

Nathalia Teixeira Romani

**Influência de diferentes concentrações de
antígeno na composição de uma vacina anti-HIV
baseada em células dendríticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dr^a Telma Miyuki Oshiro
Sumida

São Paulo

2018

Nathalia Teixeira Romani

**Influência de diferentes concentrações de
antígeno na composição de uma vacina anti-HIV
baseada em células dendríticas**

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

Versão corrigida conforme a resolução
CoPGr6018/11

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dra. Telma Miyuki Oshiro
Sumida

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Romani, Nathalia Teixeira

Influência de diferentes concentrações de antígeno na composição de uma vacina anti-HIV baseada em células dendríticas / Nathalia Teixeira Romani. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Telma Miyuki Oshiro Sumida.

Descritores: 1.HIV 2.Células dendríticas
3.Cultura de vírus 4.Imunoterapia 5.Células dendríticas derivadas de monócitos 6.Apresentação do antígeno

USP/FM/DBD-372/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro e Cleusa Romani, por sempre apoiar e incentivar todas as minhas escolhas. Dedico esta vitória com todo meu amor, unicamente, a vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar presente tanto nas horas fáceis quanto nas horas difíceis.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio, amor, carinho e confiança que a mim foi dado e que sempre soube que teria. Agradeço a eles por me ensinarem a superar cada obstáculo na vida da melhor forma. A minha mãe Cleusa, sempre guerreira e forte em todos os obstáculos da vida, meu amor. Ela que foi e sempre será minha melhor amiga e nunca medirá esforços em me ajudar a conquistar meus objetivos da melhor forma. Ao meu pai Pedro, sempre me fez sentir especial e amada, que com todas as suas palavras e conselhos sempre souberam o momento em que precisava escutá-las. Meu eterno porto seguro.

Agradeço a minha orientadora Dra. Telma Oshiro que em vários momentos teve o papel de mãe incentivando através de seu conhecimento a obter um crescimento profissional e pessoal. Agradeço as minhas companheiras de grupo Laís e Wanessa pela amizade e por todos os conhecimentos compartilhados. Agradeço imensamente a Bruna e Marina por todos os momentos difíceis em que passei, sempre estavam prontas em me ajudar, ensinando sobretudo que tudo que se faz em grupo se obtém resultados melhores e recompensadores.

Agradeço a todos os integrantes do LIM 56 pela amizade cativada e por todos ensinamentos compartilhados, em especial à Noemia, Rosangela, Patricia, Tatiana, Eduardo e Ideones pela experiência e conhecimento obtido através do aprimoramento.

Agradeço ao Dr. Alberto José da Silva Duarte pela oportunidade em realizar o mestrado. Agradeço a CAPES ao auxílio técnico e financeiro.

Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	20
2. JUSTIFICATIVA	28
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS	30
5. METODOLOGIA	31
5.1 Casuística	31
5.2 Expansão e Inativação Viral.....	32
5.3 Obtenção de MoDCs.....	33
5.3.1 Obtenção de IL4-DCs imaturas	33
5.3.2 Obtenção de aDC1s imaturas.....	34
5.3.4 Pulso com HIV	34
5.3.5 Obtenção de IL4-DCs maduras	34
5.3.6 Obtenção de aDC1 maduras	35
5.4 Avaliação da internalização de HIV pelas MoDCs	35
5.4.1 Quantificação de partículas virais internalizadas	35
5.4.2 Análise de internalização de partículas por Microscopia Confocal ...	36
5.5 Ensaio para avaliação da produção de IL-12p70 e IL-10.....	38
5.6 Protocolo de cocultivo	38
5.7 Citometria de fluxo	39
5.7.1 Avaliação da viabilidade celular	39

5.7.2	Marcação extracelular.....	40
5.7.3	Marcação intracelular.....	46
5.8	Análise Estatística.....	47
6.	RESULTADOS.....	48
6.1	Cultura de vírus.....	48
6.2	Análise do efeito do pulso viral sobre IL4-DCs	49
6.2.1	Aspecto morfológico de IL4-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV	49
6.2.2	Viabilidade das IL4-DCs	50
6.2.3	Análise das moléculas de superfície nas IL4-DCs.....	51
6.2.4	Avaliação da internalização de partículas do HIV por IL4-DCs.....	57
6.2.4.1	Avaliação quantitativa.....	57
6.2.4.2	Avaliação por imagem	58
6.2.5	Produção de IL-12p70 e IL-10.....	61
6.2.6	Efeito do pulso de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T.....	62
6.2.6.1	Monitoramento da viabilidade celular durante cocultivo de linfócitos e IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus.....	62
6.2.6.2	Efeito do pulso das IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T	64
6.2.7	Análise da expressão de IFN- γ por linfócitos T estimulados por IL4-DCs pulsadas com HIV inativado	66
6.3	Análise do efeito do pulso viral sobre aDC1	67
6.3.1	Aspecto morfológico de aDC1 derivadas de indivíduos infectados pelo HIV.....	67
6.3.2	Viabilidade das aDC1	68
6.3.3	Análise das moléculas de superfície nas aDC1	69
6.3.4	Avaliação da internalização de partículas do HIV por aDC1.....	74
6.3.4.1	Avaliação quantitativa.....	74
6.3.5	Produção de IL-12p70 e IL-10.....	75
6.3.6	Efeito do pulso de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T.....	76

6.3.6.1 Monitoramento da viabilidade celular durante co-cultivo de linfócitos e IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus...	76
6.3.6.2 Efeito do pulso das aDC1 com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T	78
6.3.7 Análise da expressão de IFN- γ por linfócitos T estimulados por aDC1 pulsadas com HIV inativado.....	79
7. DISCUSSÃO.....	81
8. CONCLUSÕES.....	90
9. ANEXOS.....	91
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
APÊNDICES	

