

Alexandre de Almeida

**Estudo de fase I/II de uma terapia celular para HIV
baseada em células dendríticas autólogas pulsadas com vírus
autólogos quimicamente inativados**

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva
Duarte

Coorientadora: Dra. Telma Miyuki Oshiro

**São Paulo
2017**

Alexandre de Almeida

**Estudo de fase I/II de uma terapia celular para HIV
baseada em células dendríticas autólogas pulsadas com vírus
autólogos quimicamente inativados**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na Biblioteca da FMUSP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva
Duarte

Coorientadora: Dra. 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

Almeida, Alexandre de
Estudo de fase I/II de uma terapia celular para HIV baseada em células dendríticas
autólogas pulsadas com vírus autólogos quimicamente inativados / Alexandre de
Almeida. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.
Orientador: Alberto José da Silva Duarte.
Coorientadora: Telma Miyuki Oshiro Sumida.

Descritores: 1.HIV 2.Imunoterapia 3.Ensaio clínico 4.Células dendríticas
5.Segurança do paciente 6.Vacinas contra a AIDS

USP/FM/DBD-066/17

Minha mãe, **Therezinha**

Primeira mestra, exemplo de dedicação e carinho
com o semelhante.

Ao meu pai, **Jorge** (in memoriam),

Presença de ausência-saudade que me faz forte.

Esta tese é dedicada de maneira muito especial à
minha esposa Lis, anjo que Deus enviou para
dar luz a minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alberto José da Silva Duarte, pelo exemplo, ensinamentos, confiança e por acreditar em mim, as vezes mais do que eu mesmo.

À Dra. Telma M. Oshiro, pelo apoio e valiosas observações.

Ao Prof. Dewton Vasconcelos, exemplo de médico, mestre e amigo por transmitir seus conhecimentos e pela ajuda.

Aos Profs. Gil Bernard, Maria Satto e Jorge Casseb, pela ajuda, força, sugestões e correções.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes, pela idealização do estudo e por compartilhá-la conosco, permitindo o avanço da pesquisa nesta área.

Ao Dr. Luiz Carlos Pereira Júnior, pela compreensão e apoio, permitindo eu pudesse participar deste projeto.

Ao Prof. Dr. Cláudio Pannuti, pelo apoio e cessão de espaço no laboratório de virologia do IMT-FMUSP.

Aos colaboradores do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Fundação Pró-Sangue de SP, Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP, Universidade Federal de Pernambuco e Instituto de Medicina Tropical-USP, pela contribuição e atenção dispensados durante o desenvolvimento do projeto.

À Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de DST/Aids, por nos inserir no contexto de fortalecer a competência nacional no campo de pesquisa e desenvolvimento de vacinas anti-HIV, criando as condições para execução deste projeto.

À Noemia, Rosangela, Patrícia, Laís, Wanessa e Eduardo pela ajuda na realização de alguns testes laboratoriais.

À Ana Maria, Lídia Zeferino, Patrícia Iara, Rosangela Araújo e Celeste Romano, pela ajuda e atenção na assistência aos pacientes.

À Marisa Cantarino, pela ajuda na confecção e organização do banco de dados.

À Rosana Veronica Mendoza López, pela ajuda com a análise estatística.

Aos funcionários, estagiários, estudantes, e amigos, do LIM 56 da FMUSP que direta ou indiretamente me auxiliaram.

Aos pacientes e familiares, sem os quais não seria possível este trabalho.

À todos os meus amigos que me ajudaram acreditando, torcendo e rezando pelo meu sucesso.

À vocês..... muito obrigado!

“O mundo inteiro é um circo
se você souber olhar para ele.
O modo como o sol se põe quando você está cansado
e nasce quando você levanta.
Isso é mágica de verdade.
O modo como uma folha cresce.
O canto dos pássaros.
Como o deserto fica à noite,
quando a luz da lua o envolve.
Oh, meu garoto...
isto é circo bastante para qualquer um.
Sempre que você vê um arco-íris
e seu coração se maravilha com isso.
Sempre que você pega um punhado de areia,
e não vê areia, mas sim um mistério,
uma maravilha em sua mão.
Toda vez que você para e pensa:
Estou vivo, e estar vivo é fantástico!
Sempre que algo assim acontece,
você é parte do Circo do Dr. Lao.”

Adaptação de diálogo do filme: “As sete faces do Dr. Lao” (EUA-1964)

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

ACTG -	<i>AIDS Clinical Trials Group</i>
ADEE -	Ambulatório de Dermatologia Especializada
AICD -	Morte celular induzida por ativação (<i>Activated Induced Cell Death</i>)
AIM-V-	<i>Adoptive Immunotherapy Media</i>
ALT -	Alanina aminotransferase
ANVISA –	Agencia nacional de vigilância sanitária
ARVs-	Antirretrovirais
AST -	Aspartato aminotransferase
AT-2-	Aldrithiol-2
AUC -	Área sob a curva (<i>Area Under Curve</i>)
βHCG -	Beta Gonadotrofina Coriônica (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
BSA -	Albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD -	Grupamento de diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDC -	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control</i>)
CEP -	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
CONEP -	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTL -	Linfócito T citotóxico (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CV -	Carga viral
DC -	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DNA -	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DST -	Doenças sexualmente transmissíveis
EA -	Evento adverso
EAS -	Evento adverso sério
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA -	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC -	Fluoresceína isotiocianato (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FMUSP -	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR -	Frequência respiratória

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

GMP - Boas práticas de fabricação (*Good Manufacturing Practices*)

HAART -. Terapia antirretroviral de alta atividade (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HBV - Vírus da hepatite B (*Human B Virus*)

HCV - Vírus da hepatite C (*Human C Virus*)

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA- Antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen*)

HTLV - Vírus T-linfotrófico humano (*Human T-Lymphotropic Virus*)

IL - Interleucina

IMT-USP - Instituto de Medicina Tropical-Universidade de São Paulo

LIM 56 - Laboratório de Investigação Médica 56

MACS - Separação celular ativada por magnetismo (*Magnetic-activated cell sorting*)

MFI - Intensidade Média de Fluorescência (*Mean of Fluorescence Intensity*)

MHC - Complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MoDCs - Monocyte-derivedDCs

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*)

MSB - Ministério da Saúde do Brasil

PAM - Pressão arterial média

PBMCs- Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR - Reação de cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PECy 5 - Ficoeritrina-cianina 5 (*PhycoerythrinCyanine 5*)

PE - Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PHA - Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

PN-DST/AIDS-HV - Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis, aids e hepatites virais

RNA - Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB -	Soro Fetal Bovino
SHIV -	<i>Simian-Human Immunodeficiency Virus</i>
SIV -	Vírus da imunodeficiência símia (<i>Simian-Immunodeficiency Virus</i>)
TCLE -	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMB -	Tetrametilbenzidina
TRIS -	<i>Tris (Hydroxymethyl Aminomethane)</i>
TNE -	Tris+NaCl+EDTA

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. Serviço 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: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema do desenho do estudo	16
Fig. 2 Diagrama de fluxo com a progressão do número de participantes ao longo do estudo.....	48
Fig. 3 Marcadores fenotípicos das DCs utilizadas na vacina (MFI).....	55
Fig. 4 Marcadores fenotípicos das DCs utilizadas na vacina	57
Fig. 5 Evolução do número de células TCD4+ dos participantes submetidos à intervenção.....	60
Fig. 6 Evolução da variação da carga viral plasmática dos participantes submetidos à intervenção.....	62
Fig. 7 Evolução das médias de TCD4+ ao longo dos períodos de observação.....	69
Fig. 8 Evolução das médias de TCD8+ ao longo dos períodos de observação.....	74
Fig. 9 Evolução da porcentagem de Tregs dos participantes submetidos à intervenção.....	78
Fig. 10 Evolução das médias de CV ao longo dos períodos de observação.....	81
Fig. 11 Comparação da evolução do ΔCV com o estudo de Garcia F et al (2011)	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Causas de exclusão de pacientes não vacinados	49
Gráfico 2 Distribuição dos participantes com TCD4+<350 células/ μ L nos braços de intervenção	59
Gráfico 3 Distribuição dos EAs nos braços de intervenção	66
Gráfico 4 Média da contagem de TCD4+ por grupo, nos três períodos de observação	70
Gráfico 5 Evolução das medianas do número de células TCD4+ dos participantes submetidos à intervenção	71
Gráfico 6 Evolução das medianas dos Δ TCD4+ dos participantes submetidos a intervenção.....	72
Gráfico 7 Área sob a curva das medianas dos Δ TCD4+ dos indivíduos submetidos à intervenção.....	72
Gráfico 8 Média da contagem de TCD8+ por braço, nos três períodos de observação	75
Gráfico 9 Evolução das medianas do número de células TCD8+ dos participantes submetidos à intervenção	76
Gráfico 10 Evolução das medianas dos Δ TCD8+ dos participantes submetidos à intervenção.....	76
Gráfico 11 Área sob a curva das medianas dos Δ TCD8+ dos indivíduos submetidos a intervenção.....	77
Gráfico 12 Evolução das medianas do número de células Tregs dos participantes submetidos à intervenção	79
Gráfico 13 Evolução das medianas dos Δ Tregs dos participantes submetidos à intervenção.....	79
Gráfico 14 Área sob a curva das medianas dos Δ Tregs dos indivíduos submetidos a intervenção.....	80
Gráfico 15 Média da contagem de CV por braço, nos três períodos de observação	82
Gráfico 16 Evolução das medianas da carga viral plasmática do HIV nos participantes submetidos à intervenção	83

Gráfico 17 Evolução das medianas dos Δ da carga viral plasmática do HIV nos participantes submetidos a intervenção 83

Gráfico 18 Área sob a curva das medianas dos ΔCV dos indivíduos submetidos à intervenção..... 84

LISTA DE QUADROS & TABELAS

Quadro 1 Indivíduos excluídos após a vacinação.....	52
Quadro 2 Frequência e caracterização dos eventos adversos nos indivíduos vacinados	64
Tabela 1 Características dos indivíduos tratados.....	51
Tabela 2 Características dos participantes submetidos à intervenção (médias por braço do estudo).....	51
Tabela 3 Tempo (em semanas) consumido para a produção do antígeno.....	54
Tabela 4 Grau de severidade dos EAs	67
Tabela 5 Distribuição dos EAs nos braços de intervenção segundo a severidade	68

ARTIGOS

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. SCIENTIFIC REPORTS (Submitted).

Lais Teodoro; Pontillo, Alessandra; da Silva, Wanessa Cardoso, **Almeida A.**; et al. Autologous and allogenic systems of HIV expansion: what is the better choice for clinical application in therapeutic vaccine? IMMUNOTHERAPY Vol: 5 Issue: 12 p. 1305-1311. Dec 2013.

Almeida A, Oshiro, T. M.; Silva, L. T.; et al. Preliminary Results of a Brazilian Clinical Trial for DC-Based Immunotherapy Against HIV-1. Conference on AIDS Vaccine, Barcelona, Spain.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES Vol: 29 Issue: 11
Special Edition: SI p. A173-A173 Nov 1 2013

Oshiro T, **Almeida, Alexandre de;** Duarte, Alberto Jose da Silva. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. IMMUNOTHERAPY, v. 1, p. 1039-1051, 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

ARTIGOS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	TERAPIA ANTI-HIV	2
1.2.	VACINAS	3
1.3.	CORRELATOS DE PROTEÇÃO ANTI-HIV	4
1.4.	TERAPIA ANTI-HIV BASEADA EM DCs	7
1.4.1.	Caracterização do produto.....	8
1.4.2.	Estudos pré-clínicos	10
1.4.3.	Estudos clínicos.....	10
1.5.	JUSTIFICATIVA	11
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	OBJETIVO PRIMÁRIO	14
2.2.	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	14
3.	MÉTODOS	15
3.1.	DESENHO DO ESTUDO	16
3.1.1.	Descrição do desenho do estudo.....	16

3.1.2. <i>Endpoints</i>	16
3.1.2.1. <i>Endpoint</i> primário:.....	16
3.1.2.2. <i>Endpoints</i> secundários:	17
3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	17
3.2.1. Tamanho da amostra	17
3.2.2. Área geográfica de abrangência	18
3.2.3. Duração do estudo	18
3.2.4. Critérios de inclusão	18
3.2.5. Critérios de exclusão	18
3.2.6. Participação de mulheres.....	19
3.2.6.1. Contracepção	19
3.2.6.2. Amamentação.....	20
3.2.7. Envolvimento em outros estudos	20
3.3. PRODUTO / INTERVENÇÃO	20
3.3.1. Formulação e apresentação.....	20
3.3.2. Armazenamento e estabilidade do produto	20
3.3.3. Preparação, dose e administração do produto de estudo	20
3.3.3.1. Descrição do produto.....	21
3.3.3.2. Coleta de sangue.....	21
3.3.3.3. Isolamento e expansão do vírus.....	22
3.3.3.4. Ensaio de ELISA para detecção de p24.....	22
3.3.3.5. Inativação e purificação do HIV.....	23
3.3.3.6. Geração de células dendríticas.....	24

3.3.3.7.	Controle de qualidade da vacina.....	25
3.3.3.8.	Dose e administração.....	25
3.4.	LIMITAÇÕES À TERAPIA ANTERIOR.....	26
3.5.	MEDICAÇÕES E PROCEDIMENTOS CONCOMITANTES.....	26
3.6.	ACESSO AO PRODUTO APÓS O ENCERRAMENTO DO ESTUDO.....	26
3.7.	AVALIAÇÕES E PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....	27
3.7.1.	Avaliações clínicas	27
3.7.2.	Avaliações laboratoriais.....	27
3.7.3.	Avaliações clínico-laboratoriais extras e coleta das amostras.....	28
3.8.	PREPARAÇÃO, MANUSEIO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS.....	28
3.8.1.	Risco biológico.....	28
3.8.2.	Transporte das amostras.....	29
3.9.	ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	29
3.9.1.	Utilização de amostras armazenadas	29
3.9.2.	Acesso e descarte das amostras	29
3.10.	CALENDÁRIO DO ESTUDO	30
3.10.1.	<i>Screening</i>	30
3.10.2.	Matrícula (<i>Baseline</i>)	31
3.10.3.	Seguimento	31
3.10.4.	Visita final do estudo	32
3.10.5.	Visita de encerramento precoce.....	32
3.10.6.	Contato com os indivíduos após o término do ensaio	32
3.11.	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA.....	33

3.11.1.	Especificação dos parâmetros de segurança	33
3.11.2.	Avaliação, análise e registro dos parâmetros de segurança	33
3.11.2.1.	Escala de intensidade (severidade)	33
3.11.2.2.	Avaliação da relação de causalidade.....	34
3.11.2.3.	Arquivo / documentação	34
3.11.2.4.	Relato de eventos adversos	35
3.11.2.5.	Requisitos específicos para eventos adversos graves (EAS).....	35
3.11.3.	Seguimento dos participantes após eventos adversos.....	35
3.11.3.1.	Acompanhamento.....	35
3.12	MODIFICAÇÃO DA INTERVENÇÃO / AGENTE DO ESTUDO PARA UM PARTICIPANTE.....	36
3.12.1.	Normas para interrupção do estudo	37
3.12.2.	Normas para interromper a participação de um indivíduo	37
3.12.3.	Retirada precoce de um participante do estudo	38
3.12.4.	Reposição de participantes que interromperam sua participação no estudo.....	38
3.13.	PLANO E ESTRUTURA DE MONITORAMENTO DO ESTUDO.....	38
3.14.	CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	39
3.14.1.	Revisão dos objetivos do estudo.....	39
3.14.2.	População de estudo	39
3.14.3.	Descrição da análise	39
3.15.	HIPÓTESE DO ESTUDO	40
3.16.	MANUTENÇÃO DOS CÓDIGOS DE ALOCAÇÃO	40

3.17.	SELEÇÃO, RECRUTAMENTO E SEGUIMENTO DOS PARTICIPANTES.....	41
3.18.	ANÁLISE DE IMPACTO IMUNOVIROLÓGICO.....	41
3.19.	ANÁLISE PRELIMINAR	42
3.20.	ÉTICA / PROTEÇÃO AOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	42
3.20.1.	Comitês revisores	43
3.20.2.	Processo de obtenção do consentimento livre e esclarecido	43
3.21.	MANUSEIO DOS DADOS E MANUTENÇÃO DOS REGISTROS.....	44
3.21.1.	Metodologia de coleta dos dados	44
3.21.2.	Tipos de dados obtidos	45
3.21.3.	Documentos fonte e acesso aos documentos fonte / dados	45
3.21.4.	Política de publicação	45
4.	RESULTADOS.....	46
4.1.	CASUÍSTICA	47
4.1.1.	Recrutamento, seleção, alocação e retenção.....	47
4.2.	PREPARO DO PRODUTO.....	52
4.2.1.	Antígeno.....	53
4.2.2.	Células dendríticas.....	54
4.2.3.	Controle de qualidade.....	58
4.3.	SEGURANÇA	58
4.3.1.	Laboratório.....	58
4.3.1.1.	Contagem de células TCD4+	58
4.3.1.2.	Carga viral plasmática.....	60

4.3.2. Sinais vitais.....	63
4.3.3. Eventos adversos.....	63
4.4. IMPACTO IMUNOLÓGICO E VIROLÓGICO	68
4.4.1. Variação no número de linfócitos TCD4+.....	68
4.4.2. Variação no número de linfócitos TCD8+.....	73
4.4.3. Variação no número de linfócitos Tregs.....	77
4.4.4. Variação na carga viral plasmática	80
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES.....	101
7. ANEXOS	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
APÊNDICES	

Almeida A. Estudo de fase I/II de uma terapia celular para HIV baseada em células dendríticas autólogas pulsadas com vírus autólogos quimicamente inativados [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

RESUMO

Desde o início da pandemia de HIV/aids, a imunoterapia vem sendo utilizada como alternativa terapêutica numa tentativa de estimular uma resposta do sistema imunológico contra o agente agressor. Esta abordagem tem sido considerada promissora para obtenção do controle da infecção em longo prazo. A administração de células apresentadoras de antígeno, em especial células dendríticas, é fundamentada pelos conceitos de imunoterapia passiva e de terapia celular ativa (vacina terapêutica) além da perspectiva da eliminação dos chamados reservatórios virais, unindo assim estas diversas estratégias de intervenção. Dentre os diferentes antígenos do HIV utilizados para pulsar as células dendríticas, alguns dos melhores resultados foram obtidos com a inativação química do vírus, preservando a integridade da estrutura da sua superfície. Há alguns anos nosso grupo vem trabalhando com terapia celular baseada em células dendríticas derivadas de monócitos autólogos, pulsadas com HIV inativado quimicamente, seguindo o protocolo descrito por Lu e colaboradores em 2004. Aqui, nós apresentamos os resultados de um ensaio clínico de fase I/II que teve como objetivos avaliar a tolerância, segurança e impacto imunoviológico, de diferentes formulações do produto em pacientes cronicamente infectados pelo HIV, sem uso de antirretrovirais. Os participantes foram alocados em três braços para receber composições distintas: 3×10^7 células dendríticas sem pulso adicional de HIV inativado (Braço A), 3×10^6 células dendríticas com pulso adicional de HIV inativado (Braço B) ou 3×10^7 células dendríticas com pulso adicional de HIV inativado (Braço C). O número de participantes no braço A evoluiu com uma considerável diminuição ao longo do período de observação do estudo, prejudicando as avaliações. As análises dos outros braços mostraram que as preparações foram seguras, não se observando eventos adversos relacionados à intervenção. Os resultados sugeriram um aumento na carga viral plasmática associados a uma redução das sub-populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos pacientes do braço C além de uma redução na quantidade de linfócitos T reguladores nos indivíduos do braço B.

Descritores: HIV, imunoterapia, ensaio clínico, células dendríticas, segurança do paciente, vacinas contra a AIDS.

Almeida A. Phase I / II study of cellular therapy for HIV based on autologous dendritic cells pulsed with autologous chemically inactivated virus [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Abstract

Since the beginning of the HIV / aids pandemic, immunotherapy is being used as an alternative therapy in attempt to stimulate an immune response against the pathogenic agent. This approach has been considered as promising for achieving the control of infection in the long term. Administration of antigen presenting cells, particularly dendritic cells is based on the concepts of passive immunotherapy and active cellular therapy (therapeutic vaccine), with the perspective of eliminating the so-called viral reservoirs, thus joining different intervention strategies. From different antigens tested for loading DCs, some of the best results were obtained with chemically inactivated virus, which preserves its surface proteins. Our group has been working with cellular therapy based on dendritic cells derived from autologous monocytes pulsed with chemically inactivated HIV, following the protocol described by Lu et al in 2004. Here, we present the results of a phase I / II clinical trial aimed to evaluate tolerance, safety and immunovirological impact of different product formulations in chronically HIV-infected individuals, naïve for antiretroviral treatment. Participants were allocated to receive: 3×10^7 un-pulsed DCs (Arm A), 3×10^6 HIV-pulsed DCs (Arm B) or 3×10^7 HIV-pulsed DCs (Arm C). The number of participants in the arm A evolved with a considerable decrease over the study, so any considerations about effect of DCs without antigen overload were difficult to carry out. Outcomes in other arms showed that they were safe, with no adverse events related to the products. The results suggested an increase in plasma viral load and decline in CD4+ and CD8+ T cells subpopulations after intervention in arm C. Additionally, we observed a decrease in percentage of regulatory T cells in arm B patients.

Descriptors: HIV, immunotherapy, clinical trial, dendritic cell, patient safety, AIDS vaccines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERAPIA ANTI-HIV

O emprego terapêutico da combinação de drogas anti-HIV, chamada de “terapia antirretroviral da alta eficácia” (*Highly Active Antiretroviral Therapy-HAART*), trouxe um benefício inquestionável para os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida ^(1, 2). Apesar deste sucesso, os antirretrovirais não conseguem eliminar o patógeno, especialmente devido ao estabelecimento precoce dos chamados reservatórios virais ^(3, 4). Desta forma, ainda não se conseguiu o fim da epidemia, que está relacionado ao desenvolvimento e implementação de diversas estratégias de intervenção profilática e terapêutica ⁽⁵⁾.

Embora aspectos ligados a adesão, distribuição e acesso a estas medicações sejam importantes para o melhor controle da infecção, frequentemente o uso das mesmas é acompanhado de efeitos adversos significativos, tais como: toxicidade mitocondrial e desenvolvimento de alterações metabólicas, incluindo resistência à insulina e lipodistrofia, dentre outras ⁽⁶⁻⁹⁾.

A emergência de cepas resistentes aos antirretrovirais, levando à falência terapêutica também se tornou um grande problema ^(10, 11) sendo, portanto, imperativa a busca de novas abordagens de tratamento.

Desde o início da pandemia de HIV/aids, a imunoterapia vem sendo utilizada como intervenção, numa tentativa de estimular uma resposta do sistema imunológico contra o agente agressor ⁽¹²⁾. Mais recentemente esta abordagem tem sido considerada como promissora para obtenção do controle da infecção em longo prazo ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Vários estudos têm avaliado a administração de componentes do sistema imune como: imunoglobulinas ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, citocinas ⁽¹⁹⁻²²⁾ ou células ⁽²³⁻²⁶⁾, numa tentativa de reconstituir e/ou reforçar possíveis aspectos relevantes de uma resposta anti-HIV.

Outra abordagem imunológica dentro da terapia de combate a este retrovírus consiste na administração das mais diversas formulações antigênicas buscando estimular uma resposta imune eficiente, o que levou os pesquisadores a incluírem este recurso dentro do rol do que convencionamos chamar “vacinas terapêuticas” ^(27, 28).

1.2. VACINAS

Ao lado da utilização da água potável e dos antibióticos, a vacinação tem sido a ação de saúde pública de maior sucesso no controle das moléstias infecciosas. Mais de duzentos anos após o desenvolvimento da imunização ativa por Edward Jenner, a história tem testemunhado vários exemplos de sucesso no controle de diversas doenças através deste tipo de intervenção, passando pela erradicação da varíola, até a velocidade espantosa no desenvolvimento da vacina contra o H1N1 ⁽²⁹⁻³¹⁾.

A vacinação clássica envolve a administração do agente infeccioso completo inativo/atenuado ou seus componentes, incluindo seu material genético para inserção no ácido desoxirribonucleico (*DesoxyribonucleicAcid-DNA*) das células do hospedeiro (com ou sem o auxílio de vetores) ⁽³²⁾. Nesta última situação, durante a transcrição e tradução do genoma celular, haverá também a produção de elementos do patógeno que vão, assim, ativar a resposta imune.

Qualquer que seja a estratégia de produção do imunobiológico, os antígenos envolvidos deverão estimular uma reação protetora, constituindo-se desta maneira em imunógenos. Para tanto, por vezes entram na composição da vacina substâncias capazes de amplificar e/ou modular a resposta imunológica, chamadas de adjuvantes ^(33, 34).

A imunização ativa é um procedimento já bem sedimentado na medicina, extremamente eficaz, com exemplos de controle de patógenos cuja composição antigênica não é muito variável. No caso, entretanto, de microrganismos com mecanismos de escape mais complexos, como alta taxa de mutação e alteração da composição estrutural, o desenvolvimento de novas estratégias é necessário. A ciência busca o entendimento de como o sistema imunológico interage com o agente agressor, identificando suas partes relevantes para montar uma resposta eficaz ⁽³⁵⁾.

Os conhecimentos derivados da vacinologia sugerem que a indução da resposta imune pode atuar no controle da replicação de diversos agentes causadores de doenças em seres humanos. Desta forma, a intervenção com imunoterapia poderia ser uma estratégia útil na infecção pelo HIV. A questão, portanto, é desenvolver uma vacina capaz de suplantar a imunodeficiência estabelecida nos pacientes infectados, sendo o grande desafio avaliar quais componentes do sistema imunológico devem ser

preferencialmente estimulados, e qual estratégia utilizar para a ativação eficiente desses componentes.

1.3. CORRELATOS DE PROTEÇÃO IMUNE ANTI-HIV

Um dos maiores desafios no campo da imunoterapia contra o HIV repousa no fato de que os correlatos de proteção imune nesta infecção não foram, até o momento, totalmente esclarecidos ^(36, 37).

O estabelecimento dos correlatos de proteção imune é algo relativamente recente no campo da vacinologia. A maioria das vacinas ainda é analisada sob uma lógica “Jenneriana”, testando-se (com algum grau de empirismo) sua segurança e eficácia, com posterior estudo dos correlatos de proteção que, uma vez estabelecidos, são utilizados para o aprimoramento do produto.

Esta lógica é sustentada pelo fato de que, para grande parte das infecções, existem indivíduos que resistem ao processo e eliminam o agente agressor o que, infelizmente, não ocorre na imunodeficiência humana associada à retrovírus.

Desta forma, no HIV/aids, a maior parte das pesquisas de correlatos de proteção imunológica direciona-se para:

- 1- indivíduos que representam modelos naturais de resistência à infecção seja por que são capazes de bloqueá-la (ex. indivíduos altamente expostos mas não infectados ⁽³⁸⁾ ou nos quais a interação com o patógeno leva a uma alteração na história natural da infecção (ex. não progressores em longo tempo ⁽³⁹⁾, controladores de elite ⁽⁴⁰⁾, infectados pelo HIV-2, que evoluem mais lentamente para aids do aqueles infectados pelo tipo 1 (HIV-1), agente mais comum da epidemia ^(41, 42));
- 2- resposta imune à infecção aguda, que sabidamente controla a replicação viral, ainda que por um período de tempo curto ^(43, 44).

A função da resposta humoral específica na resposta anti-HIV ainda é controversa. A persistência da exploração deste tipo de imunidade é apoiada especialmente pelos achados obtidos com modelo de primatas não humanos onde a imunização ativa ou passiva protegeu da infecção pelo vírus da imunodeficiência símia

(*Simianimmunodeficiency vírus-SIV*)⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Impulso adicional foi dado com a descoberta de anticorpos neutralizantes de amplo espectro, capazes de inativar diversas cepas do vírus⁽⁴⁸⁾, entretanto, como se demonstrou mais tarde, o surgimento destes anticorpos ocorre tardiamente não contribuindo para o controle da infecção natural^(49, 50). Ainda que a lógica da resposta imune contra vírus em geral sugira que anticorpos com função neutralizante tenham um papel importante^(51, 52), o fato é que não há evidência contundente de que estes anticorpos alterem a evolução da infecção natural pelo HIV^(53, 54).

O único ensaio clínico que demonstrou, até o momento, algum benefício com uma vacina profilática anti-HIV sugere, como correlato de proteção, a ação de anticorpos não neutralizantes direcionados para o envelope viral, com função relacionada à citotoxicidade⁽⁵⁵⁾. Outros estudos, todavia, falharam em demonstrar a importância do fenômeno citotóxico mediado por anticorpos nos indivíduos capazes de controlar naturalmente a infecção⁽⁵⁶⁾.

Contribuem para a polêmica em torno do tema, pesquisas mostrando que a depleção de linfócitos B em primatas não humanos e humanos está relacionada ao aumento da carga viral plasmática no HIV/aids^(57, 58).

Existem evidências de que ações mediadas por células linfoides, maturadas no timo (linfócitos T) e que expressam em sua superfície as moléculas CD8 e CD4, são importantes para o controle do vírus⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. A hipótese de que a resposta implementada pelos linfócitos TCD8+ represente um correlato de proteção imunológica na infecção pelo HIV possui grande número de argumentos científicos.

Esta reação está relacionada ao controle transitório da carga viral plasmática durante a história natural da aids^(43, 62). Apesar da imunodeficiência manifesta, os indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma resposta TCD8+ robusta, capaz de controlar a replicação viral *in vitro*⁽⁶³⁾. Na infecção aguda, este tipo de resposta encontra-se direcionada a poucos epítomos, mas, à semelhança do que acontece com os anticorpos neutralizantes, à medida que a doença progride, a reação torna-se mais ampla^(64, 65). Até cerca de 18% do total das células destes indivíduos podem ser específicas para o retrovírus⁽⁶⁶⁾. Paradoxalmente, entretanto, esta resposta parece não ser suficiente para controlar definitivamente a infecção e, cedo, são encontradas cepas virais mutantes, resultado do escape da resposta TCD8+⁽⁶⁷⁾.

Evidências em modelos de primatas não humanos corroboram a importância da resposta TCD8+, sendo que a depleção destas células associada ao aumento da carga viral plasmática do HIV (CV)^(68, 69).

Resposta celular TCD8+ também foi encontrada, com aspectos funcionais característicos, entre os “não progressores em longo tempo”, “controladores de elite” e “indivíduos altamente expostos, mas não infectados”⁽⁷⁰⁻⁷²⁾.

Fisiologicamente, existe uma íntima relação entre os linfócitos T CD4+ e a resposta TCD8+. Esta associação persiste na infecção pelo HIV^(73, 74), sendo que, Ritchie et al.(2011) demonstraram a importância da resposta mediada por células TCD4+ em indivíduos altamente expostos, mas não infectados⁽⁷⁵⁾.

Embora pareça sublinhada pelo óbvio, a preservação da resposta T CD4+ é relevante na resposta anti-HIV e isto também tem sido demonstrado em estudos comparativos envolvendo “não progressores em longo tempo” e “controladores de elite”, que apresentam características funcionais distintas deste tipo de linfócito^(76, 77).

Dentro dos linfócitos T CD4+, merece destaque uma sub-população chamada de “reguladora” (Treg), importante na patogênese da aids. Estas células parecem desempenhar papéis aparentemente antagônicos na infecção pelo retrovírus causador da imunodeficiência humana adquirida. Estas funções contrastantes, derivam da propriedade supressora destas células, relevante para reduzir a ativação celular excessiva, característica da aids e sabidamente deletéria no âmbito da doença. O mesmo efeito inibidor das Tregs prejudica, entretanto, o desenvolvimento de uma resposta anti-HIV específica^(78, 79). Observando os efeitos dos linfócitos T reguladores nos modelos naturais de resistência, verificamos que não há um padrão exclusivo definido como “protetor” no que diz respeito à frequência das Tregs. Nos indivíduos que controlam a infecção, ainda que mantida ativação celular, há uma redução das Tregs⁽⁸⁰⁾. Já nos altamente expostos, mas não infectados, há maior número destas células⁽⁸¹⁾. Nos últimos anos, tem sido sugerido que a modulação da função das Tregs através de imunoterapia poderia auxiliar no controle da infecção pelo HIV^(82, 83).

A cronologia dos eventos na fisiopatologia da aids mostra que a rapidez com que a infecção se estabelece suscita um acionamento imediato dos mecanismos de defesa⁽⁸⁴⁾. Neste cenário, a imunidade inata e das mucosas também parecem representar aspectos fundamentais da resposta contra o vírus⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾.

Produtos capazes, portanto, de estimular um ou mais aspectos diversos da resposta imune anti-HIV representam uma abordagem atraente para o desenho de uma imunoterapia nesta condição⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾. Neste sentido, diversas estratégias de vacinação utilizando diferentes antígenos têm demonstrado que a imunização de primatas não humanos com o vírus da imunodeficiência adquirida símia (SIV) e/ou o vírus quimérico SHIV foi capaz de protegê-los do desafio com o vírus vivo⁽⁹²⁻⁹⁴⁾.

Dentro do mesmo contexto, dezenas de ensaios clínicos, envolvendo vacinas candidatas empregando diversas abordagens vêm sendo conduzidos nos últimos anos^(31, 91, 95-97).

1.4. TERAPIA ANTI-HIV BASEADA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Paul Langerhans foi o primeiro a caracterizar as células dendríticas (DCs) em 1868, acreditando que estas eram células nervosas por causa de suas longas extensões citoplasmáticas tipo dendritos. Mais de um século depois, em 1973, Ralph Steinman e Zanvil Cohn foram os primeiros a cunhar o termo "célula dendrítica"⁽⁹⁸⁾.

Estas células estão estrategicamente posicionadas na superfície da pele e das mucosas, onde literalmente capturam possíveis agentes agressores. Ao tomar contato com eles, as DCs se ativam e desencadeiam uma resposta imune imediata (resposta inata). Associadas ao antígeno, as DCs migram para órgãos linfoides específicos (ex.: linfonodos, baço, tecido linfóide associado às mucosas), onde vão interagir com outras células, iniciando um tipo de resposta distinto, chamada de adaptativa. Nestes locais, os linfócitos B e T são ativados através de seus receptores, capazes de reconhecer pequenos fragmentos, chamados de determinantes antigênicos, conjugados às proteínas produtos da família de genes chamados complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*-MHC) classe I e II, exibidos na superfície da DCs, num fenômeno chamado de apresentação antigênica⁽⁹⁹⁾.

Sentinelas e reguladoras da resposta imune, as DCs apresentam notória plasticidade em suas propriedades e funções^(100, 101). Constituem uma população celular heterogênea, dividida em subtipos, de acordo com determinadas características como a localização, a expressão de marcadores, a capacidade migratória e a função imune⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾.

Protótipos de vacinas com células dendríticas foram inicialmente desenvolvidos a partir de observações de que em neoplasias, como melanomas e tumores renais metastáticos, havia uma disfunção das DCs e uma redução significativa destas ⁽¹⁰⁵⁾. A ideia de que o mesmo fenômeno pudesse ocorrer na infecção pelo HIV impulsionou pesquisas na determinação do número e da função das DCs em pacientes com HIV/aids. Diversos trabalhos apontaram para o declínio, ao longo da infecção, da atividade das células dendríticas, impossibilitando o organismo de elaborar uma resposta imune adequada ⁽¹⁰⁶⁻¹¹¹⁾.

Acredita-se que essas alterações, juntamente com a diminuição do número de linfócitos TCD4⁺, potencializem o progresso da infecção.

Na infecção pelo HIV, a administração de células apresentadoras de antígeno, em especial células dendríticas, é fundamentada nas estratégias de imunoterapia passiva e vacina terapêutica, unindo estas duas modalidades de intervenção. O racional para este tipo de intervenção apoia-se ainda na propriedade das DCs de estimular células infectadas latentes, auxiliando na eliminação dos reservatórios virais ^(112, 113).

Estratégias de imunização utilizando DCs pulsadas com antígeno têm se mostrado uma forma racional e promissora para indução de resposta imune contra o HIV ⁽¹¹⁴⁾.

1.4.1. Caracterização do produto

Um dos protocolos amplamente utilizado para obtenção de DCs objetivando a imunoterapia baseia-se na sua diferenciação a partir de monócitos, através de cultura por 5-7 dias na presença de interleucina 4 (IL-4) e *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). As DCs assim obtidas, denominadas células dendríticas derivadas de monócito (*monocyte-derived DCs- MoDCs*) apresentam características similares às DCs intersticiais ^(115, 116).

Outro grande desafio em protocolos de imunoterapia é a escolha e a introdução de antígenos relevantes na DC para o processamento, apresentação e ativação da resposta imune.

A obtenção de antígeno capaz de induzir uma resposta específica anti-HIV constitui um aspecto fundamental para o desenho de vacinas. No caso da terapia celular,

além da amplificação da resposta de memória do indivíduo vacinado, é também desejável a indução de uma proteção contra eventuais vírus mutantes, evitando assim os mecanismos de escape viral.

O HIV apresenta uma grande diversidade genética, resultado da alta dinâmica de replicação do vírus. Isto induz a “erros” que constantemente produzem mutações, levando a uma notória variabilidade dentro da população infectada e também num mesmo paciente, individualmente.

Esta grande diversidade entre os clones de variantes plasmáticas e de reservatórios latentes tem levado muitos trabalhos a utilizar vírus autólogo para indução de uma resposta específica.

De fato, estudos demonstram que a resposta celular a peptídeos derivados de sequência viral autóloga apresenta-se significativamente maior em comparação à resposta a uma sequência consenso⁽¹¹⁷⁾, sugerindo que uma resposta mais acurada pode depender de epítomos virais muito particulares que infectam cada indivíduo.

A obtenção de partículas virais autólogas para a produção de vacinas é um processo complexo e laborioso que requer a manipulação em laboratório com adequado nível de biossegurança. O procedimento envolve uma etapa de isolamento de vírus do paciente, que pode ser dificultada pela baixa carga viral de alguns indivíduos, seguida de uma etapa de expansão do HIV isolado, que requer a obtenção de uma grande quantidade de células CD4+ do próprio paciente, necessárias para a superinfecção e multiplicação do patógeno. Na sequência estes vírus são submetidos à inativação para posterior incorporação às DCs.

Um dos métodos empregados para a inativação do HIV envolve a utilização de aldrithiol-2 (AT-2). O aldrithiol-2 age sobre estruturas chamadas *Zincfingers*, presentes na proteína do nucleocapsídeo viral (p7^{NC}), produto de uma das mais conservadas sequências do genoma dos retrovírus. É um composto oxidante, que tem como efeito a destabilização das ligações covalentes entre os resíduos de cisteína e zinco presentes no nucleocapsídeo, mantendo intacta a conformação e a funcionalidade das proteínas do envelope do HIV, que preservam a capacidade de ligação com seus receptores, fusão com a membrana celular e introdução do conteúdo viral no citoplasma sem, entretanto, haver replicação viral^(118, 119).

A inativação pelo AT-2, com preservação dos epítomos antigênicos da superfície do vírus representa uma vantagem potencial sobre outros métodos como inativação pelo calor ou outras substâncias químicas (derivados do aldeído, álcoois), que promovem a desnaturação proteica,

1.4.2. Estudos pré-clínicos

A hipótese de que o distúrbio nas células dendríticas de pacientes com HIV/aids seria a origem da disfunção da resposta citotóxica relacionada aos linfócitos TCD8+ (*Cytotoxic T lymphocytes-CTL*) levou vários grupos a estudarem estas células. Lu & Andrieu (2001) mostraram que células dendríticas de pacientes estimuladas *in vitro* com vírus inativados pelo AT-2, foram eficazes na indução de linfócitos T CD8+, os quais erradicaram o vírus em culturas de células mononucleares periféricas (*Peripheral blood mononuclear cells -PBMCs*) de pacientes infectados⁽¹²⁰⁾.

A partir desta demonstração a etapa seguinte foi testar esta hipótese em modelo animal. DCs pulsadas com HIV-1 inativados com AT-2 induziram imunidade protetora antiviral em camundongos desprovidos de resposta imune B e T, que receberam passivamente células de sangue periférico humano⁽¹²¹⁾.

Num dos mais interessantes estudos já conduzidos nesta área, Lu & Andrieu (2003), demonstraram que macacos infectados pelo SIV e submetidos à intervenção com células dendríticas pulsadas *ex-vivo* com vírus inativado controlaram a infecção com redução da carga viral plasmática⁽¹²²⁾.

1.4.3. Estudos clínicos

Nos últimos anos, vários ensaios clínicos têm testado a tolerância, segurança e imunogenicidade destes produtos (revisto por Garcia e Routyem 2011)⁽¹²³⁾. Conforme as definições do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), estes estudos são classificados como sendo de fase I (farmacologia humana) e fase II (exploração terapêutica)⁽¹²⁴⁾.

Todos estes ensaios concluíram que os produtos eram seguros e bem tolerados, a despeito das diferenças na composição da vacina e desenho de cada pesquisa. Além

disto, dois estudos mostraram resultados expressivos em termos de redução na carga viral plasmática ^(125, 126).

As primeiras tentativas de imunoterapia com DCs na infecção pelo HIV analisaram um número pequeno de indivíduos (n=5-6) e utilizaram proteínas recombinantes/peptídeos sintéticos via endovenosa, não tendo mostrado resultados animadores. Apesar dos produtos serem bem tolerados, não houve impacto sobre a carga viral plasmática e os achados de imunogenicidade, encontrados em alguns indivíduos não seguiram o mesmo padrão de cinética da resposta. Estas diferenças foram relacionadas a fatores como: contagem sanguínea de células TCD4+, polimorfismos de HLA e sobrevivência das DCs após infusão ^(25, 127).

Estudos posteriores, realizados com um número um pouco maior de pacientes, utilizando peptídeos ou partículas virais inativadas revelaram não só um aumento na resposta imune específica como o controle da replicação viral ^(125, 128), embora nem sempre com uma relação nítida entre os dois parâmetros ⁽¹²⁹⁾.

Em 2004, Lu e colaboradores avaliaram o efeito em humanos de um produto voltando para imunoterapia anti-HIV, baseado em com DCs, derivadas de células monocíticas autólogas pulsadas com HIV-1 autólogo inativado com AT-2. Esses autores observaram, em pacientes infectados cronicamente com HIV-1, na ausência de terapia antirretroviral altamente potente, uma supressão significativa da carga viral plasmática. A vacina mostrou-se capaz de conter o avanço da doença em 83% dos pacientes (15/18) com a diminuição da carga viral em 44,5% (8/18) após um ano ⁽¹²⁵⁾.

Esses resultados encorajaram a continuidade desse trabalho em um grupo similar de pacientes.

1.5. JUSTIFICATIVA

A presente proposta defende a hipótese de que a administração de células dendríticas dos próprios pacientes, carregadas com vírus autólogos inativados pelo aldrithiol-2 constitui uma intervenção segura e bem tolerada, podendo atuar como estratégia imunomoduladora relevante no controle da infecção pelo HIV.

A imunoterapia com DCs pulsadas com vírus inativado quimicamente pelo AT-2 constitui um procedimento para controle do HIV em pacientes cronicamente infectados que já demonstrou bons resultados anteriormente, entretanto a manufatura do produto para intervenção é uma etapa complexa e árdua, impondo a necessidade da investigação de diferentes formulações com objetivo de simplificar o processo.

Há alguns anos nosso grupo vem trabalhando com um produto baseado em células dendríticas autólogas derivadas de monócitos, pulsadas com HIV inativado com AT-2, seguindo os estudos desenvolvidos por Lu e colaboradores ^(120, 122, 125).

Aqui, nós apresentamos os resultados de um ensaio clínico testando diferentes formulações do produto em pacientes cronicamente infectados pelo HIV, sem uso de ARVs.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

- Avaliar a segurança e tolerância a diferentes formulações de uma terapia celular baseada em DCs, nos pacientes cronicamente infectados pelo HIV;

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar o impacto imunológico nos pacientes submetidos à terapia celular baseada em DCs;
- Avaliar o impacto virológico nos pacientes submetidos à terapia celular baseada em DCs.

