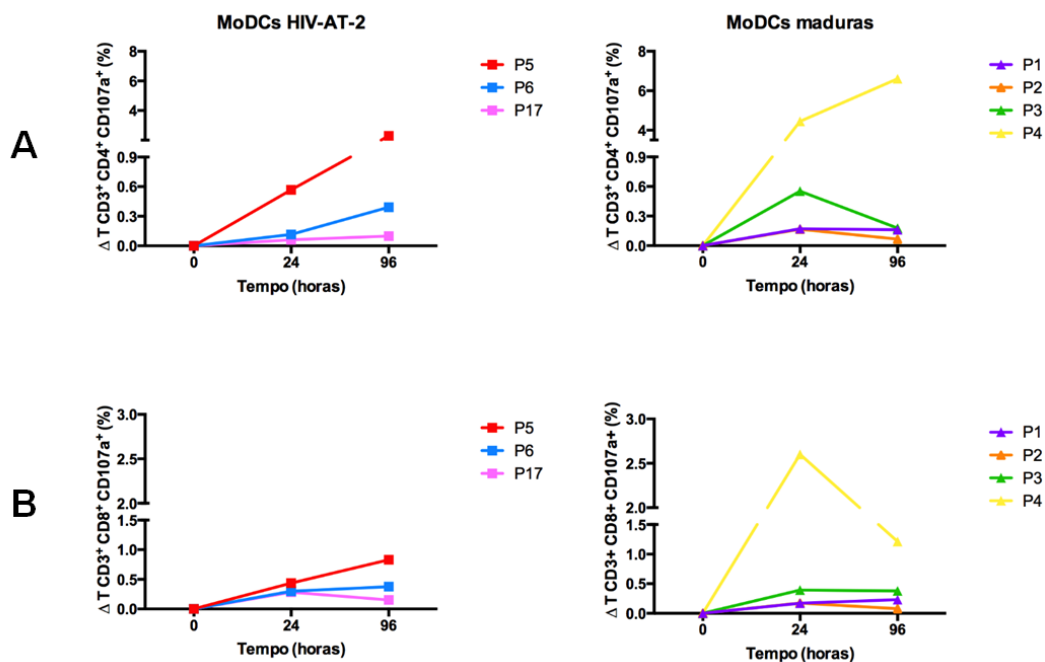
4.3.6 Indução de linfócitos autólogos com atividade citotóxica

Considerando que a expressão de CD107 está associada à liberação concomitante de perforina que, por sua vez, é consistente como processo de desgranulação⁹³, utilizamos este marcador como critério para caracterização de linfócitos T citotóxicos.

Na figura 20 estão representadas as porcentagens de linfócitos TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (B) com relação a atividade citotóxica após 24 e 96 horas de cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2 ou MoDCs maduras. Os resultados apresentados a seguir foram normalizados com a atividade citotóxica basal observada em linfócitos na ausência de estímulo (delta).

Vale destacar que este ensaio foi realizado com amostras provenientes de apenas sete indivíduos (três do grupo MoDCs HIV-AT-2 e quatro do grupo MoDCs maduras). Observamos atividade citotóxica mais elevada apenas para os linfócitos estimulados pelas MoDCs maduras de um indivíduo (P4), no qual 6,6% dos linfócitos TCD4⁺ e 2,6% dos linfócitos TCD8⁺ apresentaram positividade para a molécula CD107a.

Figura 20- Atividade citotóxica de linfócitos T autólogos após estímulo com MoDCs



Os gráficos de linhas demonstram os deltas (Δ) da porcentagem de linfócitos TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (B) citotóxicos de cada indivíduo após 24 e 96 horas de estímulo com as MoDCs HIV-AT-2 (n: 3), a esquerda ou MoDCs maduras (n: 4), a direita.

De forma geral, MoDCs induziram reduzida atividade citotóxica em linfócitos autólogos; todavia notamos uma variação no padrão dessa resposta, visto que, o estímulo das MoDCs HIV-AT-2 levou a um pico de atividade citotóxica linfocitária após 96 horas de cocultivo enquanto que as MoDCs maduras levaram a um aumento na porcentagem de linfócitos CD107a positivos com 24 horas de cultura.

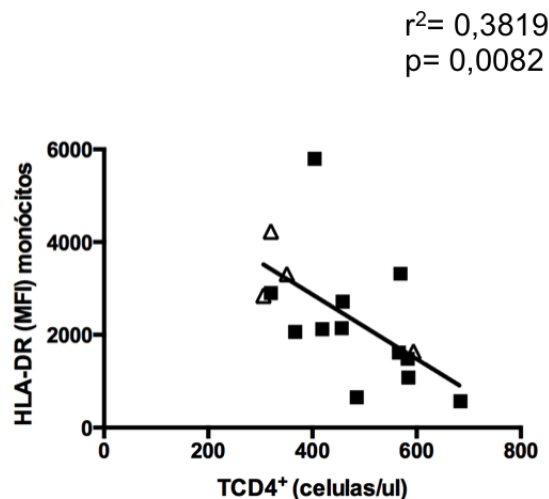
4.3.7 Análise de correlação

Finalmente utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman com o intuito de correlacionar os dados obtidos (rendimento de partículas virais; viabilidade das células; expressão de marcadores de superfície por monócitos e MoDCs; capacidade fagocítica das MoDCs imaturas; expressão de citocinas, citotoxicidade e proliferação dos linfócitos autólogos; capacidade migratória e

produção de citocinas pelas MoDCs ativadas) *versus* a carga viral e a contagem de linfócitos TCD4⁺ dos indivíduos estudados (vide tabela 1).

Dentre as diversas análises realizadas, constatamos correlação somente entre a quantidade de linfócitos TCD4⁺ e a expressão da molécula HLA-DR pelos monócitos (MFI). Foi observado que os indivíduos com elevada contagem de células TCD4⁺ (acima de 500 células/uL) apresentaram monócitos com menor expressão de HLA-DR (figura 21). Tal fato sugere que células precursoras menos ativadas poderiam estar correlacionadas a uma manutenção dos linfócitos TCD4⁺.

Figura 21- Correlação entre a contagem de linfócitos TCD4⁺ e expressão de HLA-DR por monócitos



Correlação inversa entre a contagem de células TCD4⁺ e a MFI da molécula HLA-DR expressa por monócitos. Os monócitos que foram posteriormente diferenciados em MoDCs HIV-AT-2 estão representados por quadrados (n: 13), enquanto que os monócitos que foram diferenciados em MoDCs maduras estão representados por triângulos (n: 4).

5. DISCUSSÃO

Vacinação terapêutica em associação ao uso da HAART pode ser uma abordagem promissora principalmente em caso de falha virológica, na qual a supressão viral não é obtida apesar do tratamento antirretroviral. Além disso, abordagens que associam imunoterapia baseada em DCs (com a finalidade de induzir atividade de CTLs) e tratamentos farmacológicos (voltados a reservatórios virais para reativação de vírus latentes) têm sido desenvolvidas tendo como objetivo a cura esterilizante da infecção pelo HIV⁹⁴.

O presente trabalho tem como base um estudo clínico de fase I/II de imunoterapia baseada em MoDCs HIV-AT-2 para indivíduos infectados pelo HIV, recém concluído em nosso laboratório. Neste ensaio pacientes infectados pelo HIV (*naïve* de tratamento) foram vacinados com três doses de MoDCs em intervalos de 15 dias entre cada dose. O braço A do estudo foi composto por quatro indivíduos que receberam 3×10^7 MoDCs maduras (sem o pulso adicional de HIV-AT-2); braço B, 3×10^6 MoDCs HIV-AT-2 (n: 9) e o braço C, que recebeu 3×10^7 MoDCs HIV-AT-2 (n: 6).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os dois tipos de produto vacinal utilizados neste ensaio clínico, constituído por MoDCs pulsadas com HIV-AT-2 ou somente MoDCs sem pulso, e eventualmente comparar seu efeito *in vitro*. Assim, com base no desenho do ensaio clínico, e de acordo com a disponibilidade de amostras remanescentes deste ensaio, a divisão dos grupos no presente trabalho ficou assim determinada: MoDCs maduras, constituída por amostras provenientes do braço A (n: 4) e MoDCs HIV-AT-2, constituída por amostras provenientes do braço B somadas às do braço C (n: 13). Embora as MoDCs maduras possam ser consideradas como um controle do produto vacinal, a desproporção no número amostral prejudica a análise dos dados, de modo que as comparações aqui apresentadas devem ser avaliadas com cautela.

No presente estudo o produto vacinal principal foi composto por vírus autólogo inativado, que constitui o imunógeno para o qual se deseja estimular uma resposta imune e as MoDCs, cuja função é carrear estes antígenos virais e efetivamente estimular uma resposta imune antígeno-específica¹⁴.

Com relação à metodologia empregada para expansão das partículas virais utilizadas para estimular as MoDCs, foram comparados dois sistemas: autólogo e alogênico. Os resultados obtidos apontaram vantagens quanto ao uso do sistema alogênico, visto que amostras que não puderam ser isoladas por meio do sistema autólogo foram facilmente obtidas através do sistema alogênico. Além disso, foi observado que utilizando o sistema alogênico houve um maior rendimento de partículas virais em comparação ao sistema autólogo.

Alguns fatores podem influenciar diretamente o processo de isolamento viral, como por exemplo, mecanismos antivirais presentes nas células dos indivíduos infectados, já desencadeados pelo HIV, que poderiam dificultar novas infecções celulares. Ao contrário, em células de doadores saudáveis, cuja resposta antiviral ainda não foi ativada, a infecção poderia ser facilitada⁸⁴. Além disso, há a possibilidade de que algumas peculiaridades do HIV, como o *fitness* viral, que é característico de cada cepa isolada de cada paciente também poderia afetar a dinâmica da replicação *in vitro*⁹⁵.