LISTA ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AIM-V	Meio para imunoterapia adotiva versão 5
APC	Alofococianina
APCs	Células apresentadoras de antígeno (do inglês: <i>Antigen-Presenting Cells</i>)
ARVs	Antirretrovirais
AT-2	Aldrithiol-2
BFA	Brefeldina A
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCR	Receptor para quimiocina CC
CD	Conjunto de diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CTL	Linfócito T citotóxico (do inglês: <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CXCR	Receptor para quimiocina CXC
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCs	Células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cells</i>)
DC-SIGN	Molécula não integrina, que capta a molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)

DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ENV	Glicoproteína viral do envelope do HIV
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Tamanho celular (do inglês: <i>forward scatter</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (do inglês: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GMP	Boas práticas de fabricação (do inglês: <i>Good Manufacturing Practice</i>)
Gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral altamente potente (do inglês: <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano de classe II (do inglês: <i>Human Leukocyte Antigen class II</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IM	Imatura
IONO	Ionomicina (do inglês: <i>lonomycin</i>)
MA	Madura
MFI	Intensidade de fluorescência mediana (do inglês: <i>Median Fluorescence Intensity</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i>)

MoDCs	Célula dendrítica derivada de monócito (do inglês: <i>monocyte derived dendritic cell</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês: <i>phycoerythrin</i>)
PE-Cy	Ficoeritrina cianina (do inglês: <i>phycoerythrin-cyanine</i>)
PHA	Fitohemaglutinina (do inglês: <i>Phytohemagglutinin</i>)
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetato
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAm	RNA mensageiro
SAB	Soro tipo AB humano
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Granulosidade celular (do inglês: <i>side scatter</i>)
S1PR1	Receptor 1 de esfingosina 1-fosfato
TCR	Receptor de linfócito T (do inglês: <i>T-Cell Receptor</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i>)
TNE	Tampão Tris/HCl, NaCl e EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Linfócitos T reguladores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do HIV.....	20
Figura 2 - Ciclo replicativo do HIV.....	21
Figura 3 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização fenotípica das MoDCs (IL4-DC).	42
Figura 4 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização fenotípica das MoDCs (aDC1).....	43
Figura 5 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização do perfil de ativação linfocitária com estímulo das MoDCs.	45
Figura 6 - Esquema representativo da estratégia de análise para a viabilidade das MoDCs durante o cocultivo com linfócitos T.....	46
Figura 7 - Análise do aspecto morfológico de IL4-DCs.	49
Figura 8 - Análise do aspecto morfológico das IL4-DCs pulsadas com vírus inativado.....	50
Figura 9 - Análise da viabilidade das IL4-DCs.....	51
Figura 10 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD14 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	52
Figura 11 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD80 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	52

Figura 12 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD83 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	53
Figura 13 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD86 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	53
Figura 14 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD40 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	54
Figura 15 - Mediana da expressão da molécula de superfície HLA-DR pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	55
Figura 16 - Mediana da expressão da molécula de superfície DC-SIGN pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	55
Figura 17 - Mediana da expressão da molécula de superfície CCR5 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	56
Figura 18 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD4 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI.	56
Figura 19 - Quantificação da p24 em IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus.	57
Figura 20 - Análise de IL4-DCs de paciente HIV+ sem o pulso adicional de vírus.	59
Figura 21 - Análise de IL4-DCs de paciente HIV+ com o pulso adicional de vírus vivo.	60
Figura 22 - Análise de IL4-DC de paciente HIV+ com pulso de vírus na proporção de 3, 30 e 300 partículas/célula.	61
Figura 23 - Produção de IL-12p70 e IL-10 dosada em sobrenadantes de cultura de IL4-DCs.	62

Figura 24 - Análise da viabilidade celular após 72 horas de cocultivo pelas IL4-DCs..	63
Figura 25 - Análise da viabilidade celular após 96 horas de cocultivo pelas IL4-DCs.....	64
Figura 26 - Mediana da expressão dos marcadores de superfície CD38 e HLA-DR em linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 72 horas.	65
Figura 27 - Mediana da expressão do marcador de superfície CD69 em linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 72 horas.	66
Figura 28 - Mediana da expressão de IFN- γ por linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 96 horas... ..	67
Figura 29 - Análise do aspecto morfológico das aDC1 sem o pulso do vírus. .	68
Figura 30 - Análise do aspecto morfológico das aDC1 pulsadas com vírus inativado.....	68
Figura 31 - Análise da viabilidade das aDC1.....	69
Figura 32 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD14 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.	70
Figura 33 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD80 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.	70
Figura 34 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD83 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.	71
Figura 35 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD86 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.	71
Figura 36 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD40 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.	72

Figura 37 - Mediana da expressão da molécula de superfície HLA-DR pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.....	72
Figura 38 - Mediana da expressão da molécula de superfície DC-SIGN pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.....	73
Figura 39 - Mediana da expressão da molécula de superfície CCR5 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.....	73
Figura 40 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD4 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI.....	74
Figura 41 - Quantificação da p24 em aDC1 pulsadas com diferentes quantidades de vírus.	75
Figura 42 - Produção de IL-12p70 e IL-10 dosada em sobrenadantes de cultura de aDC1.....	76
Figura 43 - Análise da viabilidade celular após 72 horas de cocultivo pelas aDC1.	77
Figura 44 - Análise da viabilidade celular após 96 horas de cocultivo pelas aDC1	77
Figura 45 - Mediana da expressão dos marcadores de superfície CD38 e HLA-DR em linfócitos T em cocultivo com aDC1 por 72 horas	78
Figura 46 - Mediana da expressão do marcador de superfície CD69 em linfócitos T em cocultivo com aDC1 por 72 horas	79
Figura 47 - Produção de IFN- γ por linfócitos estimulados por aDC1 durante 96 horas..	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos indivíduos HIV+ participantes do estudo com relação ao gênero, idade, contagem de células TCD4+ e carga viral (CV)..... 32

Tabela 2 - Relação de anticorpos utilizados na imunofluorescência indireta. .. 37

Tabela 3 - Características das culturas de expansão viral 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica de MoDCs..... 41