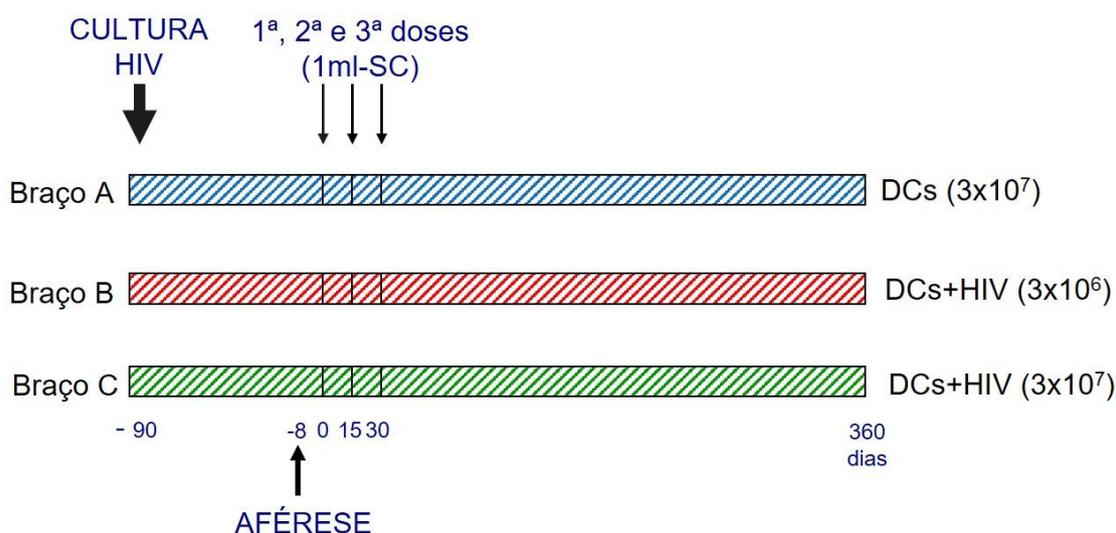
3. MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO

3.1.1. Descrição do desenho do estudo

Estudo aberto, no qual os voluntários foram alocados em três braços para receberem diferentes formulações de um produto composto de DCs geradas a partir de monócitos de sangue periférico, pulsadas com HIV autólogo inativado por AT-2. A evolução primária (segurança, tolerabilidade e impacto imunológico/virológico) foi monitorada ao longo do período de observação através de avaliações clínico-laboratoriais. A figura 1 contém a representação gráfica do desenho do estudo.

Figura 1 – Esquema do desenho do estudo



Legenda: SC – subcutâneo.

3.1.2. Endpoints

3.1.2.1. Endpoint primário:

- Quantidade de eventos adversos de grau 3 ou superior, incluindo sinais / sintomas, toxicidade laboratorial e/ou eventos clínicos, relacionados com o agente de estudo.

3.1.2.2. *Endpoints*secundários:

- Quantidade de participantes com redução na contagem sanguínea de células TCD4+ para <350 cél./ μL , confirmada por, pelo menos, duas avaliações consecutivas;
- Quantidade de participantes com elevação da carga viral (CV) plasmática $\geq 1,0$ log, em relação ao *baseline*, confirmada por, pelo menos, duas avaliações consecutivas;

3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Todos os indivíduos selecionados foram matriculados no ambulatório de dermatologia especializada-3002 (ADEE-3002) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e continuaram sendo assistidos durante todo o estudo a fim de evitar qualquer prejuízo a sua saúde.

3.2.1. Tamanho da amostra

O número dos voluntários para este estudo foi estimado em um total de 25 indivíduos infectados pelo HIV, sem indicação do uso de terapia antirretroviral, segundo os critérios do Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil (MSB). Os indivíduos foram alocados em três braços descritos a seguir:

- Braço A: pacientes submetidos à imunoterapia com 3×10^7 células dendríticas não pulsadas com vírus (quantidade prevista = 05).
- Braço B: pacientes submetidos à imunoterapia com 3×10^6 células dendríticas pulsadas com partículas virais (quantidade prevista = 10).
- Braço C: pacientes submetidos à imunoterapia com 3×10^7 células dendríticas pulsadas com partículas virais (quantidade prevista = 10).

3.2.2. Área geográfica de abrangência

Pacientes procedentes de São Paulo, que estivessem em acompanhamento regular para infecção pelo HIV e que preenchessem os critérios de inclusão no estudo.

3.2.3. Duração do estudo

Após o recrutamento e seleção dos pacientes, houve um período de observação pré-vacina, seguido de um período de vacinação e de observação pós-vacina (Figura 1). O estudo foi encerrado após o período de 12 meses de observação depois da aplicação da primeira dose do produto no último paciente incluído.

3.2.4. Critérios de inclusão

- Idade: pacientes com 18 anos ou mais;
- Infecção pelo HIV documentada segundo os critérios do Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais do MSB vigentes à época da seleção;
- Ausência de terapia antiretroviral, terapias antineoplásicas ou uso de corticosteróides por um período mínimo de seis meses antes da entrada no estudo;
- Carga viral ≥ 1.000 cópias/mL, estável (isto é, sem variação $> 0,5$ log) nos seis meses que antecederam o início do estudo;
- Contagem sanguínea de TCD4+ ≥ 350 células/ μ L, estável (isto é, sem variação $> 25\%$) nos seis meses que antecederam o início do estudo;
- Formulário de consentimento livre e esclarecido assinado (apêndice A).

3.2.5. Critérios de exclusão

- Indivíduos sem acesso venoso adequado para o procedimento de coleta de sangue ou aférese.

- Uso de qualquer substância psicoativa de uma maneira que interferisse com a habilidade dos pacientes em seguirem as exigências do estudo;
- História de infecção pelo HIV < 01 ano;
- Gravidez ou amamentação;
- Uso de terapia antiviral, terapias antineoplásicas ou corticosteróides no período de seis meses antes do início do estudo;
- Presença de doenças crônicas, tais como: infecção pelo vírus das hepatites B (HBV) ou C (HCV), infecção por HTLV I/II ou qualquer condição capaz de promover disfunção do sistema imune, com exceção da infecção pelo HIV, assim como desordens psiquiátricas ou quaisquer distúrbios que pudessem afetar a clareza do voluntário no entendimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2.6. Participação de mulheres

3.2.6.1. Contracepção

Os efeitos deste tipo de imunoterapia sobre o desenvolvimento do feto humano são desconhecidos. Por esta razão, as mulheres em idade fértil e homens participantes tiveram que concordar em utilizar contracepção adequada antes da entrada e durante o período de participação no estudo. Preservativos masculinos foram fornecidos a todos os participantes. Todas as mulheres em idade fértil realizaram duplo teste de gravidez (urina e sangue) em todas as visitas programadas.

Como os riscos para o feto não são conhecidos, os indivíduos tiveram que concordar em não engravidar uma fêmea. As mulheres em idade fértil participantes do estudo foram orientadas a procurar um serviço de ginecologia para orientação e implementação de métodos contraceptivos.

3.2.6.2. Amamentação

Devido ao risco desconhecido para efeitos adversos em lactentes, secundários ao tratamento da mãe com o produto, as mulheres foram orientadas a interromper amamentação porventura em curso.

3.2.7. Envolvimento em outros estudos

A participação simultânea em outros ensaios foi restrita a estudos observacionais. Não foi permitida coparticipação em estudos de intervenção terapêutica ou profilática.

3.3. PRODUTO / INTERVENÇÃO

3.3.1. Formulação e apresentação

Cada dose do produto foi individualmente manipulada, acondicionada em seringa com volume total de 1 mL e entregue diretamente ao pesquisador responsável pela aplicação. De modo a excluir possibilidade de erro por troca das amostras, nunca mais do que um indivíduo teve material manipulado no mesmo dia.

3.3.2. Armazenamento e estabilidade do produto

Após o preparo e acondicionamento na seringa o produto foi transportado, a uma temperatura média de 8-12 °C, até o local onde seria aplicado, sendo sempre utilizado no prazo máximo de 8h após sua produção.

3.3.3. Preparação, dose e administração do produto de estudo

O isolamento, expansão e inativação do HIV, bem como a diferenciação das DCs a partir dos monócitos autólogos foram realizados em laboratório de nível de biossegurança 2 ⁽¹³⁰⁾ do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP).

3.3.3.1. Descrição do produto

O produto de teste foi composto por células dendríticas geradas a partir da diferenciação *in vitro* de monócitos autólogos, pulsados com HIV autólogo inativado por AT-2.

3.3.3.2. Coleta de sangue

Para a obtenção de material necessário à fabricação do produto, inicialmente as coletas eram executadas através de punção venosa de sangue periférico em intervalo de 15 dias. Posteriormente passamos a utilizar o material obtido através de aférese, otimizando, desta maneira, o protocolo (necessidade de menos coletas).

As coletas foram realizadas nas dependências da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo, com o equipamento separador celular automático Spectra® (*Cobe BCT, Lakewood, CO, USA*), utilizando o programa MNC do *software* atualizado versão 6.1, com o *kit* WBC de coleta semiautomática de células mononucleares.

Após a punção venosa bilateral em região de fossa antecubital, o equipamento retirou o sangue total sob velocidade de fluxo controlada entre 50-80 mL por minuto. Após a separação da camada mononuclear, o sangue remanescente foi devolvido simultaneamente ao paciente. O tempo de procedimento foi de cerca de 120-180 minutos.

Em virtude da utilização do citrato de sódio, o sangue permaneceu anticoagulado durante todo o procedimento, inclusive a unidade de concentrado de células mononucleares. A velocidade de infusão do citrato em relação ao sangue total dependeu da velocidade de fluxo e da superfície corpórea do paciente.

A bomba de coleta de células foi, após a estabilização da faixa mononuclear, fixada em 1,3 mL por minuto, portanto, a quantidade volumétrica da unidade coletada foi em torno de 156 mL.

3.3.3.3. Isolamento e expansão dos vírus

O isolamento e expansão dos vírus a partir de amostra de sangue periférico/produto de aférese de pacientes infectados foram realizados segundo protocolo obtido do *AIDS ClinicalTrialsGroup* (ACTG) *LaboratoryTechnologistCommittee*, com algumas modificações⁽¹³¹⁾. O material obtido foi separado por gradiente de *FicollPaque Premium*® (*GE HealthcareBio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala,Sweden*) e as PBMCs foram submetidas a protocolo de depleção de células T CD8+ através de seleção positiva em campo magnético utilizando tecnologia *Magnetic-activatedcellsorting(MACS)*® *MicroBeads(Miltenyi.Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)* Cerca de 10^7 células TCD8 negativas (TCD8-) foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura contendo 10% de Soro Fetal Bovino, na presença de fitohemaglutinina (*Phytohaemagglutinin-PHA*) e interleucina 2 (*Interleukin 2 - IL-2*®) (*PeproTechInc, Rocky Hill, NJ, USA*) para promover a ativação das células. As PBMCs excedentes foram congeladas em alíquotas de 10^7 células/vial para uso posterior.

As culturas que foram ativadas com PHA e IL-2 tiveram o meio trocado a cada três dias e semanalmente foram realimentadas com 10^7 células TCD8-autólogas, previamente ativadas com PHA e IL-2 por 48 horas.

As culturas foram monitoradas semanalmente por ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linkedImmunosorbentAssay – ELISA*) para detecção da proteína p24 no sobrenadante. Culturas positivas foram expandidas em garrafas maiores e culturas que se mantiveram por mais de quatro semanas negativas foram desprezadas.

A cada repique o sobrenadante da cultura contendo as partículas virais foi armazenado a -20° C para posterior inativação. Após acúmulo de cerca de 1.000-2.000 mL de sobrenadante comprovadamente positivo para p24, as culturas foram finalizadas, sendo as PBMCs armazenadas em nitrogênio líquido e o sobrenadante dividido em alíquotas congeladas a -70° C.

3.3.3.4. Ensaio de ELISA para detecção de p24

As culturas de vírus foram monitoradas pela detecção da proteína p24 do HIV nos sobrenadantes. Para tanto foi utilizado o kit *Vironostika*® *HIV-1*

Antigen(bioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France) e os procedimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante.

Em resumo, placas de ELISA previamente sensibilizadas com a proteína p24 foram tratadas com tampão de ruptura (25 µL/poço) e em seguida foram acrescentados 100 µL da amostra a ser testada. Para o controle da reação foi utilizado um poço contendo somente sobrenadante de cultura ou controle positivo contendo 160 pg/mL de p24. Quando necessário, a curva-padrão foi determinada utilizando diluição seriada de proteína p24 entre 80 e 5 pg/mL.

Após incubação por duas horas a 37° C, a placa foi lavada quatro vezes com tampão fosfato e incubada por uma hora a 37° C com 100 µL de anticorpo de detecção conjugado à peroxidase. Após ciclo de lavagem a placa foi incubada por mais 30 minutos com substrato Tetrametilbenzidina (TMB) e a reação bloqueada com ácido sulfúrico.

A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm e a concentração da proteína p24 nas amostras foi determinada utilizando-se o programa *SoftMaxPro®* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.3.3.5. Inativação e purificação do HIV

Para a inativação dos vírus obtidos foi utilizado o protocolo descrito por Rossio et al (1998), com algumas modificações⁽¹¹⁸⁾.

O volume total dos sobrenadantes obtidos nas culturas de expansão viral, em geral cerca de um litro, foi incubado com 250 µM de Aldrithiol-2® (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) sob agitação constante por uma hora, a 37° C.

Após a inativação, o material foi centrifugado a 3.000g por 20 minutos para remoção de *debris* celulares e, a seguir, concentrado em dispositivo de ultrafiltração Amicon® (Merck Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) com membrana de 100 kDa, através de centrifugação a 2.880 g por 20 minutos em cada ciclo. Após a concentração de todo o volume, o material foi lavado duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (*Phosphatebufferedsaline* - PBS), estéril, para remoção do AT-2.

A purificação dos vírus foi realizada por ultracentrifugação em centrífuga L80 Beckman™ (*BeckmanCoulter, Inc, Fullerton, California, USA*) utilizando rotor de ângulo móvel (SW41 Ti). Para tanto, o material foi acondicionado sobre solução de sacarose 20% em 20 mM de Tris/HCl + 20 mM de NaCl + 2,5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraaceticacid* – EDTA) (TNE), na proporção de 1/3 de sacarose:2/3 sobrenadante concentrado e em seguida centrifugado a 4° C por uma hora a 100.000 g. Após este período, todo o material acima da sacarose foi removido e o *pellet* ressuspendido em TNE. Procedeu-se à nova centrifugação por mais uma hora a 100.000 g e em seguida o *pellet* foi ressuspendido em meio de cultura *Roswell Park Memorial InstituteMedium* (RPMI) e quantificado com relação ao número de partículas virais através da reação de cadeia da polimerase (PCR), utilizando *Cobas® Amplicor kit* (*Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, NJ, USA*).

O controle do processo de inativação foi realizado através da cultura durante quatro semanas de uma alíquota de partículas virais inativadas, na presença de PBMCs previamente estimuladas com PHA. O sobrenadante foi recolhido a cada três dias e monitorado com relação aos níveis de p24, dosados através da técnica de ELISA.

3.3.3.6. Geração de células dendríticas

PBMCs provenientes do produto da aférese dos participantes foram obtidas através de separação em gradiente *Ficoll-Paque Premium* (produzido em condições *Goodmanufacturingpractices* - GMP) e, após duas lavagens, foi ressuspendido em meio RPMI. A suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células/mL e o material distribuído em diferentes volumes, em garrafas plásticas de 75cm².

As garrafas foram incubadas em posição horizontal por duas horas em estufa de CO₂ a 37° C para aderência dos monócitos. Após este período as células não aderentes foram retiradas e as células remanescentes foram então cultivadas em meio de cultura *AdoptiveImmunotherapyMedia(Therapeutic Grade)* (AIM-V®*Medium CTST*™, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*), suplementado com 50 ng/mL de interleucina 4 (IL-4®) e 50 ng/mL de GM-CSF® (*CellGenixGmbH, Freiburg, Germany*), ambos com qualidade para aplicação clínica.

No 5° dia de cultura as células foram pulsadas com HIV inativado, na proporção de 10^9 partículas/ 3×10^7 DCs, incubadas por quatro horas e ativadas através de cultivo com *pool* de citocinas pró-inflamatórias (50ng/mL de fator de necrose tumoral-*Tumor*

necrosis fator - TNF α ®, 10ng/mL de interleucina 1 β - IL-1 β ® e 100ng/mL de interleucina 6 - IL-6®) (*CellGenixGmbH, Freiburg, Germany*), por 48 horas, período após o qual o material foi analisado com relação a rendimento, viabilidade e perfil fenotípico.

3.3.3.7. Controle de qualidade da vacina

Células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico foram analisadas com relação à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo (*BD FacsCalibur™, San Jose, CA, USA*).

Para tanto, foi analisado o percentual de células expressando as moléculas: CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR e CCR7. Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos: anti-CD1a-ficoeritrina (*Phycoerythrin* - PE), anti-CD11c-ficoeritrina cianina 5 (*PhycoerythrinCyanine 5* - PECy5), anti-CD14 PE, anti-CD40-Isotiocianato de fluoresceína (*Fluoresceinisothiocyanate* – FITC), anti-CD80 PE, anti-CD86 FITC, anti HLA-DR FITC, anti-CD83 FITC, anti-CCR7 PE e seus respectivos isotipos (todos do fabricante *BD-Pharmingen™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA*). Foram analisados no mínimo 10.000 eventos de uma região (*gate*) determinada segundo as características de tamanho e granulosidade celular, excluindo-se as células mortas. Critérios estabelecidos internamente fixaram uma porcentagem mínima de células expressando CD83 e CD40 $\geq 50\%$, com viabilidade superior a 70% para validar o produto.

O controle de qualidade microbiológico foi realizado através da pesquisa presença de bactérias e fungos nas amostras do produto, através da técnica de citometria de fluxo (*BD™ CellViability Kit with BD LiquidCountingBeads-BD Biosciences, San Jose, CA, USA*).

3.3.3.8. Dose e administração

A vacina foi aplicada em três doses, cada uma delas constituída de quatro injeções de 0,25 mL (total de 1 mL/dose). A dose da vacina continha 3×10^6 ou 3×10^7 DCs pulsadas ou não com HIV autólogo inativado por AT-2.

A rota de administração foi subcutânea e as doses foram aplicadas aos 0, 15 e 30 dias do estudo segundo o cronograma estabelecido (Figura 1).

3.4. LIMITAÇÕES À TERAPIA ANTERIOR

Os voluntários não tinham indicação de uso de antirretrovirais (ARVs). Não era tolerada medicação imunomoduladora nos 180 dias que antecederiam a entrada no estudo.

3.5. MEDICAÇÕES E PROCEDIMENTOS CONCOMITANTES

Porquanto possível, apesar de desconhecido o potencial de interação com outros fármacos / imunobiológicos, sua utilização não foi estimulada durante a participação no estudo. Medicação com ação imunomoduladora relevante não foi tolerada.

Os medicamentos utilizados e procedimentos realizados durante a participação no estudo foram registrados em formulários de relato de caso (CRFs) elaborados especificamente para este estudo (apêndices B e C). Pelo protocolo, a prescrição de qualquer medicação/procedimento concomitante poderia ser feita apenas quando devidamente autorizada pelo investigador clínico responsável.

3.6. ACESSO AO PRODUTO APÓS O ENCERRAMENTO DO ESTUDO

O estudo não previa doses adicionais após o término do esquema proposto. Os voluntários foram esclarecidos de que, caso provada a segurança e tolerância do produto, poderiam ser convidados a participar de estudos futuros.

3.7. AVALIAÇÕES E PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

3.7.1. Avaliações clínicas

Os pacientes foram avaliados clinicamente em visitas rotineiras de seguimento de acordo com os procedimentos padronizados. Todos os pacientes foram acompanhados até a data de encerramento, estimada em aproximadamente 12 meses após a primeira dose do produto. Visitas de acompanhamento para coleta de dados em todos os braços de tratamento seguiram o cronograma pré-estabelecido.

A cada visita, o paciente foi avaliado por membros de uma equipe multidisciplinar, devidamente capacitados para o desenvolvimento desta pesquisa. As seguintes informações foram coletadas no *screening*: consentimento livre e esclarecido assinado, histórico médico, exame clínico (anamnese, sinais vitais, exame físico direcionado).

As seguintes informações foram coletadas em cada visita de acompanhamento: histórico direcionado de saúde, gravidez auto relatada para mulheres em idade fértil, exame clínico (anamnese, sinais vitais, exame físico direcionado).

A fim de facilitar a coleta de dados, foi utilizado um diário de estudo (apêndice D), fornecido ao participante para registro de intercorrências pertinentes.

Todos os indivíduos, submetidos ou não à vacina, receberam ao término da sua participação, um relatório para ser entregue ao médico assistente. Relatórios adicionais foram providenciados sempre que necessário.

3.7.2. Avaliações laboratoriais

As análises necessárias para as respostas às questões formuladas neste estudo foram realizadas no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências, LIM 56 do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP e na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP.

As seguintes avaliações foram realizadas ao longo do estudo: hemograma completo, determinações bioquímicas sanguíneas (glicose, aspartato aminotransferase-AST e alanina aminotransferase-ALT, uréia, creatinina), contagem hematológica de células TCD4+, TCD8+, Tregs, quantificação plasmática do RNA do HIV, sorologia para o vírus da hepatite B* e da hepatite C* e para o vírus HTLV 1 e 2*, dosagem de anticorpos anti-núcleo (ANA) e Beta Gonadotrofina Coriônica (β HCG)**.

*Quando não tivessem sido realizados dentro dos últimos 12 meses.

**Quando indicado.

3.7.3. Avaliações clínico-laboratoriais extras e coleta das amostras

Os procedimentos acima descritos referem-se a visitas de *screening* / seguimento que têm a finalidade de coleta de dados. Para garantir a segurança do paciente, visitas de seguimento mais frequentes poderiam ser realizadas sob determinadas circunstâncias tais como aparecimento de sintomas clínicos, queda rápida na contagem de células TCD4+ ou elevação rápida no RNA-HIV. Quando necessário, as coletas foram realizadas nas dependências do LIM56.

3.8. PREPARAÇÃO, MANUSEIO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

3.8.1. Risco biológico

Como a transmissão do HIV e de outros agentes patogênicos de origem sanguínea pode ocorrer através de contato com agulhas contaminadas, sangue e outros produtos biológicos, precauções adequadas foram adotadas por todo o pessoal na coleta, manuseio e transporte de todos os espécimes para este estudo, como atualmente recomendado pelo *Centers for Disease Control* (CDC) e instâncias regulatórias brasileiras^(130, 132, 133).

3.8.2. Transporte das amostras

Todas as amostras foram transportadas utilizando embalagens adequadas de acordo com as normas de *Goodlaboratorypractice*(GLP) e segundo a regulamentação brasileira. As doses preparadas e contidas em seringa foram transportadas em caixas plásticas acondicionadas em material absorvedor de impacto, sob banho de gelo, para as dependências do HCFMUSP.

3.9. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

3.9.1. Utilização de amostras armazenadas

As amostras foram adequadamente armazenadas até seu processamento, segundo as normas de *Goodlaboratorypractice* (GLP)⁽¹³⁴⁾.

Conforme previsto, as amostras excedentes e os dados recolhidos no âmbito do presente protocolo constituíram um biorrepositório, nos termos da resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 441 de 12 de maio de 2011⁽¹³⁵⁾ e podem ser utilizados para estudos futuros relacionados ao desenvolvimento de vacinas anti-HIV, apenas se explicitamente autorizado pelos participantes do estudo. Em qualquer hipótese, não serão realizados testes de manipulação genética. Para qualquer outra investigação ou tratamentos experimentais propostos por este ou outros protocolos será exigida a obtenção de novo(s) termo(s) de consentimento informado em separado, conforme a legislação brasileira.

3.9.2. Acesso e descarte das amostras

O acesso às amostras foi restrito ao pessoal envolvido no estudo. As amostras e os dados foram armazenados usando códigos atribuídos pelos investigadores. Os dados são mantidos em documentos impressos arquivados em armário lacrado e computadores protegidos por senha. Apenas os investigadores e inspetores devidamente credenciados pelas instâncias regulatórias pertinentes podem ter acesso aos dados e amostras.

No futuro, caso outros pesquisadores queiram estudar essas amostras e/ou dados, será exigida a aprovação pelos órgãos competentes, conforme a legislação brasileira. Qualquer informação a ser compartilhada sobre as amostras exigirá, similarmente, aprovação prévia.

Qualquer perda ou destruição inesperada de amostras (por exemplo, devido ao mau funcionamento do congelador), que resultasse em uma violação que compromettesse a integridade dos dados científicos recolhidos para o estudo, seria reportada às instâncias regulatórias competentes.

Além disso, os indivíduos podem decidir a qualquer momento não ter as suas amostras armazenadas. Neste caso, o investigador principal irá destruir todas as amostras restantes conhecidas e enviar relatório ao participante da pesquisa e às instâncias regulatórias competentes. Esta decisão não afetará a participação do indivíduo em quaisquer outros estudos futuros.

3.10. CALENDÁRIO DO ESTUDO

O cronograma dos procedimentos do projeto está descrito no anexo A

3.10.1. Screening

O objetivo da visita de *screening* foi o rastreamento para determinar a elegibilidade do voluntário para participar do estudo. Indivíduos diagnosticados com uma condição médica durante o processo de recrutamento (por exemplo, o teste reagente para a hepatite B, hepatite C, etc.) foram notificados e encaminhados para cuidados médicos. Os seguintes procedimentos de avaliação foram concluídos antes do envolvimento efetivo no estudo:

- Consentimento livre e esclarecido assinado;
- Histórico médico;
- Exame clínico (sinais vitais, exame físico);

- Testes imunoviroológicos (TCD4+, TCD8+, carga viral plasmática);
- Coleta de amostras de plasma, soro e células (PBMCs);
- Hemograma completo;
- Determinações bioquímicas (glicose, AST e ALT, uréia, creatinina);
- Sorologia para o vírus da hepatite B* e da hepatite C* e para o vírus HTLV 1 e 2*, ANA e β HCG**.

*Quando não tivessem sido realizados dentro dos últimos 12 meses.

**Quando indicado.

3.10.2. Matrícula (*Baseline*)

A visita 1 foi definida como a data da entrada no estudo e o dia 0, a data da primeira administração da imunoterapia. Todos os participantes tiveram que assinar consentimento informado para serem considerados inscritos no ensaio clínico, e tiveram todos os procedimentos de triagem realizados antes de efetivar a primeira administração do agente da intervenção. Avaliações antes da primeira intervenção foram a base para posteriores avaliações de segurança. Mulheres com potencial reprodutivo tiveram um teste sorológico e em urina negativos para gravidez nas visitas antes da aplicação do produto e em cada visita após a intervenção.

3.10.3. Seguimento

Os indivíduos receberam o produto nos dias 0, 15 e 30 do estudo. O calendário das visitas e injeções é apresentado no anexo A. O protocolo permitiu uma “janela” de até ± 5 dias na programação das visitas e injeções do estudo. A cada vacinação, a dose foi dividida em injeções aplicadas à direita e à esquerda dos braços (região axilar) e das pernas (região inguinal) como locais para a imunização. Após as injeções, os indivíduos foram observados por um período médio de 60 minutos. Os sinais vitais foram obtidos antes e após a aplicação do produto. Após a aplicação do produto, o participante foi contatado pelo telefone no período de até 24h.

3.10.4. Visita final do estudo

Uma visita final foi realizada para os pacientes que completaram o estudo (dia 360). Os procedimentos desta visita incluíram:

- Avaliação clínica (anamnese e exame físico);
- Estudos imunoviroológicos (TCD4+, TCD8+, Tregs, Carga Viral plasmática);
- Amostras de plasma, soro e PBMCs;
- Hemograma completo;
- Determinações bioquímicas (glicose, AST e ALT, uréia, creatinina);
- Sorologia para o vírus da hepatite B* e da hepatite C* e para o vírus HTLV 1 e 2*, ANA e β HCG***.

**Quando não tivessem sido realizados dentro dos últimos 12 meses.*

***Quando indicado.*

3.10.5. Visita de encerramento precoce

Nos casos dos pacientes que encerraram sua participação precocemente no estudo, sempre que possível, foi realizada uma visita extra de encerramento.

Os procedimentos executados nesta visita foram os mesmos da visita final (vide item acima), constando a observação “visita extra de encerramento precoce” no formulário de relato de caso.

3.10.6. Contato com os indivíduos após o término do ensaio

Apenas em casos extraordinários, a critério do investigador, os indivíduos poderiam ser contatados após o término do estudo. Caso isto fosse necessário o contato seria realizado via o serviço de assistência que estivesse acompanhando o paciente.

3.11. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA

3.11.1. Especificação dos parâmetros de segurança

Parâmetros clínico-laboratoriais relacionados à segurança da intervenção proposta foram avaliados durante todo o estudo. Estes parâmetros incluíram qualquer manifestação clínica percebida pelo participante e/ou investigador, e deveriam ser relatados à equipe do estudo. Os parâmetros de avaliação laboratorial incluíram todos aqueles descritos no item 3.7.2..

Antes da aplicação da imunoterapia, foi recolhida uma alíquota de PBMC que após identificação, foi armazenada, em recipiente estéril e congelada em nitrogênio líquido para eventuais análises posteriores, mantendo-se a guarda por cinco anos. Esta alíquota será usada como contraprova em caso de necessidade. O objetivo da alíquota para contraprova é parear a identidade do indivíduo imunizado com a identidade da vacina e suas características funcionais, biológicas e de esterilidade. Os testes a serem feitos dependerão dos questionamentos que surgirem, como percentual de células viáveis, DNA *fingerprint*, atividade imunológica das células e/ou outros testes que possam comprovar a qualidade e a identidade da vacina em relação ao indivíduo imunizado.

As avaliações laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências-LIM56 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.11.2. Avaliação, análise e registro dos parâmetros de segurança

3.11.2.1. Escala de intensidade (severidade)

Oseventosadversos (EAs) seguiram as definições do *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*⁽¹³⁶⁾ e foram categorizados quanto a severidade segundo a *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) do National Cancer*

Institute(NCI)⁽¹³⁷⁾e Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events Version 2.0 November 2014. Division of AIDS (DAIDS)⁽¹³⁸⁾.

No estudo similar anterior nenhum dos 18 voluntários vacinados apresentou evento adverso sério. As reações adversas encontradas naquele estudo foram: linfadenopatia localizada nos gânglios periféricos de drenagem, prurido na pele e dor no local da injeção⁽¹²⁵⁾.

3.11.2.2. Avaliação da relação de causalidade

Baseando-se nos “Princípios de Hill”(1965)^(139, 140), a avaliação da relação de causalidade seguiu as recomendações do *Council for International Organization of Medical Sciences Working Group VI report⁽¹⁴¹⁾* e do *Manual for Expedited Reporting of Adverse Events to Division of AIDS, Version 2.0⁽¹⁴²⁾*. Desta forma os eventos adversos foram classificados de forma binária, de modo a responder a pergunta: **Existe uma possibilidade razoável de uma relação causal entre o produto e o EA?**

Os EA também foram submetidos ao algoritmo estabelecido pela *Clinical Immunization Safety Assessment (CISA)⁽¹⁴³⁾*.

Para todos os EAs registrados, o clínico que avaliou o participante da pesquisa, determinou a causalidade do efeito adverso.

3.11.2.3. Arquivo / documentação

Em cada contato com o participante do estudo, a informação sobre eventos adversos foi solicitada através de questionamento adequado e avaliação clínica sendo imediatamente registrada em um documento fonte. Documentos fonte incluíram: anotações em prontuário, laudos de laboratório, registros de telefonemas e instrumentos de coleta de dados. Os documentos fonte foram analisados em tempo hábil pela equipe de investigação. Todos os eventos adversos identificados foram registrados em um formulário de relato de caso (CRF) e em formulário específico para relato de EA⁽¹⁴⁴⁾. A data de início, a data de término, a gravidade de cada evento e a avaliação do investigador principal sobre relação entre o EA e o agente de estudo / intervenção também foram registrados no CRF e em formulário específico para relato de EA.

3.11.2.4. Relato de eventos adversos

Os relatos de eventos adversos para este estudo seguiram os seguintes procedimentos:

- Todos os eventos adversos identificados foram registrados em um formulário de relato de caso (CRF) e em formulário específico para relato de EA.
- Os investigadores submeteram, periodicamente, relatório contendo um sumário atualizado de todos os eventos adversos ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de referência do estudo (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-CaPPesq-HCFMUSP).

3.11.2.5. Requisitos específicos para eventos adversos graves (EAS)

No interesse da segurança dos participantes do estudo e objetivando cumprir os requisitos legais para a condução de estudos clínicos no Brasil, todos os eventos adversos sérios, devido a qualquer causa, que ocorreram durante o curso do estudo foram imediatamente comunicados ao CEP de referência assim que o pesquisador responsável teve conhecimento do evento.

Eventos adversos sérios foram devidamente comunicados a:

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP

Telefone: (011) 2661-7585

Fax: (011) 2661-7585

E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

3.11.3. Seguimento dos participantes após eventos adversos

3.11.3.1. Acompanhamento

Em cada contato com o participante da pesquisa, o investigador buscou informações sobre os eventos adversos específicos através de questionamento e exame adequado. O diagnóstico de eventos adversos se deu através da observação pelo investigador e/ou equipe do estudo, relatos espontâneos feitos pelo indivíduo e/ou

membro da família e, ainda, por meio de relato no diário do estudo. Os eventos adversos anteriormente relatados pelo participante foram constantemente reavaliados quanto à duração, intensidade e relação com o produto em estudo. Avaliação de segurança incluiu a observação e monitoramento de parâmetros clínicos, virológicos, bioquímicos, hematológicos e imunológicos.

Durante o estudo, os voluntários continuaram a ser acompanhados para assistência à sua saúde nos serviços de origem. Alternativamente, foi oferecida a possibilidade de manterem acompanhamento com a equipe do ADEE 3002. Após o término do estudo, a atenção primária à saúde do paciente retornou ao seu serviço de saúde de referência. Alternativamente, foi oferecida ao participante do estudo a manutenção da assistência no ambulatório de infecção pelo HIV do HCFMUSP (ADEE 3002). Em qualquer caso, um documento descrevendo o estudo foi enviado ao médico assistente responsável pelos cuidados primários. Este médico foi instruído verbalmente e por escrito para manter contato com os pesquisadores imediatamente, para qualquer dúvida e/ou informação sobre evento adverso. Um e-mail e um número de telefone estiveram disponíveis para fornecer acesso à equipe de investigadores.

Todos os EAS e EA não graves relatados neste estudo foram seguidos até a sua resolução ou até que o investigador entendesse que o EA / EAS tinha se estabilizado e o acompanhamento não era mais necessário. Isto significa que, em alguns casos, o acompanhamento foi necessário após o paciente interromper a participação no estudo.

3.12 MODIFICAÇÃO DA INTERVENÇÃO / AGENTE DO ESTUDO PARA UM PARTICIPANTE

A dose e/ou esquema de vacinação poderia sofrer alteração, desde que, na opinião dos investigadores isto não representasse nenhum risco adicional aos participantes do estudo.

3.12.1. Normas para interrupção do estudo

O investigador monitorou e analisou os dados do estudo à medida que estes foram disponibilizados e determinou a presença e gradação de possíveis eventos adversos. A avaliação dos EAs bem como complicações do procedimento da imunoterapia foi realizada separadamente nos três braços propostos. Caso fosse decidido, o estudo seria interrompido a qualquer momento (nenhuma nova inclusão e/ou vacinação) seria realizada e um relatório seria enviado às autoridades regulatórias competentes.

O sistema envolvendo os CEPs / Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MSB, como parte de suas funções para garantir que os participantes da pesquisa sejam protegidos, poderia interromper o estudo a qualquer momento. Revisão posterior dos eventos adversos graves, inesperados e eventos adversos relacionados ao agente/procedimento também poderiam levar as instâncias regulatórias a interromper os procedimentos do estudo. Estas instâncias detinham a autoridade para interromper o estudo temporária ou definitivamente.

3.12.2. Normas para interromper a participação de um indivíduo

Um participante poderia ser retirado do estudo nas seguintes situações:

- Por decisão própria, sem necessidade de maiores esclarecimentos;
- Por decisão da equipe do estudo, esclarecendo-se o motivo da descontinuação;
- Desenvolvimento de um *endpoint*;
- Qualquer evento adverso clínico ou laboratorial, doença intercorrente ou outra condição médica ou qualquer situação, de maneira que a permanência no estudo não fosse do melhor interesse do participante;
- Por decisão das instâncias regulatórias responsáveis pelo acompanhamento do estudo;
- Ao final do estudo, cuja duração prevista foi de, aproximadamente 90 semanas.

Em qualquer das situações acima estava prevista a garantia do acesso à assistência à saúde do participante.

No caso em que o participante fosse retirado do estudo devido a um EA, ele deveria ser registrado no CRF como tal. O participante deveria ser acompanhado e tratado pelo pesquisador até o parâmetro anormal ou sintoma ter se resolvido ou estabilizado. Caberia ao investigador determinar se o EA estava resolvido ou se atingiu um estado estável, definindo que nenhum outro seguimento seria necessário. Também deveria haver documentação para apoiar essa decisão.

3.12.3. Retirada precoce de um participante do estudo

O voluntário poderia ter sua participação no estudo precocemente interrompida devido aos motivos descritos acima. Neste caso seu seguimento pós-estudo seria realizado segundo as determinações deste protocolo (como descrito anteriormente). Sua descontinuação seria registrada e informada às instâncias regulatórias competentes (CEP/CONEP e ANVISA).

3.12.4. Reposição de participantes que interromperam sua participação no estudo

O recrutamento de indivíduos em substituição aos que interromperam precocemente sua participação no estudo foi permitido durante o todo o período em que se realizou a seleção/recrutamento/inclusão.

3.13. PLANO E ESTRUTURA DE MONITORAMENTO DO ESTUDO

Relatórios periódicos sobre o estudo foram submetidos ao CEP, segundo a legislação brasileira para condução de ensaios clínicos.

O centro onde se realizou o estudo está apto para ser auditado pelos órgãos competentes a qualquer momento.

3.14. CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS

3.14.1. Revisão dos objetivos do estudo

Este ensaio de fase I/II foi conduzido com os objetivos de estabelecer, através da análise de parâmetros clínico-laboratoriais, a tolerância, segurança e possível impacto imunoviológico de um produto anti-HIV constituído por células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos autólogos pulsadas com HIV autólogo inativado por AT-2. Três formulações distintas foram avaliadas. Duas contendo diferentes doses de células dendríticas (3×10^6 e 3×10^7) às quais se adicionou o vírus inativado e um terceiro braço de indivíduos que foi submetido à imunoterapia apenas com células dendríticas sem pulso adicional de HIV.

3.14.2. População de estudo

A previsão inicial era de vinte e cinco indivíduos envolvidos no estudo, segundo os critérios de inclusão, seguindo a distribuição abaixo:

Braço A: 3×10^7 células dendríticas sem pulso com HIV- 05 indivíduos.

Braço B: 3×10^6 células dendríticas pulsadas com HIV- 10 indivíduos.

Braço C: 3×10^7 células dendríticas pulsadas com HIV- 10 indivíduos.

3.14.3. Descrição da análise

As avaliações de segurança foram realizadas monitorando-se a evolução dos parâmetros para cada indivíduo.

Para as avaliações relacionadas a um possível impacto imunoviológico, o período total de observação foi dividido em três fases distintas:

- Fase pré-vacina (semana -51 a semana 0)
- Fase pós-vacina imediata (semana 0 a semana 6)
- Fase pós-vacina tardia (semana 6 a semana 51)

Foram calculadas as médias das variáveis de interesse obtidas em cada fase para cada um dos pacientes submetidos à intervenção, realizando-se a avaliação ao longo da pesquisa, comprando-se as fases pré x pós-vacina em cada braço. A divisão do período pós-vacinação em dois intervalos (0-6 semanas e 6-51 semanas) permitiu ainda a avaliação de um possível efeito “precoce” da imunoterapia.

Também foram calculadas e observada a evolução das medianas das contagens das variáveis de interesse para cada braço a partir do *baseline* (dia 0).

Foram calculadas e observada a evolução dos Δ das variáveis de interesse em relação ao momento imediatamente antes do início da intervenção (*baseline*, dia 0), para cada braço, no período pós-vacinação.

Foi avaliada a correlação entre as variáveis monitoradas no estudo.

3.15. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese do estudo é de que a terapia celular baseada em DCs autólogas pulsadas com HIV autólogo inativado com AT-2 constitui um produto seguro e bem tolerado, capaz de induzir alterações imunológicas e virológicas relevantes do ponto de vista de controle da infecção pelo HIV.

3.16. MANUTENÇÃO DOS CÓDIGOS DE ALOCAÇÃO

A alocação foi feita por distribuição sequencial controlada pela equipe do estudo. Assim, o primeiro indivíduo arrolado no estudo foi incluído no braço A o segundo no braço B, o terceiro no braço C, o quarto no braço A e assim sucessivamente, até que fossem atingidos os números propostos para cada braço. Após se completar o braço A (n=5), os participantes passaram a ser distribuídos apenas entre os braços B e C. Como o estudo não foi “cego”, os investigadores estavam cientes de qual braço os voluntários foram alocados. Uma planilha

contendo os códigos de alocação foi elaborada e mantida sob a guarda dos pesquisadores.

3.17. SELEÇÃO, RECRUTAMENTO E SEGUIMENTO DOS PARTICIPANTES

Os indivíduos foram selecionados segundo os critérios de inclusão/exclusão, a partir de uma triagem inicial efetuada pela equipe do Ambulatório de Imunodeficiência Secundária (ADEE3002) do Departamento de Dermatologia do HCFMUSP.

Indivíduos que fazem parte da coorte de seguimento deste ambulatório foram, após seleção, encaminhados para o estudo. Os indivíduos externos puderam ser encaminhados para seleção com relatório contendo dados clínico-laboratoriais relevantes. Durante o estudo, os participantes continuaram a ser acompanhados para assistência à sua saúde nos serviços de origem. Alternativamente, foi oferecida a possibilidade de manterem acompanhamento com a equipe do ADEE 3002.

3.18. ANÁLISE DE IMPACTO IMUNOVIROLÓGICO

Entre os objetivos deste estudo está a análise de possíveis alterações imunoviroológicas induzidas pela intervenção. Foram analisadas a contagem sanguínea de células TCD4+, TCD8+, Tregse a carga viral plasmática do HIV.

A avaliação das sub-populações linfocitárias foi realizada pela técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizando o aparelho *BD FacsCalibur™* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA).

Para tanto, foi analisado o número absoluto e/ou o percentual de células expressando as moléculas: CD3, CD45RA, CD4, CD8, CD25 e FOXP3. Foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos: anti-CD3-Isotiocianato de fluoresceína (*Fluoresceinisothiocyanate* – FITC), anti-CD45-Peridina clorofila proteína (*Peridininchlorophyllprotein*- PerCP), anti-CD4 –

Alofococinina (*Allophycocyanin-APC*), anti-CD8- Ficoeritrina (*Phycoerythrin - PE*), Anti-CD25 – Ficoeritrina cianina 5 (*PhycoerythrinCyanin 5 – PE Cy5*), Anti-FOXP3- Ficoeritrina (*Phycoerythrin-PE*) e seus respectivos isotipos (todos do fabricante *BD-Pharmingen™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA*). Foram analisados no mínimo 10.000 eventos de uma região (*gate*) determinada segundo as características de tamanho e granulosidade celular, excluindo-se as células mortas. As sobpopulações foram definidas segundo os seguintes painéis:

-Células TCD4+: CD3+/CD45+/CD4+

-Células TCD8+:CD3+/CD45+/CD8+

-Células Treg: CD3+/CD4+/CD25+/FOXP3+

A carga viral plasmática do HIV foi avaliada através da amplificação do material genético do vírus pela reação de cadeia da polimerase em tempo real (*Real time polymerasechainreaction – RT-PCR*) utilizando-se o kit Abbott Real Time HIV-1 (*Abbott Molecular Inc., Des Plaines, Illinois, USA*) segundo as instruções do fabricante.

Estes dados foram relacionados entre si e com parâmetros de evolução clínica e laboratorial. Outros estudos imunológicos e virológicos poderão ser propostos, devendo sempre ser submetidos às instâncias regulatórias e implicando obrigatoriamente na autorização explícita dos participantes do estudo.

3.19. ANÁLISE PRELIMINAR

Foi realizada uma análise interina com os dados de 12 semanas de seguimento de todos os pacientes incluídos.