Outro importante aspecto que afeta diretamente o rendimento das partículas virais é a quantidade e a qualidade das células TCD4⁺ presentes nas culturas, visto que indivíduos infectados pelo HIV apresentam um quadro de ativação crônica do sistema imune devido ao aumento nos níveis de LPS circulante⁹⁶. Deste modo, as células imunes tornam-se mais suscetíveis à morte celular, fato que interfere diretamente na disponibilidade celular e conseqüentemente na replicação viral, podendo resultar na diferença no rendimento viral quando o mesmo isolado é cultivado em células de pacientes HIV⁺ e em células de doadores saudáveis.

Em seguida avaliamos a capacidade imunogênica dos vírus expandidos em ambos os sistemas. Através de ensaios de cocultivo foi possível observar que o HIV produzido em sistema alogênico foi capaz de estimular a produção de IFN- γ por linfócitos em níveis mais elevados quando comparados ao HIV produzido em sistema autólogo, sugerindo uma maior capacidade imunogênica do primeiro. Isso pode ser devido ao fato de que o HIV obtido pelo sistema alogênico carrega consigo, durante o brotamento, proteínas tais como, HLA de classe I, II, e ICAM-1 provenientes das células hospedeiras que podem exercer efeito aloestimulador adicional na resposta imune⁹⁷.

Com base nos resultados discutidos acima e tendo em vista que a disponibilidade de linfócitos TCD4⁺ de indivíduos infectados pelo HIV é de modo geral menor comparada à disponibilidade celular de indivíduos saudáveis, a expansão do HIV através de sistema alogênico apresenta vantagens em termos de produtividade e imunogenicidade quando comparado ao sistema autólogo. Deve-se considerar, entretanto, que para que o sistema alogênico possa ser uma alternativa para a produção viral no contexto da imunoterapia anti-HIV é imprescindível que seja descartada a possibilidade de desenvolvimento de auto-anticorpos e/ou anticorpos específicos anti-HLA estimulados por estes vírus produzidos em sistema alogênico⁸¹, e que seja garantida a ausência de patógenos nas células dos indivíduos supostamente saudáveis utilizadas como substrato para a replicação viral⁸⁴.

Embora nossos resultados tenham demonstrado que vírus produzidos em sistema alogênico apresentam maior rendimento viral e maior capacidade imunogênica, no protocolo clínico no qual este trabalho foi baseado, foi utilizado vírus produzido em sistema autólogo por se tratar de uma reprodução do estudo clínico de fase I previamente publicado⁵⁷, de modo que para os ensaios de MoDCs apresentados a seguir foram utilizados vírus obtidos em sistema autólogo.

Assim, após a obtenção das partículas virais, iniciamos os ensaios para obtenção das MoDCs. Observamos que o pulso das MoDCs com o HIV-AT-2 não alterou a viabilidade das células, visto que tanto as MoDCs maduras quanto as MoDCs HIV-AT-2 apresentaram viabilidade mediana próxima a 80%. Frank e colaboradores⁹⁸ (2002) também observaram que as MoDCs mantiveram-se viáveis após a incubação com o SIV-AT-2 (vírus da imunodeficiência símia inativado com aldrithiol 2).

Com relação ao rendimento final de MoDCs, embora tenhamos observado uma ligeira diferença entre as células pulsadas e não pulsadas com HIV-AT-2, a comparação não é válida, uma vez que o pulso viral requer algumas etapas a mais de lavagens, o que pode ter interferido na quantificação das células. A caracterização das DCs utilizadas para imunoterapia de indivíduos infectados pelo HIV é de extrema importância não somente para

garantir a qualidade do produto vacinal, mas para aprofundar o conhecimento acerca de características de DCs necessárias para estimular uma boa resposta vacinal, tendo sido estudada por diversos grupos^{81,99,100,101}.

Nesse contexto, inicialmente foram realizados os ensaios de caracterização dos monócitos e das MoDCs. *In vivo*, de acordo com os sinais presentes em seu microambiente os monócitos podem alterar seu fenótipo para responder a diferentes estímulos, por exemplo, podendo se diferenciar em células dendríticas numa condição inflamatória^{24,102}. Por sua vez, sua plasticidade *in vitro* permite que os monócitos possam ser diferenciados em DCs, de acordo com o estímulo empregado¹⁰². Além disso, é importante destacar a influência da qualidade destas células precursoras na qualidade do produto final, as MoDCs.

Com relação à molécula HLA-DR, observamos uma correlação negativa entre a expressão dessa molécula em monócitos e a contagem basal de linfócitos TCD4⁺ dos indivíduos estudados. Semelhante aos nossos achados, resultados publicados por Gascon e colaboradores¹⁰³ (2002) mostraram correlação negativa entre a ativação basal de linfócitos TCD4⁺ ou de monócitos de pacientes HIV⁺ (mensurada por meio da positividade para as moléculas CD38 e HLA-DR, respectivamente) e a contagem de células TCD4⁺¹⁰³.

No que tange à caracterização das MoDCs é conhecido que para montar uma resposta imune polarizante para uma resposta T efetora adequada, as DCs devem apresentar antígenos associados ao MHC e expressar moléculas coestimuladoras⁶⁶. Neste contexto, em nossos ensaios a caracterização imunofenotípica tanto das MoDCs HIV-AT-2 quanto das MoDCs maduras revelou um aumento na expressão e/ou porcentagem das moléculas HLA-DR, CD83, CD86, CD80 e CD40, comparado às MoDCs imaturas mostrando que as MoDCs atingiram o status de maturação.

Como descrito por Pierre et al.¹⁰⁴ (1997) e Steinman et al.¹⁰⁵ (1999), em DCs imaturas, grande parte das moléculas HLA-DR permanece em vacúolos endocíticos até que estímulos externos, como citocinas pró-inflamatórias levem à sua redistribuição na superfície das DCs maduras, para que ocorra a ativação de linfócitos T *naïve*.

Referente à molécula CD83, embora a literatura ainda não tenha alcançado um consenso com relação à sua função em células mielóides, sabe-se que ela é expressa quando as células alcançam o estágio de ativação. De fato, a presença desta molécula tem sido correlacionada com a produção de citocinas imunomoduladoras pelas DCs maduras para a consequente estimulação de linfócitos T¹⁰⁶.

Uma vez ativadas, a expressão de CD40, CD86 e CD80 é fundamental para a interação das células dendríticas com seus ligantes presentes nos linfócitos (CD40L e CD28, respectivamente), levando à ativação linfocitária a fim de gerar uma resposta específica e a proliferação de células T^{107,108}.

Por sua vez, em comparação às MoDCs imaturas, foi verificada alta expressão de PD-L1 tanto nas MoDCs HIV-AT-2 como nas MoDCs maduras. Dados da literatura sugerem que a ligação da PD-1, presente principalmente em linfócitos T, NKT (subtipo de células T *natural killer*) e células B, com a molécula PD-L1 (constitutivamente expressa por APCs) leva a exaustão dos linfócitos e à consequente perda da responsividade. De fato, foi observado aumento na porcentagem de DCs PD-L1⁺ provenientes do linfonodo de indivíduos HIV⁺ em comparação a DCs de indivíduos saudáveis⁹². Além disso, o bloqueio da via PD-1-PD-L em macacos auxiliou no restabelecimento da resposta vírus específica de linfócitos T e B durante a infecção crônica pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia) *in vivo* (revisto por Velu et al.¹⁰⁹ (2015)). Em nossos achados, o microambiente inflamatório propiciado pela incubação das MoDCs com o coquetel de citocinas pode ter favorecido o aumento na expressão do marcador PD-L1, o que poderia afetar a ativação linfocitária ou induzir a apoptose de células T. Nesse contexto, embora tenhamos investigado, não observamos correlação entre a expressão de PD-L1 e a viabilidade linfocitária após cocultivo.

Em comparação às células no estágio imaturo, MoDCs HIV-AT-2 mostraram redução significativa na porcentagem de células CD1a positivas, mas o mesmo não foi observado quando comparou-se às MoDCs maduras. A molécula CD1a, conhecida por apresentar antígenos lipídicos para células T ativadas, é uma proteína caracteristicamente expressa por células de Langerhans, mas também pode ser observada *in vivo* em diversos subtipos de

DCs¹¹⁰. Quanto à sua expressão, nossos resultados mostraram uma grande variabilidade interindividual, com percentuais de MoDCs imaturas CD1a⁺ variando de 0,25 a 84% entre os pacientes avaliados. De fato, Gogolak et al.¹¹¹ (2007) averiguaram que a expressão de CD1a em MoDCs é muito heterogênea, com percentuais variando de 0 a 100% dentre os 87 indivíduos estudados. Apesar do processo de ativação levar à redução na expressão da molécula CD1a¹¹², Gogolak e colaboradores¹¹¹ mostraram que MoDCs CD1a⁺ ativadas produziram IL-12p70 ao passo que a internalização do marcador CD1a foi relacionada ao aumento da produção de IL-10. Embora tenhamos investigado, no presente estudo não foi encontrada correlação entre a expressão da molécula CD1a e a produção das citocinas IL-10 e IL-12p70 pelas MoDCs.

Com relação à molécula DC-SIGN observamos redução na sua expressão apenas quando comparamos as MoDCs imaturas com as MoDCs maduras. DC-SIGN reconhece e internaliza glicanos presentes na superfície de patógenos, como por exemplo, envelopes virais¹¹³. Após o processo de maturação a capacidade de internalização via DC-SIGN apresenta-se reduzida, dando lugar ao processo de apresentação antigênica via MHC-I ou MHC-II¹¹⁴. No contexto da infecção pelo HIV pode ocorrer interação de alta afinidade da DC-SIGN com a gp120, esta interação protege as partículas virais da degradação podendo promover a transmissão do HIV a células CD4⁺, resultando em infecção produtiva destas últimas (revisito por Van Kooyk e Geijtenbeek¹¹⁵ (2003)). O fato da expressão do marcador DC-SIGN ter se mantido elevada em MoDCs HIV-AT-2 mesmo após a ativação com o coquetel de citocinas inflamatórias pode ser explicado pela presença do HIV-AT-2, que pode ter sido internalizado por meio desta via, na qual ocorre o escape de compartimentos lisossomais¹¹⁵ e, sendo assim, a molécula DC-SIGN associada ao HIV poderia ter sido novamente expressa na membrana das MoDCs após o processo de maturação.