Quadro 2 - Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica de linfócitos..... 44

Quadro 3 - Anticorpo monoclonal utilizado para avaliação da produção de citocinas por linfócitos T. 47

RESUMO

Romani NT. *Influência de diferentes quantidades de antígeno na composição de uma vacina anti-HIV baseada em células dendríticas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A infecção pelo HIV causa um profundo comprometimento da resposta imune do hospedeiro, podendo levar à aids. Várias estratégias terapêuticas têm sido testadas ao longo dos anos, entre elas a imunoterapia com células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos (MoDCs), pulsadas com HIV-1 inativado. Neste caso, a produção de vírus para o pulso das MoDCs consiste inicialmente no isolamento do vírus a partir de amostras de sangue do paciente e, em seguida, sua expansão em culturas de células CD4. Também deve ser considerado que quantidade excessiva de vírus pode ser tóxica para as MoDCs a serem pulsadas e do mesmo modo, quantidade insuficiente de vírus pode não ser efetiva para ativar uma resposta imune específica. Neste contexto, a investigação do efeito de diferentes concentrações de vírus sobre o perfil fenotípico e funcional de MoDCs poderia auxiliar na determinação de uma quantidade ótima de vírus para o pulso das MoDCs e contribuir para o aperfeiçoamento da vacina terapêutica. **Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes quantidades de partículas virais, sobre o perfil fenotípico e funcional das MoDCs. **Metodologia:** Monócitos obtidos de indivíduos HIV+ foram diferenciados em MoDCs e pulsadas com HIV quimicamente inativado (3 partículas/MoDC, 30 partículas/MoDC, 300 partículas/MoDC). As células foram analisadas com relação ao perfil fenotípico, capacidade de internalizar p24, expressão de CD38, HLA-DR e CD69 e a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ autólogos. **Resultados:** O pulso com concentrações crescentes de vírus parece não interferir no perfil fenotípico e funcional das MoDCs. **Conclusão:** As diferentes quantidades de partículas virais utilizadas para o pulso parecem não ser tóxicas para as MoDCs estudadas, não tendo sido observadas diferenças com relação ao perfil fenotípico ou funcional das MoDCs.

Descritores: HIV; células dendríticas; cultura de vírus; imunoterapia; células dendríticas derivadas de monócitos; apresentação do antígeno.

SUMMARY

Romani NT. *Effect of diferente amounts of HIV particles on the pulsing MoDCs from HIV infected patients* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: The infection from HIV causes a profound impairment of the host immune response, which can lead to aids. Several therapeutic strategies have been tested over the years, including immunotherapy with monocyte - derived dendritic cells (MoDCs), pulsed with inactivated HIV-1. In this case, the production of virus for the pulse of the MoDCs initially consists of isolating the vírus from the patient's blood samples and then it into CD4+ cell cultures. It should also be considered that excessive amount of virus can be toxic to the MoDCs to be pulsed and likewise, insufficiently amount may not be effective for properly activate a specific immune response. In this context, the investigation of the effect of different virus concentrations on the phenotypic and functional profile of MoDCs could assist in the determination of an optimal amount of virus for the pulse of the MoDCs and contribute to the improvement of the therapeutic vaccine.

Objectives: To evaluate the effect of different amounts of viral particles on the phenotypic and functional profile of MoDCs. **Methods:** MoDCs generated from HIV+ individuals were differentiated into MoDCs and pulsed with chemically inactivated HIV (3 particles /MoDC, 30 particles /MoDC, 300 particles /MoDC). Cells were analyzed for phenotypic profile, ability to internalize p24, expression of CD38, HLA-DR and CD69, and the production of IFN- γ by autologous CD4 + and CD8 + T lymphocytes. **Results:** The pulse with increasing concentrations of virus does not seem to interfere in the phenotypic and functional profile of the MoDCs. **Conclusion:** The different amounts of viral particles used for the pulse appear to be non-toxic to the MoDCs studied, and no differences were observed regarding the phenotypic or functional profile of the MoDCs.

Descriptors: HIV; dendritic cells; virus culture; immunotherapy; monocyte-derived dendritic cells, antigen presentation.

1. INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS, atinge cerca de 36.7 milhões de pessoas no mundo, segundo dados da Organização Mundial de Saúde ⁽¹⁾. A principal característica desta infecção é a ativação crônica do sistema imune e a destruição maciça de linfócitos T CD4+, o que provoca um profundo comprometimento da resposta imune do hospedeiro que pode culminar em um quadro de imunossupressão profunda e desenvolvimento da AIDS ⁽²⁾.

O HIV pertence à família Retroviridae, gênero Lentivirus e sua estrutura consiste em um genoma de duas cópias de RNA de fita simples envoltos por um nucleocapsídeo associado às enzimas integrase e transcriptase reversa, que por sua vez está envolvido pelo capsídeo. Todo este conjunto está envolto pela matriz proteica localizada abaixo do envelope viral, que é composto pela bicamada lipídica, na qual estão inseridas as glicoproteínas gp120 e gp41 ^(3, 4) (Figura1).

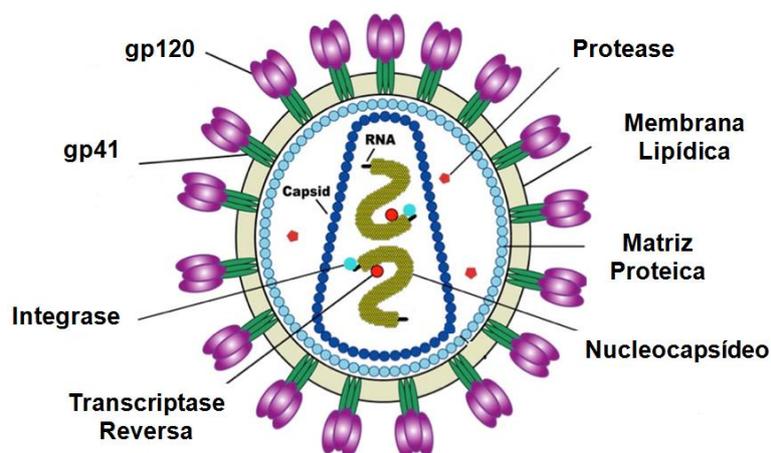


Figura 1 - Estrutura do HIV. Esquema ilustrativo da partícula do HIV e seus componentes. (Adaptado de: <https://biotechnin.asia/2015/07/19/structure-of-hiv-capsid-protein-in-its-native-state-revealed/>)

A entrada do vírus na célula hospedeira é realizada através da ligação da gp120, às moléculas CD4 presentes na superfície de células T, e também em monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs). A ligação gp120/CD4 inicia o processo de fusão do envelope viral através da gp41 e os correceptores, CCR5 e CXCR4 ^(3, 4).