3.20. ÉTICA / PROTEÇÃO AOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os pesquisadores asseguram que todas as suas atividades relacionadas com o participante da pesquisa foram guiadas e estão em conformidade com a resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 da Comissão Nacional de ética em Pesquisa (CONEP), que

rege as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Além disso, os investigadores garantem que este estudo foi realizado em plena conformidade com a revisão atual da Declaração de Helsinque e com os regulamentos e orientações do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Good Clinical Practice (GCP)*⁽¹⁴⁵⁾ o que proporcionou maior proteção aos participantes da pesquisa.

3.20.1. Comitês revisores

Uma cópia do protocolo e do formulário de consentimento livre e esclarecido foi apresentada ao CEP/CONEP e ANVISA para aprovação por escrito (registros: CEP=0239/09, CONEP=15549 e ANVISA=914858092).

Os investigadores submeteram e obtiveram aprovação do CEP/CONEP para todas as alterações posteriores do protocolo, do documento de consentimento livre e outros documentos, conforme a legislação vigente no Brasil.

3.20.2. Processo de obtenção do consentimento livre e esclarecido

O consentimento livre e esclarecido é um processo que se inicia antes do indivíduo concordar em participar do estudo e continua durante toda a participação do indivíduo no estudo.

Ampla discussão dos riscos e possíveis benefícios desta intervenção foram fornecidos aos participantes através de um processo de “acolhimento”. Material audiovisual descrevendo em detalhes o agente de estudo, a intervenção, os procedimentos do estudo e os riscos envolvidos, foi apresentado aos participantes e documentação por escrito do consentimento informado foi necessária antes de se iniciar a pesquisa.

O termo de consentimento livre e esclarecido foi aprovado pelos órgãos responsáveis e os participantes foram convidados a ler e revisar o documento. Após examinar o documento, o investigador explicou a pesquisa ao participante e respondeu quaisquer perguntas que pudessem surgir. Os participantes assinaram o documento de consentimento informado antes de qualquer procedimento a ser feito especificamente

para o estudo. Os participantes tiveram oportunidade suficiente para discutir o estudo e entender as informações antes de concordar em participar. Os participantes foram livres para retirar o consentimento a qualquer momento durante o curso do estudo.

Os direitos e bem-estar dos participantes foram protegidos, enfatizando a eles que a qualidade da sua assistência médica não seria prejudicada, caso recusasse a participar deste estudo.

A aquisição de consentimento informado foi documentada em CRF apropriado e no prontuário do participante. O formulário de consentimento livre e esclarecido foi assinado e datado pessoalmente pelo participante e pela pessoa que conduziu a discussão do consentimento informado. O formulário de consentimento livre e esclarecido assinado foi elaborado em duas vias. Uma via está sendo mantida no arquivo do estudo e uma via foi fornecida ao participante.

3.21. MANUSEIO DOS DADOS E MANUTENÇÃO DOS REGISTROS

Os dados obtidos foram manipulados pela equipe responsável pela condução do estudo. Os registros são mantidos em arquivo, cujo acesso é restrito ao pessoal envolvido e instâncias regulatórias, pelo tempo necessário segundo a legislação brasileira.

3.21.1. Metodologia de coleta dos dados

Todos os dados coletados foram registrados em formulários de registro de caso (*Case Report Forms* - CRFs), específicos para o estudo, transferidos para planilha *Excel microsoft office®* (*Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA*) e, posteriormente digitados no sistema eletrônico de gerenciamento *on-line* de dados, *Research electronic data capture (RedCap)*⁽¹⁴⁶⁾, para as análises pertinentes.

3.21.2. Tipos de dados obtidos

Foram coletados dados relacionados à evolução clínico-laboratorial dos indivíduos nas visitas previstas no estudo.

3.21.3. Documentos fonte e acesso aos documentos fonte / dados

Os pesquisadores foram responsáveis por assegurar que os dados coletados fossem completos, precisos e registrados de maneira adequada.

A documentação fonte (registro inicial dos dados) deveria estar em concordância com os dados registrados no formulário de relatório do caso. Documentos fonte incluíram todos os registros de observações ou anotações de atividades clínicas e todos os relatórios e registros necessários para a avaliação e reconstrução do ensaio clínico.

Dados para os CRFs foram coletados durante as visitas do participante do estudo, os contatos telefônicos com os indivíduos, os diários dos pacientes e aqueles captados a partir do prontuário médico. O CRF pôde servir como documento fonte para os procedimentos específicos do estudo. Não se aceitou que o CRF fosse o único registro de participação de um paciente no estudo. Isso serviu para garantir que qualquer pessoa que acessasse o prontuário médico tivesse conhecimento de que o paciente estava participando de um ensaio clínico.

3.21.4. Política de publicação

Após a conclusão do estudo, os investigadores submeteram os resultados desta pesquisa a uma revista científica. A pesquisa também foi registrada na base de dados *Clinical Trials.gov* (NCT02766049)⁽¹⁴⁷⁾.

4. RESULTADOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1. Recrutamento, seleção, alocação & retenção

Quarenta e quatro pacientes convidados para participar da pesquisa foram submetidos à seleção segundo os critérios definidos no projeto. Estes indivíduos eram provenientes de vários serviços que prestam assistência a pessoas com HIV/aids.

O recrutamento se estendeu de 25/03/2010 a 02/02/2012. Durante este período, os participantes excluídos foram sendo substituídos de modo a tentar completar as amostras previstas em cada braço do estudo. Dos 44 indivíduos recrutados, 13 saíram antes da alocação nos braços que iriam receber o produto. A razão da retirada de 12 destes 13 foi o não preenchimento dos critérios para prosseguir na pesquisa (*screeningfailure*). Uma pessoa desistiu após assinar o TCLE.

Após a alocação, houve ainda a exclusão de outros 12 indivíduos.

A figura 2 exibe o fluxograma de progresso dos participantes através das etapas do estudo. No gráfico 1 estão detalhadas as causas da remoção de todos os participantes não vacinados (antes e após a alocação).

Figura 2 – Diagrama de fluxo com a progressão do número de participantes ao longo do estudo

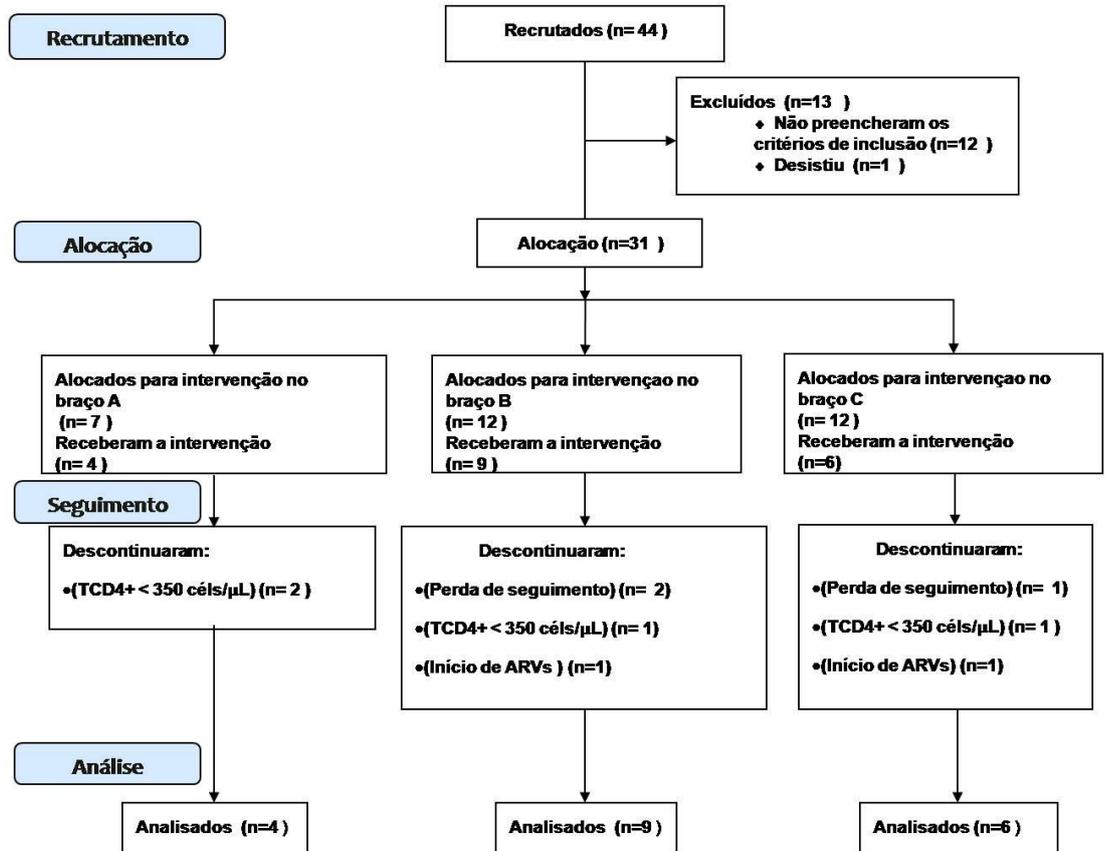
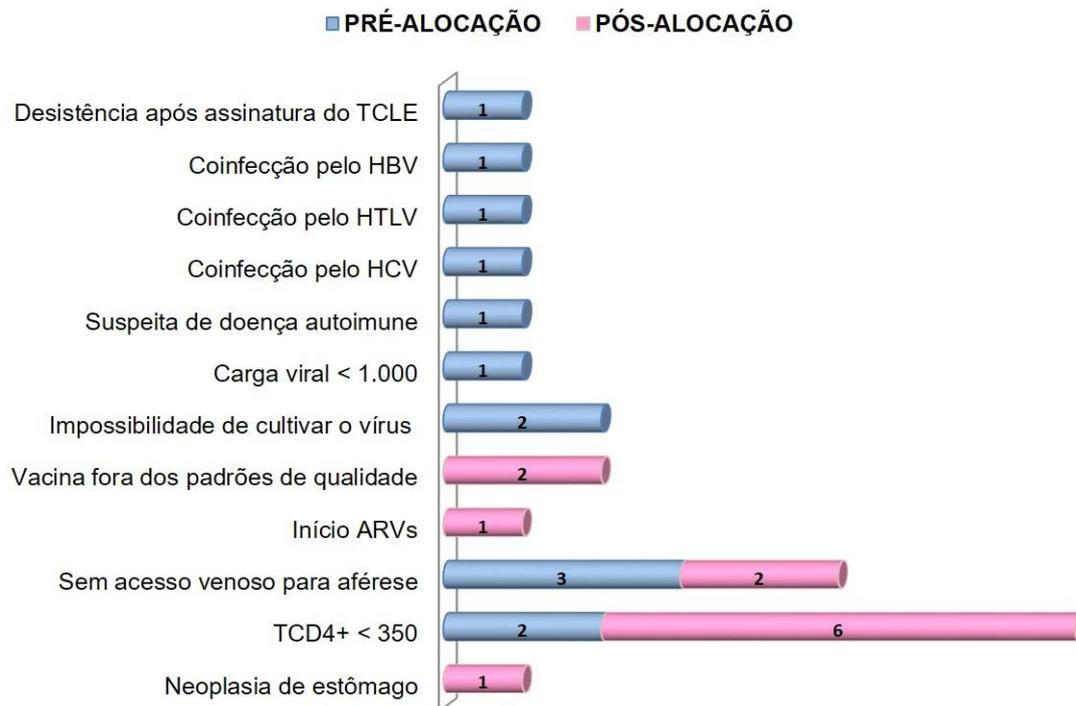


Gráfico 1 – Causas de exclusão dos pacientes não vacinados, pré e pós -alocação.



Legenda: TCLE-Termo de consentimento livre e esclarecido; HBV-Vírus da hepatite B; HCV-Vírus da hepatite C; HTLV-Vírus T-linfotrópico humano

O produto da intervenção terapêutica foi efetivamente administrado a 19 indivíduos, distribuídos da seguinte maneira:

- Quatro participantes no braço A (formulação=somente DCs na dose de 3×10^7 células)
- Nove participantes no braço B (formulação=DCs na dose de 3×10^6 células, com pulso adicional de HIV-AT-2, da ordem de 10^8 partículas virais)
- Seis participantes no braço C (formulação=DCs na dose de 3×10^7 células, com pulso adicional de HIV-AT-2, da ordem de 10^9 partículas virais)

No total, a maioria dos indivíduos que receberam a intervenção eram homens ($n=14$; 73,7%), sendo a distribuição por braços: A=4 (100%), B=7(77,7%), C=3(50%). A média de idade foi de 34,63 anos e a média do tempo desde a primeira evidência da infecção pelo HIV foi de 5,73 anos. Com relação ao número de células T CD4+ no momento de entrada no estudo, a média foi de 543 / μ L (dez participantes com TCD4+ > 500 células/ μ L). Já a quantidade média inicial de partículas virais no plasma foi de 20.371 cópias/mL.

No que diz respeito a este parâmetro (carga viral plasmática), vale destacar que, com exceção de um indivíduo, todos os outros participantes vacinados apresentavam contagem inicial abaixo de 50.000 cópias/mL.

No *baseline* (momento imediatamente antes da primeira dose da intervenção), a média de TCD4+ foi de 458 células/ μ L (oito participantes com TCD4+ > 500 células/ μ L), enquanto que a média da carga viral plasmática, 42.563 cópias/mL. Nesta ocasião, três indivíduos apresentavam carga viral acima de 50.000 cópias/mL.

O tempo médio entre a entrada no estudo e a aplicação do produto foi de 39,94 semanas (variação: 13,29 a 79 semanas), com as seguintes médias para cada braço:

-Braço A: 31,21 semanas

-Braço |B: 39,52 semanas

-Braço C: 49,11 semanas

As tabelas 1 e 2 exibem algumas características dos participantes. Quando estratificamos por braço de intervenção, observamos que as características são similares entre os braços (Tabela 2). No que diz respeito aos parâmetros de células TCD4+ e CV plasmática, considerados os níveis de variação assumidos como significantes para este estudo (0,5 log para CV e 25% para TCD4+), notamos que não houve diferença relevante entre os braços. Apenas no braço B houve elevação média da CV entre o *screeninge baseline* de 0,56 log.

Tabela 1 – Características dos indivíduos submetidos à intervenção

CÓDIGO DE ALOCAÇÃO	SEXO (14M / 5F)	TEMPO DESDE A PRIMEIRA EVIDÊNCIA DA INFECÇÃO (1-15 ANOS)	IDADE (22-56 ANOS)	BRAÇO a (n=4) b (n=9) c (n=6)	SCREENING TCD4+ (306-810 células/ μ L)	BASELINE TCD4+ (291-608 células/ μ L)	SCREENING CV (2.159-53.309 cópias/mL)	BASELINE CV (1.569-400.450 cópias/mL)
14/14	M	4	40	b	648	566	27.564	12.352
38/13	M	11	32	a	474	320/398	6.983	22.741
47/16	M	1	24	b	598	569	24.665	24.530
49/18	M	5	56	a	473	594	27.575	29.154
51/20	F	6	39	b	439	543	2.931	3.480
53/22	M	6	47	a	499	351	40.507	105.848
55/24	M	2	40	c	427	400	30.654	45.591
58/27	M	14	27	b	707	502	7.280	2.833
62/31	M	1	40	b	320/470	329 /298*	16.624	19.898
63/32	M	6	32	a	306/481	306 /297*	53.309	34.255
64/33	F	3	28	c	306/432	376	3.245	5.121
65/34	M	9	35	c	583	471	27.418	59.152
67/36	F	1,5	32	c	596	580	26.994	16.168
68/37	M	6	22	b	810	544	3.538	1.569
69/38	M	1	28	c	774	427	40.843	15.789
70/39	M	4,5	38	b	784	608	18.808	3.682
74/43	F	15	39	c	586	480	2.159	3.429
77/46	M	1	27	b	479	291/416	22.226	400.450
78/47	F	12	32	b	515	456	3.743	2.661

Nota: Os números em vermelho referem-se aos pacientes que apresentaram TCD4+<350 céls/mL , com o resultado do re-teste após a barra. Os asteriscos sinalizam indivíduos excluídos por TCD4+<350 céls/mL após a confirmação.

Legenda: ADEE-Ambulatório de Dermatologia Especializada; IIER-Instituto de Infectologia Emílio Ribas; CR-Centro de Referência.

Tabela 2 – Características dos participantes (médias por braço do estudo)

BRAÇO	TEMPO DESDE A PRIMEIRA EVIDÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV (anos)	IDADE (anos)	TCD4+ Screening (células/ μ L)	TCD4+ Baseline (células/ μ L)	CV Screening (cópias/mL) (log)	CV Baseline (cópias/mL) (log)
A	7	41,7	481	447	32.093 (1,50)	47.999 (1,68)
B	5,6	32,1	605	467	14.153 (1,15)	52.383 (1,71)
C	6	33,6	566	455	21.885 (1,34)	24.208 (1,38)

Nove indivíduos foram excluídos após o início da intervenção. Destes, sete receberam as três doses previstas e foram removidos do estudo durante o seguimento pós-vacina. Outros dois participantes foram retirados antes de completar as três doses previstas (um recebeu 1 dose e outro recebeu 2 doses, ambos excluídos por queda de TCD4+ para níveis inferiores a 350 células/ μ L).

As informações sobre os participantes submetidos à terapia do estudo cuja participação foi finalizada precocemente estão representadas no quadro 1.

Quadro 1 – Indivíduos excluídos após a vacinação

CÓDIGO DE ALOCAÇÃO	BRAÇO	MOTIVO DA EXCLUSÃO	DOSES RECEBIDAS	ÚLTIMA VISITA ANTES DA EXCLUSÃO
53/22	A	Queda de TCD4+	3	V9
63/32	A	Queda de TCD4+	1*	V6
58/27	B	Perda de seguimento (viagem para fora do país)	3	V10
62/31	B	Queda de TCD4+	2	V6
77/46	B	Início ARVs (decisão do médico assistente)	3	V9
68/37	B	Perda de seguimento (faltou)	3	V11
64/33	C	Queda de TCD4+ (Indicação de ARVs na opinião do pesquisador)	3	V8
65/34	C	Início ARVs (decisão do médico assistente)	3	V10
74/43	C	Perda de seguimento (faltou)	3	V11

Nota: *Não recebeu a 2ª dose da vacina devido a problemas no controle de qualidade (redução na viabilidade das DCs).

Todos os participantes submetidos à intervenção foram acompanhados pelo tempo previsto no protocolo (48 semanas), mesmo aqueles que foram excluídos. Para estes indivíduos vacinados, o seguimento após o término precoce da participação teve como único objetivo o acompanhamento conjunto para assistência à sua saúde, visando à segurança do paciente. Nestes casos, após a exclusão, nenhum dado foi considerado para análise.

4.2. PREPARO DO PRODUTO

Após a distribuição dos participantes pelos braços do estudo, foram feitas coletas de sangue com a finalidade de realizar o processo *in vitro* de isolamento, expansão e inativação do vírus com AT-2. Estas coletas, previstas para as visitas 2 e 3, foram realizadas em sete dos 19 indivíduos através de punção venosa periférica. Posteriormente o vírus passou a ser obtido no momento da leucoaférese, junto com as células precursoras para a geração das DCs (procedimento realizado na visita 4). Isto

permitiu o aprimoramento da produção do antígeno, através da captação de um volume maior de material para sua preparação. Desta forma, foram abolidas as visitas 2 e 3, sendo todo o material para a composição do produto (vírus, células TCD8- e monócitos) captado em uma única etapa.

Inicialmente procedeu-se o processamento do antígeno, congelando-se as PBMCs para posterior geração das DCs.

4.2.1. Antígeno

Baseado na experiência anterior dos pesquisadores com estudos *in vitro* utilizando células alogênicas para a cultura e expansão do vírus, a expectativa era de que o processo de preparação do antígeno durasse em torno de oito semanas. Observou-se, entretanto, que a produção do HIV em células autólogas foi bem mais demorada do que em células alogênicas (média de tempo necessário para a cultura do vírus = 15,87 semanas, com variação de 5 a 37,46 semanas. Braço A= 9,14 semanas, braço B=16,57 semanas, braço C=18,19 semanas). Na tabela 3 encontra-se representado o tempo necessário para a etapa de produção do antígeno (HIV-AT-2) para cada um dos indivíduos vacinados. Para os participantes do braço A o processo teve como objetivo a produção de antígeno, visando à realização de experimentos imunoviológicos posteriores, já que o pulso adicional do vírus não era necessário nas DCs deste braço.

Tabela 3-Tempo consumido para a produção do antígeno

ALOCAÇÃO	BRAÇO	TEMPO (SEMANAS)
38/13	A	14,14
49/18	A	5,43
53/22	A	7,85
14/14	B	37,43
47/16	B	12,42
51/20	B	28,43
58/27	B	9,43
62/31	B	9,57
68/37	B	16,01
70/39	B	5,86
77/46	B	11,43
78/47	B	18,57
55/24	C	5
64/33	C	17,86
65/34	C	10,01
67/36	C	36,99
69/38	C	25,28
74/43	C	14

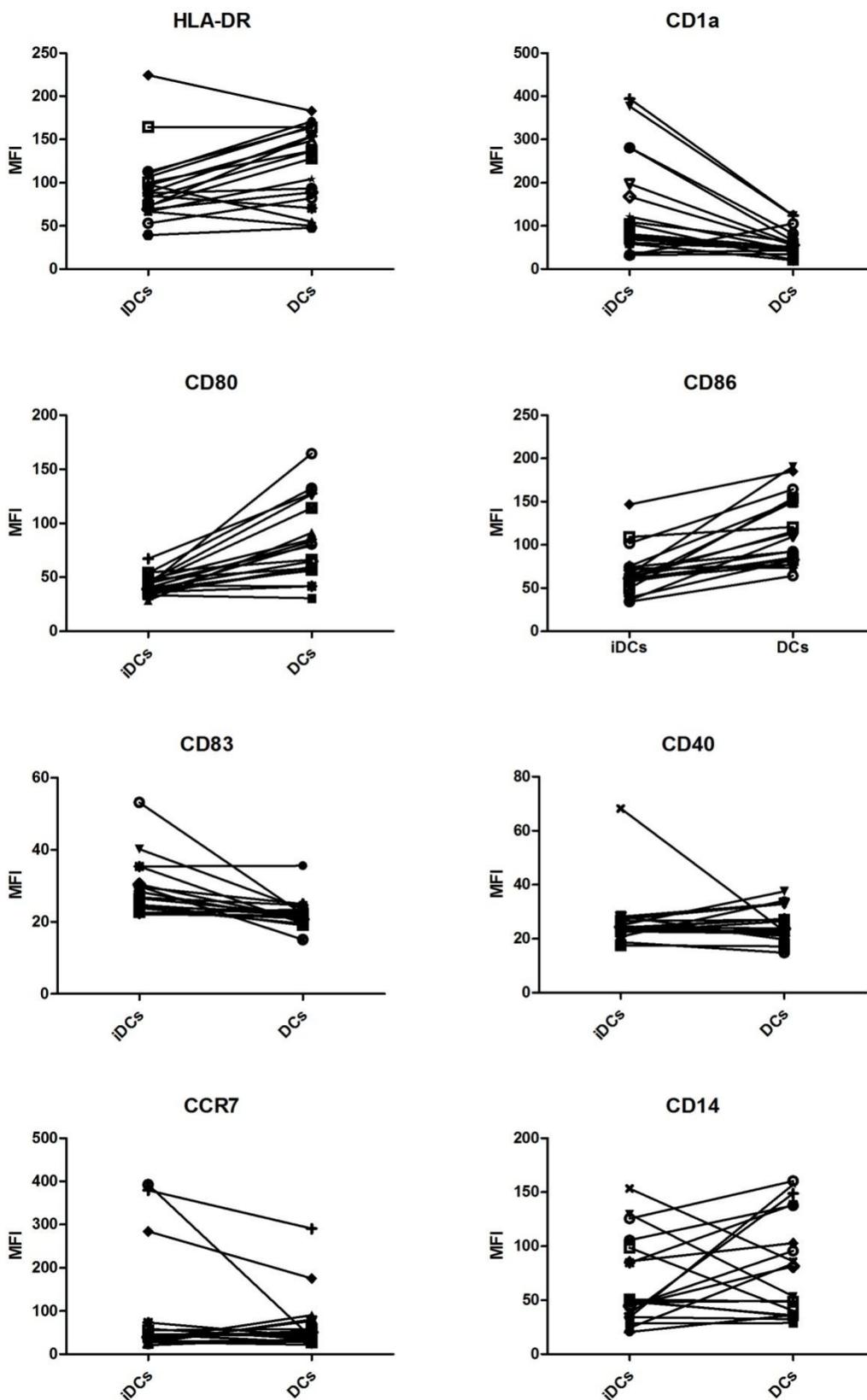
Nota: para o participante 63/32 (braço A) não foi realizado o procedimento

4.2.2. Células dendríticas

A quantidade média de DCs efetivamente utilizada na composição das formulações do produto foi: $2,81 \times 10^7$ no braço A (93,9 % do previsto), $2,93 \times 10^6$ no braço B (97,9% do previsto) e $2,59 \times 10^7$ no braço C (86,4% do previsto). A viabilidade média obtida foi de 71,85%, sendo que um participante (63/32), não recebeu a segunda dose devido à baixa quantidade de células vivas (52%). Este indivíduo foi excluído posteriormente, antes da terceira dose, por queda de TCD4+.

A expressão das moléculas de superfície permitiu caracterizar as iDCs e sua transformação em DCs “maturas/ativadas” (Figura 3).

Figura 3 - Marcadores fenotípicos das DCs utilizadas na vacina (MFI)



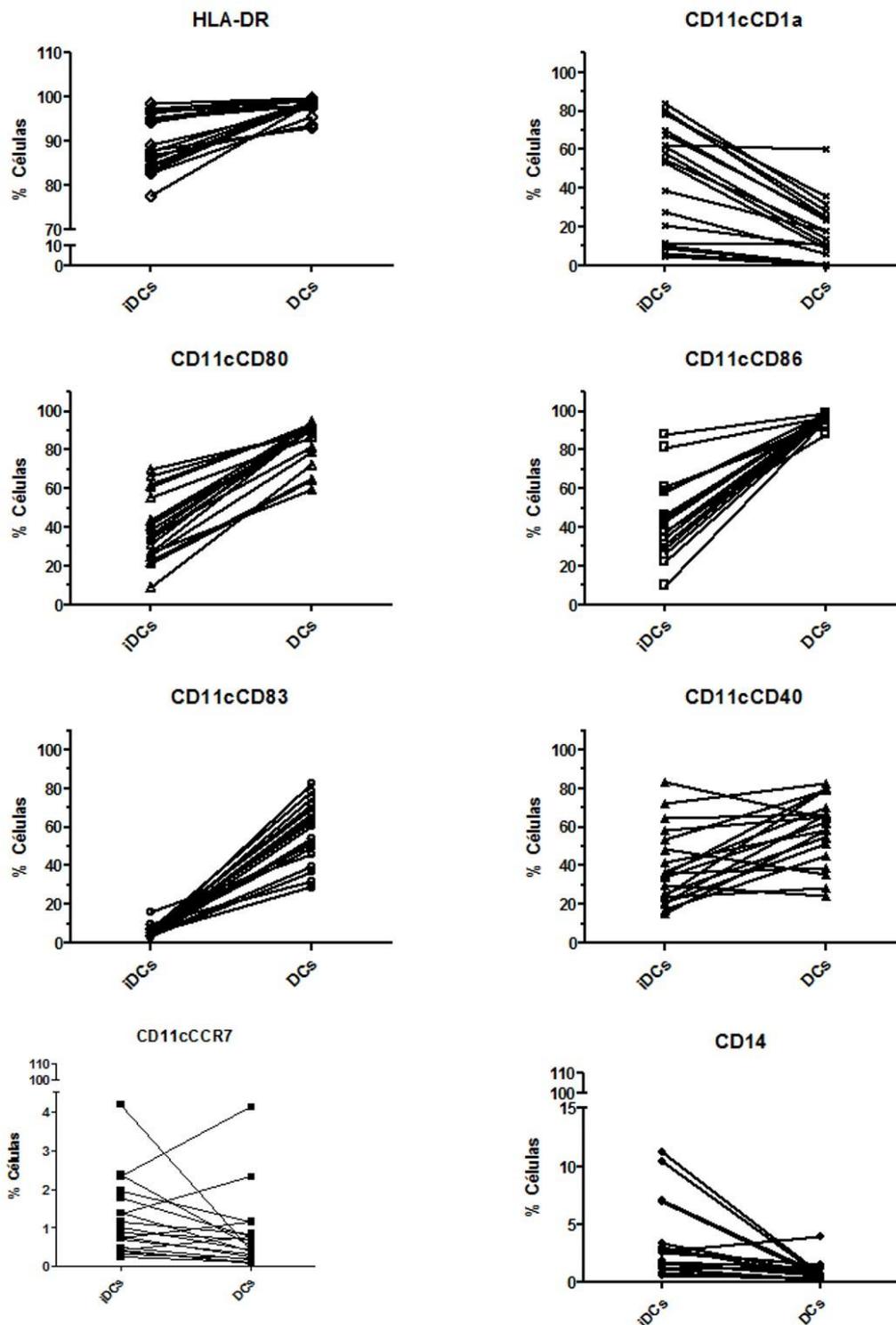
Nota: MFI-Intensidade média da fluorescência (*Mean of fluorescence intensity*)

Após a diferenciação, houve redução no número de DCs expressando CD14 e CD1a quando comparadas com as iDCs. Já o número de DCs expressando HLA-DR, CD40, CD80, CD83 e CD86 aumentou.

A porcentagem de células expressando CCR7 mostrou-se muito baixa, sendo este marcador desconsiderado para a caracterização das DCs.

A descrição fenotípica das DCs utilizando os diversos marcadores previstos no estudo está representada na figura 4.

Figura 4-Marcadores fenotípicos das DCs utilizadas na vacina



Problemas com a criopreservação em nitrogênio líquido levaram a necessidade de realização de uma segunda aférese em cinco participantes. Uma participante (78/47) apresentou dificuldade de acesso venoso nesta segunda aférese, resultando num baixo

rendimento celular e a equipe optou pelo seu remanejamento para o braço de menor quantidade de DCs na composição do produto (braço B= 3×10^6 DCs).

4.2.3. Controle de qualidade

Os critérios estabelecidos para a liberação e utilização do produto foram obedecidos satisfatoriamente. Dos 44 recrutados, três não receberam o produto por não preenchimento dos parâmetros adotados. Dois indivíduos foram excluídos antes do início da intervenção por este motivo. O outro participante (63/32), não recebeu a segunda dose da vacina.

4.3. SEGURANÇA

4.3.1. Laboratório

Os limites dos parâmetros laboratoriais monitorados seguiram os padrões de referência definidos pelo Departamento do Laboratório Central do HCFMUSP⁽¹⁴⁸⁾. Nenhum dos valores fora dos limites de normalidade foi considerado clinicamente relevante na opinião dos pesquisadores, não sendo associado a evento adverso (Anexos B-I).

Cinco participantes apresentaram testes positivos para o Fator Antinuclear (FAN). Em dois deles, a detecção já havia ocorrido antes da intervenção. Todos os casos foram testados para outros auto-anticorpos, não se confirmando a suspeita de auto-imunidade.

4.3.1.1. Contagem de células T CD4+

Quatro participantes vacinados foram excluídos por apresentarem redução no número de linfócitos TCD4+ abaixo do limite de 350 células/ μ L. A observação do período pré-intervenção sugere a possibilidade de que estes pacientes (53/22 e 63/32 do braço A; 62/31 do braço B e 64/33 do braço C) já apresentavam tendência de queda destas células que não conseguiu ser totalmente revertida pela imunoterapia. (Figura 5). Desta forma, em nenhum destes indivíduos, conseguiu-se estabelecer uma associação

consistente entre a queda de TCD4+ e a aplicação do produto. O gráfico 2 exibe a distribuição por braço dos participantes com TCD4+ < 350 células/ μ L, comparando os períodos pré e pós-vacina. Vale destacar que alguns pacientes, em especial no braço B, tiveram, logo após a vacinação, queda discreta e fugaz da contagem de linfócitos TCD4+, sem repercussão clínica (Figura 5).

Gráfico 2 – Distribuição dos participantes com TCD4+ < 350 céls./mL por braço do estudo

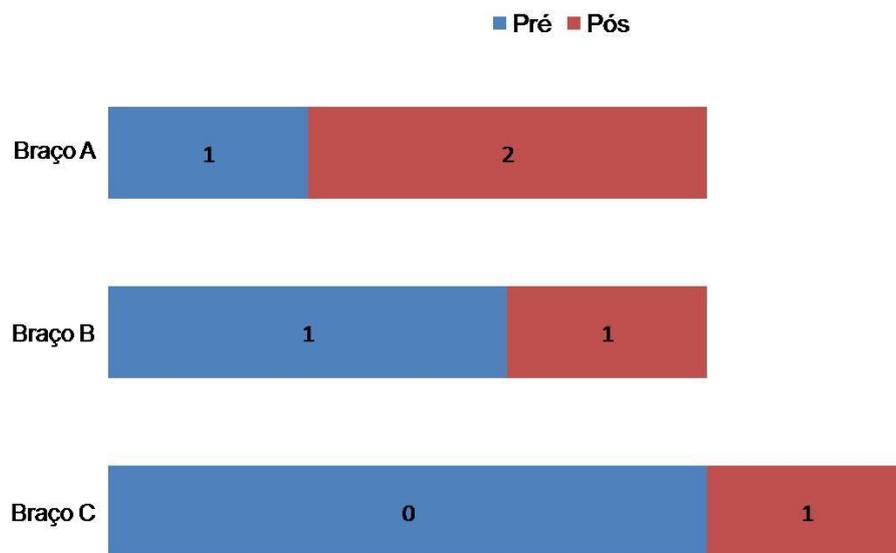
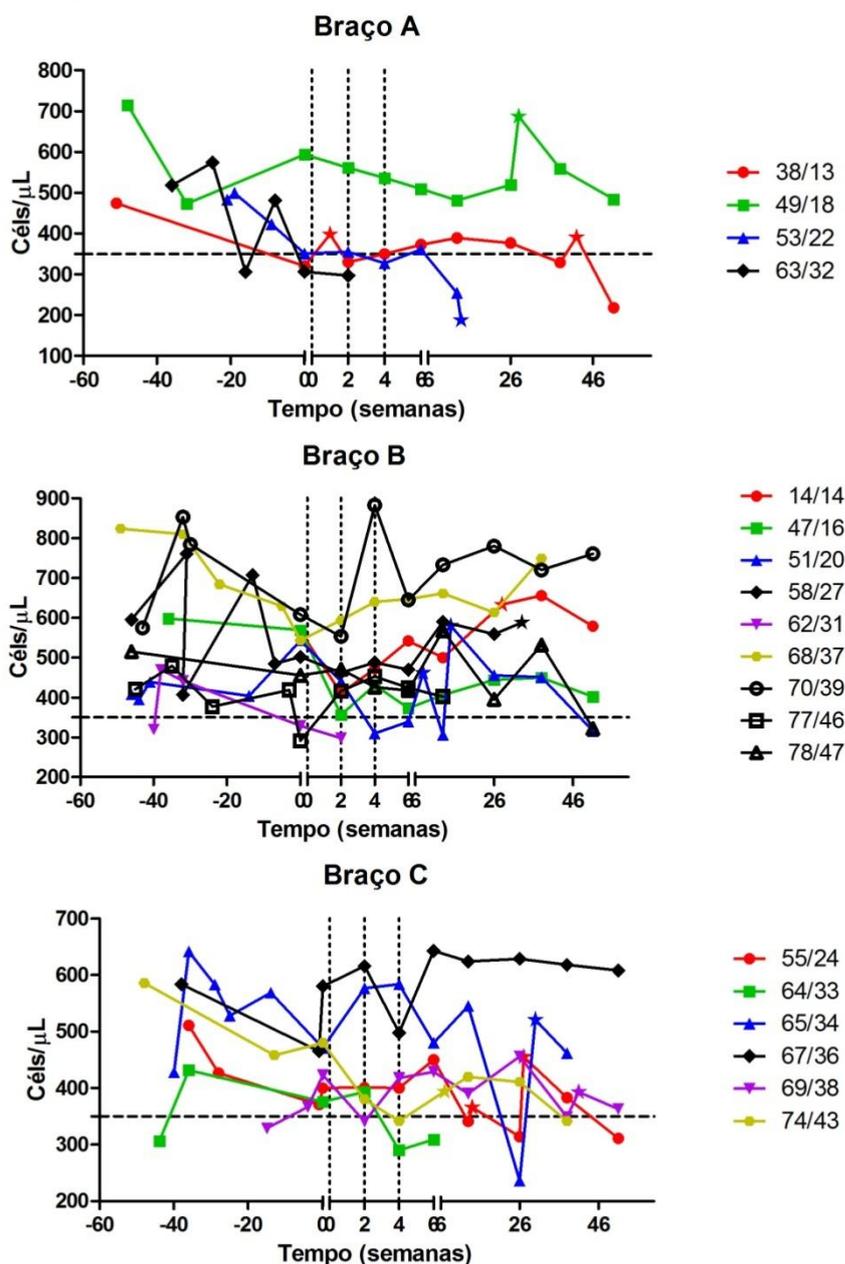


Figura 5 - Evolução do número de células TCD4+ dos participantes submetidos à intervenção



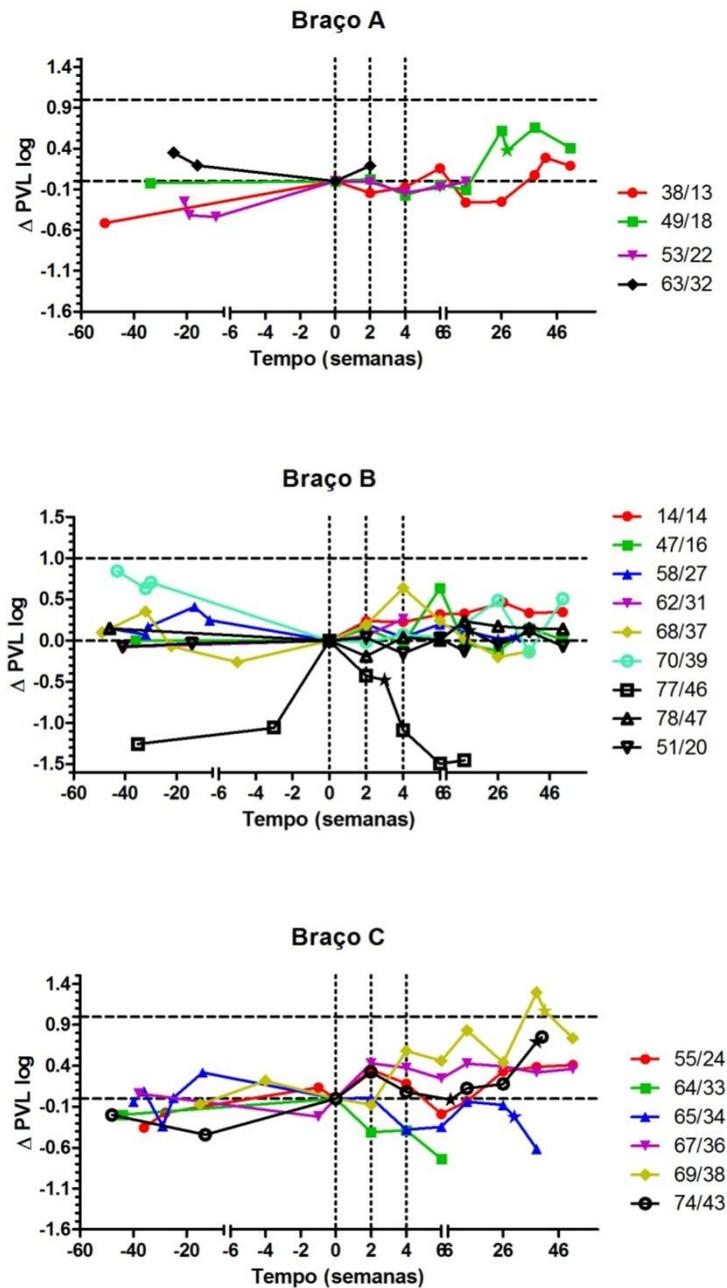
Nota: as linhas horizontais tracejadas referem-se aos limites de 0 e 1 log As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas). Os símbolos ★ significam avaliações fora do cronograma original de seguimento.

4.3.1.2. Carga viral plasmática

A análise foi realizada com os valores da carga viral plasmática do HIV expressos em logaritmo de base 10. Antes da intervenção, nenhum participante apresentou elevação da CV > 1 log. Em apenas um indivíduo do braço C (69/38) houve,

após a intervenção, uma elevação da carga viral plasmática superior a 1 log em relação ao momento imediatamente antes do início da vacinação. Este aumento não foi confirmado após repetições do teste conforme descrito no protocolo. Desta forma, a observação dos níveis de CV HIV no plasma dos pacientes revelou não haver aumento significativo em nenhum dos participantes. A figura 6 ilustra a variação dos níveis plasmáticos de CV ao longo do período de observação em relação ao momento imediatamente antes do início da vacinação (semana zero), nos três braços estudados.

Figura 6 - Evolução da variação da CV plasmática dos participantes submetidos à intervenção



Nota: as linhas horizontais tracejadas referem-se aos limites de 0 e 1 log As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas). Os símbolos * significam avaliações fora do cronograma original de seguimento.

4.3.2. Sinais vitais

Para os sinais vitais (Anexos J-O), adotaram-se como referência os valores estabelecidos pelo *American College of Emergency Physicians*⁽¹⁴⁹⁾. A fim de simplificar a análise, as pressões arteriais sistólica e diastólica foram convertidas em pressão arterial média (PAM) seguindo o cálculo referenciado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia⁽¹⁵⁰⁾. Considerando a referência adotada, observou-se que a maioria dos pacientes apresentou frequência respiratória acima dos limites considerados normais, antes e após a intervenção. Um indivíduo (65/34, braço C) apresentou queda significativa do peso registrada na semana 13 após o início da intervenção. Este indivíduo possuía patologia proctológica (retite associada ao HPV), apresentando episódios de diarreia ao longo do estudo. Este quadro já estava presente antes da entrada na pesquisa, não sendo, portanto, associado à intervenção. Nenhuma outra alteração dos sinais vitais foi considerada clinicamente significativa. Da mesma forma que os dados laboratoriais, nenhum valor fora dos parâmetros de referência foi associado a evento adverso.

4.3.3. Eventos Adversos

Diferente de alguns ensaios já publicados^(125, 126, 151), não observamos efeitos inflamatórios locais ou enfartamento ganglionar adjacente ao local da aplicação da vacina em nenhum dos pacientes submetidos à terapia.

Setenta eventos adversos foram registrados ao longo de todo o estudo. O tempo de observação foi ajustado de modo a igualar o período de análise pré e pós-vacina. Verificou-se que a frequência foi de vinte eventos antes e cinquenta eventos após a aplicação do produto (representados no quadro 2).