Em nossos ensaios observamos que em comparação às células no estágio imaturo, houve um aumento na porcentagem e MFIs medianas do marcador CXCR4 tanto para as MoDCs HIV-AT-2 quanto para as MoDCs maduras, contudo, para essa última não foi observada diferença

estatisticamente significativa. De fato, o processo de maturação leva ao aumento na regulação da molécula CXCR4¹¹⁶. Estudos têm mostrado que em resposta a estímulos inflamatórios, DCs iniciam o processo de maturação tornando-se responsivas a diferentes quimiocinas¹¹⁷, (revisto por Caux et al.¹¹⁸ (2000)). Durante a resposta imune *in vivo* através do ligante CXCR4 as DCs migram para sítios inflamatórios em resposta à quimiocina CXCL12¹¹⁹. Foi demonstrado que a CXCL12 controla simultaneamente a quimiotaxia e a sobrevivência de DCs¹²⁰. Deste modo, a expressão da molécula CXCR4 poderia fornecer sinais importantes para a protecção contra a apoptose das DCs durante a maturação¹¹⁹.

Por sua vez, a molécula CCR5 é normalmente expressa em células de Langerhans e DCs do sangue periférico¹²¹ e direciona a migração das DCs para sítios inflamatórios¹²². Foi mostrado que as MoDCs respondem às quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES por meio dos ligantes CCR1 e CCR5 (revisto por Caux et al.¹¹⁸ (2000)). Nesse contexto notamos um baixo percentual de MoDCs CCR5 positivas (< 6%) mas ainda assim houve um aumento significativo na expressão desse receptor (MFI) em MoDCs maduras, em comparação às MoDCs imaturas. Tal fato sugere que a entrada do HIV-AT-2 nas MoDCs durante a incubação também pode ter ocorrido via CCR5, além da via DC-SIGN, por isso a expressão dessa molécula nas MoDCs HIV-AT-2 manteve-se baixa após a ativação.

Referente aos correceptores para o HIV, Frank e colaboradores (2002)⁹⁸ também observaram que a interação do SIV-AT-2 (vírus da imunodeficiência símia inativado com AT-2) com MoDCs humanas levou ao aumento da expressão de CXCR4 e à diminuição da expressão do marcador CCR5 após a maturação, em comparação às MoDCs imaturas.

Em linhas gerais os dados de imunofenotipagem sugerem que o processo de diferenciação de monócitos (células precursoras) em MoDCs imaturas foi bem sucedido e que, após incubação com o coquetel de ativação, com ou sem a presença do HIV-AT-2, as células apresentaram um perfil fenotípico característico de DCs maduras. Além disso, o fato de termos

observado uma expressão diferenciada dos marcadores DC-SIGN e CCR5 pelas MoDCs HIV-AT-2 sugere que houve a internalização das partículas virais por essas células.

No contexto de imunoterapia visando o estímulo da resposta imune, o status de ativação das MoDCs é fundamental para uma resposta adequada. Nosso conjunto de resultados, com base nos dados de fenotipagem, sugere que as MoDCs apresentam potencial imunostimulador para gerar uma resposta celular HIV específica.

Após as características fenotípicas terem sido avaliadas, a capacidade fagocítica, característica marcante, mas não exclusiva de MoDCs imaturas¹²³, foi analisada por meio do englobamento de partículas solúveis de dextran-FITC. Estudos mostram que esse fenômeno ocorre por meio do receptor de manose e também via macropinocitose⁸⁵. No primeiro caso, é necessário que ocorra a ligação do antígeno a uma variedade de receptores de endocitose presentes nas DCs para que o mesmo seja internalizado em vesículas. Por sua vez na macropinocitose ocorre a captura não específica de moléculas solúveis e é iniciada pela formação de vesículas a partir da membrana plasmática¹²⁴. Os resultados apresentados no presente estudo indicam que as MoDCs imaturas internalizaram eficientemente partículas de dextran-FITC, haja vista a elevada MFI encontrada. Frente aos dados da literatura, Kato e colaboradores¹²⁵ (2000) mostraram que MoDCs imaturas apresentam alta capacidade fagocítica, similar à observada em macrófagos e células de Langerhans.

Essencialmente, o processo de maturação leva as DCs a alternarem sua função de captura de patógenos para a apresentação de antígeno aos linfócitos T a fim de iniciar uma resposta específica. Para isso, MoDCs ativadas devem migrar dos sítios periféricos aos linfonodos regionais em resposta aos quimioatraentes. Sabe-se que após a maturação as DCs migram para os linfonodos drenantes em resposta às quimiocinas CCL19 e CCL21 (revisto por Alvarez et al.¹²⁶ (2008)). Os dados obtidos no presente estudo utilizando câmara de *transwell* indicaram uma baixa capacidade migratória tanto da

MoDCs HIV-AT-2 como das MoDCs maduras. Além disso, apesar de notarmos uma tendência das MoDCs maduras terem apresentado uma capacidade migratória mais elevada em comparação às MoDCs HIV-AT-2, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Uma possível explicação para a reduzida capacidade migratória observada nas MoDCs pode ser o fato de não utilizarmos em nosso coquetel de ativação a prostaglandina E2 (PGE₂) ou o LPS que são mediadores inflamatórios utilizados para aumentar a expressão de CCR7 em MoDCs^{127,128}. De fato, em nossos ensaios, a despeito de termos investigado, não observamos expressão de CCR7 pelas MoDCs estudadas (dados não mostrados).

A expressão do receptor CCR7 pelas DCs é essencial para coordenar a migração dessas células em resposta às quimiocinas CCL19 e CCL21, que por sua vez, são expressas por células estromais em zonas de células T nos órgãos linfoides secundários¹²⁹. Além disso, as MoDCs que migram para os linfonodos também podem produzir CCL19 com o intuito de atrair linfócitos T *naïve* e de memória central CCR7⁺¹³⁰.

Scandella e colaboradores¹²⁷ (2002) estudaram MoDCs estimuladas com o mesmo coquetel de citocinas utilizado no presente estudo e mostraram que a expressão de CCR7 por essas células era reduzida, assim como a migração em resposta aos quimioatraentes, em comparação às MoDCs estimuladas por TNF- α , IL-1 β , IL-6 juntamente com a PGE₂. Em concordância com esses dados, Muthuswamy e colaboradores¹³⁰ (2010) utilizando o coquetel de ativação com PGE₂ (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE₂) observaram que cerca de 4% das MoDCs incubadas foram atraídas pela quimiocina CCL21 (100 ng/mL) após 2 horas de incubação. Apesar de termos utilizado em nossos ensaios a concentração de 200 ng/mL e o tempo de incubação ter sido superior (2 h e 30 min), apenas cerca de 0,2% das MoDCs HIV-AT-2 e 0,8% das MoDCs maduras responderam à quimiocina CCL21.

Outro aspecto analisado em nosso trabalho foi a produção das citocinas IL-12p70 e IL-10 pelas MoDCs, responsáveis por nortear o perfil de polarização

dos linfócitos via interação com essas células. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por DCs, macrófagos e células B em resposta a patógenos. Essa citocina é composta por duas subunidades, α e β , denominadas p35 e p40, respectivamente, que unidas formam a unidade p70, que corresponde à IL-12 ativa. Ao ser secretada por DCs leva à produção de IFN- γ por linfócitos T promovendo a diferenciação para o perfil Th1 (revisto por Vignali e Kuchroo¹³¹, (2012)). Em contrapartida, a IL-10 apresenta função anti-inflamatória inibindo o desenvolvimento de respostas do tipo Th1 (revisto por Saraiva e O'garra¹³², (2010)). Nesse cenário, observamos níveis reduzidos de produção de ambas as citocinas pelas MoDCs, sendo que as MoDCs maduras apresentaram tendência a um balanço mais elevado para a produção de IL-12p70 em detrimento a IL-10, em comparação às MoDCs imaturas e as MoDCs HIV-AT-2. Diferente de nossos resultados, Buisson e colaboradores¹³³ (2009) mostraram que MoDCs ativadas com LPS e CD40L solúvel provenientes de indivíduos HIV⁺ *naïve* de tratamento exibiram produção de IL-12p70 similar a observada em MoDCs obtidas de indivíduos saudáveis. Uma possível explicação para a baixa produção de IL-12p70 pode ser atribuída ao coquetel de ativação utilizado. Trabalhos tem demonstrado que IFNs tipo I e II são potentes indutores da produção de IL12p70 por MoDCs. Por sua vez, MoDCs assim obtidas são potentes estimuladoras de uma resposta Th1 citotóxica, desejável no contexto de terapia anti-tumoral ou anti-infecciosa¹³⁴.

Estudos mostram que linfócitos provenientes de indivíduos na fase aguda da infecção pelo HIV e também de controladores de elite apresentam uma alta capacidade proliferativa específica para o HIV, ao passo que esta função efetora está reduzida em indivíduos cronicamente infectados com altos índices virêmicos¹³⁵. Nesse contexto, nossos ensaios de linfoproliferação, baseados na incorporação do corante CFSE, não evidenciaram correlação entre a carga viral plasmática basal dos pacientes e a capacidade proliferativa dos linfócitos. Outrossim, as MoDCs foram capazes de induzir resposta proliferativa de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autólogos após 24 e 96 horas de cocultivo, não tendo sido evidenciada, contudo, diferença estatisticamente significativa entre a capacidade das MoDCs HIV-AT-2 em estimular a

linfoproliferação em comparação as MoDCs maduras. Ainda nesse cenário, Huang e colaboradores¹³⁶ (2009) evidenciaram que DCs pulsadas com peptídeos de HIV-1 foram capazes de estimular a resposta proliferativa e polifuncional de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos.