Após a fusão do envelope viral com a célula hospedeira ocorre a entrada do nucleocapsídeo no interior celular, onde o RNA viral é retrotranscrito pela transcriptase reversa. O DNA proviral é integrado ao DNA do hospedeiro através da ação da integrase e assim pode permanecer quiescente. No momento em que a célula é ativada, o vírus utiliza os mecanismos celulares para promover sua replicação. Para tanto, o genoma viral é transcrito em RNA mensageiro (RNAm) em seguida ocorre a síntese de proteínas virais e sucessivamente novas partículas infecciosas são liberadas pela célula por brotamento ⁽⁵⁾ (Figura 2).

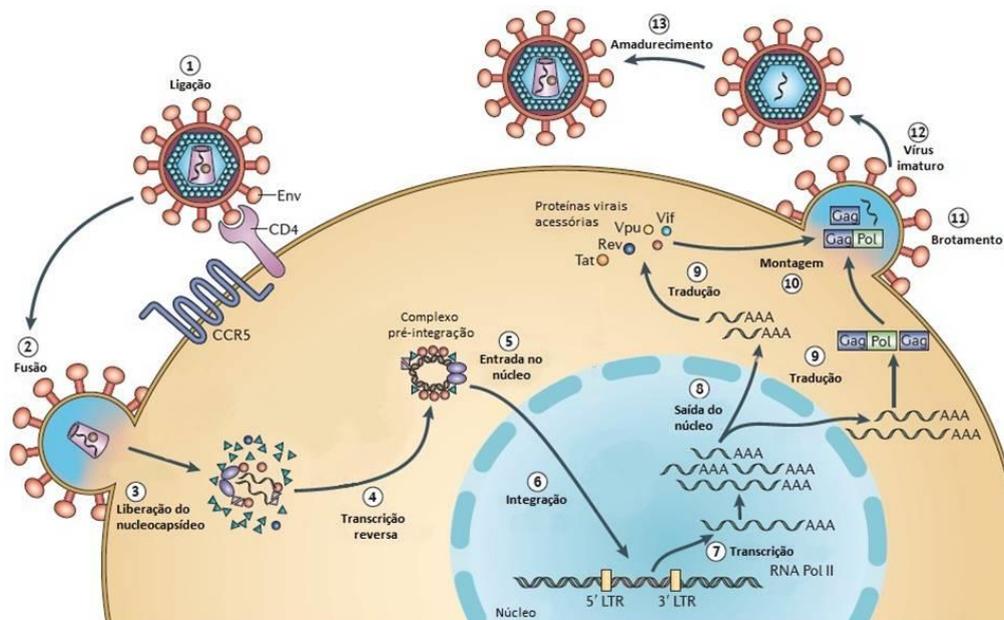


Figura 2 - Ciclo replicativo do HIV. A infecção se inicia quando glicoproteínas de membrana se ligam aos receptores CD4 e ao CCR5 ou CXCR4 (1) levando à fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira (2) o que permite a liberação do nucleocapsídeo para o interior celular (3). Após o desnudamento do material genético ocorre a transcrição reversa do RNA no citoplasma da célula (4) seguido da entrada do DNA viral no núcleo (5) onde o material genético do vírus é integrado ao DNA do hospedeiro formando o provírus (6). A transcrição proviral (7) acontece através da ação da RNA polimerase II do hospedeiro gerando novos RNAm que ao saírem do núcleo (8) são utilizados como fitas moldes para a produção de proteínas virais (9). Após a produção das proteínas virais ocorre a montagem do vírus (10) seguido do brotamento (11) e liberação das partículas virais imaturas (12). Fora da célula as partículas virais imaturas sofrem o processo de maturação por meio da clivagem de moléculas realizada pela protease (13) gerando a partícula viral infecciosa ⁽⁵⁾.

O HIV apresenta alta variabilidade genética e antigênica, resultado da alta taxa de erros na incorporação de nucleotídeos durante sua replicação, do processo de recombinação homóloga e da sua natureza altamente replicativa que constantemente produz novas mutações. Deste modo o HIV é capaz de responder de forma rápida e eficiente às perturbações do ambiente uma vez que oferece um amplo espectro de mutantes sobre os quais a seleção natural pode atuar ⁽⁶⁾. Tal variabilidade constitui uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de vacinas.

No Brasil, a terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART) é distribuída gratuitamente desde 1996 e tem melhorado a qualidade de vida do indivíduo infectado pelo HIV evitando o enfraquecimento do sistema imunológico ⁽⁷⁾.

Dentre os benefícios da terapia antirretroviral destacam-se o controle da replicação viral, com conseqüente redução do risco de transmissão da doença e como conseqüência aumento na contagem de linfócitos TCD4+, que previne a progressão para AIDS, possibilitando a restauração ao menos parcial do sistema imune ⁽⁸⁾.