Quadro 2 - Frequência e caracterização dos eventos adversos nos indivíduos vacinados

PERÍODO PRÉ-VACINA			PERÍODO PÓS-VACINA		
CÓDIGO (BRAÇO)	EVEN TO ADVERSO	N° DE EVENTOS	CÓDIGO (BRAÇO)	EVEN TO ADVERSO	N° DE EVENTOS
38/13(A)	Dislipidemia	1	53/22(A)	Cefaléia	1
38/13(A)	Escoriações MM	1	38/13(A)	Corpo estranho ocular	1
49/18(A)	Exerese de lesões de face	1	38/13(A)	Desvio septo nasal	1
			38/13(A)	Diarréia	2
			38/13(A)	Dislipidemia	1
			38/13(A)	Giardíase	1
			38/13(A)	Otalgia	2
			49/18(A)	Febre	1
			53/22(A)	Febre + dores generalizadas	1
			38/13(A)	Sinusopatia	1
TOTAL		3			12
78/47(B)	Acne	1	78/47(B)	Amenorréia	1
62/31(B)	Colite	1	47/16(B)	Artralgia ombro	1
62/31(B)	Colonoscopia	1	47/16(B)	Bronquite	1
77/46(B)	Diarréia	1	14/14(B) 14/14(B) 78/47(B) 78/47(B) 78/47(B) 78/47(B)	Cefaléia	6
77/46(B)	Dor de garganta	1	47/16(B)	Dermatite face	1
77/46(B)	Epigastralgia	1	47/16(B)	Diarréia	1
78/47(B) 62/31(B)	Herpes	2	78/47(B) 78/47(B)	Dor de garganta	2
14/14(B)	IVAS	1	78/47(B)	Herpes	1
62/31(B)	Retíte	1	14/14(B)	Herpes Zoster	1
			58/27(B) 70/39(B) 78/47(B)	IVAS	3
			14/14(B)	Lesões de pele	1
			78/47(B)	Sinusopatia	1
TOTAL		10			20

Nota: Eventos adversos identificados em ambos os períodos (pré e pós vacina) estão sombreados em azul mais escuro

Legenda: IVAS-Infecção das vias aéreas superiores; MM-Membros

(continua)

(conclusão) Quadro 2 - Frequência e caracterização dos eventos adversos nos indivíduos vacinados

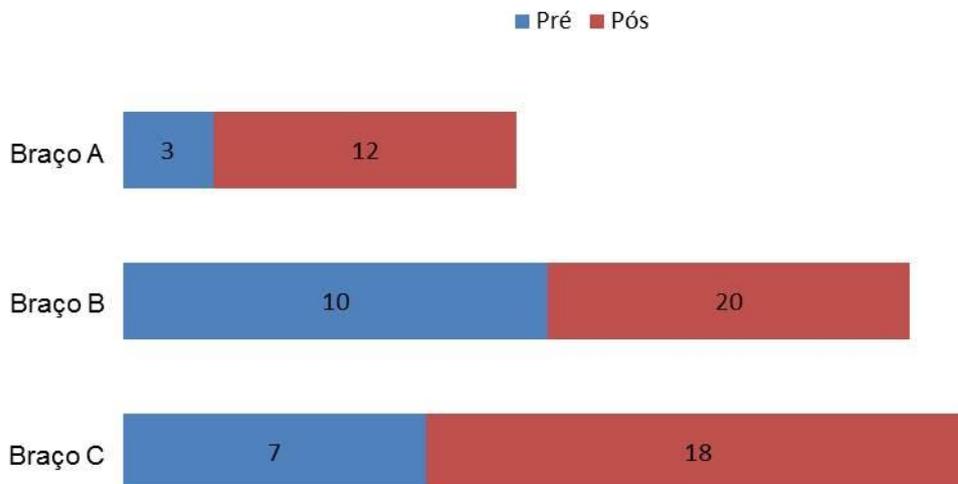
PERÍODO PRÉ-VACINA			PERÍODO PÓS-VACINA		
CÓDIGO (BRAÇO)	EVENTO ADVERSO	N° DE EVENTOS	CÓDIGO (BRAÇO)	EVENTO ADVERSO	N° DE EVENTOS
65/34(C)	Artralgia MM	1	65/34(C)	Colonoscopia	1
65/34(C)	Cisto renal	1	55/24(C)	Cólica renal	1
65/34(C)	Diarréia	1	67/36(C)	Cefaléia/náuseas	1
65/34(C)	IVAS	1	65/34 (C)	Diarréia	1
55/24(C)	Prurido cutaneo	1	65/34 (C)	Dor de garganta	1
65/34(C)	Rinite	1	64/33(C)	Dor região posterior tórax	1
65/34(C)	Sorologia reagente para Clamídia	1	64/33 (3)	Herpes	1
			65/34(3)	Infecção pelo HPV	1
			55/24(3) 55/24 (3) 65/34(3)	IVAS	3
			74/43(3)	Lesões discrômicas em face	1
			67/36(3)	Leucorréia (Gardnerella)	1
			55/24(3)	Prurido cutaneo	1
			65/34(3)	Rinite	1
			65/34(3)	Sinusopatia	1
			69/38(3)	Tosse	1
			67/36(3)	Trauma mama	1
TOTAL		7			18

Nota: Eventos adversos identificados em ambos os períodos (pré e pós vacina) estão sombreados em azul mais escuro

Legenda: IVAS-Infecção das vias aéreas superiores; MM-Membros; HPV-*Human papillomavirus*

A distribuição dos EAs pelos braços de estudo aparece no gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição dos EAs nos braços de intervenção



Legenda: EAs-Eventos adversos

Segundo os critérios definidos, nenhum evento adverso foi considerado relacionado ao produto testado.

Apenas um participante apresentou um evento grau 3 (cólica renal - braço C). Os resultados são apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Grau de severidade dos eventos adversos nos vacinados

CÓDIGO	BRAÇO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	GRAU 4
38/13	a				
49/18	a				
53/22	a				
63/32	a				
14/14	b				
47/16	b				
51/20	b				
58/27	b				
62/31	b				
68/37	b				
70/39	b				
77/46	b				
78/47	b				
55/24	c				
64/33	c				
65/34	c				
67/36	c				
69/38	c				
74/43	c				

Nota: Evento adverso grau 3 = cólica renal

Tabela 5 – Distribuição dos EAs nos braços de intervenção segundo a severidade

	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Braço A	3	2	0	0
Braço B	8	6	0	0
Braço C	6	4	1	0

Legenda: EAs-Eventos adversos

Observou-se ainda que nenhum indivíduo submetido à imunoterapia apresentou evento adverso sério (EAS).

Todos os eventos adversos foram notificados a CAPPesq em relatórios periódicos.

Todos os indivíduos envolvidos no estudo receberam um relatório detalhando sua participação na pesquisa, no momento do encerramento da sua contribuição. Relatórios parciais também foram fornecidos sempre que necessário. Conforme previsto no protocolo, os pacientes foram orientados a entregar os relatórios à equipe responsável pela sua assistência à sua saúde.

4.4. IMPACTO IMUNOLÓGICO E VIROLÓGICO

4.4.1. Variação no número de linfócitos TCD4+

Os resultados evidenciaram queda progressiva nas médias dos participantes do braço A, queda inicial seguida de elevação na maioria dos pacientes do braço B (7 em 9) e queda em quatro dos seis participantes do braço C. Neste braço (C) os pacientes 67/36 e 69/38 apresentaram aumento das médias de TCD4+. As médias dos braços sugerem a confirmação destes achados, embora sem significância estatística. Os resultados são mostrados na figura 7 e gráfico4.

Figura 7 - Evolução das médias de TCD4+ nos três períodos de observação

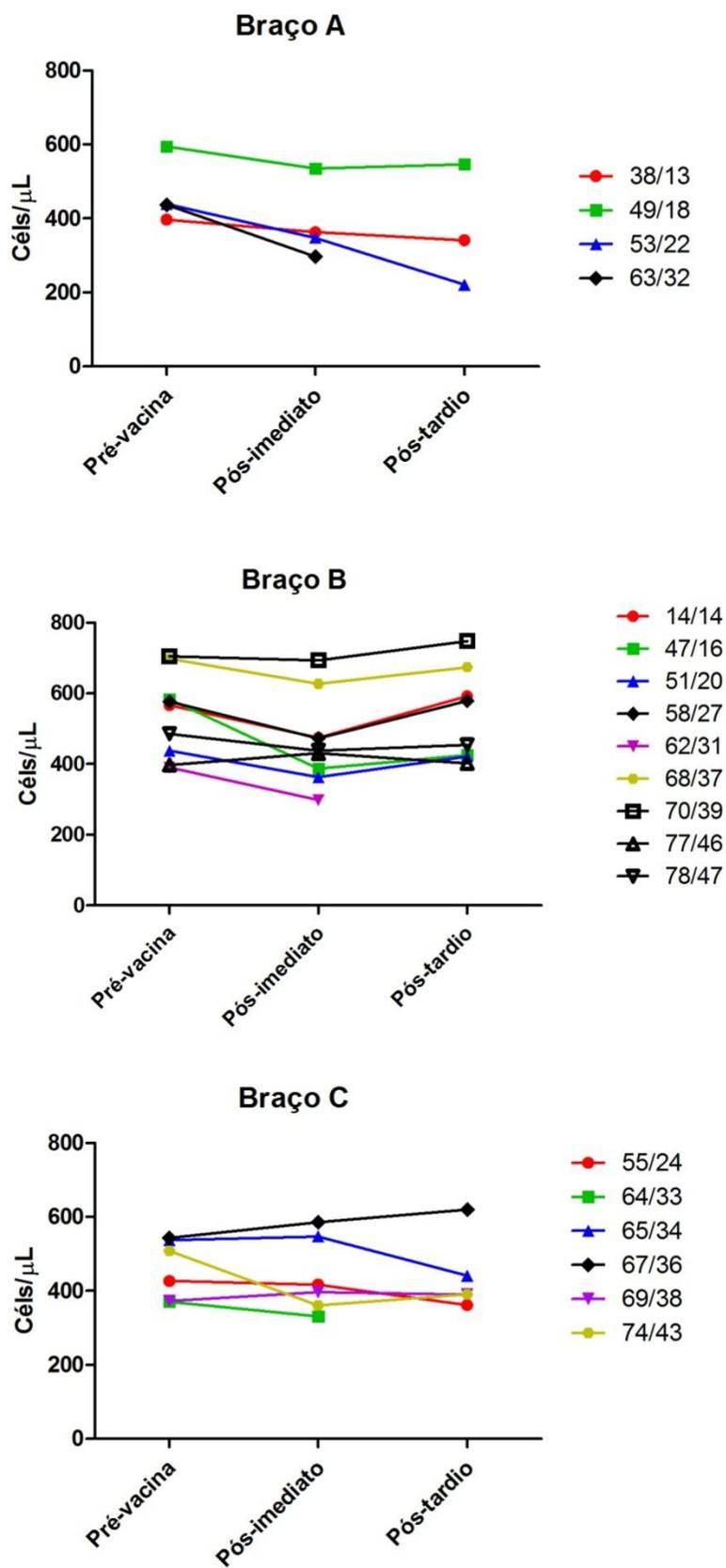
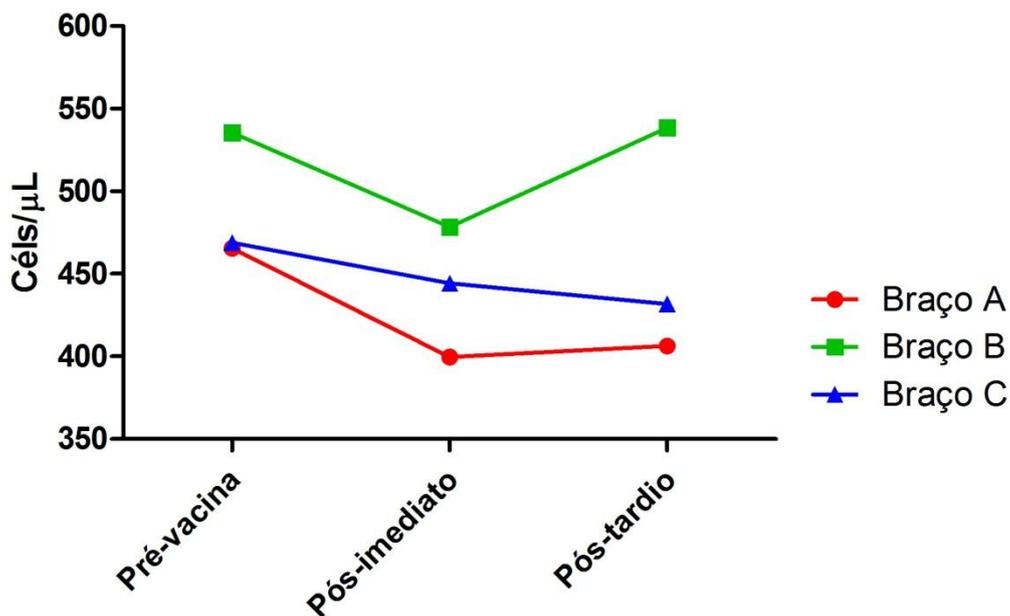
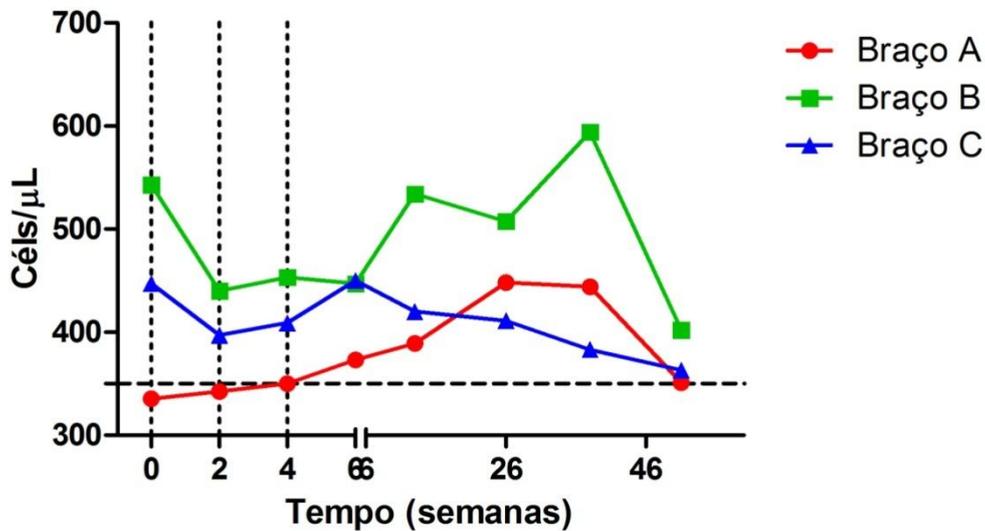


Gráfico 4 - Médias das contagens de TCD4+ por braço, nos três períodos de observação



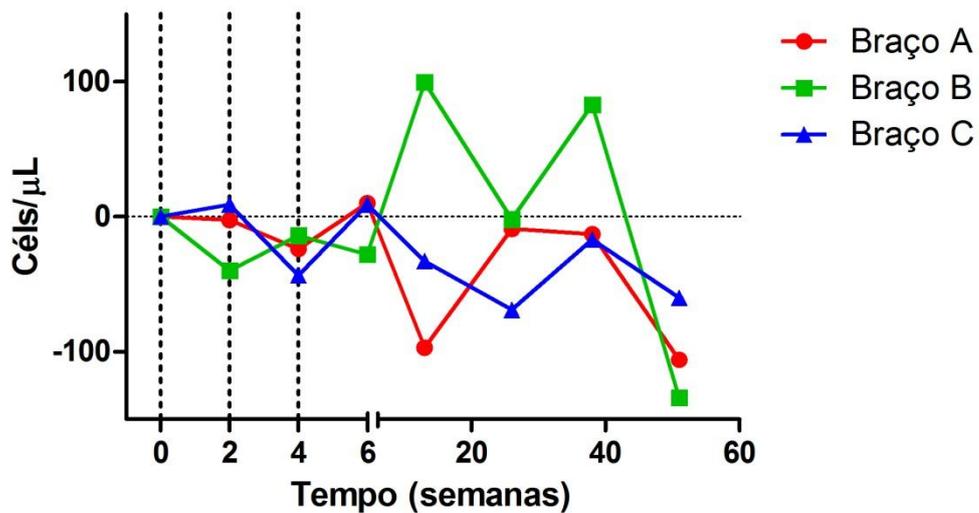
Com relação à mediana da contagem de células T CD4+ circulantes após a intervenção, a observação mostrou uma elevação no braço A até a semana 26. Os braços B e C apresentaram uma queda inicial seguida de uma elevação sustentada até a semana 38 no braço B e fugaz (até a semana 6) no braço C. Em todos os três braços observamos uma considerável amplitude dos níveis das células. Estes dados são apresentados no gráfico 5 e no anexo P.

Gráfico 5 - Evolução das medianas do número de células TCD4+ dos participantes submetidos à intervenção

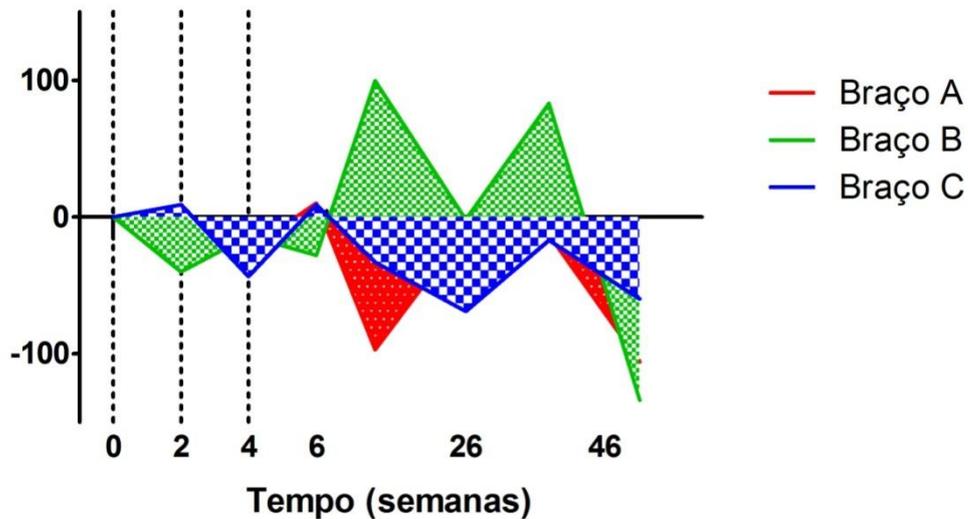


Nota: A linha horizontal tracejada refere-se ao limite de 350 células/μL. As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Tomando-se como base a contagem imediatamente antes do início da intervenção, a evolução das medianas das diferenças de TCD4+ (Δ TCD4+) nos braços mostra que houve tendência a perda de células após o início da intervenção, que só foi revertida temporariamente no braço B. Os dados estão apresentados no gráfico 6 e são confirmados pelo cálculo da área sob a curva (AUC) representado no gráfico 7. Mais uma vez observamos grande amplitude nas contagens (Anexo Q).

Gráfico 6 - Evolução das medianas dos Δ TCD4+ dos participantes submetidos à intervenção.

Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Gráfico 7 - Área sob a curva das medianas dos Δ de TCD4+ dos indivíduos submetidos à intervenção

Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas). Net area: Braço A= -1948, Braço B= 903, Braço C= - 1824

4.4.2. Variação no número de linfócitos TCD8+

À semelhança do que se observou para as células TCD4+, individualmente houve variabilidade na evolução dos níveis médios de TCD8+. No participante 38/13 do braço A, observou-se aumento destas células. No paciente 53/22 houve aumento seguido de queda, enquanto o inverso (queda seguida de aumento) ocorreu no participante 49/18. O paciente 63/32 apresentou queda na média de TCD8+. No braço B, dois pacientes exibiram aumento nas médias de TCD8+ (68/37, 77/46), enquanto que três mostraram queda (51/20, 62/31 e 70/39). Os participantes 14/14, 47/16, 58/27 e 78/47 mostram queda seguida de elevação da média das células TCD8+ (apenas o 58/27 com níveis finais superiores ao pré-vacina). No braço C, observamos aumento médio destas células nos pacientes 67/36 e 69/38. Já os participantes 55/24, 64/33 e 74/43, apresentaram queda. O participante 65/34 apresentou elevação seguida de queda da média de células TCD8+. As médias dos braços mostraram resultados diversos, com elevação no braço A e queda nos braços B e C. Os resultados são exibidos na figura 8 e no gráfico 8.

Figura 8 - Médias das contagens de TCD8+ por braço nos períodos de observação

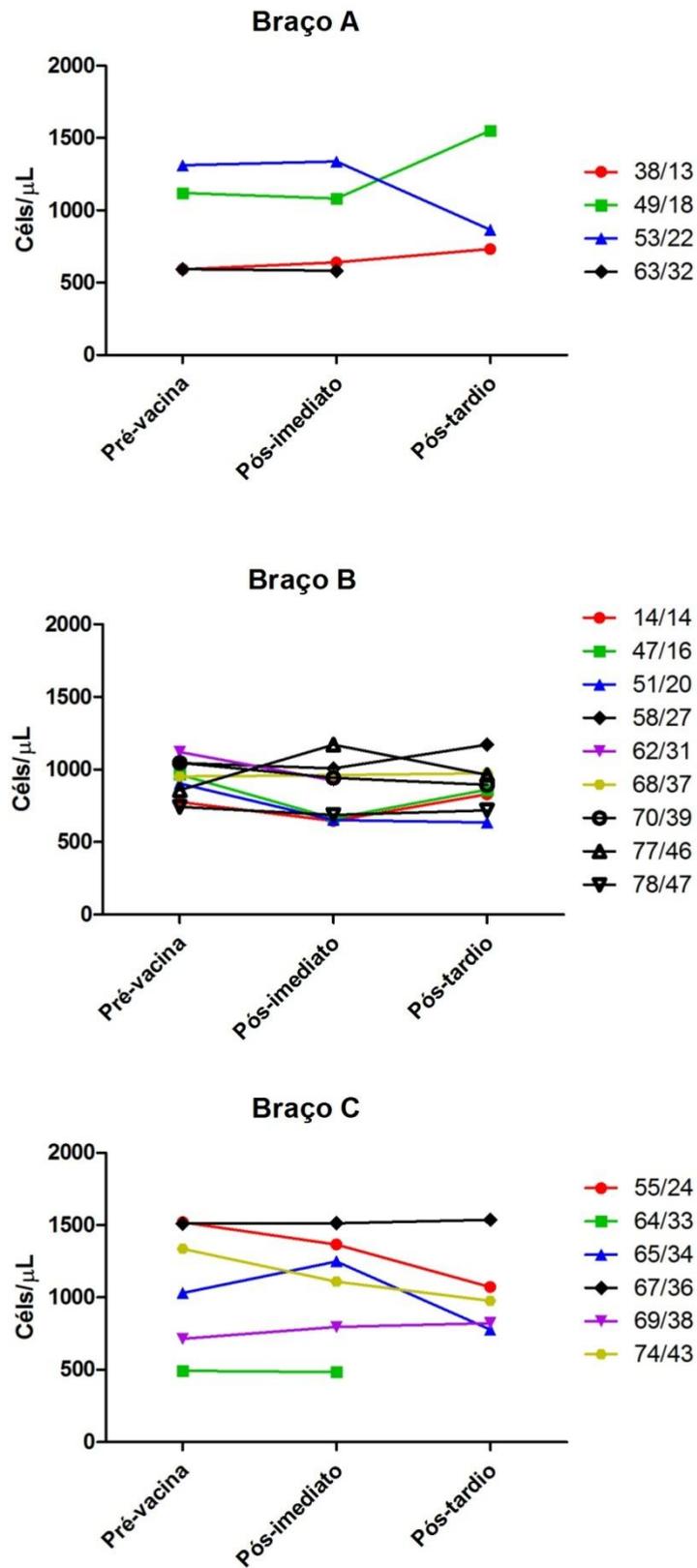
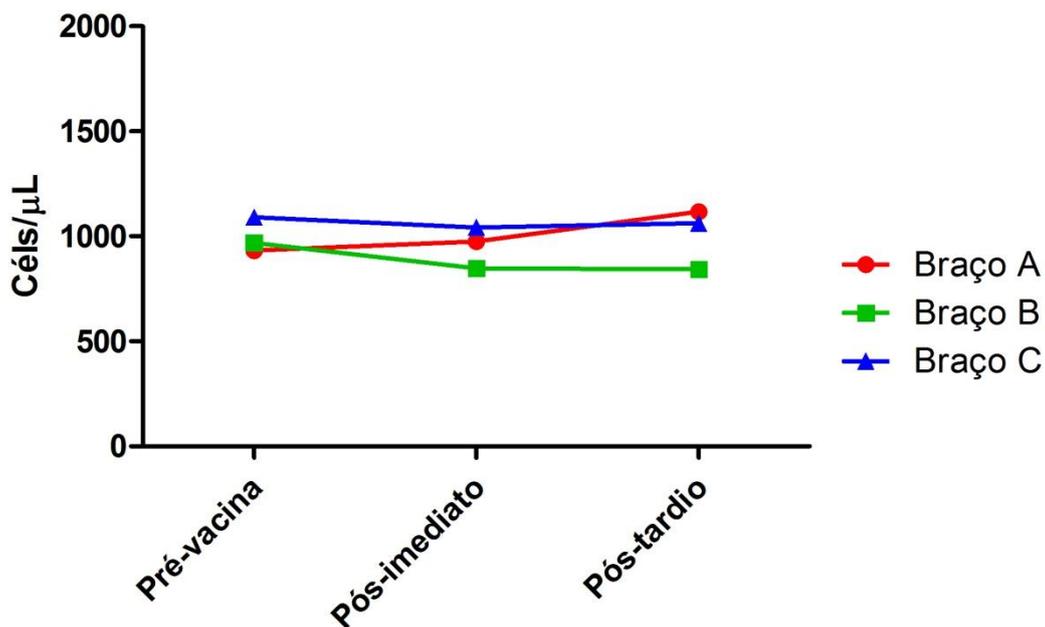
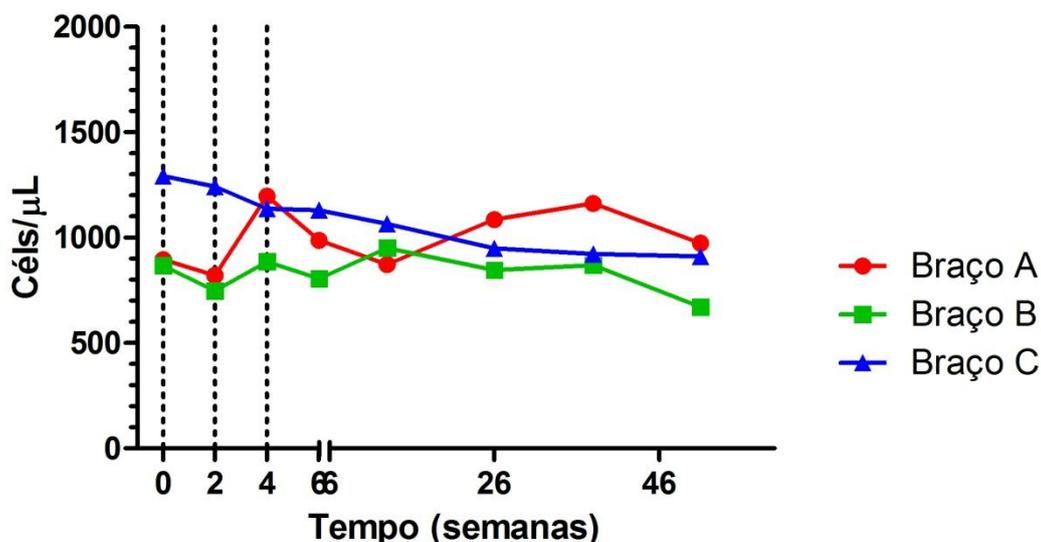


Gráfico 8 - Médias das contagens de TCD8+ por braço, nos três períodos de observação



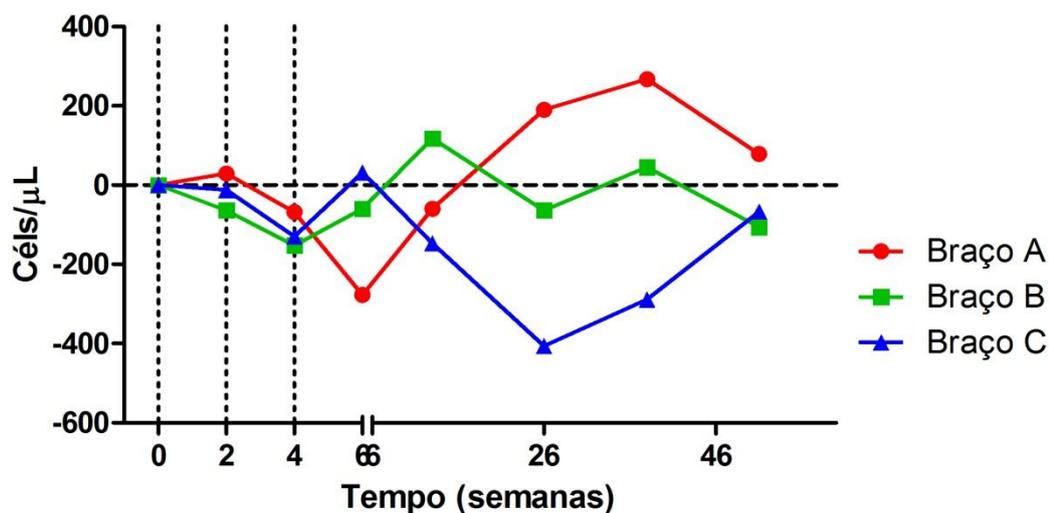
A análise das medianas no período pós-vacina mostrou uma oscilação nos níveis de TCD8+ no braço A e uma relativa estabilidade no braço B. Já no braço C, verificou-se uma queda contínua após a intervenção, persistente durante todo o período de observação do estudo (Gráfico 9). Novamente, ao observarmos a amplitude dos níveis das células, constatamos uma grande variação nos braços (menor no Braço B)(Anexo R).

Gráfico 9 - Evolução das medianas dos números de células TCD8+ dos participantes submetidos à intervenção



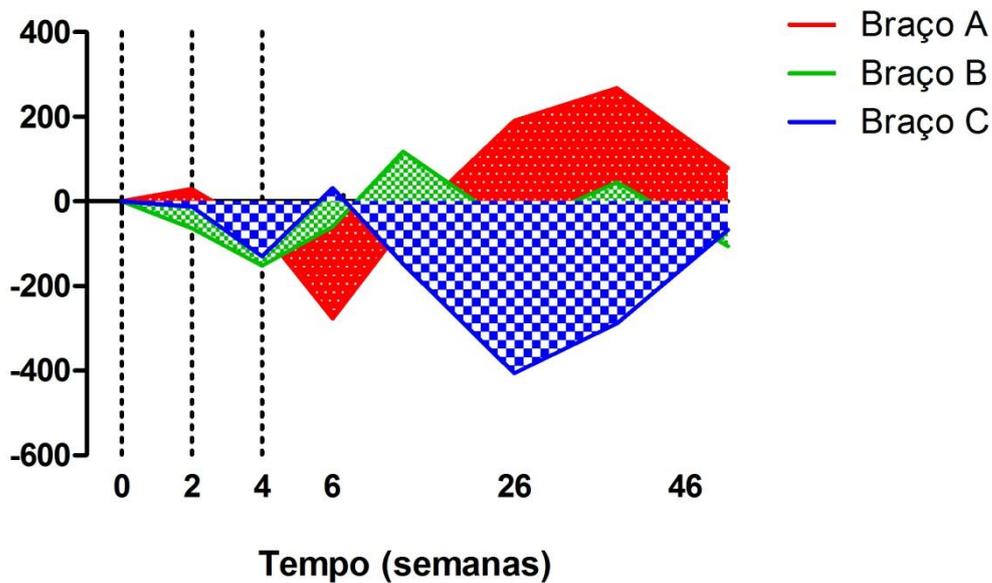
Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Tomando-se como base a contagem imediatamente anterior ao início da vacinação, a evolução das medianas das diferenças de TCD8+ (Δ TCD8+) mostrou oscilação nos três braços, com uma perda total ao longo do estudo maior no braço C. Houve variabilidade considerável nos dados. Estes resultados são apresentados nos gráficos 10 e 11 e no anexo S.

Gráfico 10 - Evolução das medianas dos Δ TCD8+ dos participantes submetidos a intervenção

Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Gráfico 11 - Área sob a curva das medianas dos Δ de TCD8+ dos indivíduos submetidos à intervenção



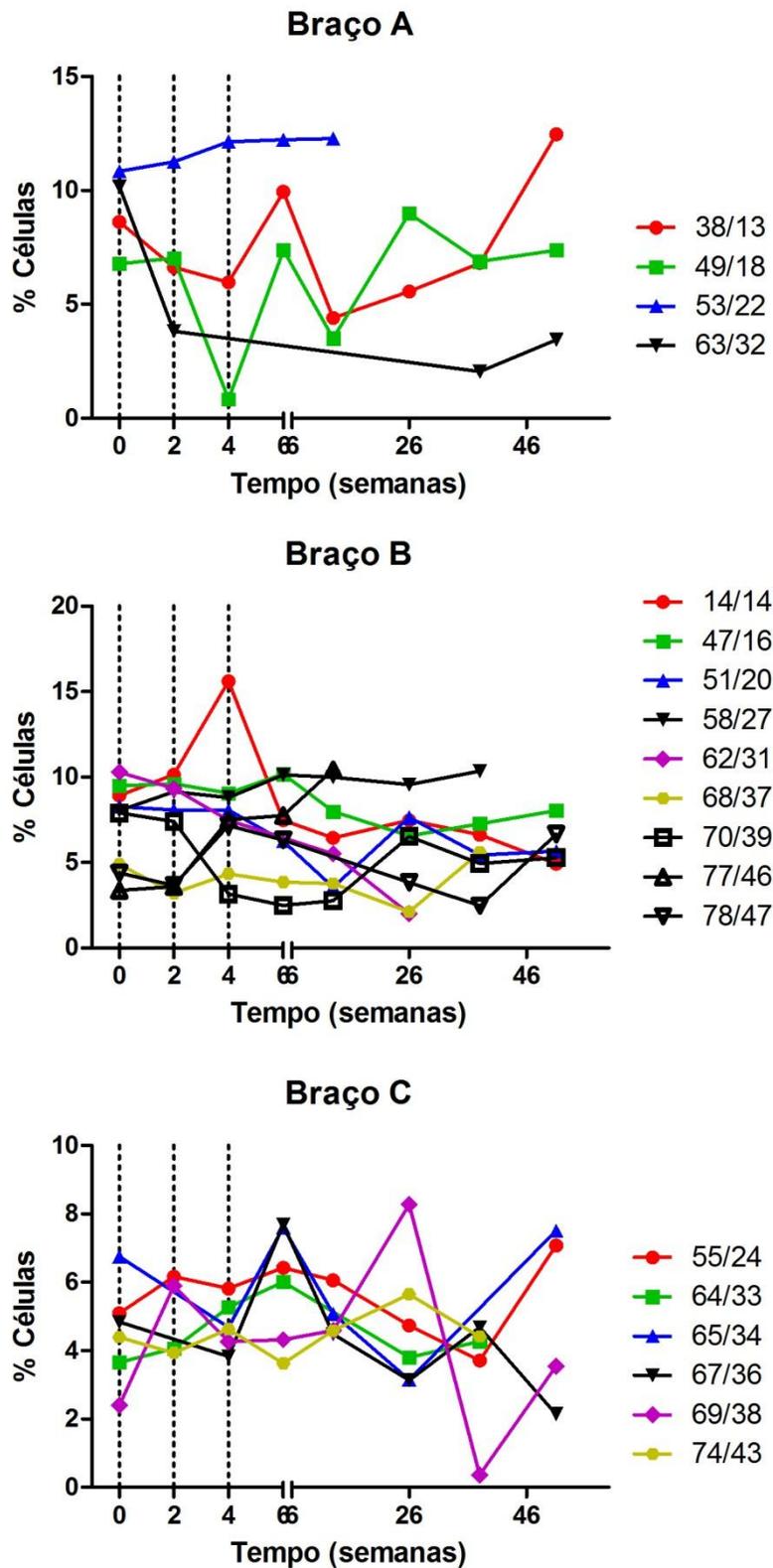
Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas). Net area: Braço A= 4277; Braço B= -448,5; Braço C= - 10760

4.4.3. Variação no número de linfócitos Tregs

Dificuldades técnicas relacionadas à coleta e processamento das amostras no período pré-intervenção prejudicaram a avaliação das células T regulatórias, que só foram contabilizadas após a vacinação.

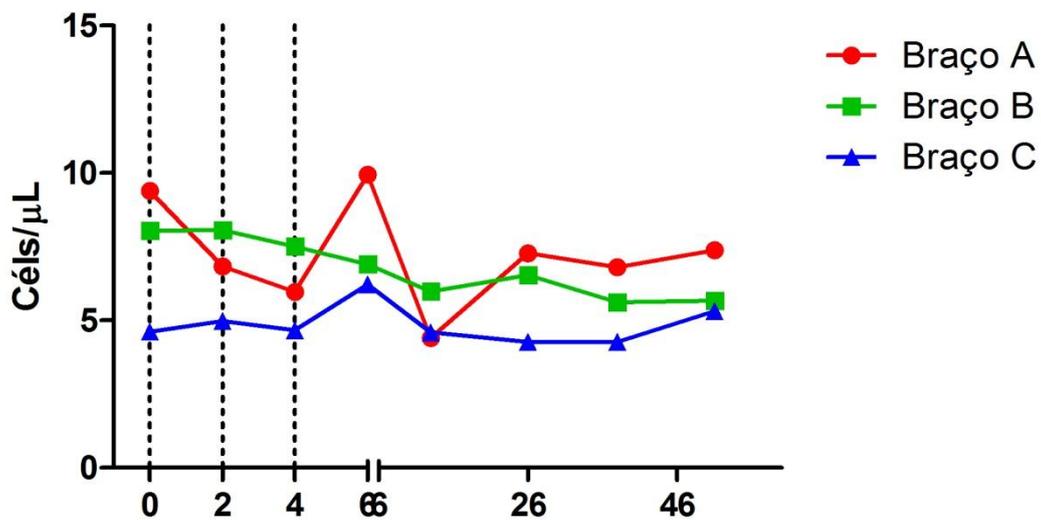
A maioria dos participantes evoluiu com queda nos níveis de Tregs após a aplicação do produto (3 em 4 no Braço A, 6 em 9 no Braço B e 3 em 6 no Braço C) (Figura 9). Estes dados são corroborados pela determinação das medianas nos três braços (Gráfico 12 e Anexo T), medianas das diferenças em relação ao *baseline* (Δ) (Gráfico 13 e Anexo U) e pelo cálculo da área sob a curva (AUC) (Gráfico 14).

Figura 9 - Evolução da % de células Tregs dos participantes submetidos à intervenção



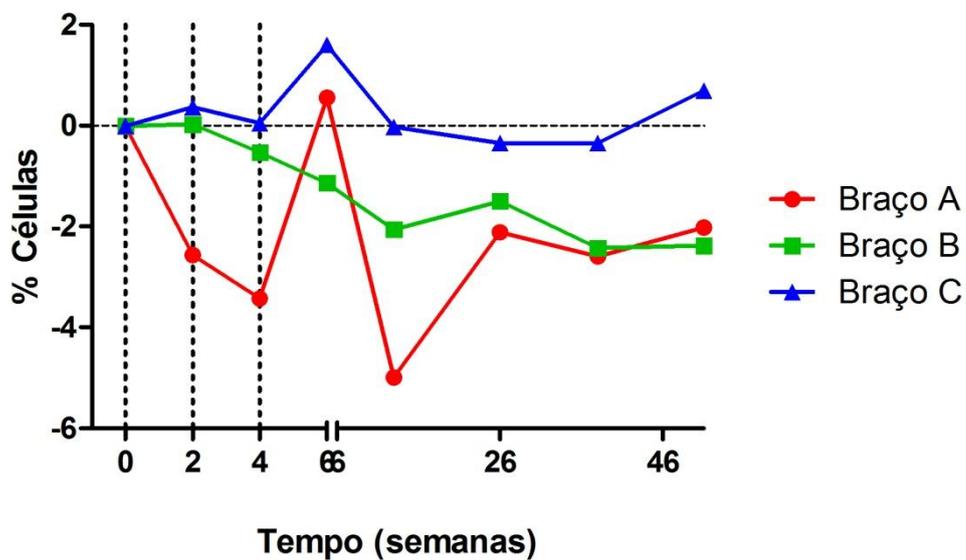
Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas).

Gráfico 12 - Evolução das medianas do número de células Tregs dos participantes submetidos à intervenção



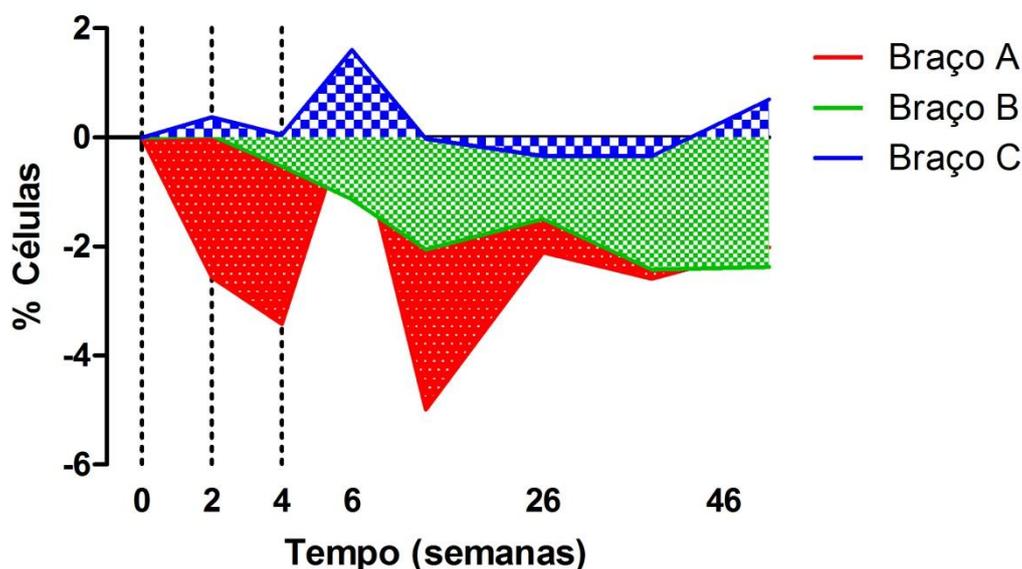
Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas).

Gráfico 13 - Evolução das medianas dos Δ Tregs dos participantes submetidos à intervenção



Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas).

Gráfico 14 - Área sob a curva das medianas dos Δ de Tregs dos indivíduos submetidos à intervenção



Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas). *Net area*: Braço A= -131,4; Braço B= - 91,22; Braço C= 3,77

4.4.4. Variação na carga viral plasmática

As análises foram realizadas com CV em log.

Com relação à análise por braço da pesquisa, todos os pacientes do braço A evoluíram com aumento das médias de CV.

No braço B, participantes (58/27, 70/39 e 77/46) apresentaram queda da CV plasmática média ao longo dos três períodos de observação, enquanto que outros três (14/14, 51/20 e 62/31), tiveram aumento. O paciente 78/47 apresentou uma queda inicial da CV, seguida de elevação para níveis superiores aos da etapa pré-vacina. Os participantes 47/16 e 68/37 evoluíram com aumento seguido de queda das médias da CV plasmática.

Apenas dois de seis pacientes do braço C tiveram queda nas médias da CV plasmática (64/33 e 65/34). Apesar desta queda, a participante 64/33 foi excluída precocemente por queda concomitante de TCD4+ para menos do que 350 células/ μ L. Os outros quatro indivíduos deste braço evoluíram com elevação das médias da CV (55/24, 67/36, 69/38 e 74/43). As médias por braço confirmam os resultados, que são mostrados na figura 10 e no gráfico 15.