Sabado e colaboradores¹³⁷ (2009) observaram que DCs pulsadas com HIV quimicamente inativado por AT-2 podem induzir resposta imune específica em linfócitos T *naïve* da mesma forma que as DCs incubadas com vírus infeccioso, apresentando potencial para reestimular células de memória existentes e também restaurar a resposta HIV específica enfraquecida na fase aguda da infecção. Nesse contexto, foi avaliada a qualidade da interação entre MoDCs e células T autólogas por meio da produção de mediadores imunes e citotoxicidade. Sabe-se que o controle imune da infecção pelo HIV está correlacionado à qualidade da resposta específica ao antígeno gerada pelos linfócitos T³². Deste modo, pacientes que controlam a infecção pelo HIV (controladores de elite e progressores lentos) apresentam linfócitos TCD8⁺ específicos para o HIV capazes de produzir múltiplas citocinas e proliferar em resposta ao antígeno, e linfócitos TCD4⁺ que expressam quantidades elevadas de IFN- γ e IL-2 em resposta aos peptídeos do HIV (revisito por Deeks e Walker²⁸, (2007)).

Em nossos ensaios quando cultivadas com linfócitos autólogos verificamos que MoDCs HIV-AT-2, mas não MoDCs maduras, foram capazes de induzir produção conjunta de IFN- γ , MIP-1 β e TNF- α pela subpopulação TCD4⁺, sugerindo o estímulo de uma resposta específica para antígenos do HIV. Com relação à indução de polifuncionalidade em células TCD8⁺, observamos que MoDCs HIV-AT-2 induziram a produção de duas ou três citocinas de forma simultânea, mas diferentemente da resposta de células TCD4⁺, as células TCD8⁺ apresentaram resposta polifuncional em momento mais tardio, após 96h de estímulo. Vale ainda salientar que as MoDCs maduras também foram capazes de induzir resposta polifuncional, entretanto em menores níveis comparadas às MoDCs HIV-AT-2.

Células TCD4⁺ orquestram tanto a resposta imune celular como a resposta imune humoral e têm papel crítico no controle da replicação viral, de

modo que a resposta de linfócitos TCD4⁺ impacta na qualidade da resposta de células TCD8⁺ (revisto por Velu et al.¹⁰⁹ (2015)). De fato, observamos que as MoDCs HIV-AT-2 induziram maiores níveis de células TCD4⁺ produtoras de citocinas após 24 horas em cultura em relação à TCD8⁺. Este padrão de resposta se inverte após 96h de cocultivo, quando observamos aumento na polifuncionalidade da subpopulação TCD8⁺. Podemos atribuir esta condição ao fato de termos utilizado partículas virais inteiras como fonte de antígenos, deste modo, sua internalização pelas DCs pode ter ocorrido majoritariamente por meio da via endocítica, na qual os antígenos degradados são apresentados via MHC de classe II¹³⁸, e por sua vez, a ativação da subpopulação linfocitária TCD4⁺ num primeiro momento pode ter induzido posteriormente a polifuncionalidade verificada em linfócitos TCD8⁺. Corroborando estes dados, vale salientar que cinética de resposta similar foi observada com relação aos nossos dados de linfoproliferação, no qual observamos que o pico de proliferação de linfócitos TCD4⁺ acontece em 24h de cocultivo enquanto TCD8⁺ tem sua proliferação maior após 96h de cocultivo.

Há poucos trabalhos publicados avaliando o potencial de DCs em induzir resposta polifuncional de linfócitos T, ademais devem ser levadas em consideração as diferenças nas condições de cultura entre os estudos. Isto posto, Flamar et al.¹³⁹ (2013) observaram que DCs cultivadas na presença de IFN- α (IFN- α DCs) estimuladas com anticorpo recombinante anti-CD40 fusionado com peptídeos do HIV (α CD40.HIV 5 pep), levaram à produção de IFN- γ e TNF- α ou somente MIP-1 β por linfócitos TCD4⁺.

Huang e colaboradores¹⁴⁰ (2010) observaram que DCs pulsadas com diferentes combinações de peptídeos do HIV foram capazes de induzir resposta antígeno-específica com a produção simultânea de dois mediadores imunes por linfócitos TCD8⁺, sendo que, a resposta de células TCD8⁺ foi predominante quando comparada à encontrada em linfócitos TCD4⁺.

Em contrapartida, Sabado e colaboradores¹³⁷ (2009) encontraram uma atividade polifuncional predominante em linfócitos TCD4⁺ provenientes de indivíduos não infectados quando cocultivados com MoDCs HIV-AT-2, mostrando que as DCs pulsadas com partículas virais inativadas pelo AT-2 foram capazes de estimular uma resposta específica *in vitro*.

Ademais, foi mostrado por Romain et al¹⁴¹ (2012) que a habilidade das DCs em induzir uma resposta polifuncional pode ser extrapolada para um modelo *in vivo*. Nesse estudo, primatas não humanos foram inoculados com DCs autólogas derivadas do precursor CD34⁺ expressando o Gag e posteriormente, PBMCs provenientes dos mesmos animais foram estimuladas *in vitro* com o mesmo pool de peptídeos do Gag utilizado para pulsar as DCs e foi observada a produção combinada de IFN- γ e TNF- α ou IFN- γ e MIP-1 β por linfócitos TCD8⁺ enquanto que células TCD4⁺ produziram simultaneamente IL-2 e MIP-1 β .

A citotoxicidade também é uma função de extrema importância para o controle da infecção pelo HIV. A presença de células TCD4⁺ proliferando e expressando granzima B e perforina nos estágios iniciais da infecção está relacionada ao controle da replicação viral¹⁴². Além disso, foi observado que linfócitos TCD8⁺ provenientes de indivíduos HIV⁺ não progressores expressam CD107a ao mesmo tempo que produzem IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α e IL-2³².

Deste modo, examinamos a capacidade das MoDCs ativadas em induzirem linfócitos com atividade citotóxica determinada pela expressão da vesícula CD107a na superfície celular. Nossos resultados mostraram variabilidade na atividade citotóxica entre os indivíduos estudados e de forma geral, as MoDCs induziram uma reduzida ativação de CTLs. Resultados similares foram observados no estudo do produto vacinal utilizado em indivíduos HIV⁺ por Allard et al.¹⁰⁰ (2008), no qual as MoDCs promoveram uma fraca sustentabilidade na magnitude e amplitude da resposta de células TCD8⁺ citotóxicos.

A análise individual dos dados de proliferação, produção de citocinas e citotoxicidade de linfócitos T autólogos estimulados por MoDCs revelou uma grande variabilidade interindividual nas amostras estudadas. Observamos que alguns indivíduos não apresentaram resposta celular frente às MoDCs, além do fato de que linfócitos provenientes de alguns indivíduos apresentaram níveis elevados de ativação basal, o que pode ter mascarado a resposta específica.

Além disso, não observamos correlação entre a PD-L1 expressa pelas MoDCs ativadas e a variabilidade da resposta linfocitária obtida. Considerando que é necessária a interação da PD-1 com seu ligante (PD-L1) para que ocorra a inibição da resposta e exaustão das células T, o fato de não termos avaliado a apoptose assim como a expressão da molécula PD-1 em linfócitos nos impede de fazer correlações mais pertinentes.

A despeito de nossas tentativas de correlacionar resultados de fenotipagem de MoDCs com os ensaios funcionais, não obtivemos quaisquer indícios de correlação entre os dados. Podemos especular que o perfil de expressão gênica diferencial de cada indivíduo (revisto por Coelho et al.⁹⁴ (2016)), bem como a morte de linfócitos recém ativados tenham contribuído para a variabilidade dos resultados obtidos. De fato, esta variabilidade foi também observada no estudo de Lu e colaboradores⁵⁷ (2004), visto que embora alguns indivíduos tenham mostrado exuberante resposta à vacina, cerca de metade dos pacientes não foram capazes de responder à terapia. Posteriormente polimorfismos em genes da resposta imune inata foram correlacionados à resposta prolongada ou fraca/transitória observada nesses indivíduos vacinados¹⁴³. Entretanto, outros fatores como a qualidade das MoDCs poderiam influenciar a resposta induzida pela vacina.

Embora tenhamos pesquisado as possíveis correlações entre características de MoDCs e qualidade da resposta funcional (dados não mostrados), no presente trabalho não foi possível identificar características fenotípicas de MoDCs que pudessem estar relacionadas a sua resposta funcional.

Em resumo os resultados obtidos demonstram que as partículas virais obtidas a partir de sistema alogênico apresentaram maior rendimento viral e maior capacidade imunogênica em comparação ao HIV obtido por meio de sistema autólogo. Além disso, MoDCs provenientes de indivíduos HIV⁺ apresentaram níveis de maturação adequados, assim como capacidade endocítica, quando imaturas. Por outro lado mostraram reduzida capacidade migratória e reduzida habilidade em secretar as citocinas IL-10 e IL-12p70. Com relação ao estímulo de resposta linfocitária, embora a análise individual

tenha revelado que nem todas as amostras foram capazes de responder ao estímulo com MoDCs, constatamos que MoDCs HIV-AT-2 foram capazes de induzir (tanto em linfócitos TCD4⁺ quanto TCD8⁺ autólogos) proliferação e resposta polifuncional mas reduzida atividade citotóxica.

Além da importância da dose utilizada, a fim de aprimorar o produto vacinal, protocolos alternativos de diferenciação/ativação de MoDCs devem ser estudados. Tem sido observado que extensos períodos de cultura para gerar DCs maduras podem afetar negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (revisto por Bol et al.¹⁴⁴ (2016)). Adicionalmente, outros protocolos têm sido estudados com o intuito de induzir uma alta produção de IL-12 pelas DCs, melhorando a resposta polifuncional HIV específica mediada por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Nesse cenário, Mosca e colaboradores¹⁴⁵ (2000) mostraram que a ativação das DCs com IFN- γ e CD40L juntamente com LPS aumentou a produção de IL-12 pelas células. Mais recentemente, a utilização de GM-CSF e IFN- α para diferenciar monócitos em MoDCs, seguida pela ativação das MoDCs imaturas com lipopeptídeos do HIV juntamente com LPS melhoraram a qualidade da resposta imune, mensurada pela redução no rebote da CVP dos indivíduos após a suspensão do HAART⁶⁸.