Por outro lado, principalmente em países subdesenvolvidos, uma parcela dos indivíduos infectados não tem acesso ao tratamento. Além disso a terapia a longo prazo provoca efeitos colaterais e disfunções metabólicas que comprometem a boa adesão ao tratamento. Tendo em vista tais fatos fazem-se necessárias estratégias terapêuticas complementares, para o manejo de indivíduos infectados pelo HIV ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Neste sentido, imunoterapia complementar aos antirretrovirais (ARVs) como os imunoterápicos, poderiam levar a uma aceleração e/ou consolidação da restauração imune. Na infecção pelo HIV/AIDS várias estratégias têm sido propostas em conjunto com o tratamento com HAART, como a administração de citocinas como, Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-7 (IL-7) que atuam no desenvolvimento de linfócitos T, homeostase e proliferação dessas células ^(8, 11, 12). Também têm sido propostas as vacinas terapêuticas, que têm como princípio a administração de antígenos de HIV com o objetivo de melhorar uma resposta

imune específica e efetiva anti-HIV e assim auxiliar na redução da carga viral circulante, atuando como complemento à terapia antirretroviral⁽⁹⁾.

Várias estratégias para a composição de vacinas terapêuticas têm sido desenvolvidas, como a utilização de partículas virais inativadas, proteínas ou peptídeos virais, material genético viral, isolado ou associado a vetores e o uso de células dendríticas (DCs) carregadas com antígenos relevantes do HIV ⁽¹³⁾.

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) responsáveis pelo reconhecimento e processamento de antígenos e apresentação destes aos linfócitos T específicos que estabelece um elo entre a imunidade inata a adaptativa ^(14, 15).

Nos tecidos periféricos, as DCs imaturas funcionam como sentinelas amostrando o ambiente com relação à presença de patógenos. No estágio imaturo estas células possuem alta capacidade de reconhecer, internalizar e processar antígenos, entretanto apresentam limitação para interagir com linfócitos T específicos e estimular resposta efetora ⁽¹⁶⁾.

Por sua vez, as DCs maduras apresentam alta capacidade de interagir com linfócitos T e iniciar a resposta imune adaptativa. Através da alta expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 e o aumento dos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), estas células migram para os órgãos linfóides secundários onde interagem com células T, para dar início ao processo de apresentação antigênica ⁽¹⁷⁾.

O processo de apresentação antigênica consiste na exposição de antígenos ligados ao MHC expressos pelas DCs para linfócitos T específicos para tais antígenos, capazes de reconhecê-los através de seus receptores (TCR) ^(18, 19). O reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T constitui o 1° sinal para a ativação. O 2° sinal é dado pela ligação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e/ou CD86 presentes na APC com a molécula CD28 presente nos linfócitos T. Finalmente, o estímulo pelas citocinas presentes no microambiente promovem o 3° sinal que, somado aos demais sinais, promovem a ativação e diferenciação da célula T ⁽²⁰⁾.

Uma vez que a célula T é ativada ocorrem alterações nas moléculas de superfície envolvidas na resposta funcional dessa célula. Particularmente na infecção pelo HIV ocorre a persistência de um quadro de ativação crônica refletindo no aumento de expressão de marcadores de ativação de leucócitos como CD38 e HLA-DR ⁽²¹⁾.

A molécula CD38 é uma ectoenzima envolvida no fornecimento de energia através de sinais intracelulares, como metabolismo do Ca^{2+} necessários ao processo de ativação ^(22, 23).

Pouco se sabe sobre a função da molécula HLA-DR expressa por células T. Tais moléculas têm sido usadas por várias décadas para identificação de um fenótipo "ativado" de células T ⁽²³⁾.

A proteína de membrana CD69 também está associada à ativação sendo a primeira a ser sintetizada e expressa na superfície da célula, do mesmo modo está envolvida com a saída de células T dos órgãos linfóides através da redução na expressão do receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1). Células T ativadas ficam retidas nos órgãos linfóides até que sinais como proliferação e diferenciação de células de memória efetoras sejam iniciados. Após a divisão celular essas células voltam a expressar altos níveis de S1PR1 permitindo a saída de células T ativadas dos órgãos linfóides ^(24, 25).

Uma vez que o processo de apresentação antigênica tenha sido realizado o perfil da resposta de células T vai depender da natureza do antígeno apresentado, do tipo de estímulo e do microambiente durante o processo de apresentação antigênica. Assim sendo, ocorre a diferenciação de células TCD4+ em subtipos de células T auxiliares como Th1, Th2, Th17 e linfócitos T reguladores (Treg).

No contexto da resposta à infecção pelo HIV, células Th1 parecem estar associadas à proteção e sua diferenciação está relacionada à presença de IL-12 no microambiente. Estas células produzem altos níveis de IFN- γ , importante para a ativação de macrófagos, que auxilia na eliminação de células infectadas por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF. Em contrapartida, a

produção da Interleucina-10 (IL-10) inibe o desenvolvimento de respostas tipo Th1, promovendo um ambiente supressor que muitas vezes pode favorecer infecções oportunistas. A IL-10 também está envolvida na ativação de respostas induzidas pelas células Treg, que impedem o dano tecidual causado pela ativação generalizada das células T. Por outro lado, pode ser prejudicial por contribuir com a persistência viral devido à supressão nociva causada pela ativação. Alguns estudos associam a interação entre Tregs e outro subtipo celular denominado Th17, células importantes para a proteção contra infecções fúngicas e bacterianas extracelulares, tendo como papel induzir a inflamação através da interleucina-17 (IL-17) ⁽²⁵⁻³²⁾. Prendergast e colaboradores (2010)⁽³³⁾ demonstraram que a depleção de células Th17 em sangue periférico pode prejudicar a imunidade da mucosa limitando a reconstituição dessas células, por meio da redução de células CD4. Neste caso também foi associado a um declínio gradual em Tregs nos indivíduos infectados pelo HIV promovendo a ativação imune.

Por sua capacidade ímpar em estimular e direcionar a resposta imune específica, as DCs têm sido utilizadas em protocolos clínicos de imunoterapia. Os primeiros estudos eram direcionados para o tratamento de tumores e posteriormente iniciaram-se os estudos no contexto de doenças infecciosas como a infecção pelo HIV.