Figura 10 - Evolução das médias de CV nos três períodos de observação

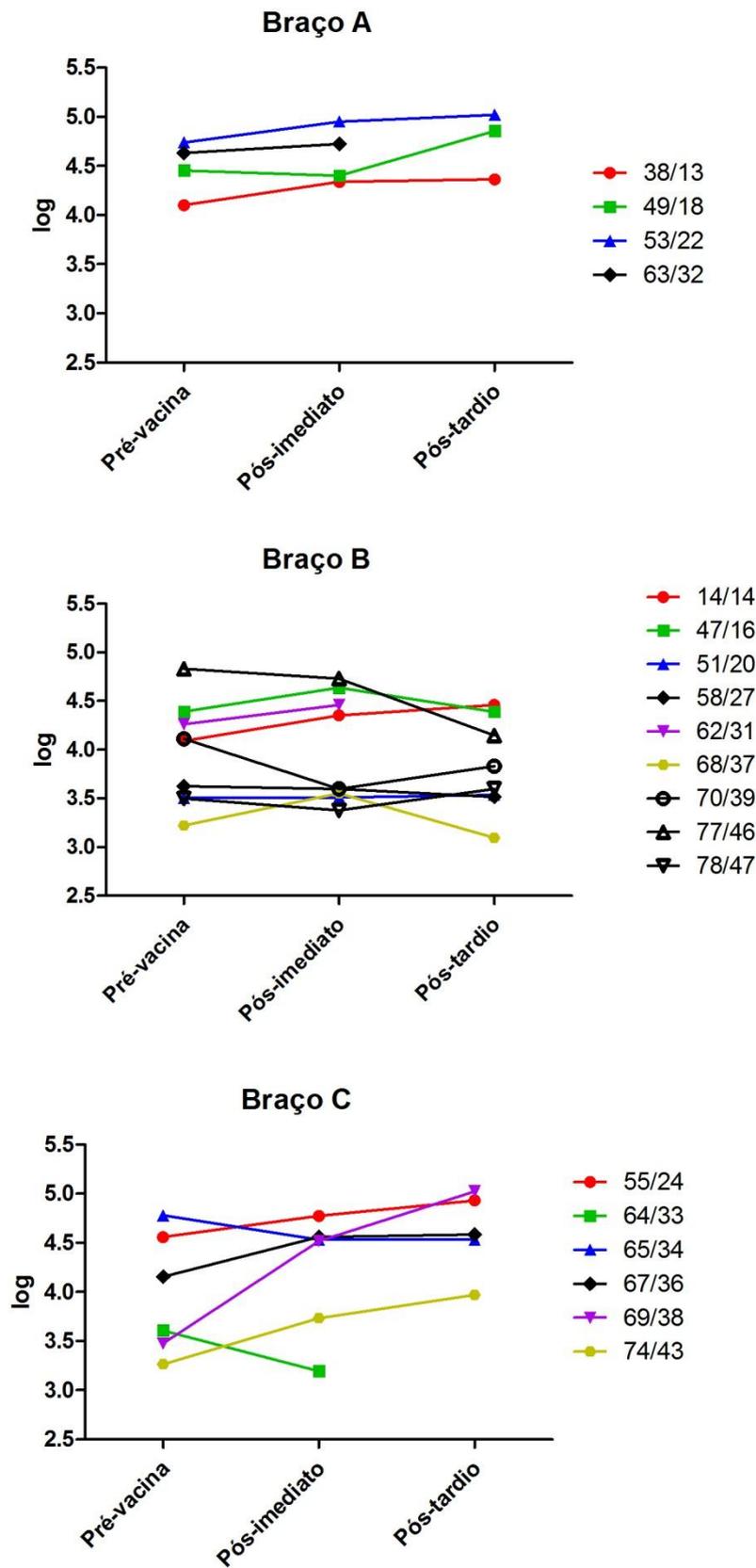
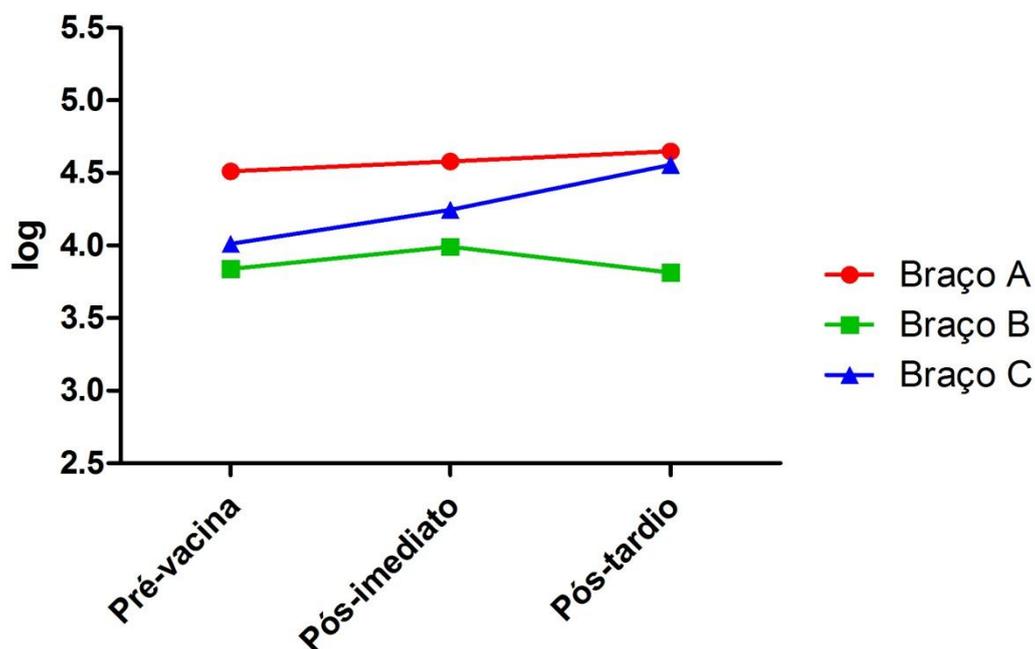
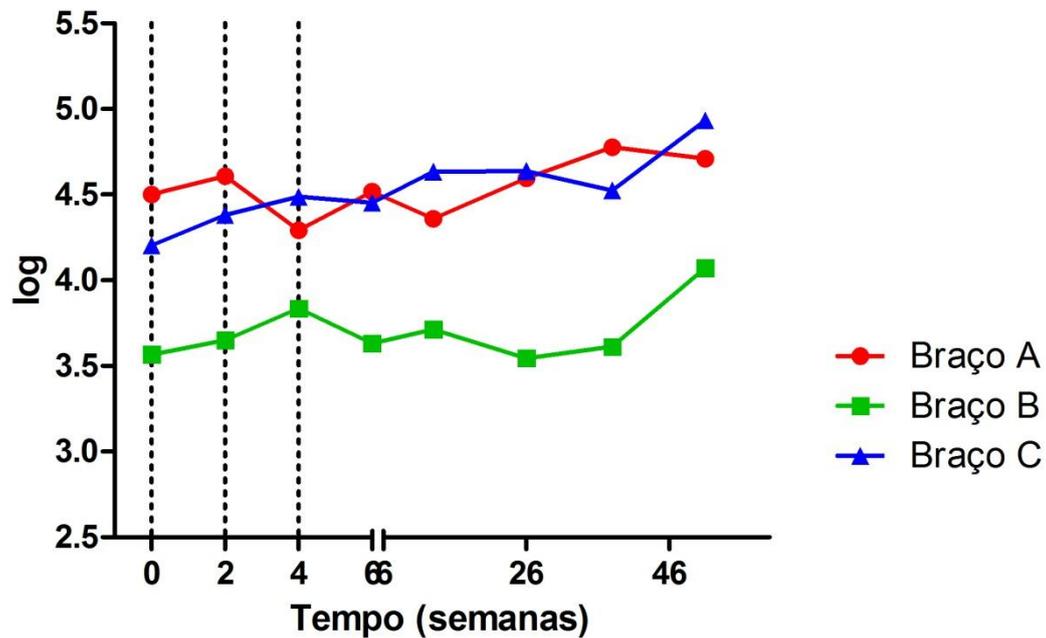


Gráfico 15 - Médias das contagens de CV por braço nos períodos de observação

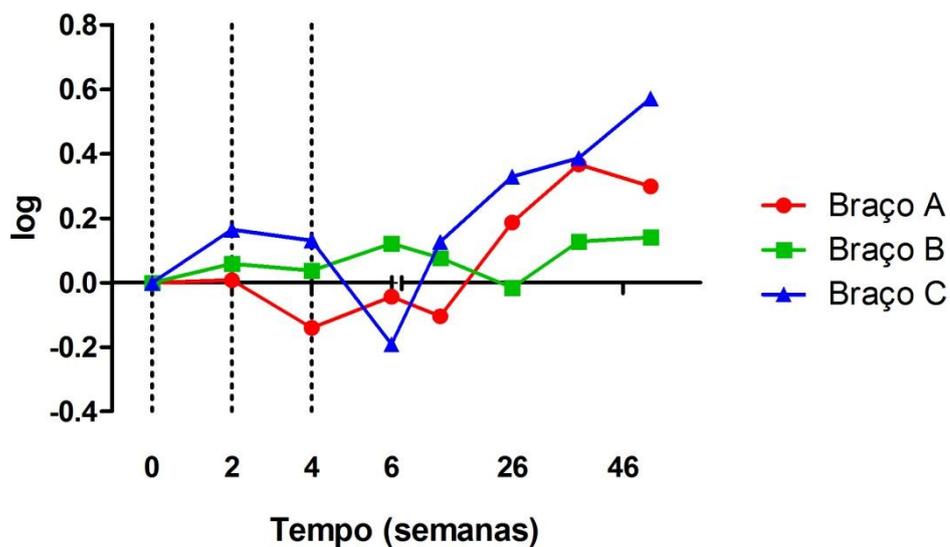


A análise das medianas permitiu evidenciar um aumento inicial da carga viral plasmática do HIV durante o período de vacinação. Nos braços A e B, seguiu-se uma oscilação da CV, entretanto, pudemos notar que o aumento foi persistente no braço C. Quando calculada a diferença entre as contagens nos tempos após a intervenção e o *baseline* (ΔCV) e a AUC, confirmamos esta tendência no braço C. Os dados são apresentados nos gráficos 16, 17 e 18. As amplitudes das contagens nos braços são exibidas nos anexos V e X.

Gráfico 16 - Evolução das medianas de CV dos participantes submetidos à intervenção

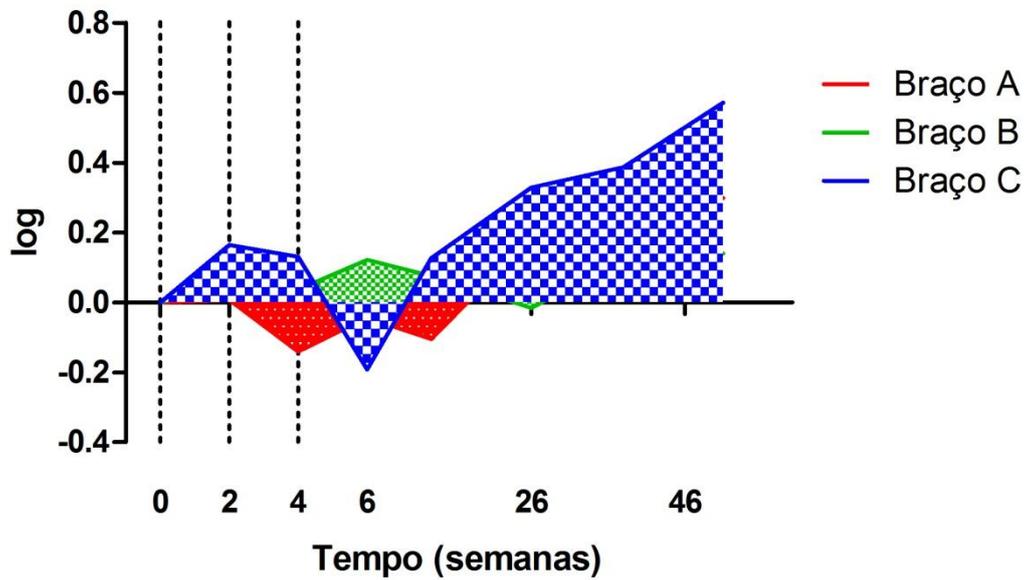


Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Gráfico 17 - Evolução das medianas dos Δ da CV plasmática dos participantes submetidos à intervenção

Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se ao momento de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas)

Gráfico 18 - Área sob a curva das medianas dos Δ CV dos indivíduos submetidos à intervenção



Nota: As linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos de aplicação da intervenção (0, 2 e 4 semanas).

5. DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO

Imunoterapia para a infecção pelo HIV tem sido uma intervenção alternativa aos antirretrovirais perseguida há muito tempo. À semelhança do que vem sendo observado em oncologia, a utilização de células dendríticas pulsadas com antígenos do vírus parece ser uma opção promissora ⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾. Em pessoas vivendo com HIV/aids, este tipo de tratamento começou a ser estudado no final dos anos 90 ⁽²⁵⁾ contabilizando, até o momento, cerca de 22 estudos envolvendo seres humanos.

No cenário da imunodeficiência causada pelo HIV a utilização das DCs como intervenção terapêutica parte de três premissas fundamentais: primeiro, o conhecimento de que nesta doença ocorre uma disfunção quantitativa e qualitativa destas células ^(109-111, 155, 156). Neste sentido, o emprego das DCs derivadas de monócitos autólogos manipulados *ex-vivo* teria um papel de “reposição” semelhante a outras imunoterapias como, por exemplo, a administração de imunoglobulinas em pacientes com hipogamaglobulinemia. O segundo princípio que norteia este tipo de terapia é a reconhecida capacidade das DCs de estimular a resposta imune, notadamente suas vertentes relacionadas à resposta adaptativa ^(99, 102, 103, 157-159). Este segundo aspecto foi responsável pela inclusão desta estratégia entre as chamadas “vacinas terapêuticas”. A terceira diretriz que norteia o racional deste tipo de intervenção na infecção pelo HIV deriva do conhecimento da capacidade que as DCs têm de, quando em contato com células latentes infectadas, promoverem a ativação destas células, estimulando a produção ativa de vírus e exposição ao sistema imune, favorecendo assim a eliminação dos reservatórios virais ^(112, 113).

Este ensaio clínico de fase I/II baseia-se na pesquisa publicada por LU W *et al* em 2004 ⁽¹²⁵⁾, em que se alcançaram resultados espetaculares, com redução significativa da carga viral em boa parte dos indivíduos submetidos à intervenção. Nossa proposta foi explorar diferentes formulações do produto no contexto de segurança/tolerabilidade e possível efeito imunoviológico, seguindo-se as outras diretrizes estabelecidas naquele estudo realizado em Recife.

O pequeno número de participantes distribuídos pelos braços impossibilitou análises comparativas consistentes entre os grupos, atendo-se o presente estudo a avaliação evolutiva e correlação dos parâmetros de interesse “intragrupo”. Este mesmo

aspecto (número reduzido de indivíduos) foi mais prejudicial no braço A, no qual apenas dois pacientes completaram o tempo total de observação previsto. Desta forma, neste braço em particular, nenhuma conclusão mais contundente pôde ser realizada.

As características de idade e sexo dos participantes submetidos à intervenção refletiram, proporcionalmente, a prevalência da condição na área de abrangência segundo dados do MSB, com uma menor quantidade de indivíduos brancos⁽¹⁶⁰⁾. O tempo de diagnóstico e os níveis de CV e TCD4+ permitiram caracterizar indivíduos cronicamente infectados sem critérios de maior gravidade da doença.

Um dos aspectos discutidos em estratégias de intervenção terapêutica na infecção pelo HIV diz respeito ao momento certo para a intervenção. Teoricamente, toda intervenção baseada no “fortalecimento” da resposta imune seria mais efetiva em pacientes com menor dano no sistema. À semelhança do que têm sido proposto para os ARVs, vários pesquisadores defendem a utilização de imunoterapia precocemente^{(161),(162)}. Isto corresponderia a estágios iniciais da infecção, o que impõe desafios substanciais:

1-O vírus causa dano ao sistema imune muito precocemente, no prazo de poucos dias⁽¹⁶³⁾ sendo pequena a “janela” de tempo para que a intervenção possa ser considerada precoce;

2-Na prática clínica é quase impossível diagnosticar indivíduos recentemente infectados, conseqüentemente a abordagem se faz em pacientes cronicamente infectados.

A participação das pessoas não se restringiu a vacinação e cessão de material biológico junto com outros dados para análise. Os indivíduos foram envolvidos no estudo, desde o processo de elaboração de materiais utilizados na pesquisa (como, por exemplo, o “diário do estudo”) até a discussão dos resultados com os pesquisadores, seja individualmente ou em reuniões periódicas com toda a equipe. Esta estratégia permitiu uma maior retenção dos participantes além de influenciar na melhor qualidade das informações obtidas.

O período de recrutamento, embora comparável a outros ensaios clínicos envolvendo terapia anti-HIV baseadas em DCs⁽¹⁶⁴⁾, foi prolongado devido a dificuldades técnicas na produção da vacina.

Para esta produção, a escolha do imunógeno representa um aspecto fundamental. No cenário do HIV/aids, as opções envolvem:

- a) a partícula viral inteira inativada pelas mais diversas metodologias, lembrando que a utilização de vírus atenuado foi praticamente abolida depois que estudos em primatas não humanos revelaram a possibilidade de reversão do processo de atenuação com retorno da patogenicidade⁽¹⁶⁵⁾;
- b) “fragmentos” do HIV como, por exemplo, proteínas/peptídeos;
- c) material genético viral, que será incorporado ao genoma das células do hospedeiro (com ou sem auxílio de vetores), levando à transcrição e tradução de proteínas virais.

Qualquer que seja a estratégia utilizada, a DC representa, como potente apresentadora de antígeno, um “intermediário natural” no desenvolvimento da resposta imune. Isto torna a terapia baseada em DCs uma atraente intervenção, pois, teoricamente, simula e amplifica a imunogenicidade. A opção pela utilização do vírus inteiro, inativado, proporciona a exposição da maior diversidade de epítomos antigênicos possível.

A inativação pelo AT-2 permite a preservação da conformação proteica da superfície do vírus, mantendo sua capacidade de fusão do envelope com a membrana celular e introdução do material viral no citoplasma celular para potencial processamento e apresentação antigênica. Enquanto intervenção em indivíduos já cronicamente infectados, esta propriedade do AT-2 parece mais relevante que a preservação de epítomos do envelope para reconhecimento por receptores de linfócitos B (*B cell receptor*-BCR), visando uma resposta humoral específica, embora esta seja também uma perspectiva possível.

Em nosso estudo adotamos uma adaptação do protocolo utilizado por Lu e Andrieu (2004) que emprega células pulsadas com vírus autólogos inativados com AT-2 como imunógeno⁽¹²⁰⁾. Nossa opção do uso dos vírus do próprio indivíduo foi calcada na asserção de que estes seriam menos nocivos para o receptor do produto. O conceito de autólogo na infecção pelo HIV é passível de críticas, se levarmos em consideração a dinâmica de replicação deste retrovírus, que se multiplica a uma velocidade impressionante, gerando vários mutantes (cerca de 10^9 em 24h)^(166, 167). Isto significa que o conjunto de populações virais que infecta o indivíduo está mudando constantemente. Por outro lado, é fato que o envelope da partícula viral deriva, em

grande parte, da membrana da célula do organismo hospedeiro, sendo procedente a discussão de *self x non self*, sob este prisma.

Um raciocínio semelhante também pressupõe que a utilização de células autólogas no processo de expansão do vírus em cultura resultaria num produto final mais seguro e melhor tolerado, embora haja argumentos de que o uso de células alogênicas poderia potencializar a diferenciação das DCs, além de representar uma possível aceleração na produção do antígeno para utilização em larga escala ⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾.

Poucos estudos publicados na literatura empregaram uma metodologia que necessitasse da cultura do vírus para composição deste tipo de vacina. Evidentemente a necessidade de expandir o HIV em cultura está ligada a necessidade de determinar sua quantidade necessária para a produção da vacina. Um dos fatores críticos passa a ser, então, estabelecer a melhor quantidade de DCs para se empregar e qual a quantidade ideal de vírus para pulsá-las. Whiteside et al (2009) estudaram quatro pacientes infectados pelo HIV sem terapia antiretroviral. Estes autores conseguiram cultivar e expandir o vírus num sistema *in vitro*, comparando células CD4+ autólogas com células alogênicas de indivíduos não infectados para alimentar a cultura. Eles obtiveram êxito em três pacientes, com um rendimento superior utilizando células autólogas ⁽¹⁷¹⁾.

Garcia et al(2011), mostraram ausência de um possível efeito deletério com a utilização de vírus cultivado em células alogênicas, embora o tempo de preparo do Ag ainda tenha sido longo (mediana de 10 meses) ⁽¹⁵¹⁾.

Na nossa experiência, observamos que cultivo do vírus em células autólogas foi mais demorado do que com células alogênicas ⁽¹⁷⁰⁾, o que levou a um atraso na aplicação do produto nos participantes. Isto teve impacto negativo na condução da pesquisa, uma vez que as características dos indivíduos podem mudar ao longo do tempo, interferindo em um possível efeito da vacina. Além disto, a obtenção das informações no período pré-intervenção também ficou bastante prejudicada, pois o tempo para atingir a quantidade de vírus suficiente para a imunoterapia era imprevisível e, de fato, foi diferente para os participantes, impedindo a sincronização da coleta dos dados.

A dificuldade de produção do antígeno a partir de células autólogas pode ser explicada pelo fato de que, nos indivíduos com HIV/aids, os mecanismos de defesa contra o vírus, como fatores de restrição e a produção de interferons, já foram disparados, tornando as células mais resistentes a infecção ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁸⁾.

No nosso estudo, observamos também que, para alguns indivíduos, não se conseguiu êxito no processo de diferenciação de DCs a partir de monócitos e este fato não foi esclarecido pelos pesquisadores. Uma possível explicação para este problema seria a formação de agregados de plaquetas e monócitos, frequente nos indivíduos infectados pelo HIV⁽¹⁷⁹⁾ e que dificultaria o processo de separação dos monócitos das outras células, feito por aderência em superfície plástica. Outro fenômeno observado foi a apoptose precoce dos monócitos em cultura o que poderia estar relacionado ao grau de ativação celular do indivíduo infectado, levando à morte celular induzida por ativação (*activation-induced cell death*)⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾.

A estas dificuldades relacionadas com a produção do antígeno viral e das DCs, somou-se um problema técnico envolvendo a criopreservação das células, que obrigou a realização de um segundo procedimento de aférese em alguns pacientes, contribuindo para a demora até a intervenção.

O longo tempo decorrido desde a entrada no estudo até a intervenção associou-se com a queda de TCD4+ e exclusão de vários pacientes antes da aplicação do produto.

Após o recrutamento de 44 indivíduos, o número originalmente previsto de 25 participantes não foi atingido, aplicando-se o produto efetivamente a 19 pacientes. Este rendimento pode ser considerado bom se comparado com outros estudos envolvendo vacinas anti-HIV⁽¹⁸³⁾.

Além da interferência pelas dificuldades já citadas, este baixo número de participantes vacinados relacionou-se ao rigor adotado na caracterização e seleção da população de estudo segundo os critérios de inclusão e exclusão, próprios deste tipo de pesquisa.

Com relação à produção da vacina, uma inovação em relação a outros estudos publicados foi a adoção do controle de qualidade exclusivamente por citometria de fluxo. Já bem estabelecida na literatura^(184, 185), a utilização da citometria de fluxo para controle de imunobiológicos implementou uma agilidade estratégica fundamental ao estudo, considerando a curta meia-vida do produto e segurança para o receptor. Através da utilização desta técnica, constatamos uma redução da quantidade de DCs CCR7+, provavelmente relacionada a utilização de IL-6 no protocolo de diferenciação celular. Esta citocina parece levar à inibição da expressão de CCR7, por um mecanismo de interferência com a transcrição⁽¹⁸⁶⁾. Outro possível mecanismo estaria relacionado a

ação da proteína Vpu, do HIV. Efeito na diminuição da expressão de CCR7, mediada por esta proteína do HIV já foi demonstrado em linfócitos, mas, à semelhança do que fazem outros vírus (HHV8, CMV), poderia ocorrer também nas DCs no HIV/aids⁽¹⁸⁷⁾.

A redução da expressão de CCR7, proteína fundamental no funcionamento adequado das DCs, através da indução da sua migração⁽¹⁸⁸⁾, nos remete a reflexão sobre qual é o “melhor tipo” de DC para utilizar nesta imunoterapia. É extensa a lista de fatores que podem ser alterados no processo de produção deste tipo de produto e isto tem sido motivo de consideração em várias revisões envolvendo o tema^(123, 189, 190). Dentre estes, devemos considerar o fato de que as características fenotípicas, funcionais e genéticas permitem distinguir dezenas de tipos de DCs^(101, 191) e o conhecimento que as DCs geradas *in vitro* a partir de precursores, não possuem exatamente as mesmas características das DCs *in vivo*⁽¹⁹²⁻¹⁹⁵⁾.

Do ponto de vista clínico o produto testado se mostrou seguro. O discreto aumento da frequência respiratória (FR) observado na maioria dos pacientes, antes e após a intervenção, provavelmente estava associado aos limites estabelecidos segundo a referência adotada e não foi considerado clinicamente relevante. Entendemos que o maior número de eventos adversos observados em todos os braços após a intervenção deveu-se ao número de visitas realizadas no período pós-vacinação, superior ao período pré-vacina. O cronograma original já previa este “desequilíbrio”, que foi acentuado após o cancelamento de algumas visitas pré-vacina para obtenção do vírus (substituídas pela leucoaférese para a maior parte dos pacientes conforme já esclarecido).

As avaliações de segurança foram feitas monitorando-se as variáveis individualmente e não se observou relação consistente de nenhum EA com a aplicação da imunoterapia. No caso dos linfócitos TCD4+, quatro indivíduos apresentaram queda na contagem após o início da intervenção. A observação caso a caso mostrou que todos eles apresentavam, antes da aplicação do produto, níveis já decrescentes, sugerindo uma tendência de queda não relacionada com a vacina.

Outra análise do impacto da terapia com DCs na contagem de TCD4+, TCD8+, Tregs e CV HIV foi feita através das médias dos indivíduos nos períodos pré x pós-vacina e também pela comparação entre as medianas das contagens e dos Δ s dos braços no período pós-vacina. As interpretações utilizando as medianas e Δ s devem ser consideradas com cautela, principalmente no braço A, que possuía um número muito

pequeno de indivíduos. Isto fica claro quando observamos a evolução de TCD4+ neste braço. Individualmente notamos queda das médias em todos os participantes, mas a curva das medianas pós-vacina sugere elevação constante até a semana 38. Isto se deve ao fato de que o braço, com apenas quatro participantes no início da intervenção, perdeu outros dois ao longo do seguimento, sendo que um deles (49/18) apresentou sempre níveis mais elevados que todos os outros, deslocando a curva.

O mesmo tipo de interferência parece ter ocorrido quando observamos a evolução das médias de TCD8+ no braço A (diferentes para cada indivíduo) e comparamos com as medianas dos Δ s e AUC, que sugerem o maior ganho de células entre os três braços.

No braço B, observamos um padrão evolutivo de queda seguida de elevação de linfócitos TCD4+ em sete dos nove participantes. Considerando que Lu W e Andrieu JM observaram, *in vitro*, indução de resposta CTL específica analisando este mesmo produto ⁽¹²⁰⁾, elaboramos a hipótese de que esta oscilação na contagem de TCD4+ pode ser decorrente de um estímulo da resposta citotóxica, causando um *clearence* inicial das células infectadas.

A falta de sincronismo entre as coletas no período pré-intervenção sugeriu a possibilidade de criopreservação das amostras para posterior avaliação das Tregs, entretanto, a comparação da frequência destas células em amostras a fresco x amostradas congeladas mostrou uma redução nas amostras criopreservadas, corroborando dados da literatura ⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾. Isto impôs a necessidade do processamento das amostras a fresco, em tempo real logo após a coleta, o que só pode ser efetivado no período pós-intervenção.

A ambigüidade relacionada ao papel das Tregs na infecção pelo HIV se mostra quando procuramos por estudos envolvendo imunoterapia anti-HIV baseada em DCs que analisaram a frequência destas células.

Macatangay BJ et. al. (2010) demonstraram um aumento na quantidade de total de Tregs após a administração de DCs carregadas com peptídeos do HIV ⁽¹⁹⁹⁾, enquanto Brezar V et. al. (2015) evidenciaram uma redução na porcentagem de Tregs HIV específicas após a vacinação com um produto baseado em DCs pulsadas com lipopeptídeos virais ⁽²⁰⁰⁾.

Em nosso ensaio clínico, procuramos, neste primeiro momento, apenas avaliar se a aplicação de DCs poderia afetar os níveis das Tregs, analisando uma possível correlação com outras variáveis clínico - laboratoriais. Diferente do estudo de Macatangay BJ et al (2010), nosso ensaio sugere uma possível redução da frequência de Tregs, melhor caracterizada no braço B (3×10^6 DCs pulsadas com HIV-AT2), e que não se correlacionou nem com aspectos clínicos, nem com PVL ou outras subpopulações linfocitárias.

Da mesma forma que para os linfócitos TCD25+, cautela deve ser usada na interpretação das variações de Tregs associadas à infecção pelo HIV, uma vez que alterações nos níveis destas subpopulações podem simplesmente relacionar-se com variações no total de TCD4+.

No artigo publicado por Brezar V et. al.(2015), a caracterização das Tregs foi feita utilizando-se um fenótipo, baseado em citometria de fluxo, mais específico do o empregado por Macatangay BJ et al. (2010) e em nosso estudo. Os pesquisadores argumentaram que a metodologia empregada permitiu caracterizar Tregs HIV específicas, enquanto nós observamos Tregs “totais”. Estende-se a crítica ao fato de que o painel de anticorpos monoclonais utilizado por nós e pelo grupo de Pittsburgh não pode ser considerado absolutamente específico para Tregs, já que outros linfócitos T auxiliares ativados, também podem expressar CD25 e FoxP3⁽²⁰¹⁾.

Em ambos os estudo (Macatangay BJ et al.-2010 e Brezar V et al.-2015), observou-se uma correlação inversa entre Tregs e resposta celular específica anti-HIV.

Vários fatores podem influenciar os níveis de Tregs relacionados à imunoterapia baseada em DCs pulsadas com HIV.

É possível que a quantidade final de Tregs associada ao uso da vacina seja a resultante da influência do HIV (dependente da ligação gp120-CD4) versus a influência das DCS. Foi demonstrado que a ligação entre a glicoproteína do envelope viral, gp120 e seu receptor CD4 presente na superfície dos linfócitos regulatórios, leva a ativação e acúmulo destas células em órgãos linfoides secundários e está relacionada a sobrevivência destas células através da indução de moléculas anti-apoptóticas⁽²⁰²⁻²⁰⁴⁾. É também notória a propriedade das DCs de influenciar na diferenciação dos linfócitos em diferentes sub-populações, incluindo Tregs^(205, 206) Consideradas as diferenças

quantitativas na composição do produto nos braços B e C, a redução de Tregs sugerida no braço B poderia ser o somatório dos fatores acima.

O HIV está se relaciona ao fenômeno de translocação microbiana, ativação celular e apoptose induzida por ativação⁽²⁰⁷⁾, reduzindo, desta forma a população total de TCD4+/CD25+ e, conseqüentemente, as Tregs. A imunização, por sua vez, induz ativação celular e expansão das células de memória, incluindo Tregs. Se a ativação já estiver “no limite”, ocorrerá uma maior morte das células específicas ativadas (AICD), incluindo Tregs.

Com relação a CV plasmática, todos os braços apresentaram, após o início da intervenção, elevação transitória, num efeito semelhante ao conhecido quando da aplicação de qualquer imunógeno em indivíduos com HIV/aids e explicado pela ativação imune induzida pelas vacinas^(125, 208). É possível, também, que a ativação de células produtoras de vírus, induzida pelo contato com as DCs tenha colaborado para este fenômeno⁽¹¹²⁾. Após este período, seguiu-se uma redução dos níveis de CV em diferentes magnitudes para cada braço. Esta redução foi fugaz, durando até a 13-26 semanas, seguindo-se novamente de elevação da CV, não se correlacionando com as subpopulações de linfócitos estudadas. Esta redução na CV já havia sido observada em outros estudos^(125, 126) e sua duração efêmera pode estar ligado ao déficit quantitativo das DCs observada na infecção pelo HIV.

Num elegante estudo em primatas não humanos, Pandrea et al (2013) demonstraram que a redução das mDCs parece ser conseqüenciada apoptose destas células, secundaria a ativação celular induzida principalmente por LPS, num mecanismo semelhante ao que acontece com os linfócitos^(111, 207). Estes e outros pesquisadores já haviam demonstrado a relação entre ativação crônica do sistema imune e disfunção das DCs^(207, 209).

Assim, o fenômeno de “hiperativação” crônica do sistema imune, conseqüente a translocação microbiana, parece exercer um papel fundamental na patogênese da doença, levando a depleção e à disfunção de vários tipos de células fundamentais na resposta imunológica^(207, 210).

Nossos resultados parecem reforçar o paradoxo representado pelos papeis das DCs na infecção pelo HIV. A atuação fundamental destas células na resposta imune faz delas uma alternativa atraente no desenvolvimento de imunoterapia para esta

condição. Por outro lado, também importante e bem estabelecida é a atividade das DCs na patogênese do HIV/aids, disseminando e amplificando a infecção em estágios precoces⁽²¹¹⁻²¹³⁾. Este segundo aspecto parece-nos importante para reflexão no contexto da terapia celular anti-HIV baseada nestas células e pode estar associado aos resultados encontrados neste estudo, constituindo-se na base de uma hipótese para explicá-los.

A interação HIV-DCs tem sido alvo de numerosos estudos desde o início da epidemia^{(110),(214)}. Embora muitos aspectos desta complexa interação permaneçam ainda obscuros, é bem reconhecida a capacidade das DCs de se associarem a dois tipos de infecção: CIS-representada pela replicação intracelular associada a retrotranscrição e integração do genoma viral ao da DC e TRANS-associada à ligação do vírus com a membrana celular através da interação com vários receptores^(213, 215-217). Estas interações com diferentes tipos de receptores levam a distintos destinos da partícula viral após contato com a DC. O vírus pode ser transportado pela DC diretamente ligado a membrana, ou em compartimentos intracelulares (endossomas)⁽²¹⁶⁾. Nos endossomas ele pode permanecer intacto ou ser processado e ter seus peptídeos conjugados à moléculas de MHC II, para estímulo de células TCD4+. Alternativamente, os antígenos virais podem seguir a via de conjugação e apresentação com MHC I para ativação de linfócitos TCD8+ (*cross-presentation*).

A transferência do HIV à outras células mediada pelas DCs, independente de replicação viral (infecção TRANS) ocorre quando, ao encontrar uma “célula-alvo”, o vírus reemerge, formando a chamada “sinapse infecciosa”, sendo então transmitido⁽²¹⁸⁾. Outro mecanismo envolvido na infecção do tipo TRANS está associado aos chamados exossomas. Estas estruturas, inicialmente descritas por Johnstone et al nos anos 80, são nanopartículas derivadas de microvesículas contidas no interior dos endossomas^(219, 220). Quando da fusão do endossoma com a membrana celular, os exossomas são liberados para o meio exterior. Responsáveis pela comunicação intercelular, os exossomas contêm proteínas, lipídeos e mRNA⁽²²¹⁾.

Este comportamento das DCs na infecção pelo HIV levou à sua comparação com o “Cavalo de Tróia”^(213, 222, 223). Os exossomas vêm sendo implicados na patogênese da infecção pelo HIV há algum tempo, não só pelo seu papel na infecção TRANS, mas também pelo seu efeito citopático associado à entrega de fatores virais nocivos⁽²²⁴⁾.

O tipo de produto utilizado no nosso e em vários outros ensaios de imunoterapia anti-HIV baseada em DCs pressupõe a utilização da partícula viral inativada. O tipo de inativação promovida pelo AT-2 tem como suposta “vantagem” o fato da manutenção da conformação protéica, importante em vários aspectos da resposta imune. Esta superioridade pode, entretanto, ser relativizada se levarmos em conta que as DCs pulsadas com HIV-AT-2 estão carregadas de proteínas citopáticas, numa concentração elevada, provavelmente maior do que aquela encontrada na história natural do HIV/aids. Neste sentido, o papel de “Cavalo de Tróia” atribuído às DCs na infecção pelo HIV, poderia estar sendo reforçado, explicando o porquê de a utilização de concentrações da ordem de 10^7 células com pulso de 10^9 vírus resultarem num efeito deletério nas contagens de TCD4+, TCD8+ e CV. Note-se que isto não se traduziu em manifestação clínica, uma vez que não observamos EA associados. Já a dose de 10^6 DCs parece não ter tido um efeito prejudicial, que poderia representar a resultante positiva do balanço entre os dois papéis da DC. Infelizmente o número pequeno de participantes no braço que recebeu as DCs sem pulso adicional não permitiu maiores conclusões quanto ao pulso com o vírus inativado. A proposta é conduzir estudos *in vitro* no sentido de esclarecer este aspecto.

Infelizmente os vários ensaios clínicos utilizando esta terapia celular baseada em DCs na infecção pelo HIV possuem, quase todos, diferenças metodológicas que dificultam a comparação entre os seus resultados. Apesar disso, nosso estudo, como a grande maioria dos já realizados, mostrou que o produto foi seguro, no que diz respeito ao desenvolvimento de EAs, sugerindo uma evolução temporal diferente dos parâmetros imunoviológicos monitorados nos dois braços que utilizaram diferentes quantidades de DCs pulsadas com HIV inativado.

Nosso ensaio estudou três formulações diferentes da vacina, utilizando como comparação os indivíduos no período antes da intervenção. Não achamos que a utilização das DCs sem pulso adicional de vírus possa ser considerada placebo. Devemos levar em consideração o fato que de embora estas células sejam consideradas pela maioria dos estudiosos como mais resistentes a infecção do que os linfócitos, elas também contêm vírus *in natura*, e sua administração em concentrações elevadas como a que utilizamos, não pode ser considerada inócua. Os estudos de Steinman R e Inaba K (1989) administrando DCs “puras”, sem pulso antigênico, mostraram apenas que não

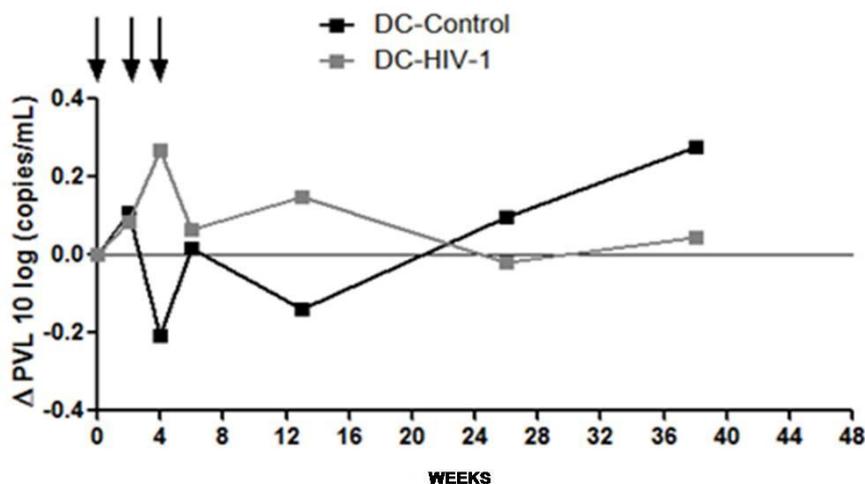
houve estímulo de resposta imune específica⁽¹⁰²⁾, não se aprofundando em avaliar outros possíveis efeitos.

Comparando nossos achados com os descritos por Garcia et al em 2011⁽¹⁵¹⁾ percebemos alguma semelhança no que diz respeito a evolução do ΔCV HIV no braço que utilizou as DCs sem o pulso adicional do vírus, ressaltando que utilizamos uma quantidade de DCs da ordem de 10^7 , enquanto aquele autor utilizou 10^6 células. Observando o braço que utilizou DCs na ordem de grandeza de 10^6 pulsadas com HIV inativado, verificamos uma melhor evolução no estudo de Garcia. Comparando-se as metodologias em detalhes observamos várias diferenças que podem ser responsáveis pelos achados. Estas diferenças e as curvas evolutivas do ΔCV nos dois estudos são apresentadas na figura 11.

Figura 11 – Comparação da evolução do ΔCV plasmática com o estudo de Garcia F et al (2011)

A

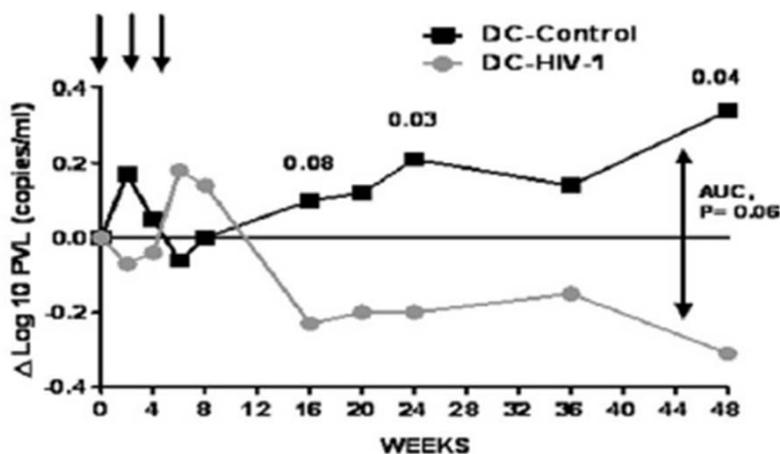
- Inativação pelo AT-2
- Expansão do vírus em células autólogas
- Não se utilizou AZT no processo de pulso das DCs
- Obtenção de PBMCs através de leucoaférese
- Grupo DC-Control = 10⁷ células



DC-Control	4	4	3	3	3	2	2
DC-HIV	9	9	9	8	8	6	6

B

- Inativação pelo calor
- Expansão do vírus em células alogênicas
- Utilização de AZT no processo de pulso das DCs
- Obtenção de PBMCs através de punção venosa
- Grupo DC-Control = 10⁶ células



DC-Control	12	12	12	12	11	11	11	9
DC-HIV-1	10	10	10	10	8	8	8	7

Fonte: adaptação de figura extraída de Garcia F et al. *A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection*. JID. 2011

Nota: Comparação entre o presente estudo (A) e o estudo de Garcia et al (B). As setas mostram os momentos de aplicação das doses da vacina. Legenda: DC-Control- apenas DCs sem pulso adicional de HIV; DC-HIV-1-DCs com pulso adicional de HIV inativado (10⁹ partículas virais); AT-2-aldrithiol 2; AZT-azidotimidina; PBMCs-peripheral blood mononuclear cells

Afora uma menor quantidade de DCs, observa-se no estudo espanhol a inativação pelo calor. Esta técnica, amplamente utilizada desde os primórdios da vacinologia têm como inconveniente a redução no efeito imunogênico, decorrente da desnaturação proteica⁽²²⁵⁾. Na infecção pelo HIV, entretanto, esta mesma desnaturação poderia ser responsável pela inativação do arsenal protéico viral disseminado pela DC, inclusive com redução do potencial “inflamatório” decorrente da presença de proteínas celulares “estranhas” decorrentes do cultivo do HIV em células alogênicas. A utilização da Zidovudina na cultura celular evitaria a infecção CIS da DC. Desta forma, as DC do estudo espanhol estariam menos carregadas com partículas e peptídeos virais com potencial nocivo.

È ainda possível que a coleta através de punção venosa periférica resulte em células menos ativadas. Durante nosso estudo, comparamos a ativação de linfócitos T, através da expressão do marcador CD38, em células colhidas por punção venosa e colhidas por leucoaférese, encontrando uma ativação maior na última situação (dados não publicados). Ainda que a evidência seja episódica, para a possibilidade de interferência na imunoterapia devido a este fator, sendo que o efeito final sobre o produto carece de maiores estudos.

A produção de antígenos e células para composição do produto representa, sem dúvida um aspecto crucial no desenvolvimento deste tipo de intervenção. Na infecção pelo HIV, a terapia celular baseada em DCs sofre críticas pertinentes quanto a sua aplicabilidade em larga escala, mas o esforço empregado no sentido de simplificar o processo tem mostrado que este não é, em absoluto, um obstáculo intransponível. Recentemente a *FoodandDrugAdministration* (FDA) aprovou, para testes em seres humanos, uma vacina terapêutica composta por DCs pulsadas com HIV-AT-2, baseando-se nos estudos realizados por Miller et al⁽²²⁶⁾. Nesta plataforma, o vírus autólogo é obtido diretamente, inativado e estocado para posterior pulso das DCs, dispensando a cultura em células permissivas para sua expansão.

Outro ponto passível de melhora neste tipo de imunoterapia refere-se a abordagem feita em estudos como o de Vogt et al (2013), onde peptídeos do vírus são adsorvidos a nanopartículas que são introduzidas na base do folículo piloso e captadas pelas DCs residentes⁽²²⁷⁾. Desta forma o “carregamento” das DCs é feito *in vivo*, dispensando a necessidade de diferenciação a partir da manipulação *in vitro* de seus precursores.

A despeito da boa perspectiva e do considerável papel da DC na resposta imune, as lacunas no conhecimento da biologia desta célula e na patogênese da infecção pelo HIV afetam aspectos fundamentais no desenho dos testes pré-clínicos e ensaios clínicos comprometendo várias etapas do processo, dificultando padronizações sobre tipo de DC e de antígeno a ser utilizado, via de administração, monitoramento de respostas, etc.. Isto compromete a comparação entre os estudos já realizados impedindo conclusões mais consistentes em ensaios clínicos de fases iniciais, cujo número de participantes é, por definição, pequeno.

6. CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÕES

- Seguindo as definições e os critérios estabelecidos para este ensaio clínico, as formulações testadas utilizando diferentes quantidades de DCs, pulsadas com HIV inativado se mostraram seguras;
- Consideradas as limitações da pesquisa, no que diz respeito ao impacto imunológico medido através da contagem de células TCD4+, TCD8+ e Tregs, o conjunto dos resultados sugere evolução diferente nos braços empregando diferentes quantidades de DCs, pulsadas com HIV inativado, com queda de TCD4+ e TCD8+ no braço C e queda de Tregs no braço B;
- Consideradas as limitações da pesquisa, com relação ao impacto virológico, medido através da variação da carga viral plasmática do HIV, o estudo sugere uma evolução diferente nos braços empregando diferentes quantidades de DCs, pulsadas com HIV inativado, com aumento da CV no braço C.

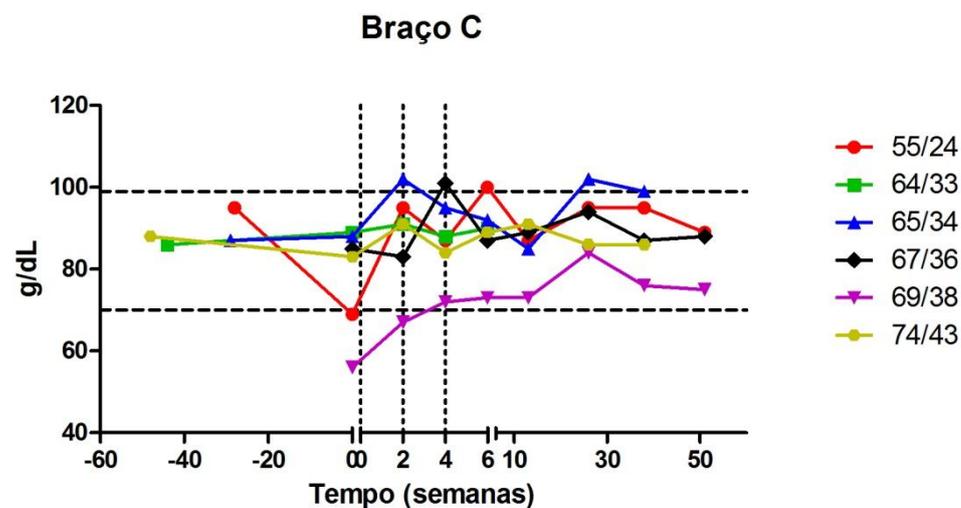
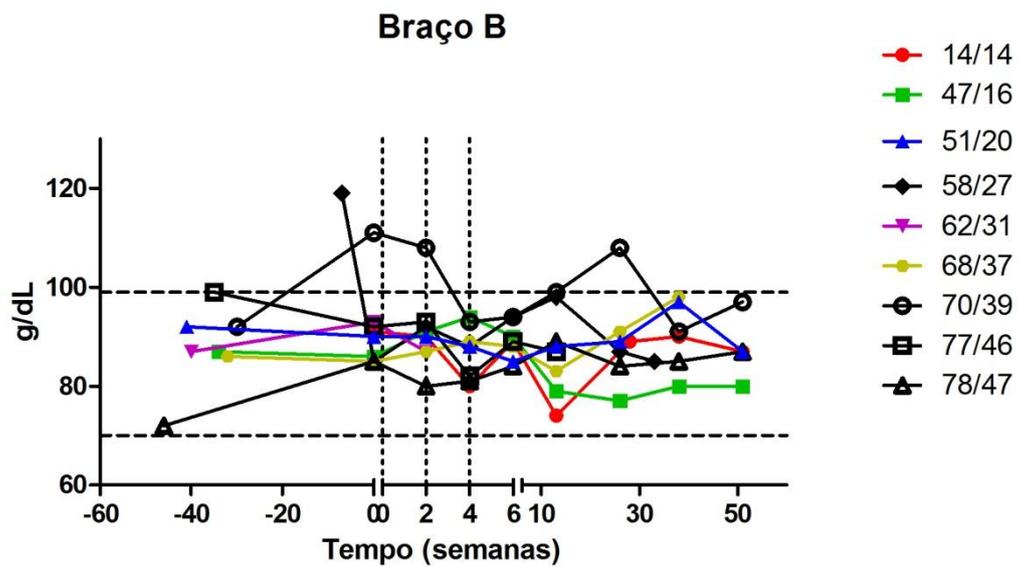
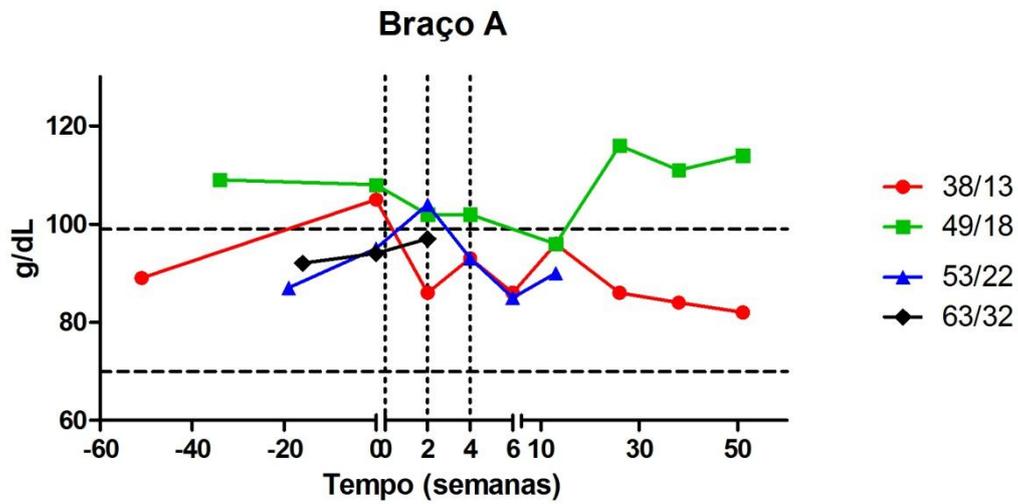
7. ANEXOS

ANEXO A–CRONOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

	V1 <i>Screening</i>	V2	V3	V4	V5 <i>Baseline</i>	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	TOTAL
TEMPO (DIA)	-90	-75	-60	-8	0	15	30	45	90	180	270	360	
TCLE	X												1
AVALIAÇÃO CLÍNICA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Exs. VIROLOGIA	X				X	X	X	X	X	X	X	X	8
Exs. IMUNOLOGIA	X				X	X	X	X	X	X	X	X	8
VACINAÇÃO					X	X	X						3
AFÉRESE				X									1
Exs INCLUSÃO/SEGURANÇA (HMG, BIOQ, SOROLS, ANA, βHCG)	X				X	X	X	X	X	X	X	X	9
ESTOQUE AMOSTRAS					X	X	X		X	X	X	X	7
COLETA PBMCs *	X	X	X										3
CONTRA PROVA					X	X	X						3

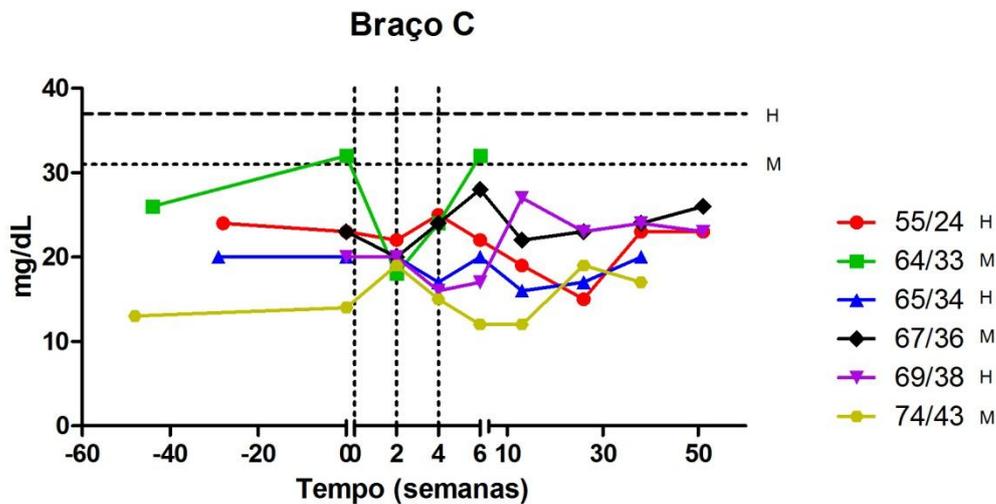
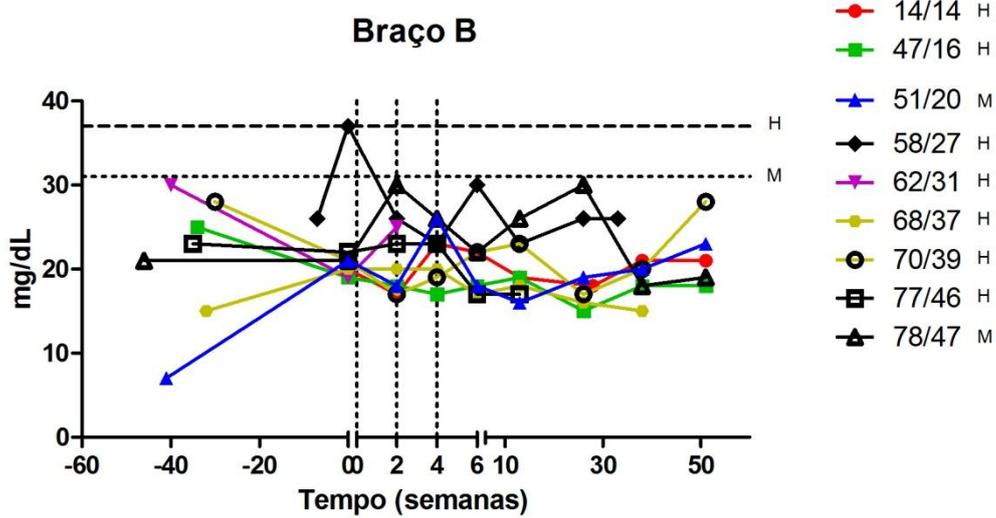
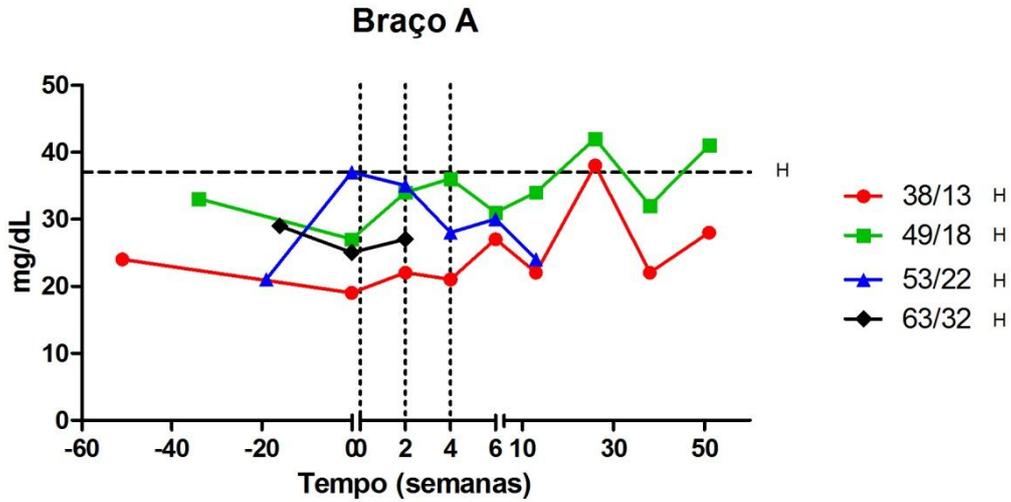
*Alternativamente, as PBMCs para o preparo da vacina foram obtidas no procedimento da aférese.

ANEXO B - GLICEMIA



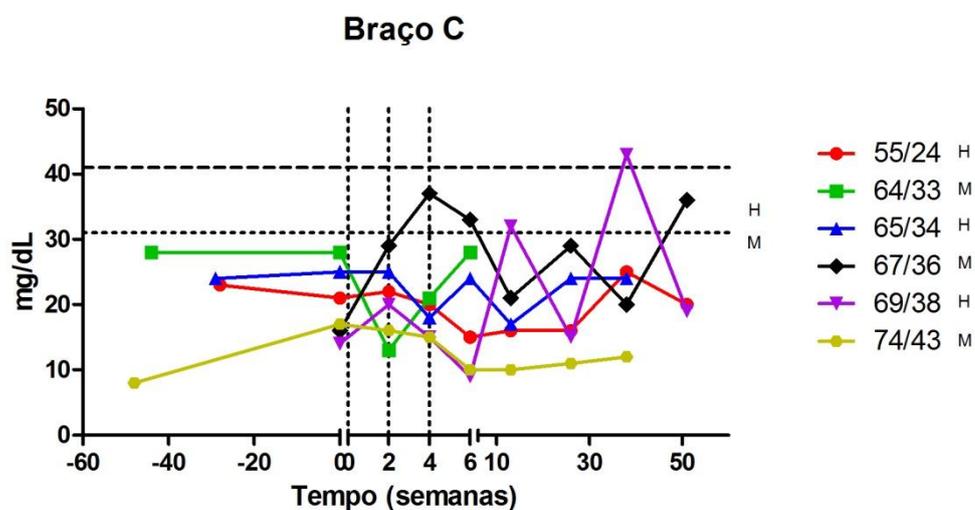
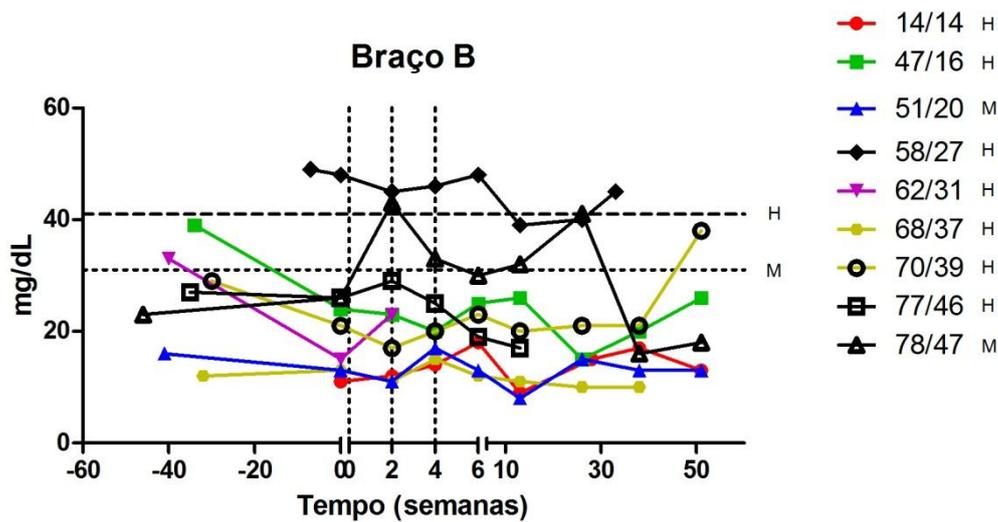
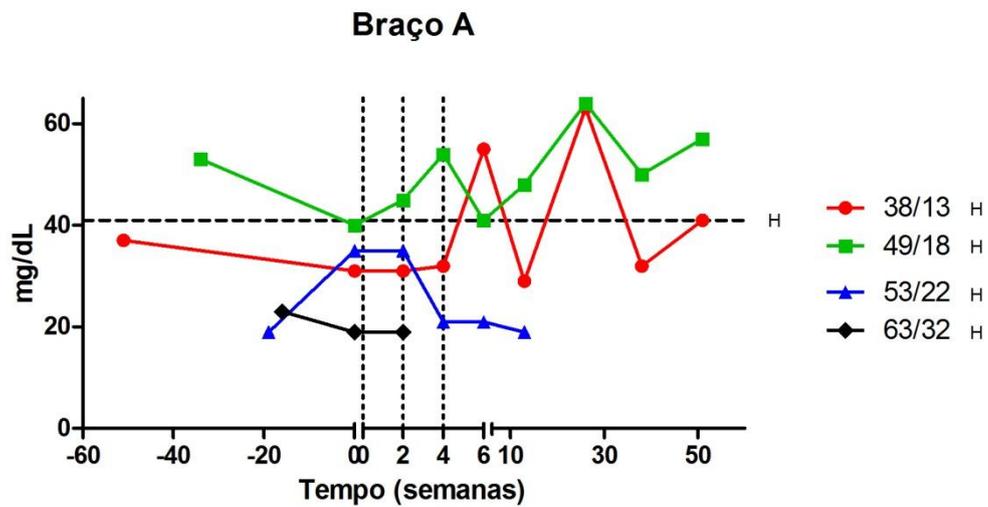
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO C - AST



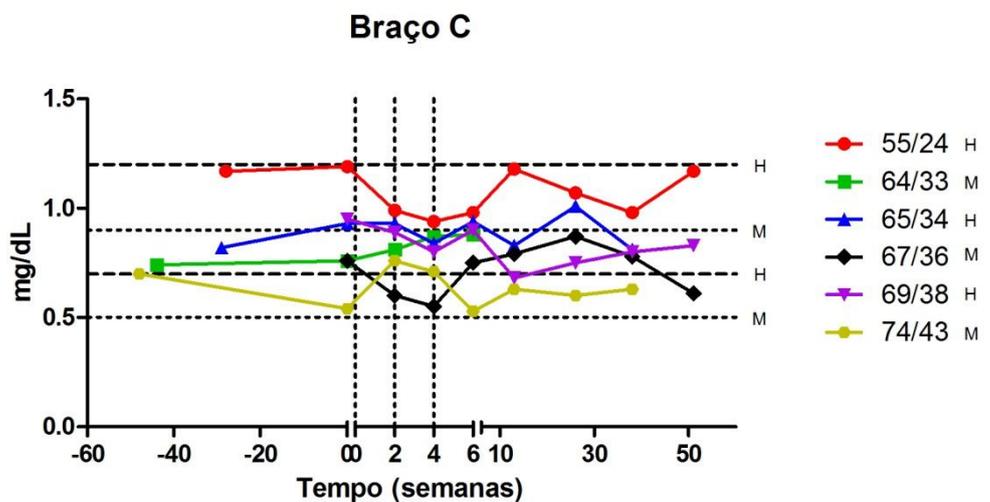
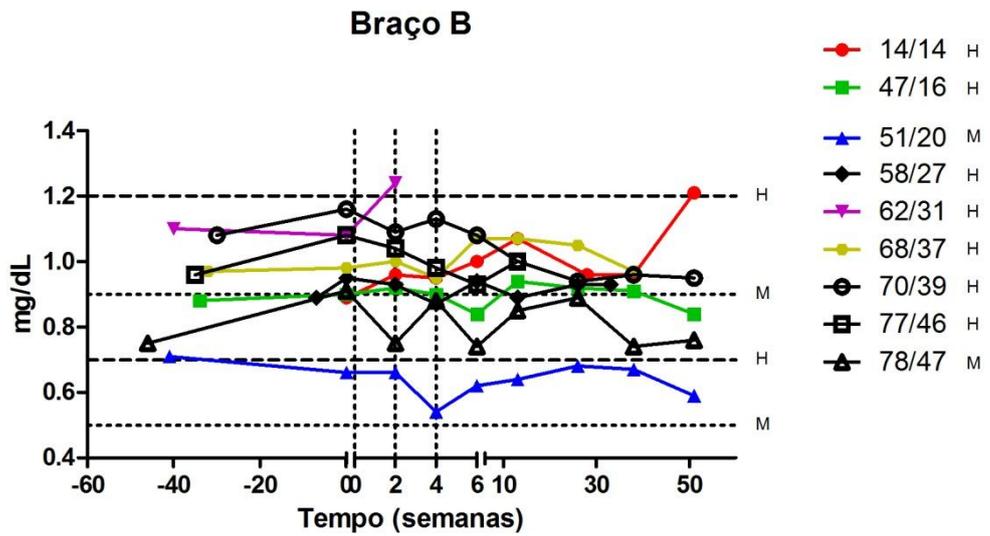
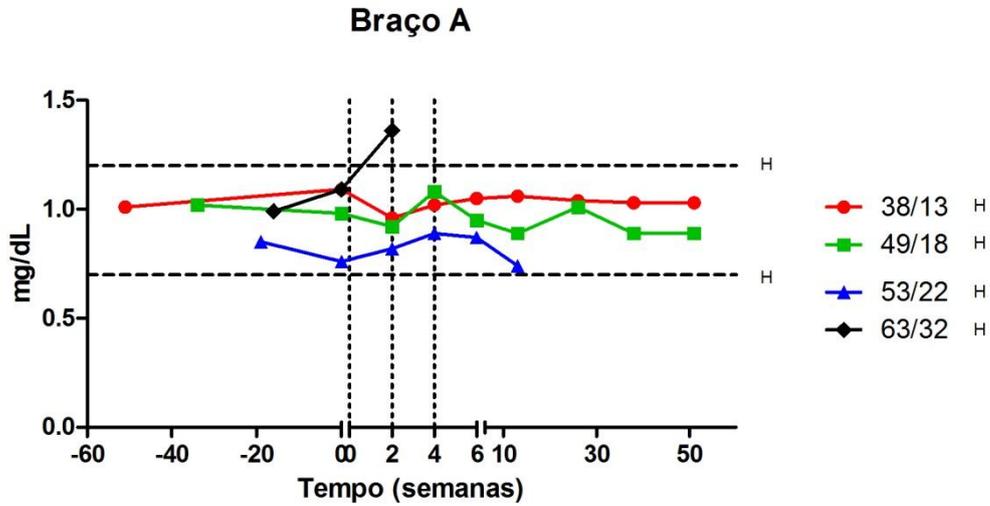
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO D - ALT



Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

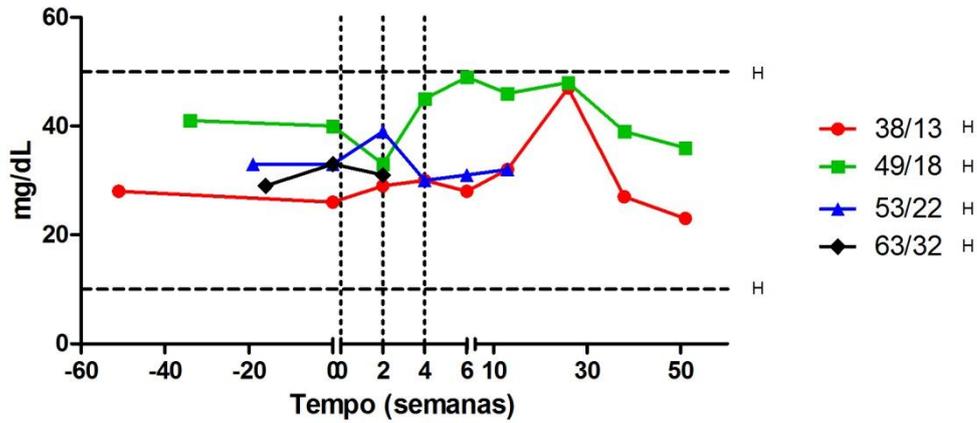
ANEXO E - CREATININA



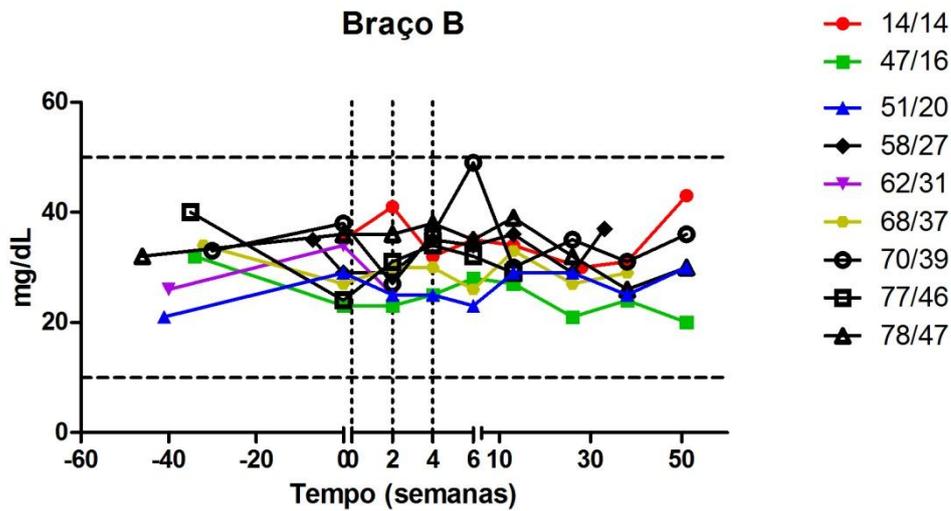
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO F - URÉIA

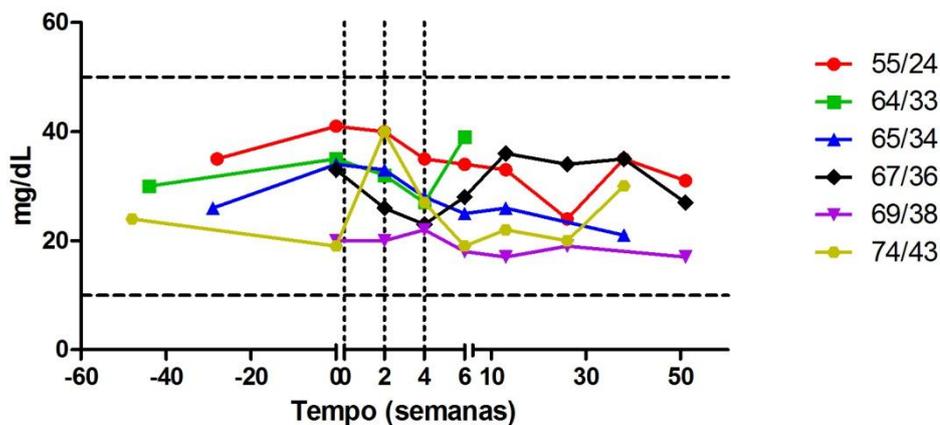
Braço A



Braço B



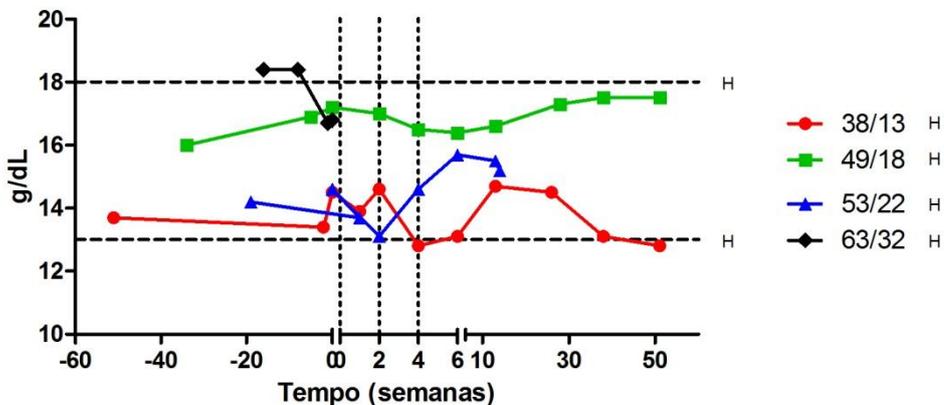
Braço C



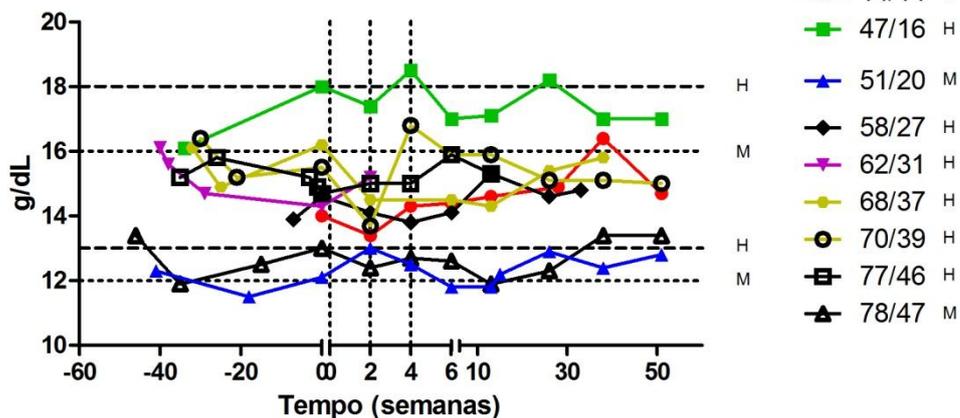
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO G - HEMOGLOBINA

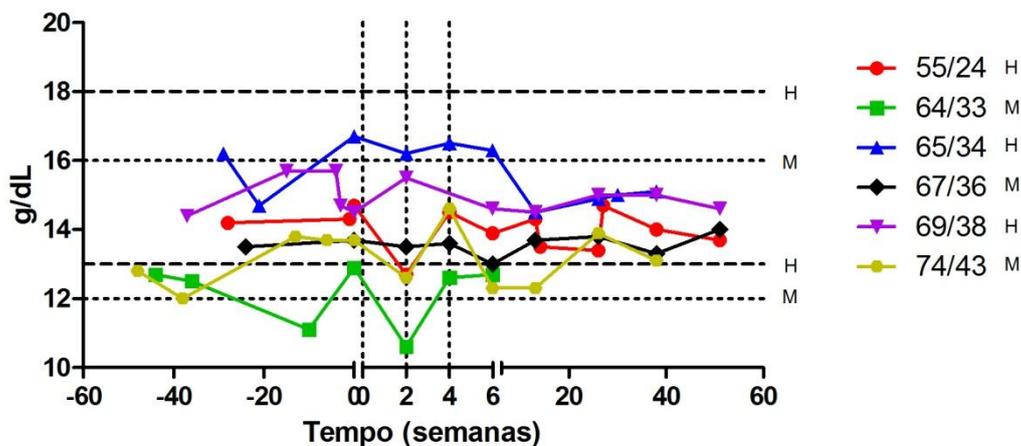
Braço A



Braço B



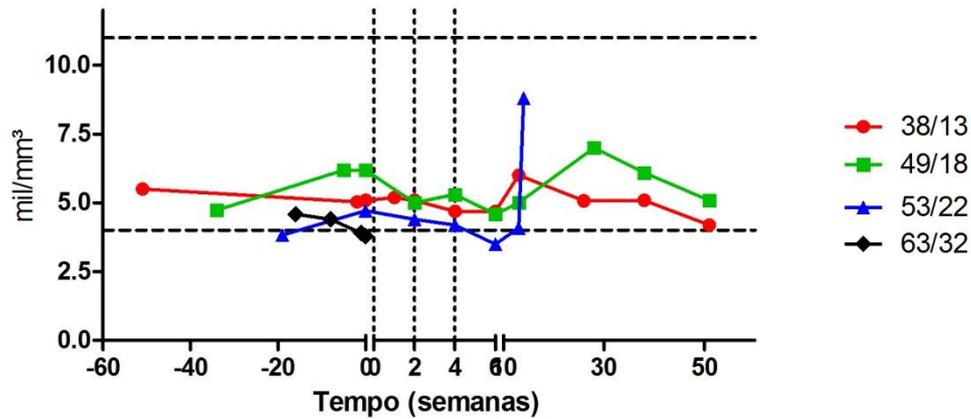
Braço C



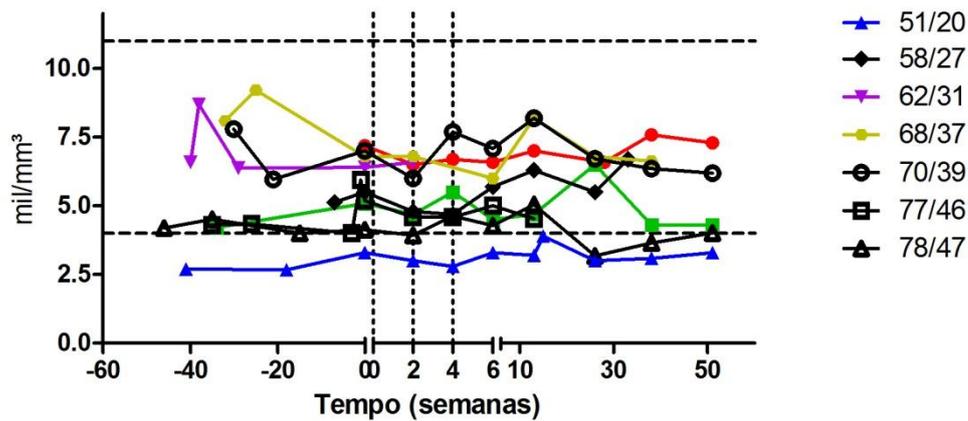
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO H - LEUCÓCITOS

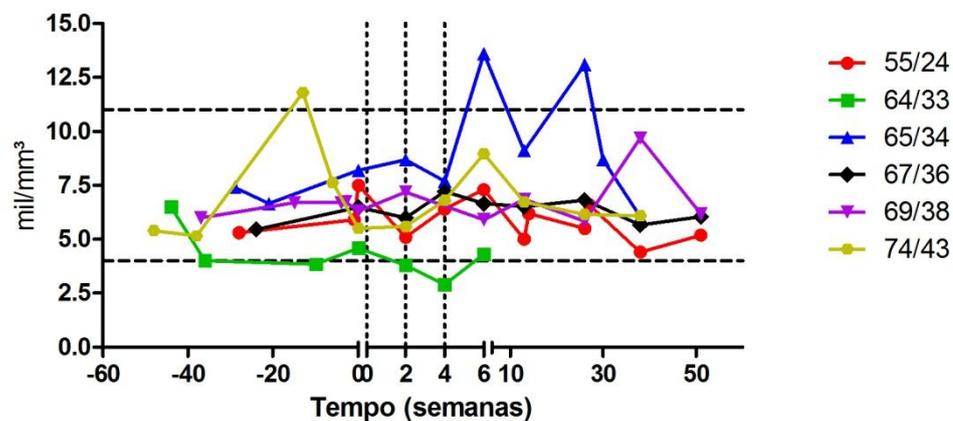
Braço A



Braço B



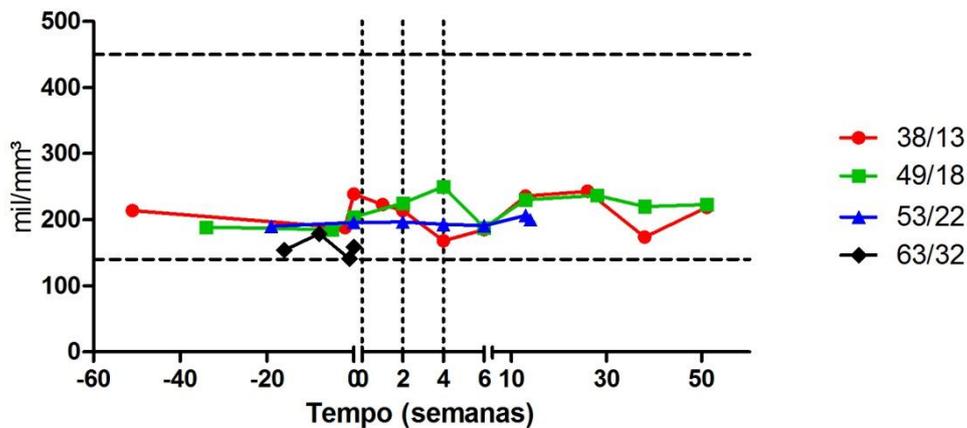
Braço C



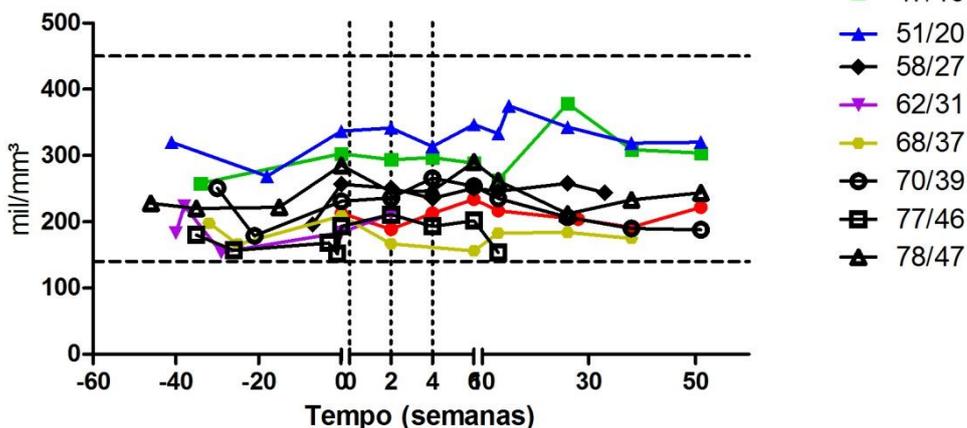
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO I- PLAQUETAS

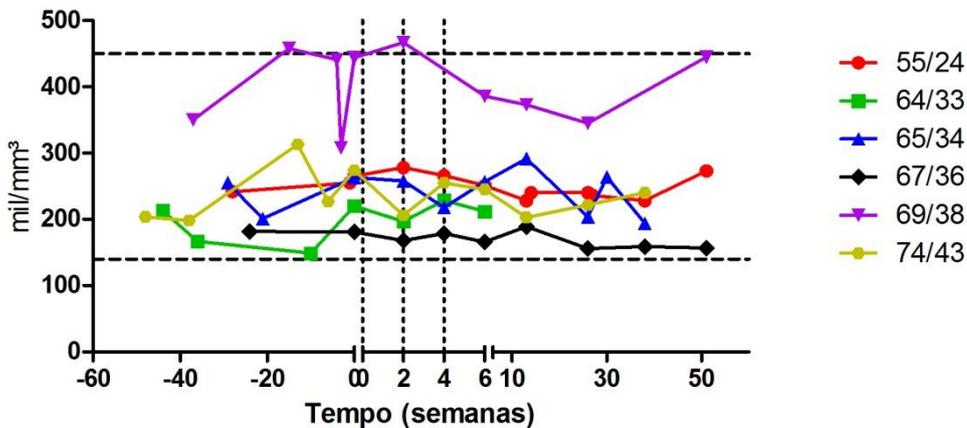
Braço A



Braço B

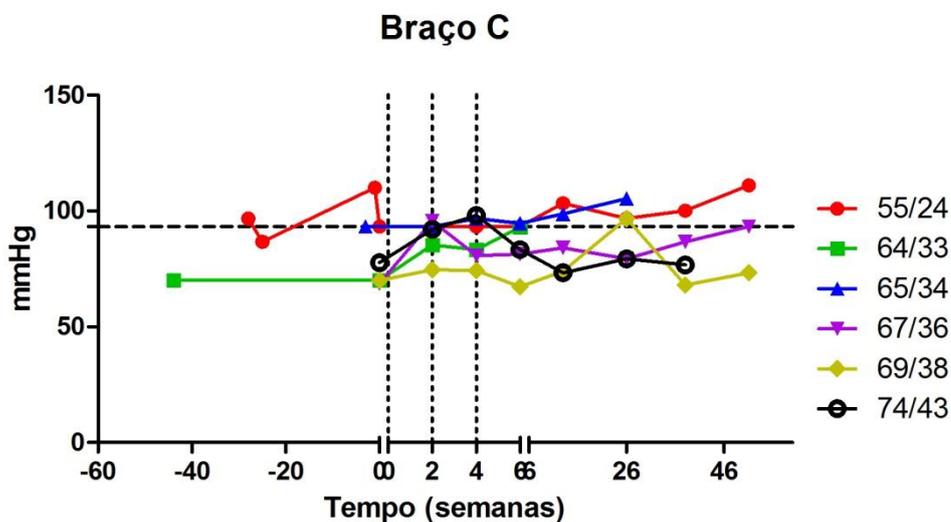
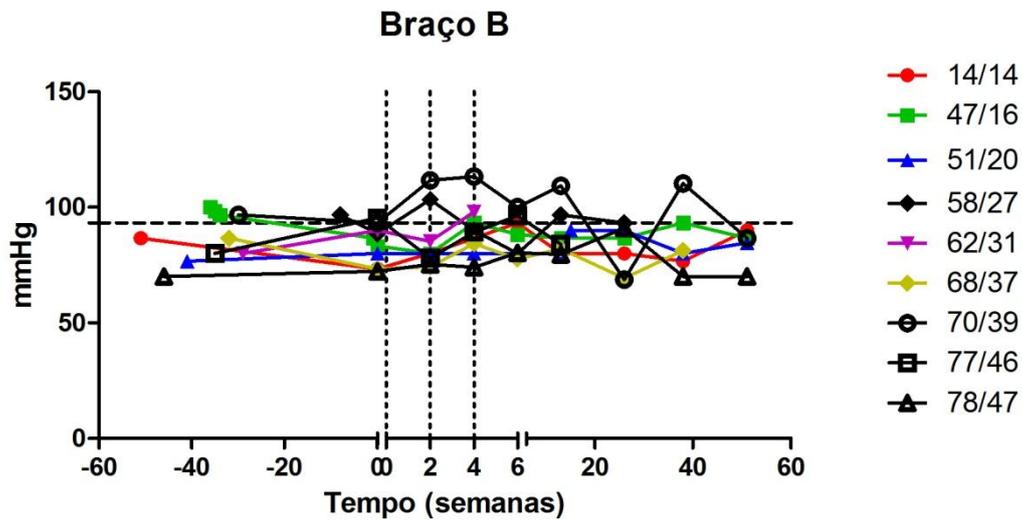
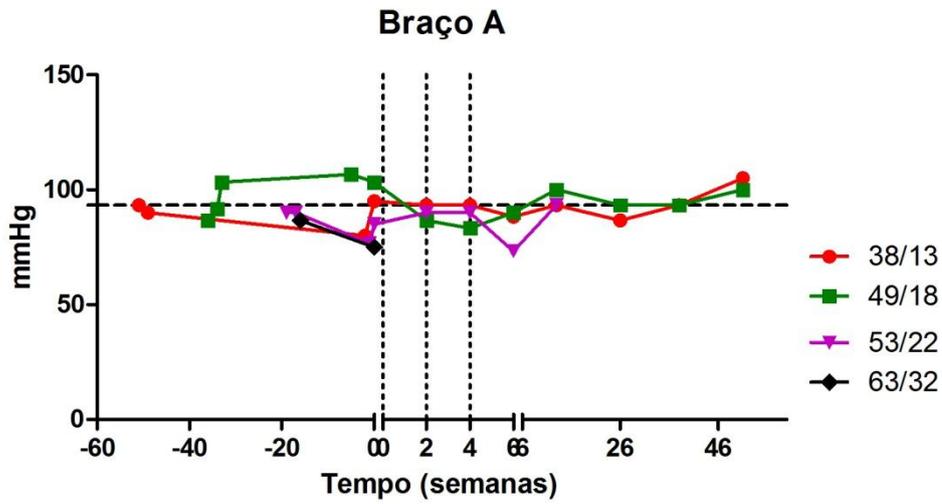