Considerando que, de forma geral, os ensaios clínicos publicados utilizando MoDCs no contexto da infecção pelo HIV têm mostrado uma resposta de CTLs e linfoproliferativa fraca e/ou transitória, apesar de ser parcialmente associada por alguns autores com o controle da replicação viral (revisto por Coelho, et al.⁹⁴ (2016)), melhorias ainda precisam ser feitas a fim de aprimorar o produto vacinal utilizado na imunoterapia da infecção pelo HIV.

6. CONCLUSÃO

- A produção de vírus autólogo através do sistema alogênico resultou em maior rendimento viral e potencial imunogênico.
- Apesar dos resultados indicarem que as MoDCs provenientes de indivíduos HIV⁺ apresentaram níveis de maturação adequados, o produto vacinal composto por MoDCs HIV-AT-2 foi capaz de induzir resposta polifuncional antígeno específica *in vitro* em apenas alguns indivíduos.

7. ANEXOS

ANEXO A

Cinética para definição dos tempos do ensaio de cocultivo

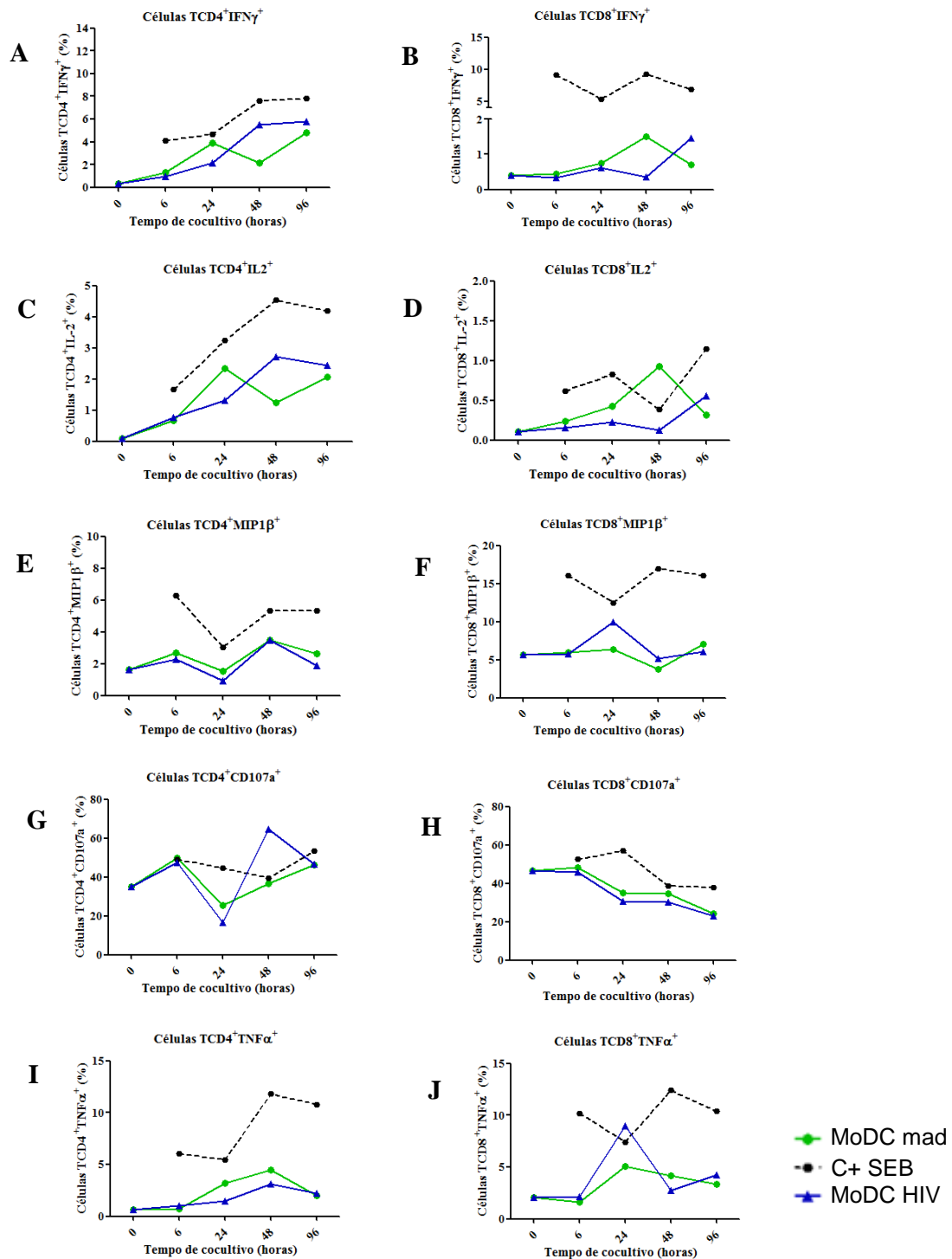


Figura I: Determinação dos tempos de cocultivo. MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) (azul) e MoDCs maduras (MoDC mad) (verde) foram cocultivadas com linfócitos autólogos provenientes

de indivíduo infectado pelo HIV por 6, 24, 48 e 96 horas para determinação dos tempos de indução individual de cada um dos mediadores imunológicos estudados. Em preto, controle positivo composto por SEB que foi adicionado à cultura nas últimas 6 horas de incubação. Os gráficos a esquerda representam a produção de IFN- γ (A), IL-2 (C), MIP-1 β (E), CD107a (G) e TNF- α (I) em linfócitos TCD4⁺. Os gráficos a direita representam a produção de IFN- γ (B), IL-2 (D), MIP-1 β (F), CD107a (H) e TNF- α (J) em linfócitos TCD8⁺.

ANEXO B

Controle positivo da expressão de mediadores imunes por linfócitos autólogos

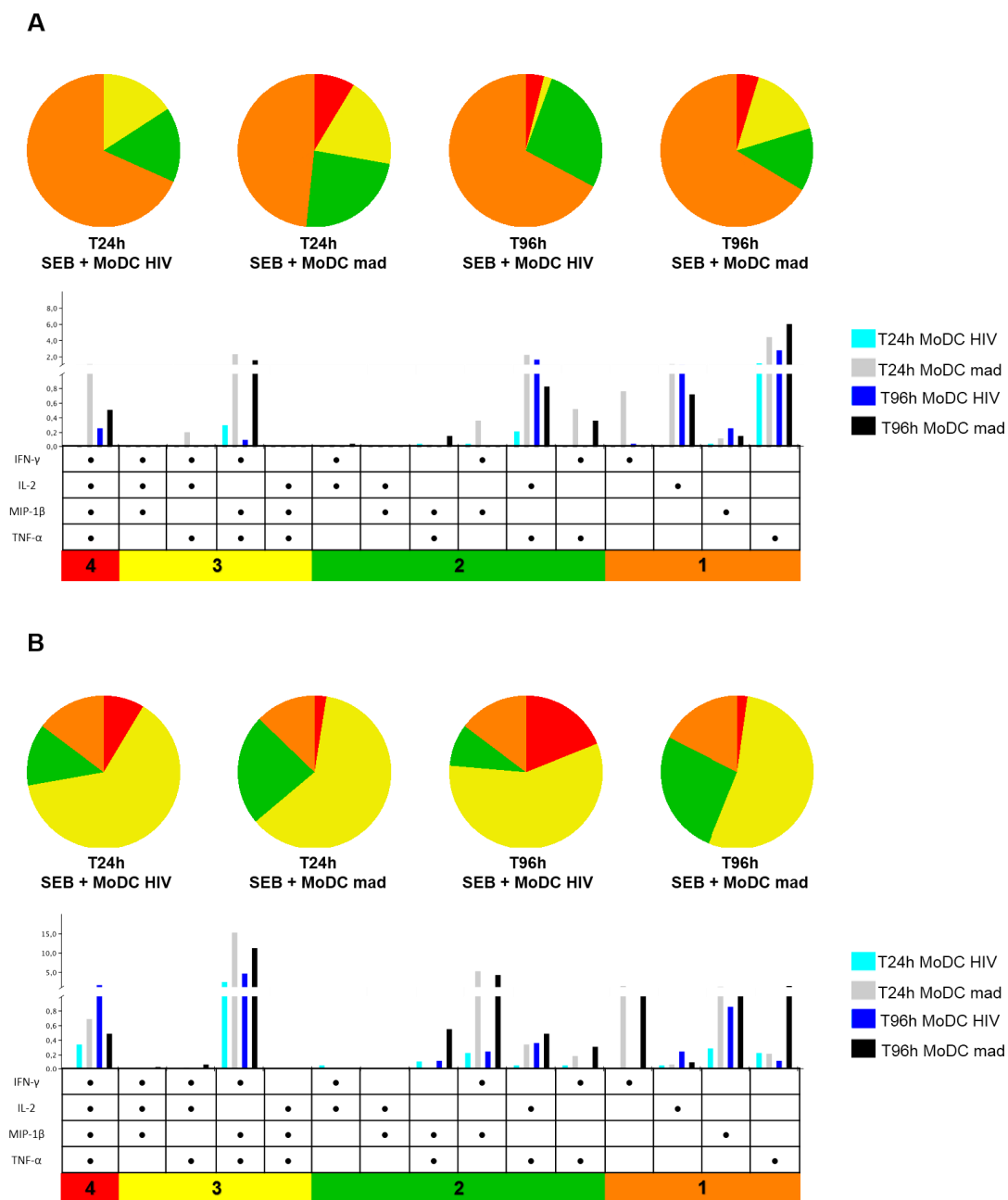


Figura II. Controle positivo da expressão de citocinas por linfócitos autólogos. O diagrama de setores circulares mostra a quantidade de mediadores imunes expressos isolada ou simultaneamente por células TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (B) após 24 (T24h) e 96 horas (T96h) de cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2 (MoDC HIV) ou MoDCs maduras (MoDC mad), juntamente com o controle positivo do ensaio, composto por SEB. A expressão de quatro mediadores simultaneamente está representada pela cor vermelha; três, em amarelo; dois, em verde ou uma função, em alaranjado. Os gráficos de barras representam a porcentagem mediana de células expressando cada um dos mediadores imunológicos, de forma combinada (atividade polifuncional) ou isolada (atividade monofuncional), nos tempos estudados (em azul claro, 24, e azul escuro, 96 horas após cocultivo com as MoDCs HIV-AT-2) (n: 13); em cinza (T24h) e preto

(T96h) após cocultivo com as MoDCs maduras (n: 4), sendo que, nas últimas 6 horas em cultura, todos os poços receberam 1 µg/mL de SEB.