Por serem relativamente escassas na circulação, a aplicação das DCs em protocolos de imunoterapia somente foi possível com o desenvolvimento de técnica capaz de diferenciar estas células a partir de um precursor facilmente disponível. Neste sentido Sallusto e Lanzavecchia ⁽³⁴⁾ demonstraram em estudos *in vitro* que monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 poderiam se diferenciar em células com características de DCs, sendo denominadas células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs). Tal fato permitiu a obtenção destas células em larga escala, tornando possível sua aplicação em protocolos clínicos de imunoterapia.

Até o presente mais de 12 ensaios clínicos de imunoterapia baseada em MoDCs para indivíduos infectados pelo HIV já foram publicados, totalizando mais de 200 pacientes estudados ⁽³⁵⁾. De modo geral foi constatado tratar-se de um

procedimento seguro, uma vez que efeitos colaterais mínimos foram observados durante o seguimento vacinal. Os resultados de eficácia, por sua vez, demonstram que alguns pacientes são capazes de responder à vacina, enquanto em outros a vacina não é capaz de promover alterações na carga viral ⁽³⁶⁾.

Para seu uso em imunoterapia antiviral, alguns requisitos são necessários para que a MoDC efetivamente exerça sua função de apresentar antígenos e estimular uma resposta específica, como por exemplo o estágio de maturação e o tipo de antígeno a ser apresentado ao linfócito.

Com relação ao tipo de antígeno para o carregamento das MoDCs, uma variedade de opções tem sido proposta, tanto em ensaios *in vitro* como ensaios clínicos, por exemplo a utilização de peptídeos e vetores virais carregando antígenos relevantes, a introdução de fragmentos de HIV através de eletroporação e pulso com vírus inativado ⁽³⁷⁾. Até o presente os resultados de protocolos clínicos mais promissores em termos de controle viral são os que utilizaram vírus inteiro e inativado ^(38, 39).

A obtenção de vírus é realizada através da expansão, em geral de vírus autólogos, isolados do paciente em culturas celulares. Para seu uso em protocolos clínicos, é necessário que estes vírus sejam inativados. A inativação pode ser realizada fisicamente, por exemplo através de calor, ou quimicamente através de agentes oxidantes como o Aldrithiol-2 (AT-2). A diferença entre os dois métodos reside no fato da inativação por calor desnaturar as proteínas virais. Por sua vez, a inativação química mantém o vírus estrutural e conformacionalmente íntegro capaz de se ligar e se fundir à membrana da célula alvo, porém incapaz de produzir qualquer novo vírion ⁽⁴⁰⁾.

A obtenção de vírus inativado é um processo laborioso, que requer inicialmente o isolamento do HIV a partir de amostras de sangue periférico e posterior expansão dos vírus em culturas de células CD4+ autólogas ou alogênicas ^(41, 42). No caso de um protocolo clínico, no qual o produto vacinal deve ser produzido em condição GMP (*good manufacturing practice*), o processo torna-se ainda mais complexo.

Os protocolos clínicos de vacina de MoDCs pulsadas com vírus inativado por processo físico ou químico em geral utilizam 1 bilhão de partículas de HIV inativado (10^9) para cada dose de vacina de 30 milhões de MoDCs (3×10^7), cerca de 30 partículas/DC.

Considerando que dentre os estudos publicados até o presente nem todos os pacientes foram capazes de responder à vacina com MoDCs pulsadas, que o estímulo de uma resposta eficiente está relacionado à quantidade ótima de estímulo, e que não há relatos na literatura referentes à quantidade ótima de vírus para o pulso de MoDCs, consideramos importante averiguar o efeito de diferentes concentrações de vírus sobre o perfil fenotípico das MoDCs e sobre o estímulo de uma resposta celular.

2. JUSTIFICATIVA

A produção de vírus para o pulso de MoDCs a serem utilizadas em protocolos de vacina terapêutica constitui um processo complexo e laborioso, que requer inicialmente o isolamento do vírus a partir de amostras de sangue do paciente e em seguida sua expansão em culturas de células CD4+. Tal etapa constitui fator limitante para a produção da vacina, uma vez que necessita de uma grande quantidade de células autólogas e demanda um tempo considerável para a produção. Por sua vez, o rendimento viral depende diretamente do *fitness* viral e da qualidade das células CD4 nas quais o vírus vai ser expandido.

Além disto, quantidades altas de vírus podem ser tóxicas para as MoDCs pulsadas e do mesmo modo, quantidade baixa de vírus pode não ser efetiva para ativar uma resposta imune específica.

Neste contexto, a investigação do efeito de diferentes concentrações de vírus sobre o perfil fenotípico e funcional de MoDCs pode auxiliar na determinação de uma quantidade ótima de vírus para o pulso das MoDCs e contribuir para o aperfeiçoamento da vacina terapêutica.

Ressaltamos que neste trabalho os dados principais referem-se ao estudo com IL4-DCs, que são as MoDCs mais comumente utilizadas em protocolos clínicos. Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, entretanto, cresceu o interesse do grupo na utilização de células polarizantes para resposta Th1, denominadas aDC1. Considerando a possibilidade futura de avaliar as aDC1 em protocolo clínico, ensaios preliminares foram realizados com estas células, em número limitado de amostras (n=3-4), e estes resultados são também apresentados nesta dissertação.

3. HIPÓTESE

O pulso de MoDCs com concentrações diferentes de HIV inativado do convencionalmente utilizado (proporção de 30 partículas/MoDC) pode alterar o perfil fenotípico e funcional das MoDCs, modificando a resposta antigênica.

4. OBJETIVOS

Geral: Avaliar o efeito do pulso de MoDCs com diferentes proporções de HIV inativado (3 partículas/MoDC, 30 partículas/MoDC, 300 partículas/MoDC) sobre seu perfil fenotípico e funcional.

Específicos:

Avaliar o efeito de diferentes quantidades de vírus sobre:

- a expressão de moléculas de superfície como CD14, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR, DC-SIGN, CCR5;
- a viabilidade das MoDCs;
- a capacidade de internalização dos vírus pelas MoDCs;
- a capacidade das MoDCs em estimular uma resposta de células T.