Braço C



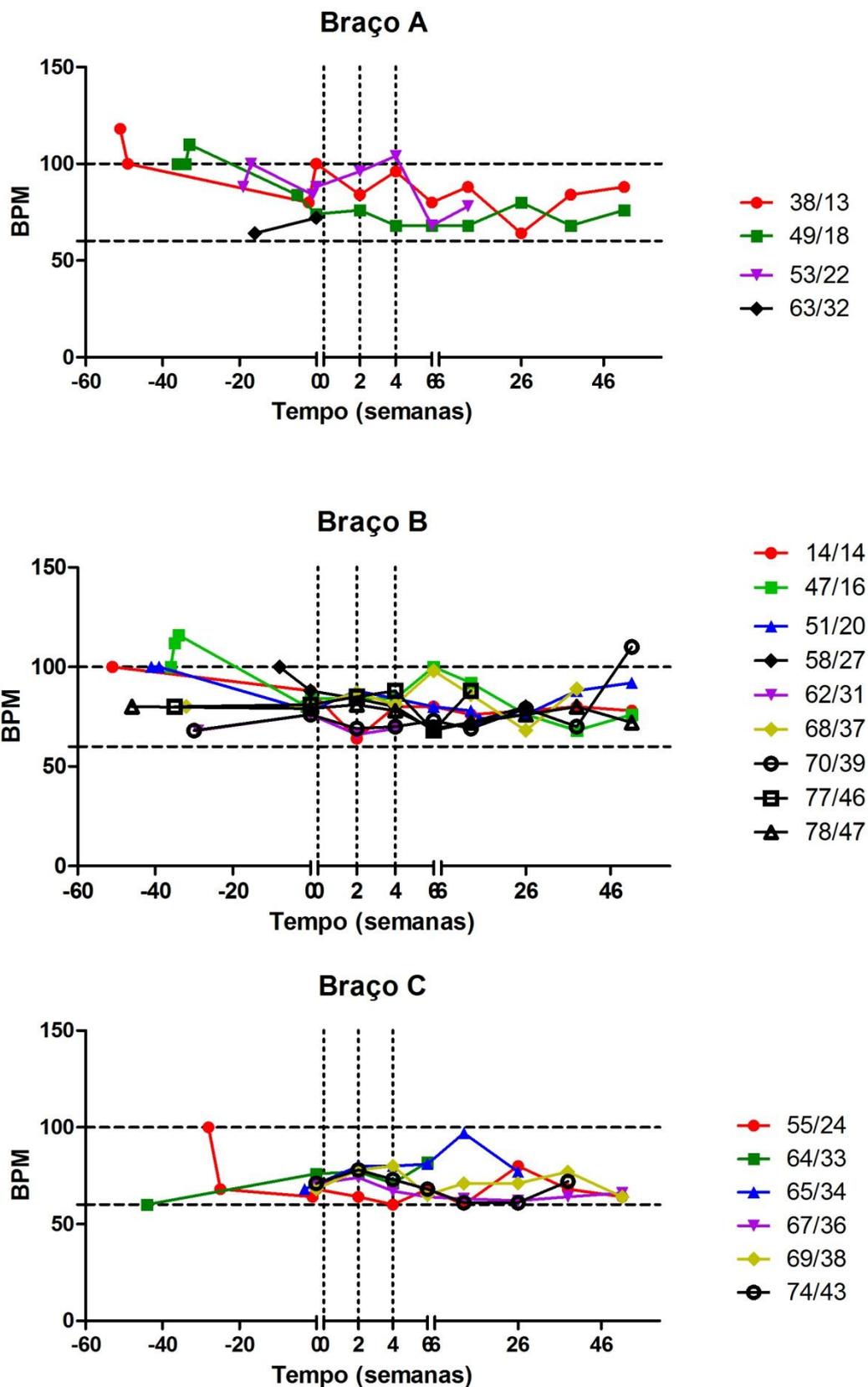
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO J - PAM



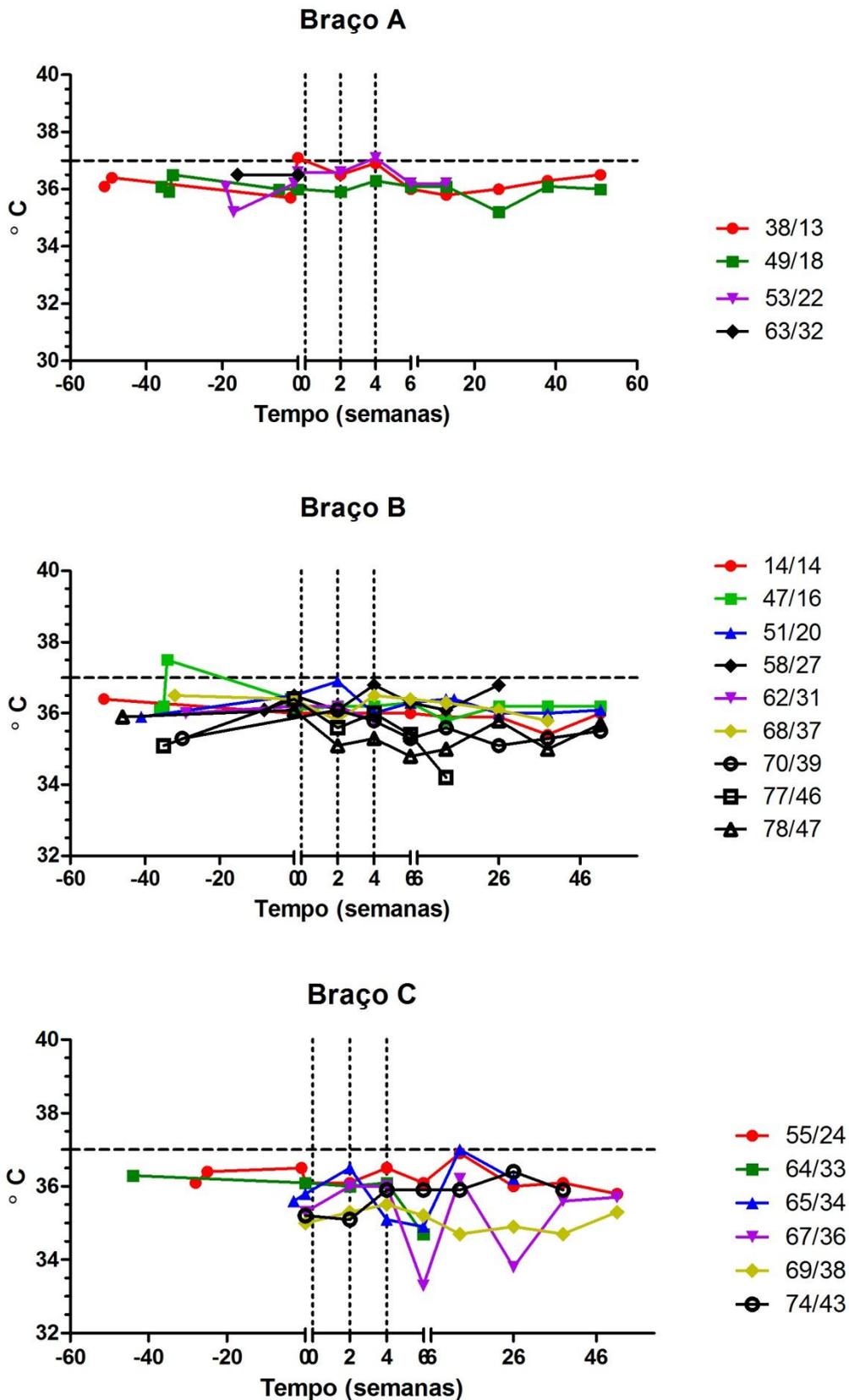
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO L - FC



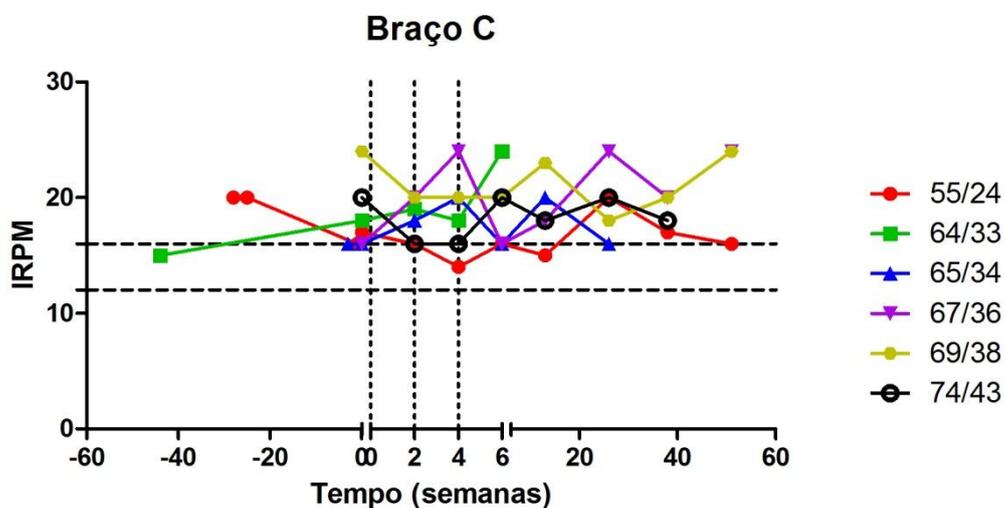
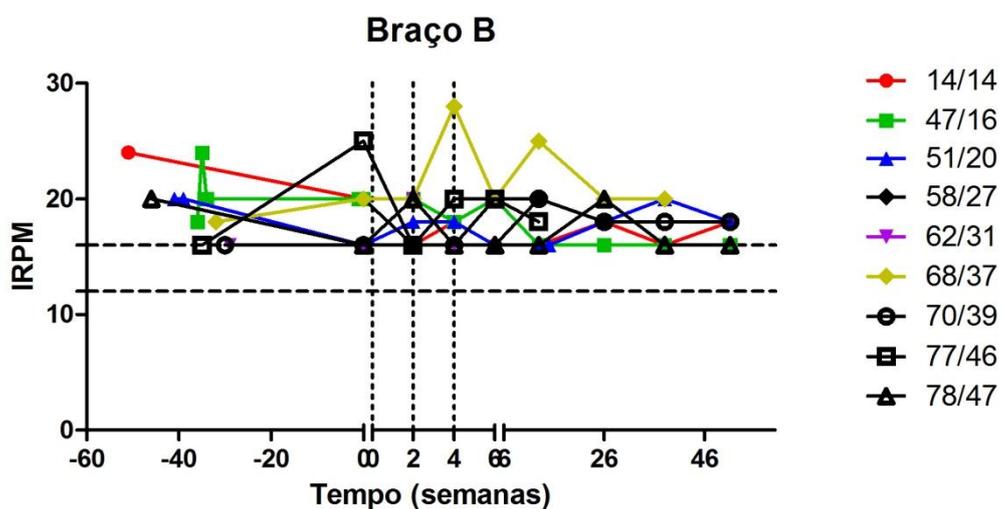
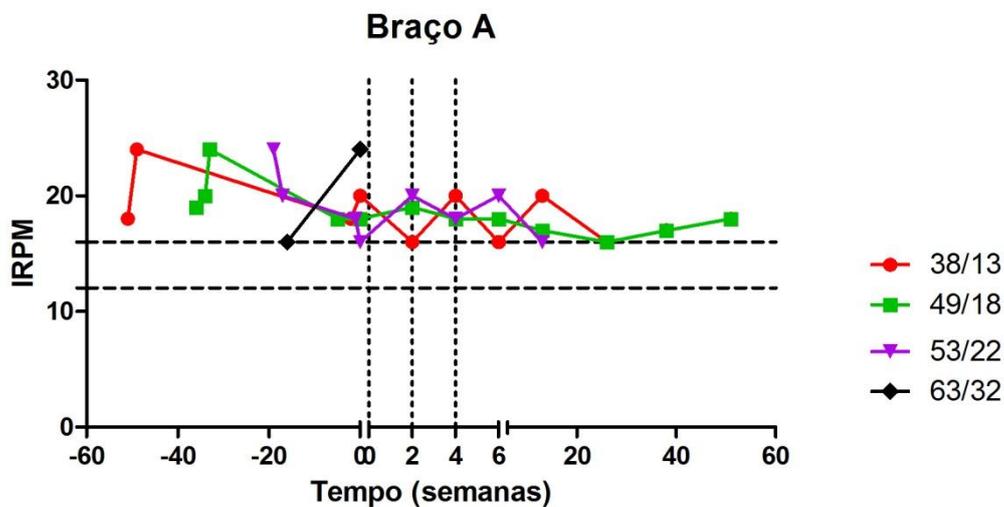
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO M - TAX



Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

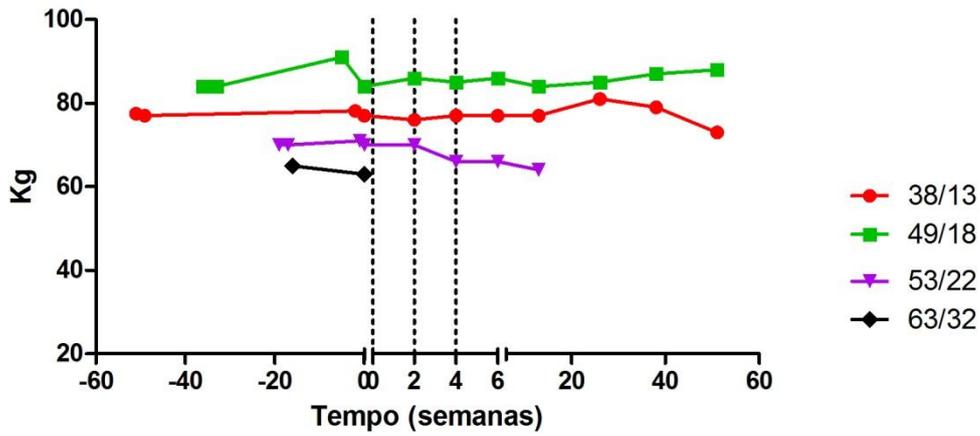
ANEXO N - FR



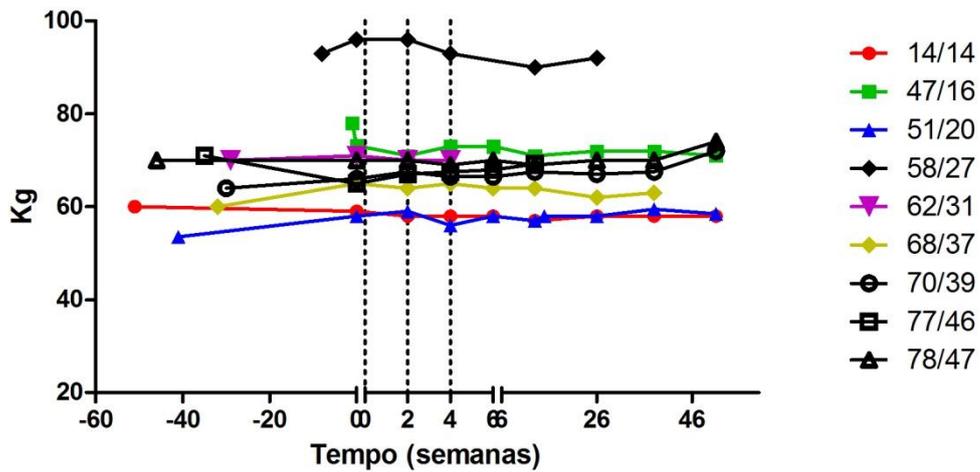
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas). As linhas tracejadas na horizontal referem-se aos limites da normalidade, segundo as referências adotadas.

ANEXO O - PÊSO

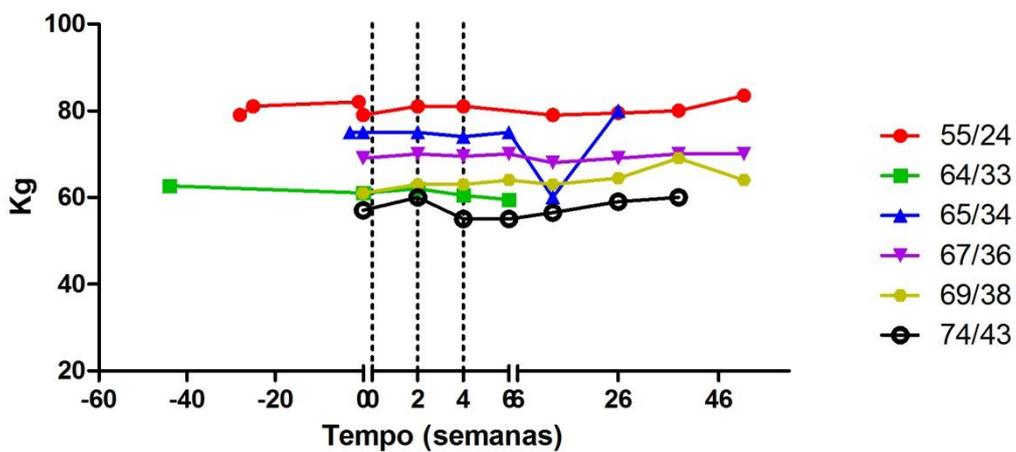
Braço A



Braço B

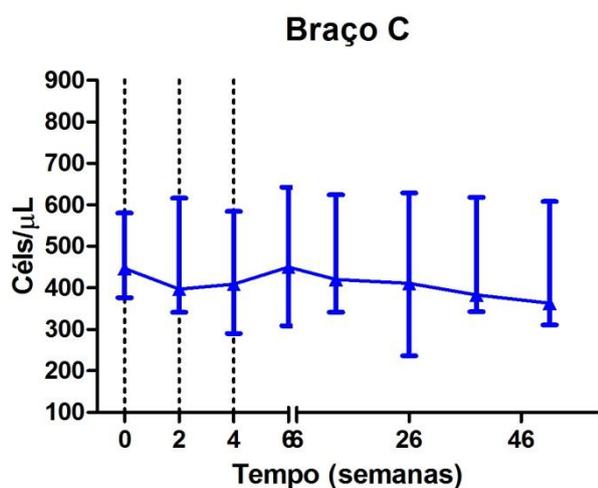
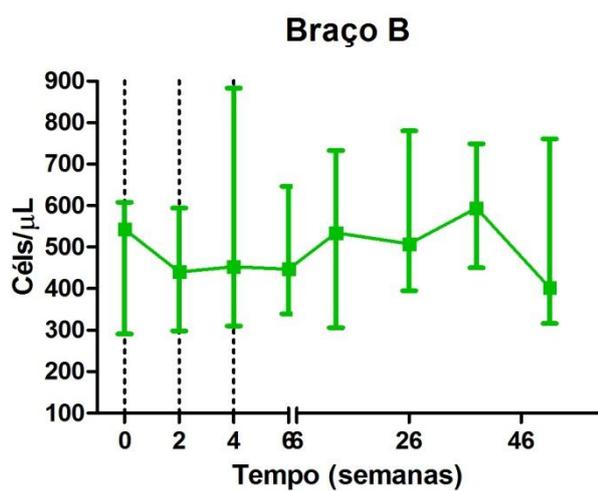
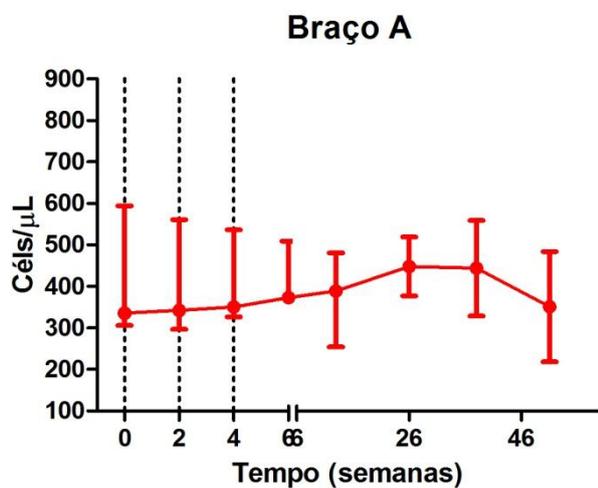


Braço C



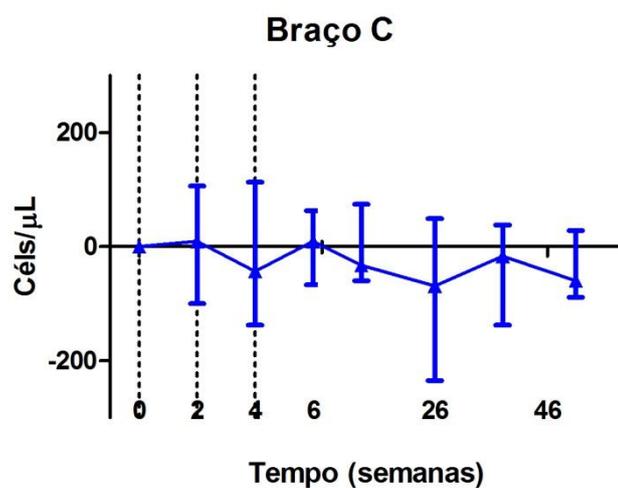
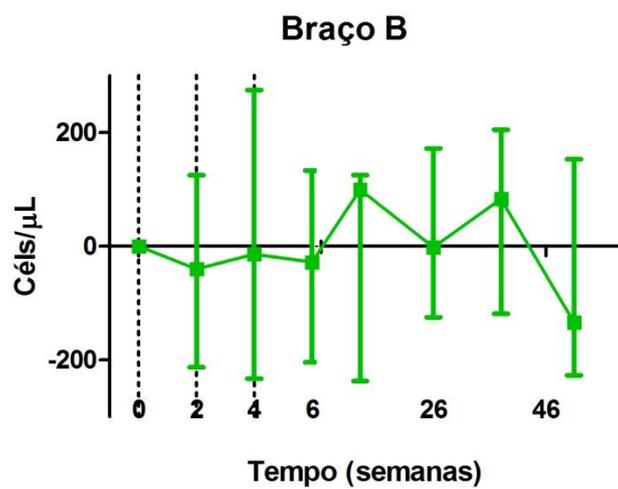
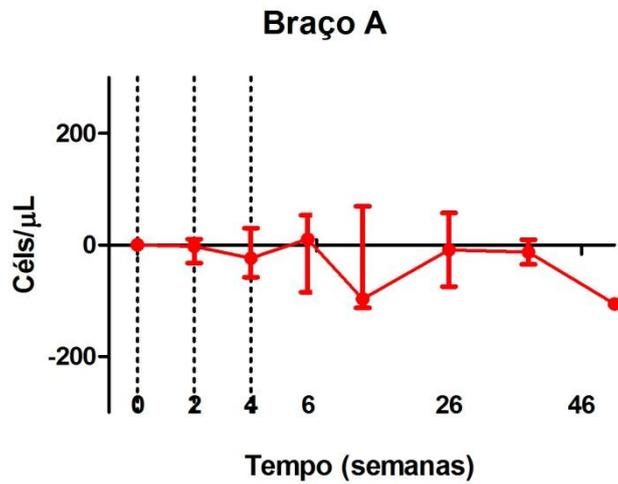
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO P - MEDIANAS DE TCD4+ COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



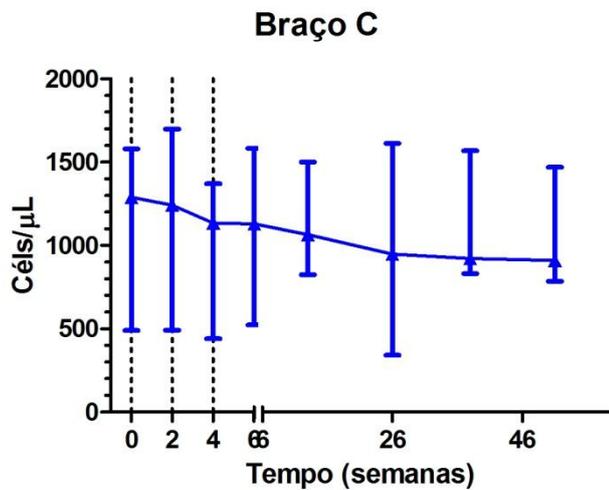
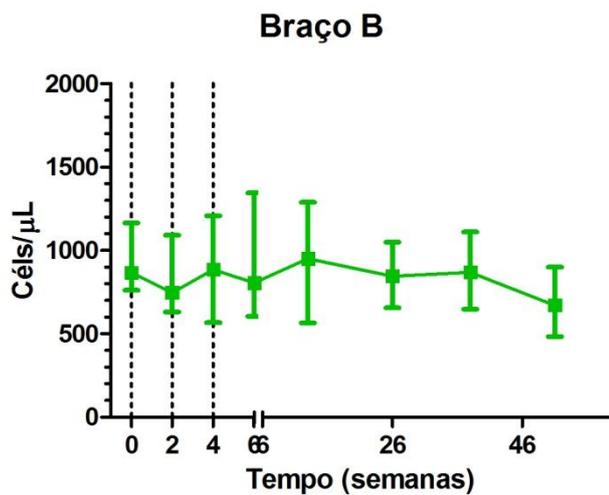
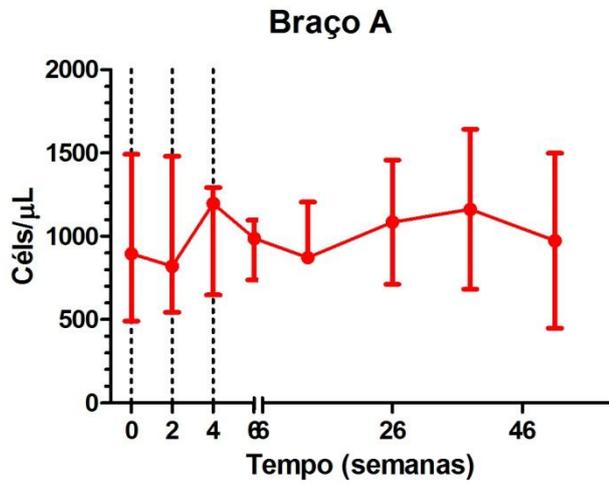
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO Q - MEDIANAS DOS Δ TCD4+ COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



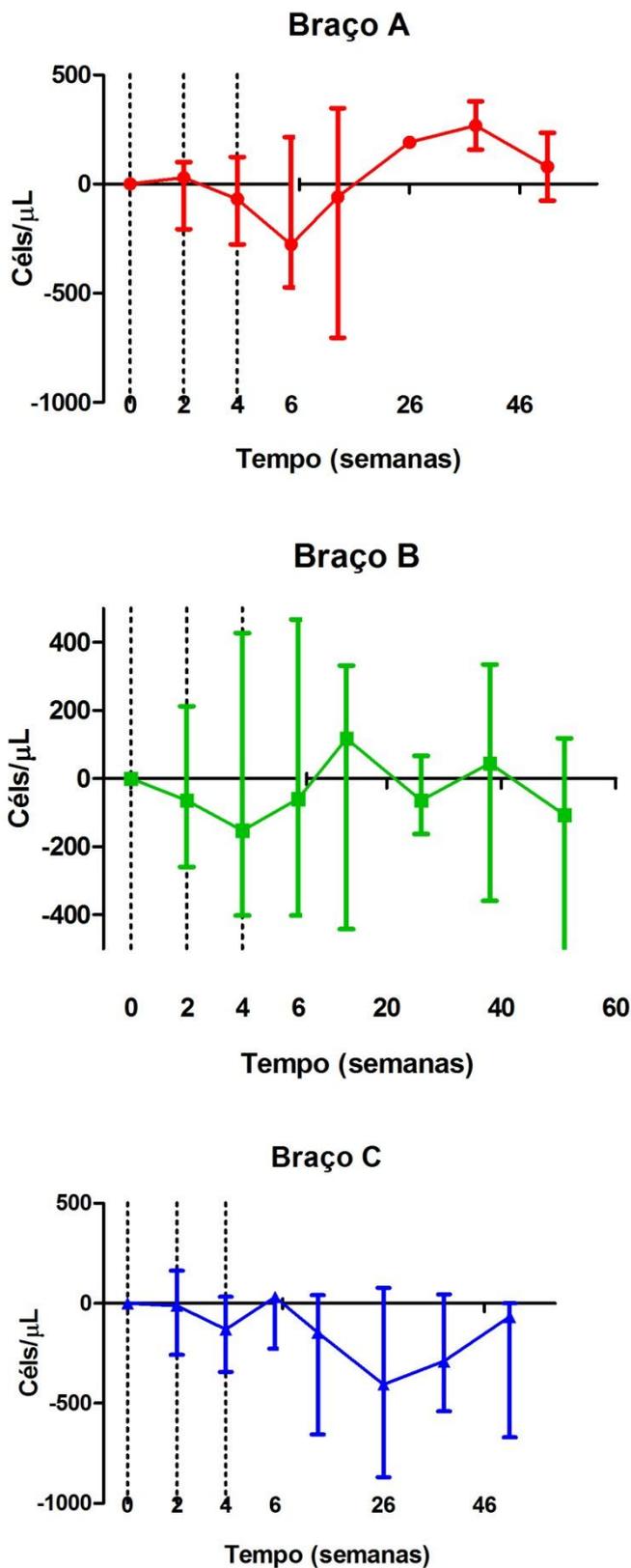
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO R - MEDIANAS DE TCD8+ COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



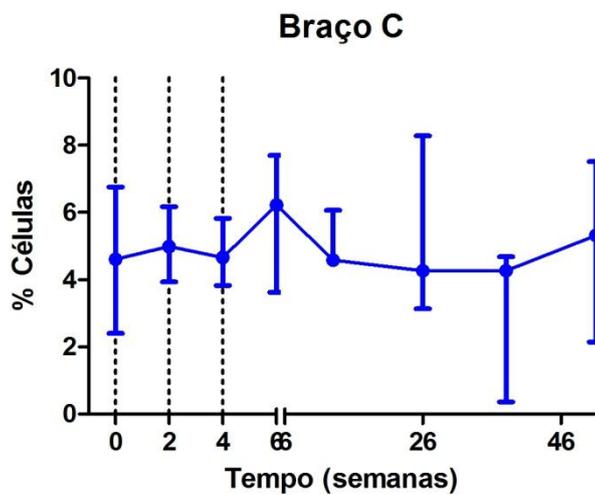
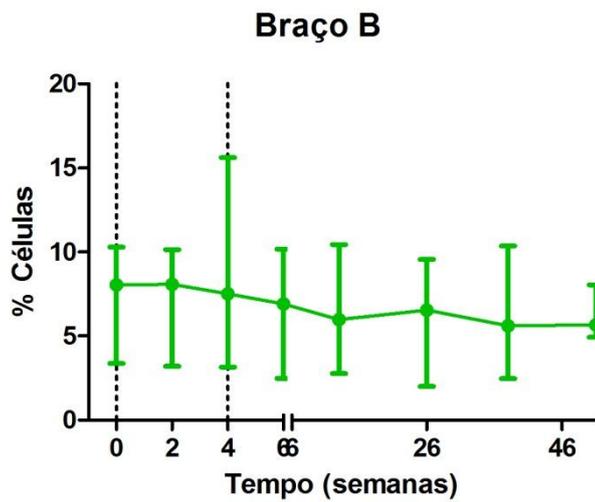
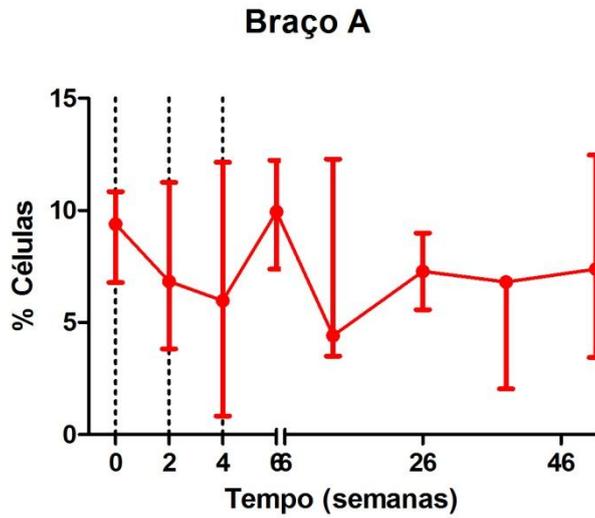
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO S - MEDIANAS DOS Δ TCD8+ COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



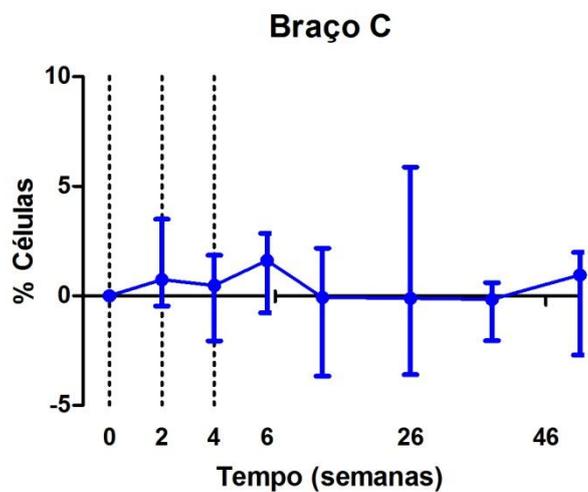
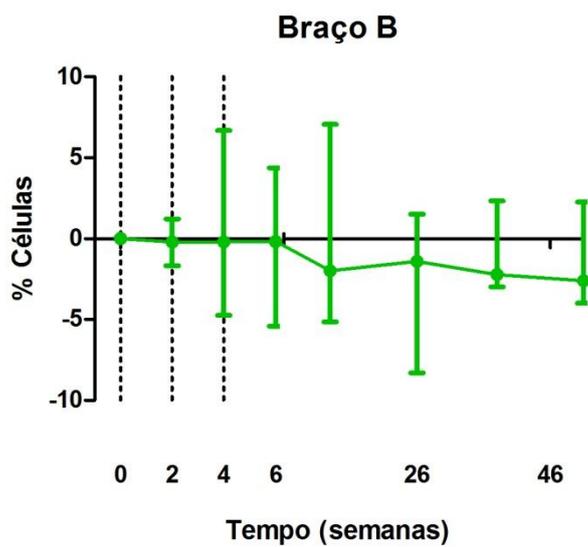
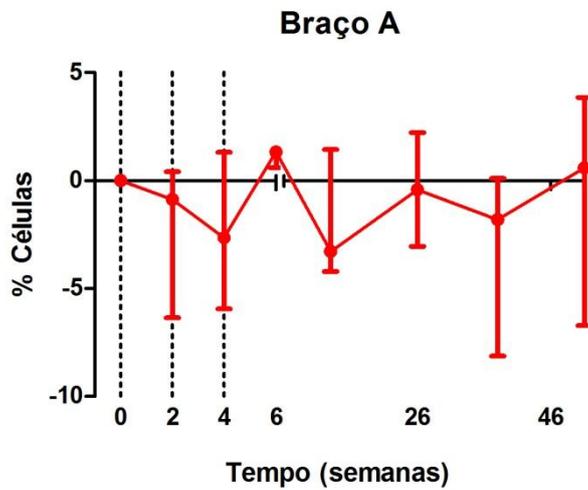
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO T - MEDIANAS DOS Δ Tregs COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



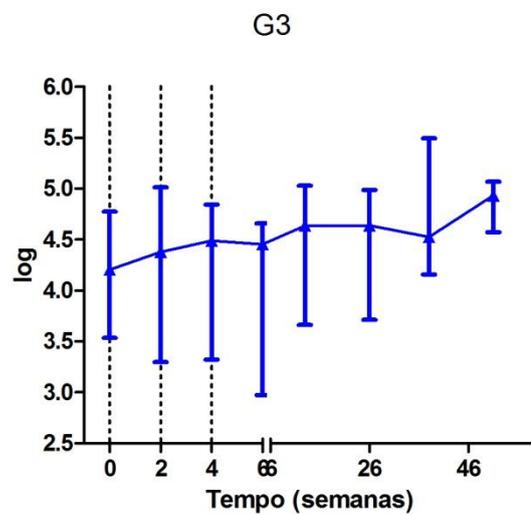
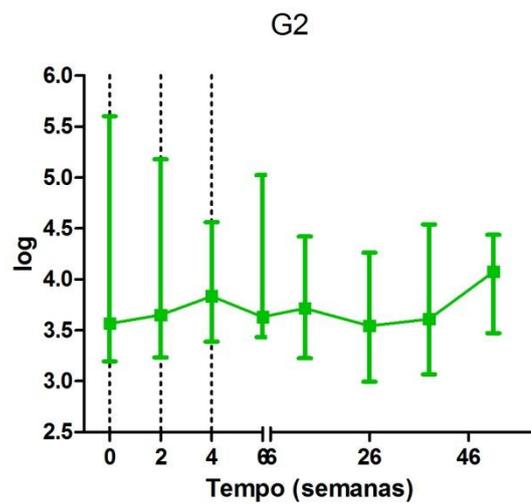
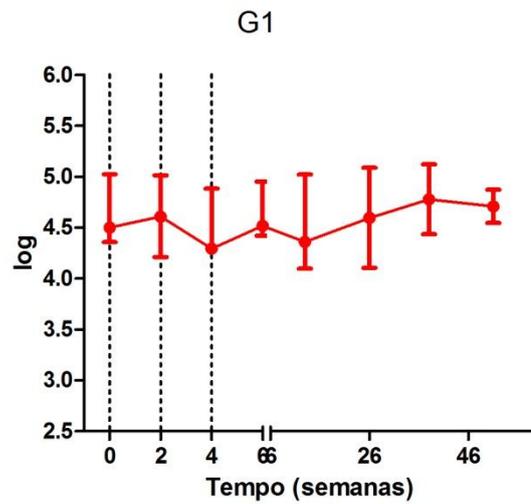
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO U - MEDIANAS DE Δ Tregs COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



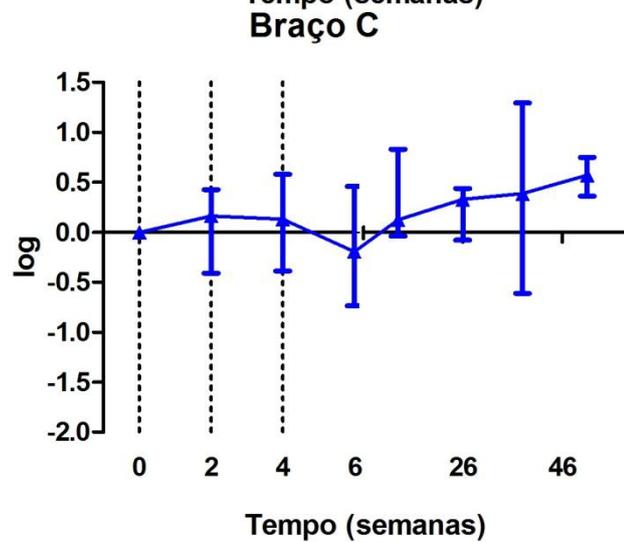
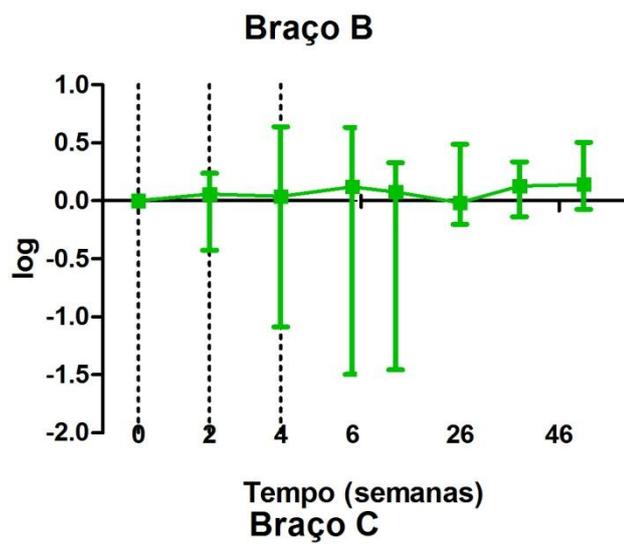
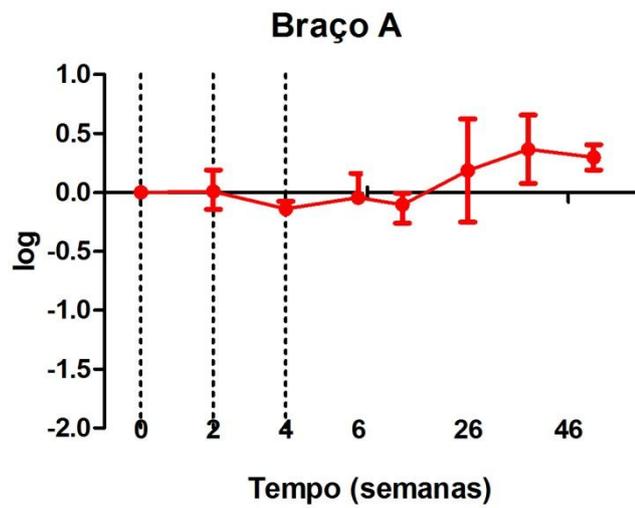
Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO V - MEDIANAS DA CV DOS GRUPOS COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

ANEXO X - MEDIANAS DOS ΔCV COM AMPLITUDE DAS CONTAGENS



Nota: as linhas tracejadas verticais referem-se aos momentos da aplicação da vacina (0, 2 e 4 semanas).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(13):853-60.
2. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. *Lancet*. 1998;352(9142):1725-30.
3. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278(5341):1295-300.
4. Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: The main obstacles to viral eradication. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(1):91-7.
5. Fauci AS, Folkers GK, Dieffenbach CW. HIV-AIDS: much accomplished, much to do. *Nature Immunology*. 2013;14(11):1104-7.
6. Lewis W, Dalakas MC. MITOCHONDRIAL TOXICITY OF ANTIVIRAL DRUGS. *Nature Medicine*. 1995;1(5):417-22.
7. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *Aids*. 1998;12(7):F51-F8.
8. Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*. 2000;356(9239):1423-30.
9. Vigouroux C, Maachi M, Nguyen TH, Coussieu C, Gharakhanian S, Funahashi T, et al. Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Aids*. 2003;17(10):1503-11.
10. Clavel F, Hance AJ. Medical progress: HIV drug resistance. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(10):1023-35.
11. Cozzi-Lepri A, Phillips AN, Clotet B, Mocroft A, Ruiz L, Kirk O, et al. Detection of HIV drug resistance during antiretroviral treatment and clinical progression in a large European cohort study. *Aids*. 2008;22(16):2187-98.
12. Lane HC, Siegel JP, Rook AH, Masur H, Gelmann EP, Quinnan GV, et al. USE OF INTERLEUKIN-2 IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. *Journal of Biological Response Modifiers*. 1984;3(5):512-6.
13. Vanham G, Van Gulck E. Can immunotherapy be useful as a "functional cure" for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology*. 2012;9.
14. Smith PL, Tanner H, Dalgleish A. Developments in HIV-1 immunotherapy and therapeutic vaccination. *F1000Prime Reports*2014.
15. Cillo AR, Mellors JW. Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? *Current Opinion in Virology*. 2016;18:14-9.
16. Karpas A, Hill F, Youle M, Cullen V, Gray J, Byron N, et al. EFFECTS OF PASSIVE-IMMUNIZATION IN PATIENTS WITH THE ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME-RELATED COMPLEX AND ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(23):9234-7.
17. Vittecoq D, Mattlinger B, Barresinoussi F, Courouce AM, Rouzioux C, Doinel C, et al. PASSIVE IMMUNOTHERAPY IN AIDS - A RANDOMIZED TRIAL OF SERIAL HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS POSITIVE TRANSFUSIONS OF PLASMA RICH IN P24 ANTIBODIES VERSUS TRANSFUSIONS OF SERONEGATIVE PLASMA. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(2):364-8.

18. Levy J, Youvan T, Lee ML. PASSIVE HYPERIMMUNE PLASMA THERAPY IN THE TREATMENT OF ACQUIRED-IMMUNODEFICIENCY-SYNDROME - RESULTS OF A 12-MONTH MULTICENTER DOUBLE-BLIND CONTROLLED TRIAL. *Blood*. 1994;84(7):2130-5.
19. Lin SJ, Roberts RL, Ank BJ, Nguyen QH, Thomas EK, Stiehm ER. Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on activated natural killer (ANK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in HIV infection. *Journal of Clinical Immunology*. 1998;18(5):335-45.
20. Abrams D, Levy Y, Losso MH, Babilker A, Collins G, Cooper DA, et al. Interleukin-2 Therapy in Patients with HIV Infection. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(16):1548-59.
21. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard J-P, Goujard C, Lelievre J-D, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(4):997-1007.
22. Azzoni L, Foulkes AS, Papasavvas E, Mexas AM, Lynn KM, Mounzer K, et al. Pegylated Interferon Alfa-2a Monotherapy Results in Suppression of HIV Type 1 Replication and Decreased Cell-Associated HIV DNA Integration. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;207(2):213-22.
23. Riddell SR, Greenberg PD. PRINCIPLES FOR ADOPTIVE T-CELL THERAPY OF HUMAN VIRAL DISEASES. *Annual Review of Immunology*. 1995;13:545-86.
24. Lieberman J, Skolnik PR, Parkerson GR, Fabry JA, Landry B, Bethel J, et al. Safety of autologous, ex vivo expanded human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte infusion in HIV-infected patients. *Blood*. 1997;90(6):2196-206.
25. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shaper 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 Research and Human Retroviruses*. 1998;14(7):551-60.
26. Leibman RS, Riley JL. Engineering T Cells to Functionally Cure HIV-1 Infection. *Molecular Therapy*. 2015;23(7):1149-59.
27. Bachmann MF, Dyer MR. Opinion - Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004;3(1):81-8A.
28. Carcelain G, Autran B. Immune interventions in HIV infection. *Immunological Reviews*. 2013;254:355-71.
29. Stone R. SWINE FLU OUTBREAK China First to Vaccinate Against Novel H1N1 Virus. *Science*. 2009;325(5947):1482-3.
30. **Organization WH. Pandemic influenza vaccine**

manufacturing process and timeline: pandemic

- (H1N1) 2009 briefing note 7** Geneva2009 [Available from: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_vaccine_20090806/en/].
31. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(12):889-93.
 32. Strugnell R, Zepp F, Cunningham A, Tantawichien T. Vaccine antigens. *Perspectives in Vaccinology*. 2011;1(1):61-88.
 33. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
 34. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*. 2011;12(6):509-17.