8. REFERÊNCIAS

1. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*. J Clin Virol. 2005;34(4):233-44.
2. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. Capítulo 12. *Falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro*. In: *Imunobiologia de Janeway*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
3. Engelman A, Cherepanov P. *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol. 2012;10(4):279-90.
4. Laurindo-Teodorescu, L., Teixeira, P. R. *Histórias da aids no Brasil: as respostas governamentais à epidemia de aids*. Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, v. 1, p. 464, 2015.
5. World Health Organization, WHO [homepage on the Internet]. Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/en/>.
6. Brasil. *Boletim Epidemiológico AIDS e DST*. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, PN de DST e AIDS, Ano IV, n. 1, 27ª à 53ª semana epidemiológica, jul./dez. 2014 e 1ª à 26ª semana epidemiológica, jan./jun. 2015.
7. Mindel A, Tenant-Flowers M. *ABC of AIDS - Natural history and management of early HIV infection*. Br Med J. 2001;322 (7297):1290-3.
8. Centers of Disease Control and Prevention, [homepage on the Internet]. U.S. Department of Health & Human Services, USA. Disponível em <http://www.cdc.gov/globalaids/Resources/pmtct-care/pmtct-who-hhs-cmpntsM1.html>
9. Van Vaerenbergh K. *Study of the impact of HIV genotypic drug resistance testing on therapy efficacy*. Verh K Acad Geneeskdg Belg. 2001;63(5):447-73.
10. Finzi D, Siliciano RF. *Viral dynamics in HIV-1 infection*. Cell. 1998;93(5):665-71.
11. Orsega S. *Adult HIV Infection Treatment Update 2014: An Approach to HIV Infection Management and Antiretroviral Treatment*. J Am Assoc Nurse Pract. 2015;11(1):95-102.
12. Regidor DL, Detels R, Breen EC, Widney DP, Jacobson LP, Palella F, et al. *Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation*. Aids. 2011;25(3):303-14.

13. Palmer S, Josefsson L, Coffin JM. *HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection*. J. Intern. Med. 2011;270(6):550-60.
14. Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature. 1998;392(6673):245-52.
15. Steinman RM, Cohn ZA. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice - I. Morphology, quantitation, tissue distribution* (Reprinted from J Exp Med, vol 137, pg 1142-1162, 1973). J. Immunol. 2007;178(1):5-25.
16. Hart DNJ. *Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood. 1997;90(9):3245-87.
17. Steinman RM. *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol. 1991;9:271-96.
18. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YT, et al. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol. 2000;18:767.
19. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. *The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting*. Annu Rev Immunol, Vol 31. 2013;31:563-604.
20. Guilliams M, van de Laar L. *A hitchhiker's guide to myeloid cell subsets: practical implementation of a novel mononuclear phagocyte classification system*. Front Immunol. 2015;6.
21. Lipscomb MF, Masten BJ. *Dendritic cells: Immune regulators in health and disease*. Physiol. Rev. 2002;82(1):97-130.
22. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat. Med. 1999;5(8):919-23.
23. Guilliams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. *Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species*. Immunity. 2016;45(3):669-84.
24. Zhou LJ, Tedder TF. *CD14(+) blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83(+) dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(6):2588-9.

25. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. *Immunity*. 1999;11(6):753-61.
26. Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, Selssler J, Schott M. *Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells*. *Horm Metab Res*. 2008;40(2):99-107.
27. Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V. *The Role of Human Dendritic Cells in HIV-1 Infection*. *J Invest Dermatol*. 2015;135(5):1225-33.
28. Deeks SG, Walker BD. *Human immunodeficiency virus controllers: Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy*. *Immunity*. 2007;27(3):406-16.
29. Jia MM, Hong KX, Chen JP, Ruan YH, Wang Z, Su B, et al. *Preferential CTL targeting of Gag is associated with relative viral control in long-term surviving HIV-1 infected former plasma donors from China*. *Cell Research*. 2012;22(5):903-14.
30. Mothe B, Llano A, Ibarondo J, Zamarrero J, Schiaulini M, Miranda C, et al. *CTL Responses of High Functional Avidity and Broad Variant Cross-Reactivity Are Associated with HIV Control*. *Plos One*. 2012;7(1).
31. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. *Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA*. *Science*. 1998;279(5359):2103-6.
32. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8(+) T cells*. *Blood*. 2006;107(12):4781-9.
33. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. *Cellular immune responses to HIV*. *Nature*. 2001;410(6831):980-7.
34. Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P. *Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells*. *J Immunol*. 1999;163(3):1105-9.
35. Cocchi F, Devico AL, Garzinodemo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. *Identification of RANTES, MIP-1-alpha, and MIP-1-beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8(+) T-cells*. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.

36. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. *Cellular immune responses to HIV*. Nature. 2001;410(6831):980-7.
37. Schmidt B, Fujimura SH, Martin JN, Levy JA. *Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy*. J Clin Immunol. 2006;26(1):55-64.
38. Dillon SM, Robertson KB, Pan SC, Mawhinney S, Meditz AL, Folkvord JM, et al. *Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008;48(1):1-12.
39. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. *Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection*. AIDS. 2005;19(3):261-71.
40. Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. *Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1*. Blood. 2003;101(11):4505-11.
41. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. *Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus*. J. Virol. 2001;75(14):6710-3.
42. Wu L, Kewal Ramani VN. *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nat. Rev. Immunol. 2006;6(11):859-68.
43. Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. *Dendritic cells and HIV specific CD4(+) T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer*. Blood. 2006;108(5):1643-51.
44. Groot F, van Capel TMM, Schuitemaker JHN, Berkhout B, de Jong EC. *Differential susceptibility of naive, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission*. Retrovirology. 2006;3.
45. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, et al. *Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides*. PLoS Biol. 2012;10(12).

46. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature. 2003;424(6944):99-103.
47. Luban J. *Innate Immune Sensing of HIV-1 by Dendritic Cells*. Cell Host Microbe. 2012;12(4):408-18.
48. Tsunetsugu-Yokota Y, Muhsen M. *Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission*. Front Microbiol. 2013;4.
49. Hertoghs N, van der Aar AMG, Setiawan LC, Kootstra NA, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. *SAMHD1 degradation enhances active suppression of dendritic cell maturation by HIV-1*. J Immunol. 2015;194(9):4431-7.
50. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. Nat. Med. 1996;2(1):52-8.
51. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. *Clinical use of dendritic cells for cancer therapy*. Lancet Oncol. 2014;15(7):E257-E67.
52. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, et al. *Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma*. J. Exp. Med. 1999;190(11):1669-78.
53. Schreibelt G, Bol KF, Westdorp H, Wimmers F, Aarntzen E, Duiveman-de Boer T, et al. *Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells*. Clin. Cancer Res. 2016;22(9):2155-66.
54. Gowans EJ, Roberts S, Jones K, Dinatale I, Latour PA, Chua B, et al. *A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals*. J Hepat. 2010;53(4):599-607.
55. Zabaleta A, D'Avola D, Echeverria I, Llopiz D, Silva L, Villanueva L, et al. *Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Mol Ther Methods Clin Dev. 2015.
56. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shapero MH, Dupuis M, van Schooten WCA, et al. *A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed*

allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998;14(7):551-60.

57. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. *Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection.* Nat. Med. 2004;10(12):1359-65.
58. Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcami J, Morente V, et al. *Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection.* J Infect Dis. 2005;191(10):1680-5.
59. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, et al. *Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial.* J Med Virol. 2006;78(6):711-8.
60. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. *Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals.* Clin Vaccine Immunol. 2008;15(2):284-92.
61. Gandhi RT, O'Neill D, Bosch RJ, Chan ES, Bucy RP, Shopis J, et al. *A randomized therapeutic vaccine trial of canarypox-HIV-pulsed dendritic cells vs. canarypox-HIV alone in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy.* Vaccine. 2009;27(43):6088-94.
62. Kloverpris H, Karlsson I, Bonde J, Thorn M, Vinner L, Pedersen AE, et al. *Induction of novel CD8(+) T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes.* Aids. 2009;23(11):1329-40.
63. Routy J-P, Boulassel M-R, Yassine-Diab B, Nicolette C, Healey D, Jain R, et al. *Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy.* Clin Immunol. 2010;134(2):140-7.
64. Garcia F, Climent N, Assoumou L, Gil C, Gonzalez N, Alcami J, et al. *A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection.* J Infect Dis. 2011;203(4):473-8.
65. Allard SD, De Keersmaecker B, de Goede AL, Verschuren EJ, Koetsveld J, Reedijk ML, et al. *A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption.* Clin Immunol. 2012;142(3):252-68.