5. METODOLOGIA

5.1 Casuística

Para este estudo utilizamos células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas por leucaférese e estoques virais, correspondente ao material excedente de 6 pacientes, participantes de estudo clínico de vacinação terapêutica. Tal estudos foi registrado e aprovado no Comitê de Ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 0791/09 cujo armazenamento de amostras estava previsto e foi autorizado pelos participantes. Adicionalmente mais 6 pacientes foram recrutados para obtenção de amostras de sangue periférico através de punção venosa simples, totalizando 12 indivíduos incluídos no estudo.

Todos os pacientes doadores das amostras foram convidados a autorizar a utilização deste material segundo os objetivos desta pesquisa. O presente trabalho está registrado e aprovado pela CAPPesq sob número 1.192.234.

Na tabela abaixo é possível observar características de 12 pacientes, sendo que para os 6 primeiros foram utilizadas amostras congeladas, remanescentes do estudo clínico e os últimos 6 pacientes não são participantes do estudo clínico e doaram amostras coletadas por meio de punção venosa simples e as células não foram previamente congeladas.

Tabela 1 - Características dos indivíduos HIV+ participantes do estudo com relação ao gênero, idade, contagem de células TCD4+ e carga viral (CV)

Sujeitos da pesquisa	Gênero	Tempo desde a primeira evidência da infecção (1-15 anos)	Idade	Uso de terapia antirretroviral	Contagem de células TCD4+ (cél/μL)	CV (cópias/mL)*
1	M	1	39	Não	322	6.693
2	F	4	27	Não	707	7.280
3	M	1	28	Não	427	40.843
4	M	4	40	Não	648	27.564
5	F	6	39	Não	439	2.931
6	M	1	36	Não	1.509	30.918
7	F	6	45	Sim	922	< 40
8	M	4	33	Sim	684	< 40
9	M	1	30	Sim	968	< 40
10	M	1	64	Sim	657	< 40
11	M	6	49	Sim	1072	< 40
12	M	6	56	Sim	1057	< 40
Média	-	3,4	40	-	784,33	9705

* Os valores indicados como <40 cópias/mL foram consideradas como 40 cópias/mL para a realização da média. M: masculino; F: feminino.

5.2 Expansão e Inativação Viral

Estoques virais obtidos dos isolados anteriormente utilizados no protocolo clínico foram reativados através da inoculação do vírus em culturas de PBMCs provenientes de indivíduos saudáveis, em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Life Technologies®/ USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB -

Gibco®/ USA) e ativadas com 20 UI/mL de IL-2 (PeproTech®/ USA) e 1% de fitohemaglutinina (PHA - Gibco®/ USA). As culturas foram realimentadas semanalmente com novas PBMCs ativadas e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias.

Os sobrenadantes da cultura contendo os vírus em expansão foram armazenados a -80°C até atingir cerca de 300 mL e posteriormente descongelados e inativados com *Aldrithiol-2* (2,2'-Dipyridyl disulfide, AT-2). Para tanto os sobrenadantes foram incubados em banho-maria a 37°C sob agitação por uma hora com 250 µM de AT-2 e em seguida concentrados através da centrifugação por 20 minutos a 3500 rpm em filtros Centricon Millipore 100 kDa.

O material concentrado foi em seguida ultracentrifugado para purificação do vírus e remoção do AT-2 utilizando gradiente de sacarose à 20% em tampão TNE (20mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e 2,5 mM de EDTA; pH 7,5). Foram realizadas duas ultracentrifugações (L80 Beckman, rotor de ângulo móvel - SW41 Ti) a 4°C por 1 hora a 100.000 x g cada. Posteriormente foi obtida uma alíquota para o processo de quantificação de RNA através do equipamento Abbot RealTime HIV-1. O vírus purificado e inativado foi estocado a -80° até o momento de ser utilizado.

As culturas de cada um dos três isolados foram expandidas separadamente e os *pools* foram constituídos após o processo de inativação e purificação viral.

5.3 Obtenção de MoDCs

5.3.1 Obtenção de IL4-DCs imaturas

PBMCs armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37°C e em seguida foram realizadas duas lavagens com solução salina a 600 g por 10 minutos a 15°C. Ao fim das lavagens a suspensão celular foi distribuída em placa de cultura de 24 poços a uma concentração de 5×10^6 /mL em meio de cultura RPMI 1640 e incubado durante 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Ao final do período de incubação as células não aderentes foram

removidas e as células aderentes (predominantemente monócitos) foram mantidas e cultivadas em meio AIM-V (Gibco®/ USA) por 5 dias na presença de 50 ng/mL de *Granulocyte-macrophagecolony-stimulating-factor* (PeproTech®/ USA) e IL-4 (PeproTech®/ USA) na mesma concentração, para obtenção de IL-4 MoDCs imaturas.

5.3.2 Obtenção de aDC1s imaturas

Para a obtenção de aDC1 foram utilizadas amostras de cerca de 70 mL de sangue periférico, coletados de indivíduos infectados pelo HIV. PBMCs foram obtidas por meio do gradiente de densidade Ficoll/Hypaque (GE healthcare/ Sweden) seguido de duas lavagens com solução salina a 600 g por 10 minutos a 15°C. A suspensão celular foi distribuída igualmente em placa de cultura de 24 poços a uma concentração de 5×10^6 /mL em meio de cultura RPMI 1640 e incubado durante 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Células não aderentes foram congeladas por meio da solução de congelamento (SFB + 20% de Dimetilsulfóxido - DMSO) para uso posterior. Células aderentes foram mantidas e cultivadas durante 5 dias em meio de cultura IMDM (Gibco®/ USA) contendo 10% SFB na presença de 100ng/mL de GM-CSF (PeproTech®/ USA) e 200ng/mL de IL-4 (PeproTech®/ USA) para obtenção de aDC1 imaturas.