35. Nabel GJ. GLOBAL HEALTH Designing Tomorrow's Vaccines. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(6):551-60.
36. Koup RA, Graham BS, Douek DC. The quest for a T cell-based immune correlate of protection against HIV: a story of trials and errors. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(1):65-70.
37. Corey L, Gilbert PB, Tomaras GD, Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. *Science Translational Medicine*. 2015;7(310):9.
38. Fowke KR, Nagelkerke NJD, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996;348(9038):1347-51.
39. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, Stanley M, et al. LONG-TERM HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS INFECTION IN ASYMPTOMATIC HOMOSEXUAL AND BISEXUAL MEN WITH NORMAL CD4+ LYMPHOCYTE COUNTS - IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL CHARACTERISTICS. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;163(5):959-65.
40. 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.
41. Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, et al. REDUCED RATE OF DISEASE DEVELOPMENT AFTER HIV-2 INFECTION AS COMPARED TO HIV-1. *Science*. 1994;265(5178):1587-90.
42. Gandhi RT, Kwon DS, Macklin EA, Shopis JR, McLean AP, McBrine N, et al. Immunization of HIV-1-Infected Persons With Autologous Dendritic Cells Transfected With mRNA Encoding HIV-1 Gag and Nef: Results of a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2016;71(3):246-53.
43. Koup RA, Safrit JT, Cao YZ, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. TEMPORAL ASSOCIATION OF CELLULAR IMMUNE-RESPONSES WITH THE INITIAL CONTROL OF VIREMIA IN PRIMARY HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 SYNDROME. *Journal of Virology*. 1994;68(7):4650-5.
44. Perreau M, Levy Y, Pantaleo G. Immune response to HIV. *Current Opinion in Hiv and Aids*. 2013;8(4):333-40.
45. Girard M, Kieny MP, Pinter A, Barresinoussi F, Nara P, Kolbe H, et al. IMMUNIZATION OF CHIMPANZEES CONFERS PROTECTION AGAINST CHALLENGE WITH HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(2):542-6.
46. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine*. 2000;6(2):207-10.
47. Parren P, Marx PA, Hessel AJ, Luckay A, Harouse J, Cheng-Mayer C, et al. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *Journal of Virology*. 2001;75(17):8340-7.
48. Kwong PD, Mascola JR. Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies. *Immunity*. 2012;37(3):412-25.
49. Gray ES, Madiga MC, Hermanus T, Moore PL, Wibmer CK, Tumba NL, et al. The Neutralization Breadth of HIV-1 Develops Incrementally over Four Years and Is

- Associated with CD4(+) T Cell Decline and High Viral Load during Acute Infection. *Journal of Virology*. 2011;85(10):4828-40.
50. Mikell I, Sather DN, Kalams SA, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. Characteristics of the Earliest Cross-Neutralizing Antibody Response to HIV-1. *Plos Pathogens*. 2011;7(1):15.
51. Plotkin SA. Correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47(3):401-9.
52. Plotkin SA. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(7):1055-65.
53. Piantadosi A, Panteleeff D, Blish CA, Baeten JM, Jaoko W, McClelland RS, et al. Breadth of Neutralizing Antibody Response to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Affected by Factors Early in Infection but Does Not Influence Disease Progression. *Journal of Virology*. 2009;83(19):10269-74.
54. Euler Z, van Gils MJ, Bunnik EM, Phung P, Schweighardt B, Wrin T, et al. Cross-Reactive Neutralizing Humoral Immunity Does Not Protect from HIV Type 1 Disease Progression. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(7):1045-53.
55. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(14):1275-86.
56. Smalls-Mantey A, Doria-Rose N, Klein R, Patamawenu A, Migueles SA, Ko SY, et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Primary HIV-Infected CD4(+) T Cells Is Directly Associated with the Magnitude of Surface IgG Binding. *Journal of Virology*. 2012;86(16):8672-80.
57. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Simon MA, Lifton MA, Lin WY, et al. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 2003;77(3):2165-73.
58. Huang KHG, Bonsall D, Katzourakis A, Thomson EC, Fidler SJ, Main J, et al. B-cell depletion reveals a role for antibodies in the control of chronic HIV-1 infection. *Nature Communications*. 2010;1:7.
59. Chakrabarti LA, Simon V. Immune mechanisms of HIV control. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(4):488-96.
60. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 2011;473(7348):523-U270.
61. Walker B, McMichael A. The T-Cell Response to HIV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(11):19.
62. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. VIRUS-SPECIFIC CD8+ CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ACTIVITY ASSOCIATED WITH CONTROL OF VIREMIA IN PRIMARY HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 INFECTION. *Journal of Virology*. 1994;68(9):6103-10.
63. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. LYMPHOCYTES-CD8+ CAN CONTROL HIV-INFECTION INVITRO BY SUPPRESSING VIRUS-REPLICATION. *Science*. 1986;234(4783):1563-6.
64. Goonetilleke N, Liu MKP, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Gansarov VV, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(6):1253-72.
65. Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-

specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *Journal of Virology*. 2003;77(3):2081-92.

66. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, et al. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: Relationship to viral load in untreated HIV infection. *Journal of Virology*. 2001;75(24):11983-91.

67. Phillips RE, Rowlandjones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, et al. HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS GENETIC-VARIATION THAT CAN ESCAPE CYTOTOXIC T-CELL RECOGNITION. *Nature*. 1991;354(6353):453-9.

68. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(6):991-8.

69. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8(+) lymphocytes. *Science*. 1999;283(5403):857-60.

70. Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(9):1758-65.

71. 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.

72. Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(7):487-98.

73. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, et al. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 1999;73(8):6715-20.

74. Chevalier MF, Julg B, Pyo A, Flanders M, Ranasinghe S, Soghoian DZ, et al. HIV-1-Specific Interleukin-21(+) CD4(+) T Cell Responses Contribute to Durable Viral Control through the Modulation of HIV-Specific CD8(+) T Cell Function. *Journal of Virology*. 2011;85(2):733-41.

75. Ritchie AJ, Campion SL, Kopycinski J, Moodie Z, Wang ZM, Pandya K, et al. Differences in HIV-Specific T Cell Responses between HIV-Exposed and -Unexposed HIV-Seronegative Individuals. *Journal of Virology*. 2011;85(7):3507-16.

76. Theze J, Chakrabarti LA, Vingert B, Porichis F, Kaufmann DE. HIV controllers: A multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clinical Immunology*. 2011;141(1):15-30.

77. Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, et al. HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cell Responses During Acute HIV Infection Predict Disease Outcome. *Science Translational Medicine*. 2012;4(123):10.

78. Fazekas de St Groth B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response.? *Aids*. 2008;22(6):671-83.

79. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood*. 2013;121(1):29-37.

80. Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, et al. A Low T Regulatory Cell Response May Contribute to Both Viral Control and Generalized Immune Activation in HIV Controllers. *Plos One*. 2011;6(1):10.

81. Card CM, McLaren PJ, Wachihhi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased Immune Activation in Resistance to HIV-1 Infection Is Associated with an Elevated Frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(9):1318-22.
82. Macatangay BJC, Rinaldo CR. Regulatory T cells in HIV immunotherapy. *HIV therapy*. 2010;4(6):639-47.
83. Jenabian MA, Ancuta P, Gilmore N, Routy JP. Regulatory T Cells in HIV Infection: Can Immunotherapy Regulate the Regulator? *Clinical & Developmental Immunology*. 2012.
84. Barouch DH, Ghneim K, Bosche WJ, Li Y, Berkemeier B, Hull M, et al. Rapid Inflammasome Activation following Mucosal SIV Infection of Rhesus Monkeys. *Cell*. 2016;165(3):656-67.
85. Haynes BF, Shattock RJ. Critical issues in mucosal immunity for HIV-1 vaccine development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;122(1):3-9.
86. Broliden K, Haase AT, Ahuja SK, Shearer GM, Andersson J. Introduction: Back to basics: mucosal immunity and novel HIV vaccine concepts. *Journal of Internal Medicine*. 2009;265(1):5-17.
87. Ploquin MJY, Jacquelin B, Jochems SP, Barre-Sinoussi F, Mueller-Trutwin MC. Innate immunity in the control of HIV/AIDS: recent advances and open questions. *Aids*. 2012;26(10):1269-79.
88. Altfeld M, Gale M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nature Immunology*. 2015;16(6):554-62.
89. Klein M. Prospects and challenges for prophylactic and therapeutic HIV vaccines. *Vaccine*. 2003;21(7-8):616-9.
90. Virgin HW, Walker BD. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature*. 2010;464(7286):224-31.
91. McElrath MJ, Haynes BF. Induction of Immunity to Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Vaccination. *Immunity*. 2010;33(4):542-54.
92. Johnson RP, Desrosiers RC. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Current Opinion in Immunology*. 1998;10(4):436-43.
93. Liang XP, Casimiro DR, Schleif WA, Wang FB, Davies ME, Zhang ZQ, et al. Vectored Gag and Env but not Tat show efficacy against simian-human immunodeficiency virus 89.6p challenge in Mamu-A*01-negative rhesus monkeys. *Journal of Virology*. 2005;79(19):12321-31.
94. Koopman G, Beenhakker N, Hofman S, Walther-Jallow L, Makitalo B, Mooij P, et al. Immunization with apoptotic pseudovirus transduced cells induces both cellular and humoral responses: A proof of concept study in macaques. *Vaccine*. 2012;30(15):2523-34.
95. Girard MP, Plotkin SA. HIV vaccine development at the turn of the 21st century. *Current Opinion in Hiv and Aids*. 2012;7(1):4-9.
96. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*. 2013;31(35):3502-18.
97. Prevention AGAfH. *Clinical Trials Update*.
98. Steinman RM, Cohn ZA. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *Journal of Experimental Medicine*. 1973;137(5):1142-62.
99. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
100. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*. 2001;2(7):585-9.

101. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jojic V, Cohain A, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*. 2012;13(9):888-99.
102. Steinman R, Inaba K. IMMUNOGENICITY - ROLE OF DENDRITIC CELLS. *Bioessays*. 1989;10(5):145-52.
103. Steinman RM. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology*. 2007;37:S53-S60.
104. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annual Review of Immunology*. 2008;26:293-316.
105. Gaborilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(12):941-52.
106. Grassi F, Hosmalin A, McIlroy D, Calvez V, Debre P, Autran B. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *Aids*. 1999;13(7):759-66.
107. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*. 2001;98(8):2574-6.
108. Jones GJ, Watera C, Patterson S, Rutebemberwa A, Kaleebu P, Whitworth JA, et al. Comparative loss and maturation of peripheral blood dendritic cell subpopulations in African and non-African HIV-1-infected patients. *Aids*. 2001;15(13):1657-63.
109. Barratt-Boyes SM, Wijewardana V, Brown KN. In acute pathogenic SIV infection plasmacytoid dendritic cells are depleted from blood and lymph nodes despite mobilization. *Journal of Medical Primatology*. 2010;39(4):235-42.
110. Wonderlich ER, Kader M, Wijewardana V, Barratt-Boyes SM. Dissecting the role of dendritic cells in simian immunodeficiency virus infection and AIDS. *Immunologic Research*. 2011;50(2-3):228-34.
111. Wijewardana V, Kristoff J, Xu CL, Ma DZ, Haret-Richter G, Stock JL, et al. Kinetics of Myeloid Dendritic Cell Trafficking and Activation: Impact on Progressive, Nonprogressive and Controlled SIV Infections. *Plos Pathogens*. 2013;9(10):18.
112. van der Sluis RM, van Montfort T, Pollakis G, Sanders RW, Speijer D, Berkhout B, et al. Dendritic Cell-induced Activation of Latent HIV-1 Provirus in Actively Proliferating Primary T Lymphocytes. *Plos Pathogens*. 2013;9(3).
113. Norton TD, Miller EA, Bhardwaj N, Landau NR. Vpx-containing dendritic cell vaccine induces CTLs and reactivates latent HIV-1 in vitro. *Gene Therapy*. 2015;22(3):227-36.
114. Engelmayer J, Larsson M, Lee A, Lee M, Cox WI, Steinman RM, et al. Mature dendritic cells infected with canarypox virus elicit strong anti-human immunodeficiency virus CD8(+) and CD4(+) T-cell responses from chronically infected individuals. *Journal of Virology*. 2001;75(5):2142-53.
115. 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. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(4):1109-18.
116. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. PROLIFERATING DENDRITIC CELL PROGENITORS IN HUMAN BLOOD. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;180(1):83-93.
117. Altfeld M, Addo MM, Shankarappa R, Lee PK, Allen TM, Yu XG, et al. Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses

- to highly variable regions by using peptides based on autologous virus sequences. *Journal of Virology*. 2003;77(13):7330-40.
118. 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. *Journal of Virology*. 1998;72(10):7992-8001.
119. Chertova E, Crise BJ, Morcock DR, Bess JW, Henderson LE, Lifson JD. Sites, mechanism of action and lack of reversibility of primate lentivirus inactivation by preferential covalent modification of virion internal proteins. *Current Molecular Medicine*. 2003;3(3):265-72.
120. Lu W, Andrieu JM. In vitro human immunodeficiency virus eradication by autologous CD8(+) T cells expanded with inactivated-virus-pulsed dendritic cells. *Journal of Virology*. 2001;75(19):8949-56.
121. Lapenta C, Santini SM, Logozzi M, Spada M, Andreotti M, Di Pucchio T, et al. Potent immune response against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(2):361-7.
122. Lu W, Wu XX, Lu YZ, Guo WZ, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nature Medicine*. 2003;9(1):27-32.
123. Garcia F, Routy J-P. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. *Vaccine*. 2011;29(38):6454-63.
124. Use ICfHoTRfPfH. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, GENERAL CONSIDERATIONS FOR CLINICAL TRIALS E81997 13 JAN 2017. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E8/Step4/E8_Guideline.pdf.
125. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature Medicine*. 2004;10(12):1359-65.
126. 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. *Science Translational Medicine*. 2013;5(166).
127. Shapero MH, Kundu SK, Engleman E, Laus R, van Schooten WCA, Merigan TC. In vivo persistence of donor cells following adoptive transfer of allogeneic dendritic cells in HIV-infected patients. *Cell Transplantation*. 2000;9(3):307-17.
128. 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. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15(2):284-92.
129. Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(10):1680-5.
130. Prevention CfDCa, Health NIo. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4th ed1999.
131. Group ACT. Laboratory Technologist Committee.
132. Técnicas A-ABdN. NBR 12808 - Resíduos de Serviço de Saúde. Classificação. 1993.
133. Técnicas A-ABdN. NBR 12809 - Manuseio de Resíduos de Serviço de Saúde. 1993.

134. Organization WH. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. 2nd ed2009.
135. Saúde CND, (CNS). Resolução 441 de 12 de maio de 2011. 2011.
136. (ICH) ICoHoTRfRoPfHU. POST-APPROVAL SAFETY DATA MANAGEMENT: DEFINITIONS AND STANDARDS FOR EXPEDITED REPORTING E2D. 2003.
137. Institute NC. Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v 4.0. 2009.
138. (DAIDS) DoA. Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. 2014.
139. Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2015;108(1):32-7.
140. Reps J, Garibaldi J, Aickelin U, Gibson J, Hubbard R. A supervised adverse drug reaction signalling framework imitating Bradford Hill's causality considerations. *Journal of Biomedical Informatics*2015.
141. (CIOMS) CfIOoMS. Management of Safety Information from Clinical Trials: Report of CIOMS Working Group VI. 2005.
142. Center DRS. Manual for Expedited Reporting of Adverse Events to Division of AIDS. 2010.
143. Halsey NA, Edwards KM, Dekker CL, Klein NP, Baxter R, LaRussa P, et al. Algorithm to assess causality after individual adverse events following immunizations. *Vaccine*. 2012;30(39):5791-8.
144. Comissão, Pesquisa-CAPPesq dÉpAdPd. Formulário para Encaminhamento de Relatos de Eventos Adversos. 2015.
145. Dixon JJ. The International Conference on Harmonization Good Clinical Practice guideline. 1998. p. 65-74.
146. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *Journal of Biomedical Informatics*. 2009;42(2):377-81.
147. Health NIo. *ClinicalTrials.gov*.
148. HCFMUSP DdLCd. Manual de Exames.
149. Physicians ACoE. ER 101: Vital Signs.
150. Cardiologia SBd. Cálculos em Cardiologia. 2014.
151. Garcia F, Climent N, Assoumou L, Gil C, Gonzalez N, Alcami J, et al. A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(4):473-8.
152. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(5):411-22.
153. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):265-77.
154. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity*. 2013;39(1):38-48.

155. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Persistent abnormalities in peripheral blood dendritic cells and monocytes from HIV-1-positive patients after 1 year of antiretroviral therapy. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2006;41(4):405-15.
156. Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, Qin L, Hu N, Taylor E, et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood*. 2010;116(19):3839-52.
157. Inaba K, Steinman RM, Vanvoorhis WC, Muramatsu S. DENDRITIC CELLS ARE CRITICAL ACCESSORY CELLS FOR THYMUS-DEPENDENT ANTIBODY-RESPONSES IN MOUSE AND IN MAN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1983;80(19):6041-5.
158. Inaba K, Steinman RM. PROTEIN-SPECIFIC HELPER LYMPHOCYTE-T FORMATION INITIATED BY DENDRITIC CELLS. *Science*. 1985;229(4712):475-9.
159. Inaba K, Young JW, Steinman RM. DIRECT ACTIVATION OF CD8+ CYTOTOXIC LYMPHOCYTE-T BY DENDRITIC CELLS. *Journal of Experimental Medicine*. 1987;166(1):182-94.
160. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST AeHV. *Boletim Epidemiológico - Aids e DST*. 2014.
161. Birx DL, Loomis-Price LD, Aronson N, Brundage J, Davis C, Deyton L, et al. Efficacy testing of recombinant human immunodeficiency virus (HIV) gp160 as a therapeutic vaccine in early-stage HIV-1-infected volunteers. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(3):881-9.
162. Group ISS. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med* 2015. p. 795-807.
163. Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med* 2007. p. 114-7.
164. 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. *European Journal of Immunology*. 2014;44(9):2802-10.
165. Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Williams AL, Chenine AL, McClure HM, Anderson DC, et al. Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *Aids*. 2003;17(2):157-66.
166. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. RAPID TURNOVER OF PLASMA VIRIONS AND CD4 LYMPHOCYTES IN HIV-1 INFECTION. *Nature*. 1995;373(6510):123-6.
167. Mansky LM, Temin HM. LOWER IN-VIVO MUTATION-RATE OF HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 THAN THAT PREDICTED FROM THE FIDELITY OF PURIFIED REVERSE-TRANSCRIPTASE. *Journal of Virology*. 1995;69(8):5087-94.
168. Wallgren AC, Andersson B, Backer A, Karlsson-Parra A. Direct allorecognition promotes activation of bystander dendritic cells and licenses them for Th1 priming: A functional link between direct and indirect allosensitization. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2005;62(3):234-42.
169. de Gruijl TD, van den Eertwegh AJM, Pinedo HM, Scheper RJ. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2008;57(10):1569-77.
170. da Silva LT, Pontillo A, da Silva WC, de Almeida A, da Silva Duarte AJ, Oshiro TM. Autologous and allogeneic systems of HIV expansion: what is the better choice for clinical application in therapeutic vaccine? *Immunotherapy*. 2013;5(12):1305-11.

171. Whiteside TL, Piazza P, Reiter A, Stanson J, Connolly NC, Rinaldo CR, Jr., et al. Production of a Dendritic Cell-Based Vaccine Containing Inactivated Autologous Virus for Therapy of Patients with Chronic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(2):233-40.
172. Yamamoto JK, Barresinoussi F, Bolton V, Pedersen NC, Gardner MB. HUMAN ALPHA-INTERFERON AND INTERFERON-BETA BUT NOT GAMMA-INTERFERON SUPPRESS THE INVITRO REPLICATION OF LAV, HTLV-III, AND ARV-2. *Journal of Interferon Research*. 1986;6(2):143-52.
173. Meylan PRA, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD, Kornbluth RS. MECHANISMS FOR THE INHIBITION OF HIV REPLICATION BY INTERFERON-ALPHA, INTERFERON-BETA, AND INTERFERON-GAMMA IN PRIMARY HUMAN MACROPHAGES. *Virology*. 1993;193(1):138-48.
174. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, Steinman RM, et al. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(13):2887-93.
175. Coleman CM, Spearman P, Wu L. Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology*. 2011;8.
176. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*. 2011;474(7353):658-U137.
177. Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(2):125-35.
178. Gruetter MG, Luban J. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(2):142-50.
179. Singh MV, Davidson DC, Kiebal M, Maggirwar SB. Detection of circulating platelet-monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *Journal of Virological Methods*. 2012;181(2):170-6.
180. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(7):532-42.
181. Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, et al. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated human immunodeficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*. 2010;71(6):541-50.
182. Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, Corbeil J, et al. HIV/SIV Infection Primes Monocytes and Dendritic Cells for Apoptosis. *Plos Pathogens*. 2011;7(6):16.
183. Unidade de Pesquisa de Vacinas Anti-HIV de São Paulo C-DA, FMUSP e. Reporter Vacinas. 2012.
184. Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K. Novel Flow Cytometry-Based Screening for Bacterial Contamination of Donor Platelet Preparations Compared with Other Rapid Screening Methods. *Clinical Chemistry*. 2009;55(8):1492-502.
185. Bhusari P, Tabor D, Yamagata R, Galinski M. Application of flow cytometry for rapid bioburden screening in vaccine virus production. *PDA J Pharm Sci Technol* 2012. p. 445-52.
186. Hegde S, Pahne J, Smola-Hess S. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappa B binding activity and CCR7 expression. *Faseb Journal*. 2004;18(10):1439-+.

187. Ramirez PW, Famiglietti M, Sowrirajan B, DePaula-Silva AB, Rodesch C, Barker E, et al. Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu Results in Impaired Migration and Chemotactic Signaling within CD4(+) T Cells. *Cell Reports*. 2014;7(6):2019-30.
188. Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunological Reviews*. 2000;177:141-9.
189. Figdor CG, de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*. 2004;10(5):475-80.
190. Rinaldo CR. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *Journal of Internal Medicine*. 2009;265(1):138-58.
191. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage (vol 13, pg 1145, 2012). *Nature Immunology*. 2013;14(4):413-.
192. Turville SG, Arthos J, Mac Donald K, Lynch G, Naif H, Clark G, et al. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood*. 2001;98(8):2482-8.
193. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature Immunology*. 2002;3(10):975-83.
194. Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman KA, Shin A, Beecroft T, et al. Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood*. 2003;102(5):1753-63.
195. Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *Journal of Immunology*. 2005;175(7):4265-73.
196. Seale AC, de Jong BC, Zaidi I, Duvall M, Whittle H, Rowland-Jones S, et al. Effects of cryopreservation on CD4+CD25+T cells of HIV-1 infected individuals. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2008;22(3):153-8.
197. Elkord E. Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *Journal of Immunological Methods*. 2009;347(1-2):87-90.
198. Sattui S, de la Flor C, Sanchez C, Lewis D, Lopez G, Rizo-Patron E, et al. Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2012;82B(1):54-8.
199. Macatangay BJC, Szajnik ME, Whiteside TL, Riddler SA, Rinaldo CR. Regulatory T Cell Suppression of Gag-Specific CD8(+) T Cell Polyfunctional Response After Therapeutic Vaccination of HIV-1-Infected Patients on ART. *Plos One*. 2010;5(3):9.
200. Brezar V, Ruffin N, Richert L, Surenaud M, Lacabaratz C, Palucka K, et al. Decreased HIV-Specific T-Regulatory Responses Are Associated with Effective DC-Vaccine Induced Immunity. *Plos Pathogens*. 2015;11(3).
201. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International Immunology*. 2007;19(4):345-54.
202. Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108(12):3808-17.
203. Ji JX, Cloyd MW. HIV-1 binding to CD4 on CD4(+)CD25(+) regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in,

- peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *International Immunology*. 2009;21(3):283-94.
204. Becker C, Taube C, Bopp T, Michel K, Kubach J, Reuter S, et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Blood*. 2009;114(6):1263-9.
205. Krathwohl MD, Schacker TW, Anderson JL. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;193(4):494-504.
206. Presicce P, Shaw JM, Miller CJ, Shacklett BL, Chougnet CA. Myeloid dendritic cells isolated from tissues of SIV-infected Rhesus macaques promote the induction of regulatory T cells. *Aids*. 2012;26(3):263-73.
207. 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. *Nature Medicine*. 2006;12(12):1365-71.
208. Fauci AS, Marovich MA, Dieffenbach CW, Hunter E, Buchbinder SP. Immune Activation with HIV Vaccines. *Science*. 2014;344(6179):49-51.
209. Yonkers NL, Rodriguez B, Asaad R, Lederman MM, Anthony DD. Systemic Immune Activation in HIV Infection Is Associated with Decreased MDC Responsiveness to TLR Ligand and Inability to Activate Naive CD4 T-Cells. *Plos One*. 2011;6(9).
210. Brenchley JM, Douek DC. Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annual Review of Immunology*, Vol 30. 2012;30:149-73.
211. Teleshova N, Frank I, Pope M. Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;74(5):683-90.
212. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(11):859-68.
213. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends in Immunology*. 2014;35(3):114-22.
214. Piguet V, Steinman RM. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends in Immunology*. 2007;28(11):503-10.
215. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170-9.
216. McDonald D. Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection. *Viruses-Basel*. 2010;2(8):1404-717.
217. Kijewski SDG, Gummuluru S. A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far. *Future Virology*. 2015;10(3):257-69.
218. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003;300(5623):1295-7.
219. Pan BT, Johnstone RM. FATE OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR DURING MATURATION OF SHEEP RETICULOCYTES INVITRO - SELECTIVE EXTERNALIZATION OF THE RECEPTOR. *Cell*. 1983;33(3):967-77.
220. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2005;34(3):214-9.
221. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology*. 2015;6.

222. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JEK. The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10592-7.
223. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, Carmen Puertas M, Borrás FE, Blanco J, et al. HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse? *Plos Pathogens*. 2010;6(3).
224. Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, et al. HIV Nef is Secreted in Exosomes and Triggers Apoptosis in Bystander CD4(+) T Cells. *Traffic*. 2010;11(1):110-22.
225. **Nunnally BK, Turula VE, Sitrin RD.** *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015.
226. Miller E, Spadaccia M, Sabado R, Chertova E, Bess J, Mac Trubey C, et al. Autologous aldrithiol-2-inactivated HIV-1 combined with polyinosinic-polycytidylic acid poly-L-lysine carboxymethylcellulose as a vaccine platform for therapeutic dendritic cell immunotherapy. *Vaccine*. 2015;33(2):388-95.
227. Vogt A, Hadam S, Deckert I, Schmidt J, Stroux A, Afraz Z, et al. Hair follicle targeting, penetration enhancement and Langerhans cell activation make cyanoacrylate skin surface stripping a promising delivery technique for transcutaneous immunization with large molecules and particle-based vaccines. *Experimental Dermatology*. 2015;24(1):73-5.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Versão de 28 de outubro de 2009

I-DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº SEXO : .MF

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

ENDEREÇO

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

(.....).....

II-DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“ESTUDO DE FASE II DA VACINA TERAPÊUTICA PARA HIV COM CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS PRIMADAS COM VÍRUS AUTÓLOGOS INATIVADOS”

PESQUISADOR:Alberto José da Silva Duarte

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado do Departamento de Dermatologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 16 915 (SP)

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica – LIM56; Ambulatório de Imunodeficiências do Serviço de Dermatologia do HC FMUSP

2. OUTRAS INFORMAÇÕES PARA CONTATO (SE NECESSÁRIO)

Nome: Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa – CAPPesq

Presidente: Prof. Dr. Eduardo Massad

Endereço: R. Ovídio Pires de Campos, 225 / sl 505 – Adm.

Pinheiros, São Paulo / SP

CEP: 05403-010

Número de telefone: (11) 3069-6442

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 144 semanas

Prezado Sr(a)

O senhor (a) está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa com a finalidade de se obter uma vacina contra o vírus da aids, que é preparada utilizando o sangue do próprio paciente. Com a amostra de seu sangue será produzida uma vacina só para o senhor (a). Só poderão usar esse tipo de vacina as pessoas que ainda não tomaram qualquer tipo de remédio para tratar a aids, e que tiverem os seus exames de sangue estáveis por, pelo menos seis meses antes da entrada no estudo.

Durante 144 semanas o(a) senhor(a) será acompanhado(a) pela equipe do estudo, e deve se comprometer a comparecer às visitas pré-definidas para que o efeito da vacina seja acompanhado de maneira adequada e segura.

Inicialmente, para sua inclusão no estudo, serão coletados, cerca de 70 mL de sangue para realizar os seguintes exames: análises para CD4, CD8, carga viral, testes para avaliar a possibilidade de auto-agressão pelo sistema imune, hemograma, exames para avaliar função do fígado e rins, dosagem da glicose sanguínea, exames para hepatites e infecção por um vírus chamado HTLV (relacionado a doenças do sistema imune), teste de gravidez (para mulheres em idade fértil com risco de engravidar). Além disto, será feito o armazenamento de células mononucleadas periféricas (PBMC), plasma e soro, com o objetivo de cultivar o vírus para produção da vacina.

O vírus utilizado na preparação da vacina será retirado das células do seu sangue, que foram coletadas no período pré-vacinal. Antes da produção da vacina esse vírus será morto (inativado) no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP.

Para preparar a vacina é necessário também retirar do seu sangue células específicas, através de um procedimento chamado aférese, que será realizado na Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo. Toda a produção da vacina utilizará seu próprio sangue e materiais esterilizados, garantindo sua segurança e a do profissional que realizará o procedimento. Para uma melhor compreensão dos métodos que serão adotados, leia com atenção os itens abaixo, os quais lhe serão também explicados com detalhes.

A aférese é um procedimento considerado seguro, semelhante a uma doação de sangue, e será realizado por um médico especializado do Hemocentro. Este procedimento é feito também para pacientes com leucemia e não há relatos, de problemas graves decorrentes deste procedimento médico nos pacientes que foram vacinados na primeira fase de um estudo de vacina para aids, semelhante a este. Alguns pacientes podem sentir sintomas leves como: tontura, sudorese, mal-estar, queda da pressão arterial, tremores, calafrios, formigamento, náuseas, vômitos e hematomas na região de punção.

No dia da aférese, serão introduzidas duas (02) agulhas no seu braço para que o sangue saia e depois volte para seu corpo.

O processo tem duração total de cerca de 2 horas. A sua pressão sanguínea e respiração serão monitoradas durante todo o tempo da aférese, e também serão realizados, no próprio Hemocentro, exames de sangue (coagulograma e hemograma completo, que tem a contagem de células vermelhas, células brancas e plaquetas) para controlar o seu estado de saúde. O(A) senhor (a) não estará perdendo sangue, ocorrerá apenas a retirada das células necessárias para a sua vacina, em um volume de cerca de 150 mL de sangue. Uma amostra de 10 mL de sangue será coletada ao final da aférese para realização de hemograma completo.

Se necessário, será prestado socorro imediato pelo médico hematologista do Hemocentro e pelo médico do projeto, acompanhando o senhor (a) ao setor de emergência.

Se o numero de vírus e/ou células obtidos não for suficiente para o preparo da vacina, mesmo que o senhor (a) tenha feito a aférese, não será possível produzir a vacina e por isso o senhor (a) não poderá ser vacinado e terá que deixar o estudo.

Caso seja incluído(a) no estudo, o sr(a) receberá a vacina, que terá sua aplicação dividida em quatro locais do seu corpo: debaixo dos dois braços e na parte interna das coxas, por via subcutânea (0,5 ml em cada local), por um profissional capacitado, utilizando material estéril. Antes da aplicação da vacina, será recolhida uma alíquota de 10 ml de sangue que será identificada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada por 05 anos em recipiente estéril para eventuais análises posteriores. A aplicação da vacina será realizada no HCFMUSP. Serão aplicadas três doses com intervalo de 15 dias. É muito importante que o senhor receba as três doses para a melhor resposta imunológica contra o vírus.

O(A) senhor (a) será submetido a exames periódicos e pré-definidos durante todo o estudo, com intuito de avaliar sua resposta ao tratamento com a vacina e eventuais efeitos adversos que ela possa provocar. Para isso, cerca de 70mL de sangue serão coletados em visitas pré-estabelecidas, para pesquisa da carga viral, números das células de defesa e dosagem das enzimas do fígado e rim, testes para avaliar a possibilidade de auto-agressão pelo sistema imune, hemograma, dosagem da glicose sanguínea e teste de gravidez (para mulheres em idade fértil com risco de engravidar).

Os efeitos indesejáveis esperados com a aplicação da vacina são mínimos como, por exemplo, vermelhidão e dor leve no local de aplicação da vacina e febre baixa. Entretanto, todos os sintomas que o(a) senhor(a) venha a apresentar devem ser relatados imediatamente ao seu médico.

Os testes iniciais não mostraram efeitos colaterais graves provocados pelo uso da vacina, entretanto, os médicos e enfermeiros envolvidos no projeto estão prontos para prestar-lhe socorro imediato durante o período que estiver recebendo as doses da vacina, e mesmo durante todo o período que estiver sob observação, dando pronto atendimento ambulatorial ou encaminhando-o(a) ao serviço de emergência, se por ventura isto se fizer necessário.

Se por ventura o(a) senhor(a) apresentar reações indesejáveis importantes à vacina, ou piora da evolução da infecção pelo HIV (como diminuição do CD4 e/ou aumento da carga viral e/ou manifestações clínicas definidoras de aids), o esquema de vacinação será interrompido e o tratamento indicado será introduzido.

É preciso que o senhor (a) saiba que este procedimento pode ou não lhe beneficiar, pois vai depender de como suas células irão responder para combater o vírus.

Para participar deste estudo o(a) senhor(a) não pode ter outras doenças como hepatite B, hepatite C, HTLV1 e 2, câncer ou diabetes. Caso tenha alguma história dessas doenças avise o seu médico. Ao aceitar participar deste estudo, o Sr(a) deverá concordar em utilizar métodos contraceptivos sabidamente eficazes (por exemplo: camisinha e anticoncepcional oral). Os métodos mais adequados serão discutidos com a equipe e disponibilizados gratuitamente ao Sr (a). Mulheres em idade fértil deverão realizar teste de gravidez a cada visita. Mulheres grávidas ou amamentando também não podem participar do estudo. Mulheres que vierem a engravidar durante o estudo, serão imediatamente excluídas do mesmo, entretanto continuarão a ser acompanhadas pela equipe do estudo até que seja determinado que não há risco para sua saúde. Caso seja julgado necessário, os filho(a)(s) desta gestação também será (serão) acompanhado(a)(s) após o nascimento até que seja determinado que não há risco para a saúde dele (a)(s). Da mesma forma, parceiras dos participantes que porventura vierem a engravidar durante o estudo, poderão (caso considerado necessário) ser solicitadas a fazer acompanhamento com a equipe até que seja considerado não haver risco para saúde delas.

Caso aceite participar do estudo sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

Sua participação tem grande importância para o estudo e os resultados desta pesquisa poderão gerar benefícios aos indivíduos infectados pelo HIV, por isso solicitamos sua autorização para usar os resultados obtidos no estudo em publicações científicas, preservando sempre o sigilo sobre a sua identidade.

Solicitamos sua autorização para estocar as células (PBMC) e outros materiais biológicos, como soro e plasma, para possíveis estudos posteriores relacionados com esta vacina. Toda a nova pesquisa a ser feita com este material só será realizada após a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (sistema CEP/CONEP) e após sua explícita autorização por escrito. O armazenamento será de até cinco anos, podendo ser renovado mediante solicitação da instituição depositante, acompanhada de justificativa e relatórios pertinentes, bem como a norma/regulamentação da instituição para armazenamento de amostras biológicas humanas.

O(A) senhor(a) pode abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso prejudique o seu tratamento neste ou em outro serviço, e não haverá nenhum ônus pela desistência. Neste caso, é importante avisar ao médico que esta lhe acompanhando, para que o Sr(a) não venha a ter nenhum prejuízo com seu tratamento.

A sua participação neste estudo é de grande valor, visto que os resultados gerados neste estudo poderão significar um grande benefício no tratamento da aids. A nossa expectativa é que a vacina consiga estimular o seu sistema de defesa a lutar contra o HIV, diminuindo ou abolindo a necessidade do tratamento com medicamentos anti-retrovirais.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte. O endereço e telefones para contato com ele e com os seus assistentes estão no final deste documento.

O(A) senhor(a) não terá benefícios financeiros ou de qualquer outra espécie se participar deste estudo. Este é um estudo ainda inicial, mas que tem grande expectativa no controle da doença por períodos longos. Estas respostas, porém, somente serão conhecidas após o término da pesquisa.

Está prevista uma ajuda de custo para despesas com alimentação e transporte nos dias de comparecimento às visitas do estudo. Não está prevista nenhuma outra remuneração por sua participação neste estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa **“ESTUDO DE FASE II DA VACINA TERAPÊUTICA PARA HIV COM CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS PRIMADAS COM VÍRUS AUTÓLOGOS INATIVADOS”**.

Eu recebi orientações do sobre a minha decisão em participar desse 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 isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu Consentimento Livre e Esclarecido a qualquer momento, antes ou durante o transcorrer do estudo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome _____ do _____ participante:
.....RG.....

Endereço.....
.....

Telefone _____ (e-mail).....

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

Assinatura de testemunha Data ____ / ____ / ____

No caso de pacientes 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 ____ / ____ / ____

IMPORTANTE

Em caso de dúvidas, urgências ou emergências o(a) senhor(a) poderá procurar os seguintes médicos:

1. **Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte** (Coordenador do projeto)

Telefone Celular de Emergência : (11) _____ (24 horas)

Sala de Pesquisa da Dermatologia “(11) 3069.8006 (08 – 17 horas)
LIM 56. Dermatologia USP :(11) 3061 7499 / 3061 7457 (7–17horas)

2. Dr. Jorge Casseb

Telefone Celular de Emergência : (11) _____(24 horas)
Sala de Pesquisa da Dermatologia “(11) 3069.8006 (08 – 17 horas)
LIM 56. Dermatologia USP :(11) 3061 7499 / 3061 7457 (7–17horas)

3. Dr. Alexandre de Almeida

Telefone Celular de Emergência : (11) _____ (24 horas)
Sala de Pesquisa da Dermatologia “(11) 3069.8006 (08 – 17 horas)
LIM 56. Dermatologia USP :(11) 3061 7499 / 3061 7457 (7–17horas)

4. Dra. Ana Paula Veiga

Telefone Celular de Emergência : (11) _____ (24 horas)
Sala de Pesquisa da Dermatologia “(11) 3069.8006 (08 – 17 horas)
LIM 56. Dermatologia USP :(11) 3061 7499 / 3061 7457 (7–17horas)

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: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20,
FAX: 3069-6442 ramal 26
E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (CRF) *SCREENING*

ESTUDO DE FASE II DA VACINA TERAPÊUTICA PARA HIV COM CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTOLÓGAS PRIMADAS COM VÍRUS AUTÓLOGOS INATIVADOS

ETIQUETA			
Nome: _____			
—			
Nº	do	registro	na
instituição: _____			
Sexo: () masculino () feminino			

SCREENING

Data da visita: ____/____/____

Data da assinatura do TCLE: ____/____/20____

DADOS DEMOGRÁFICOS:

Número de Alocação: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Serviço de Origem: _____

Cor referida: branco negro pardo amarelo

HISTÓRICO E DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE:

1. Primeiro Teste Positivo para HIV

Exame com cópia no prontuário	
Anti-HIV Reagente: ____/____/____	Métodos: _____ ,
Carga Viral: ____/____/____	Nº cópias/mL: _____

O paciente possui algum antecedente e/ou condições concomitantes, alergia a drogas e/ou cirurgias/procedimentos nos últimos 05 anos? Sim Não

CONDIÇÃO	DEFINE AIDS	INÍCIO	FIM	CONTINUA
CONDIÇÃO	DEFINE AIDS	INÍCIO	FIM	CONTINUA

Uso regular de métodos contraceptivos:

Sexo masculino	Sexo feminino
Uso de preservativo	Pílulas, injeções ou implantes hormonais Preservativos feminino
Vasectomia	Tabela Exige o uso de preservativo
Outros	Outros Menopausa/ cirurgia

Medicamentos Concomitantes: (considerar os últimos 6 meses)

MED CONCOMITANTES ()SIM ()NÃO			
MEDICAÇÃO	MOTIVO	INÍCIO	TÉRMINO

Exame clinico:

Normal

Anormal

Não realizado

Sinais vitas:

PA _____

FC _____

TAX _____

FR _____

PESO _____

Últimos exames (Considerar os últimos 06 meses):

	TCD4	%	CV	LOG
DATA				

Sorologias (Considerar os últimos 12 meses)

HBV (___/___/___): reagente não reagente

HCV (___/___/___): reagente não reagente

HTLV (___/___/___): reagente não reagente

Obs: _____

Nome do médico _____ Data ___/___/___

Assinatura _____ CRM _____

APÊNDICE C – FORMULÁRIO DE RELATO DE CASO (CRF) SEGUIMENTO

ESTUDO DE FASE II DA VACINA TERAPÊUTICA PARA HIV COM CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTOLÓGAS PRIMADAS COM VÍRUS AUTÓLOGOS INATIVADOS

ETIQUETA

Nome: _____

–

Nº do registro na instituição: _____

Sexo: () masculino ()feminino

TIPO DE VISITA

Seguimento (V__): Sim Não

Visita de encerramento: Sim Não

Encerramento precoce: Sim Não . Motivo: _____

Visita extra: : Sim Não

Visita pós-gravidez: Sim Não

DATA DA VISITA: ____/____/____

DADOS DEMOGRÁFICOS:

Número de Alocação: _____

Grupo: _____ (PREENCHER SOMENTE APÓS RANDOMIZAÇÃO)

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO (PREENCHER NA V2):

O paciente satisfaz todos os critérios de inclusão no estudo? Sim Não

INTERCORRÊNCIAS

CONDIÇÃO	DEFINE AIDS	INÍCIO	FIM	CONTINUA
CONDIÇÃO	DEFINE AIDS	INÍCIO	FIM	CONTINUA

Apresenta **Evento Adverso Sério** : Sim (PREENCHER NOTIFICAÇÃO) Não

Descrição: _____

Uso regular de métodos contraceptivos:

Sexo masculino	Sexo feminino
Uso de preservativo	Pílulas, injeções ou implantes hormonais Preservativos feminino
Vasectomia	Tabela Exige o uso de preservativo
Outros	Outros Menopausa/ cirurgia

Medicamentos Concomitantes:

MED CONCOMITANTES ()SIM ()NÃO			
MEDICAÇÃO	MOTIVO	INÍCIO	TÉRMINO

Exame clinico:

Normal

Anormal

Não realizado

Sinais vitas:

PA _____

FC _____

TAX _____

FR _____

PESO _____

Exames desde a última visita :

DATA	CD4	%	CD8	%	CV	LOG

DATA	CD3	%	CD38	%	CD107	%	Treg	%	Dioc6	%

DATA	CD3/CD4 IFNg/TNF/IL2	%	CD3/CD8 IFNg/TNF/IL2	%

Obs: para os exs a seguir, só registrar outras datas caso sejam diferentes da primeira informada.

Exame	valor	não realizado (motivo)	não se aplica	data
Glicemia				
AST				
ALT				
Uréia				
Creatinina				
Hb				
Leucócitos				
Plaquetas				
βHCG				
FAN				
HBV				
HCV				
HTLV				

OBS: _____

Nome do médico _____ Data ___/___/___

Assinatura _____ CRM _____