66. Van Gulck E, Vlieghe E, Vekemans M, Van Tendeloo VFI, Van De Velde A, Smits E, et al. *mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients*. *Aids*. 2012;26(4):F1-F12.
67. Garcia F, Climent N, Guardo AC, Gil C, Leon A, Autran B, et al. *A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication*. *Sci Transl Med*. 2013;5(166).
68. Levy Y, Thiebaut R, Montes M, Lacabaratz C, Sloan L, King B, et al. *Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load*. *Eur J Immunol*. 2014;44(9):2802-10.
69. Jacobson JM, Routy JP, Welles S, DeBenedette M, Tcherepanova I, Angel JB, et al. *Dendritic Cell Immunotherapy for HIV-1 Infection Using Autologous HIV-1 RNA: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72(1):31-8.
70. Macatangay BJC, Riddler SA, Wheeler ND, Spindler J, Lawani M, Hong F, et al. *Therapeutic vaccination with dendritic cells loaded with autologous HIV type 1-infected apoptotic cells*. *J Infect Dis*. 2016;213(9):1400-9.
71. A service of the U.S. National Institutes of Health [homepage on the Internet]. USA. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
72. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. *Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation*. *J Immunol*. 1998;160(9):4587-95.
73. Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble-antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor-necrosis-factor-alpha*. *J. Exp. Med*. 1994;179(4):1109-18.
74. Erdmann M, Dorrie J, Schaft N, Strasser E, Hendelmeier M, Kampgen E, et al. *Effective clinical-scale production of dendritic cell vaccines by monocyte elutriation directly in medium, subsequent culture in bags and final antigen loading using peptides or RNA transfection*. *J Immunother*. 2007;30(6):663-74.

75. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. *Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells*. Immunology. 2005;114(2):204-12.
76. Oshiro TM, de Almeida A, da Silva Duarte AJ. *Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality*. Immunotherapy. 2009;1(6):1039-51.
77. Pion M, Serramia MJ, Diaz L, Bryszewska M, Gallart T, Garcia F, et al. *Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer*. Biomaterials. 2010;31(33):8749-58.
78. Tan PH, Beutelspacher SC, Xue SA, Wang YH, Mitchell P, McAlister JC, et al. *Modulation of human dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy*. Blood. 2005;105(10):3824-32.
79. Kavanagh DG, Kaufmann DE, Sunderji S, Frahm N, Le Gall S, Boczkowski D, et al. *Expansion of HIV-specific CD4(+) and CD8(+) T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef*. Blood. 2006;107(5):1963-9.
80. Gavioli R, Cellinia S, Castaldello A, Voltan R, Gallerani E, Gagliardoni F, et al. *The Tat protein broadens T cell responses directed to the HIV-1 antigens Gag and Env: Implications for the design of new vaccination strategies against AIDS*. Vaccine. 2008;26(5):727-37.
81. Gil C, Climent N, Garcia F, Hurtado C, Nieto-Marquez S, Leon A, et al. *Ex vivo production of autologous whole inactivated HIV-1 for clinical use in therapeutic vaccines*. Vaccine. 2011;29(34):5711-24.
82. Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW, Vasquez GM, et al. *Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins*. J. Virol. 1998;72(10):7992-8001.
83. Rutebemberwa A, Bess JW, Brown B, Arroyo M, Eller M, Slike B, et al. *Evaluation of aldrithiol-2-inactivated preparations of HIV type 1 subtypes A, B, and D as reagents to monitor T cell responses*. AIDS Res Hum Retroviruses . 2007;23(4):532-42.
84. da Silva LT, Pontillo A, da Silva WC, de Almeida A, da Silva Duarte AJ, Oshiro TM. *Autologous and allogenic systems of HIV expansion: what is*

- the better choice for clinical application in therapeutic vaccine?* Immunotherapy. 2013;5(12):1305-11.
85. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class-II compartment - down-regulation by cytokines and bacterial products.* J. Exp. Med. 1995;182(2):389-400.
 86. Mucci I, Legitimo A, Compagnino M, Consolini R, Migliaccio P, Metelli MR, et al. *The methodological approach for the generation of human dendritic cells from monocytes affects the maturation state of the resultant dendritic cells.* Biologicals. 2009;37(5):288-96.
 87. Obermajer N, Svajger U, Jeras M, Sattin S, Bernardi A, Anderluh M. *An assay for functional dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) inhibitors of human dendritic cell adhesion.* Analytical Biochemistry. 2010;406(2):222-9.
 88. Chan KS, Kaur A. *Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+T lymphocytes in rhesus macaques.* J Immunol Methods . 2007;325(1-2):20-34.
 89. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. *SPICE: Exploration and Analysis of Post-Cytometric Complex Multivariate Datasets.* Cytometry Part A. 2011;79A(2):167-74.
 90. Dembek CJ, Kutscher S, Heltai S, Allgayer S, Biswas P, Ghezzi S, et al. *Nef-specific CD45RA+CD8+T cells secreting MIP-1 beta but not IFN-gamma are associated with nonprogressive HIV-1 infection.* AIDS Res Ther. 2010;7.
 91. Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. *Data Analysis in Flow Cytometry: The Future Just Started.* Cytometry Part A. 2010;77A(7):705-13.
 92. Carranza P, Estrada PMD, Rivera DD, Ablanedo-Terrazas Y, Reyes-Teran G. *Lymph nodes from HIV-infected individuals harbor mature dendritic cells and increased numbers of PD-L1+ conventional dendritic cells.* Hum Immunol. 2016;77(7):584-93.
 93. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+T cells by a flow cytometric assay for degranulation.* J Immunol Methods. 2003;281(1-2):65-78

94. Coelho AV, de Moura, Kamada AJ, da Silva RC, Guimarães RL, Brandão LA, de Alencar LC, Crovella S. *Dendritic Cell-Based Immunotherapies to Fight HIV: How far from a success story? A systematic review and meta-analysis*. Int J Mol Sci. v. 12, n. 17, Nov 2016.
95. Yue L, Pfafferott KJ, Baalwa J, Conrod K, Dong CC, Chui C, et al. *Transmitted virus fitness and host T cell responses collectively define divergent infection outcomes in two HIV-1 recipients*. PLoS Pathog. 2015;11(1).
96. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat. Med. 2006;12(12):1365-71.
97. Cantin R, Methot S, Tremblay MJ. *Plunder and stowaways: Incorporation of cellular proteins by enveloped viruses*. J. Virol. 2005;79(11):6577-87.
98. Frank I, Piatak M, Stoessel H, Romani N, Bonnyay D, Lifson JD, et al. *Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): Differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs*. J. Virol. 2002;76(6):2936-51.
99. Marovich MA, Mascola JR, Eller MA, Louder MK, Caudrelier PA, El-Habib R, et al. *Preparation of clinical-grade recombinant canarypox-human immunodeficiency virus vaccine-loaded human dendritic cells*. J Infect Dis. 2002;186(9):1242-52.
100. Allard SD, Pletinckx K, Breckpot K, Heirman C, Bonehill A, Michiels A, et al. *Functional T-cell responses generated by dendritic cells expressing the early HIV-1 proteins Tat, Rev and Nef*. Vaccine. 2008;26(29-30):3735-41.
101. Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, Mead H, Montes M, Ranganathan R, et al. *Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine*. J Immunol Methods. 2011;365(1-2):27-37.
102. Mitchell AJ, Roediger B, Weninger W. *Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes*. Cell Immunol. 2014;291(1-2):22-31.

103. Gascon RL, Narvaez AB, Zhang RZ, Kahn JO, Hecht FM, Herndier BG, et al. *Increased HLA-DR expression on peripheral blood monocytes in subsets of subjects with primary HIV infection is associated with elevated CD4 T-cell apoptosis and CD4 T-cell depletion.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2002;30(2):146-53.
104. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, et al. *Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells.* Nature. 1997;388(6644):787-92.
105. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. *Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: Recent cell biological studies.* Hum Immunol. 1999;60(7):562-7.
106. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. *CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses.* Eur J Immunol . 2007;37(3):686-95.
107. Ma DY, Clark EA. *The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.* Semin Immunol. 2009;21(5):265-72.
108. Watanabe S, Inoue J. *Intracellular delivery of lipopolysaccharide induces effective Th1-immune responses independent of IL-12.* Plos One. 2013;8(7).
109. Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. *Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options.* Retrovirology. 2015;12.
110. Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. *CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells.* Clin Exp Immunol. 2009;155(3):523-33.
111. Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, et al. *Differentiation of CD1a(-) and CD1a(+) monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR gamma.* Blood. 2007;109(2):643-52.
112. Cao XC, Sugita M, van der Wel N, Lai J, Rogers RA, Peters PJ, et al. *CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation.* J. Immunol. 2002;169(9):4770-7.
113. Menon S, Rosenberg K, Graham SA, Ward EM, Taylor ME, Drickamer K, et al. *Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN*

- demonstrated with surface force measurements. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(28):11524-9.*
114. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, et al. *The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. J. Immunol. 2002;168(5):2118-26.*
115. van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. *DC-sign: Escape mechanism for pathogens. Nat. Rev. Immunol. 2003;3(9):697-709.*
116. Ricart BG, John B, Lee D, Hunter CA, Hammer DA. *Dendritic cells distinguish individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. J. Immunol. 2011;186(1):53-61.*
117. Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, et al. *Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. J. Immunol. 1997;159(4):1993-2000.*
118. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, et al. *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. Semin Immunopathol. 2000;22(4):345-69.*
119. Humrich JY, Humrich JH, Averbeck M, Thumann P, Termeer C, Kampgen E, et al. *Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. Immunology. 2006;117(2):238-47.*
120. Delgado-Martin C, Escribano C, Luis Pablos J, Riol-Blanco L, Luis Rodriguez-Fernandez J. *Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendritic cells. J Biol Chem. 2011;286(43):37222-36.*
121. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(9):5215-20*
122. Rossi R, Lichtner M, De Rosa A, Sauzullo I, Mengoni F, Massetti AP, et al. *In vitro effect of anti-human immunodeficiency virus CCR5 antagonist maraviroc on chemotactic activity of monocytes, macrophages and dendritic cells. Clin Exp Immunol. 2011;166(2):184-90.*

123. Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, Carano RAD, et al. *Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(9):4287-92.
124. Liu Z, Roche PA. *Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells.* Front Physiol. 2015;6.
125. Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DNJ. *Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells.* Int Immunol. 2000;12(11):1511-9.
126. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. *Mechanisms and consequences of dendritic cell migration.* Immunity. 2008;29(3):325-42.
127. Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. *Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells.* Blood. 2002;100(4):1354-61.
128. Cirone M, Conte V, Farina A, Valia S, Trivedi P, Granato M, et al. *HHV-8 reduces dendritic cell migration through down-regulation of cell-surface CCR6 and CCR7 and cytoskeleton reorganization.* Virol J. 2012;9.
129. Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, et al. *CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2.* Blood. 2004;103(5):1595-601.
130. Muthuswamy R, Kalinski P, Reinhart T, Schadendorf D. *PGE2 transiently enhances dc expression of CCR7 but inhibits the ability of dcs to produce CCL19 and attract naive T cells.* Clin Immunol. 2010;135:S100-S.
131. Vignali DAA, Kuchroo VK. *IL-12 family cytokines: immunological playmakers.* Nat Immunol. 2012;13(8):722-8.
132. Saraiva M, O'Garra A. *The regulation of IL-10 production by immune cells.* Nat. Rev. Immunol. 2010;10(3):170-81.
133. Buisson S, Benlahrech A, Gazzard B, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. *Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10.* J Infect Dis. 2009;199(12):1862-71.

134. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, et al. *Alpha-type-1 polarized dendritic cells: A novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity*. Cancer Research. 2004;64(17):5934-7.
135. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, et al. *HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4(+) T cells endowed with proliferative capacity*. J. Exp. Med. 2003;198(12):1909-22.
136. Huang X-L, Fan Z, Borowski L, Rinaldo CR. *Multiple T-cell responses to human immunodeficiency virus type 1 are enhanced by dendritic cells*. Clin Vaccine Immunol. 2009;16(10):1504-16.
137. Sabado RL, Kavanagh DG, Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, Rosenberg E, et al. *In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4(+) T cells in acute HIV-1 infection*. Plos One. 2009;4(1).
138. Sabado RL, Babcock E, Kavanagh DG, Tjomsland V, Walker BD, Lifson JD, et al. *Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1*. Eur J Immunol. 2007;37(7):1752-63.
139. Flamar A-L, Xue Y, Zurawski SM, Montes M, King B, Sloan L, et al. *Targeting concatenated HIV antigens to human CD40 expands a broad repertoire of multifunctional CD4(+) and CD8(+) T cells*. Aids. 2013;27(13):2041-51.
140. Huang X-L, Fan Z, Borowski L, Mailliard RB, Rolland M, Mullins JI, et al. *Dendritic cells reveal a broad range of MHC class I epitopes for HIV-1 in persons with suppressed viral load on antiretroviral therapy*. Plos One. 2010;5(9).
141. Romain G, van Gulck E, Epaulard O, Oh S, Li DP, Zurawski G, et al. *CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates*. Eur J Immunol. 2012;42(8):2019-30.
142. Zaunders JJ, Munier ML, Kaufmann DE, Ip S, Grey P, Smith D, et al. *Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection*. Blood. 2005;106(5):1660-7.

143. Segat L, Brandao LAC, Guimares RL, Pontillo A, Athanasakis E, de Oliveira RM, et al. *Polymorphisms in innate immunity genes and patients response to dendritic cell-based HIV immuno-treatment*. Vaccine. 2010;28(10):2201-6.
144. Bol KF, Schreibelt G, Gerritsen WR, de Vries IJM, Figdor CG. *Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond*. Clin. Cancer Res. 2016;22(8):1897-906.
145. Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, et al. *A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 Ligand and interferon-gamma treatment*. Blood. 2000;96(10):3499-504.

APÊNDICES

APÊNDICE A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO.....CIDADE.....

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

2.RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

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

ENDEREÇO:Nº.....APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** *Caracterização das células dendríticas utilizadas em um ensaio clínico de fase I/II de vacina terapêutica anti-HIV*

PESQUISADOR : Dra Telma Miyuki Oshiro.....

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica . INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBio 39439/01-D.

UNIDADE DO HCFMUSP: Lab Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses.....

Rubrica do sujeito de pesquisa
ou responsável.....

Rubrica do pesquisador.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

O Sr(a). está sendo convidado(a) para participar como voluntário desta pesquisa sobre “Caracterização das células dendríticas utilizadas em um ensaio clínico de fase I/II de vacina terapêutica anti-HIV”.

Se decidir participar, é importante que leia atentamente as informações contidas neste termo a fim de melhor compreender a sua participação na pesquisa.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): o(a) Sr(a) foi convidado(a) para participar desta pesquisa por já ter participado de um estudo de vacina de células dendríticas para tratamento da infecção pelo HIV. O objetivo desta outra pesquisa agora é caracterizar detalhadamente a vacina utilizada no seu tratamento com o objetivo de melhorar o produto para projetos futuros.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Caso concorde em participar desta pesquisa, utilizaremos o material excedente do preparo da vacina, coletado por ocasião da aférese, e que está armazenado em nosso laboratório.

Caso haja a necessidade excepcional de uma nova coleta, ela será dentro das visitas de rotina que você já iria realizar. É importante salientar que a pesquisa não mudará em nada a forma de seu tratamento.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: como descrito acima, a princípio não está prevista nenhuma coleta extra de sangue. Será utilizado material previamente armazenado no laboratório. Excepcionalmente, poderão ser realizadas coleta de sangue (volume aproximado de 4 colheres de sopa), mas sem alterar as datas em que você já viria ao laboratório para seu acompanhamento.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados: o desconforto principal está relacionado à punção da veia no antebraço para coleta de sangue. Poderá haver alguma dor e inchaço, que devem desaparecer em alguns minutos.

Rubrica do sujeito de pesquisa
ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

5 – Benefícios para o participante: O voluntário não terá nenhum benefício direto, mas certamente estará colaborando para o desenvolvimento de vacinas anti-HIV. Não haverá benefício adicional por participar deste protocolo.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos: Não se aplica.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso as informações junto aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Telma Miyuki Oshiro que pode ser encontrado no endereço Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 470 prédio 2 – 3º andar Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes. Os participantes serão identificados, após a entrada no estudo, por códigos, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Despesas e compensações: Sua participação no estudo é totalmente voluntária, não sendo previsto nenhum tipo de compensação financeira relacionada.

12 – A equipe envolvida pela condução do estudo assume o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa
ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

CONSENTIMENTO:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Caracterização das células dendríticas utilizadas em um ensaio clínico de fase I/II de vacina terapêutica anti-HIV”

Eu discuti com a equipe da pesquisa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é voluntária e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo em participar deste estudo e entendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Rubrica do sujeito de pesquisa
ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

APÊNDICE B



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

PROJETO DE PESQUISA

Título: CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS UTILIZADAS EM UM ENSAIO CLÍNICO DE FASE I/II DE VACINA TERAPÊUTICA ANTI-HIV
Pesquisador Responsável: Telma Miyuki Oshiro **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Lais Teodoro da Silva **CAAE:** 07712012.1.0000.0068
Co-autores: Alexandre de Almeida, Alessandra Pontillo, Alberto José da Silva Duarte
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9895

Número do Parecer: 188.165

Data da Relatoria: 23/01/2013

Apresentação do Projeto: Os pesquisadores pretendem caracterizar células dendríticas derivadas de monócitos de indivíduos infectados por HIV utilizadas na imunoterapia, com relação à aspectos fenotípicos e funcionais e, correlacionar com a resposta à vacinação. Será utilizado material estocado no laboratório, oriundo de pacientes participantes de protocolo de vacinação terapêutica já aprovado em 2009 (0791/09)

Objetivo da Pesquisa: Já relatados acima

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos envolvidos nesta pesquisa, uma vez que utilizará material já colhido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Não há questionamentos de natureza ética

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados ao projeto

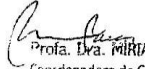
Recomendações: Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Nenhuma

Situação do Parecer: APROVADO

Necessita apreciação da CONEP: NÃO

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – 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

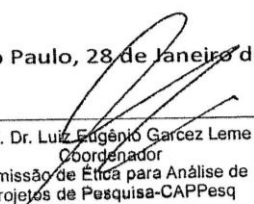

Prof. Dra. MIRIAN NACAGAMI SOTTO
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
Área de Dermatologia
Faculdade de Medicina da USP

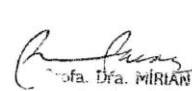


Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

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, 28 de Janeiro de 2013


Prof. Dr. Luiz Edgênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq


Prof. Dra. MIRIAN NACAGAMI SOTTO
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
Área de Dermatologia
Faculdade de Medicina da USP

APÊNDICE C

Artigos publicados/ submetidos e participação em congressos

da Silva, LT., Pontillo, A., Silva, WC., Almeida, A., Duarte, AJS., Oshiro, TM. *Autologous and allogenic systems of HIV expansion: what is the better choice for clinical application in therapeutic vaccine?* Immunotherapy, 2013, 5(12): 1305–1311.

Almeida, A., Oshiro, TM., **Silva, LT.**, Silva, WC., de Almeida, CN., Maria, A., Barbuto, JAM., Duarte, AJS. *Phase I/II clinical trial of anti-HIV cellular therapy based on dendritic cells pulsed with chemically inactivated virus* (SUBMETIDO)

Pontillo, A., Reis, EC., **Silva, LT.**, Duarte, AJS., Crovella, S., Oshiro, TM. *Dendritic cells used in anti-HIV immunotherapy showed different modulation in anti-HIV genes expression: New concept for the improvement of patients' selection criteria.* Journal of Cellular Immunotherapy, 2016, 2:85-94.

Pontillo, A., **Silva, LT.**, Oshiro, TM., Finazzo, C., Crovella, S., Duarte, AJS. *HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients.* AIDS, 2012, 26:11–18.

- 14th International Symposium on Dendritic Cells (2016) (Travel Award);
- 2016 Towards an HIV Cure Symposium and the 21st International AIDS Conference (AIDS 2016) (Scholarship Award);
- XL and XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology (2015 e 2016);
- VIII Curso Avançado do patogênese do HIV (2013).