5.3.4 Pulso com HIV

No quinto dia de cultura as MoDCs imaturas (IL4-DCs e aDC1) diferenciadas a partir dos monócitos foram pulsadas com vírus inativado por AT-2 em diferentes quantidades, na proporção de 3, 30 ou 300 partículas virais por MoDC incubando-se durante quatro horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

5.3.5 Obtenção de IL4-DCs maduras

Após o período de pulso viral foram realizadas lavagens para remoção de vírus eventualmente não internalizados pelas MoDCs. Em seguida as IL4-DCs

imaturas foram ativadas com coquetel de citocinas pró-inflamatórias utilizando 50ng/ml de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α - PeproTech®/ USA), 10 ng/mL de Interleucina-1 beta (IL-1 β - PeproTech®/ USA); e 100 ng/mL de Interleucina-6 (IL-6 - PeproTech®/ USA), além de IL-4 e GM-CSF nas concentrações anteriormente utilizadas. As células continuaram em cultura por mais 48 horas até finalizar o processo de maturação. O controle do ensaio foi constituído por IL4-DCs não pulsadas com HIV, mas igualmente tratadas com coquetel de citocinas. No sétimo dia as IL4-DCs foram retiradas da placa de cultura através de banho de gelo.

5.3.6 Obtenção de aDC1 maduras

Após o período de incubação para o pulso viral os vírus não internalizados foram igualmente descartados. Logo após as aDC1 imaturas foram ativadas com coquetel de citocinas pró-inflamatórias contendo 50ng/mL de TNF- α , 25ng/mL de IL-1 β , 20 μ g/mL de Ácido polinosínico-policidínico (Poly I:C - (Sigma-Aldrich®/ USA), 1000IU/mL de Interferon-Alfa (IFN- α) e 1000 UI/mL de Interferon-Gama (IFN- γ), (ambos *Miltenyi Biotec/ Germany*). As células continuaram em cultura por mais 48 horas até finalizar o processo de maturação. O controle do ensaio foi constituído por MoDCs não pulsadas com HIV, mas igualmente tratadas com coquetel de citocinas. No sétimo dia as MoDCs foram retiradas da placa de cultura como anteriormente descrito.

5.4 Avaliação da internalização de HIV pelas MoDCs

5.4.1 Quantificação de partículas virais internalizadas

PBMCs de 5 indivíduos saudáveis e 5 pacientes HIV+ foram acondicionadas em placa de 96 poços fundo "chato" a uma concentração de 1×10^6 /mL em meio de cultura RPMI 1640 para obtenção de MoDCs imaturas (IL4-DCs ou aDC1). No 5º dia de cultura as células foram pulsadas com diferentes concentrações de vírus quimicamente inativados (proporção de 3, 30 e 300 partículas virais/célula) durante 2 horas. Como controle positivo as MoDCs

foram incubadas com vírus R5 infectivo HIV-1 NL4-3 AD8 (pNL (AD8) com MOI de 0,5 partículas, gentilmente cedido pela Prof^a Bruna Alencar, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Ao final do processo de pulso viral o material eventualmente não internalizado foi removido por meio de lavagem exaustiva e as células descoladas por meio da incubação com 50ul de tripsina durante 30 minutos.

Logo após, as células foram transferidas para placa fundo "V" e centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. Após obter o *pellet* de células o sobrenadante foi descartado e então adicionado o tampão de lise contendo o inibidor de protease (Pierce™ - ThermoFisher/ USA). A placa foi incubada no gelo durante 30 minutos.

Por fim, foi realizada uma centrifugação a 2400 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C.

Posteriormente após a coleta de todas as amostras realizou-se a quantificação da proteína p24 por meio da técnica de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante, kit HIV-1 p24 Antigen ELISA – RETROtek/ USA.

5.4.2 Análise de internalização de partículas por Microscopia Confocal

A internalização de partículas de HIV por MoDCs foi avaliada através de microscopia confocal. Os ensaios foram realizados com amostras de indivíduos saudáveis e pacientes HIV+. MoDCs imaturas foram obtidas como anteriormente descrito com a diferença que foram cultivadas sobre lamínulas e não diretamente no poço da placa de cultura.

No quinto dia, as células foram submetidas ao pulso viral com diferentes quantidades de vírus inativado por AT-2 (na proporção de 3, 30 ou 300 partículas/MoDC) ou vírus infectivo HIV-1 NL4-3 AD8 (MOI de 0.5 partículas) para controle positivo. As células foram incubadas durante 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C. O controle negativo (basal) foi constituído por MoDCs não pulsadas com HIV, mas igualmente manipuladas.

Ao fim do período de incubação foram realizadas lavagens com PBS para remoção de vírus eventualmente não internalizado. Em seguida as células foram fixadas com Paraformaldeído 4% (Labsynth®/ Brasil) por 15 a 20 minutos.

Para a marcação com o anticorpo primário, as células foram lavadas novamente com PBS e na sequência permeabilizadas e bloqueadas com solução de 2% soro albumina bovina e 0,5% de Saponina (PBS BSA Saponin 1x) por 15 minutos. Em seguida o material foi marcado com o anticorpo primário, anti-p24 (Abcam®/ UK) diluído 1:50 em PBS BSA Saponin 1x (Tabela 2) e a lâmina foi incubada por uma hora à temperatura ambiente.

Posteriormente procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário, anti-mouse Alexa-Fluor 488 (Thermo Fisher®/ USA) diluído 1:300 em PBS BSA Saponin 1x, (Tabela 2) por uma hora a temperatura ambiente, protegido da luz. Logo após procedemos o processo de montagem das lâminas com o reagente Vectashield® (Vector Laboratories/ USA) contendo 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) na concentração de 1,5 µg/mL. As lâminas montadas foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de uma hora para secagem e conservadas a 4°C.

A leitura das lâminas consistiu na excitação das fluorescências de Alexa-Fluor 488 (conjugada à p24) e DAPI utilizando o laser Hélio-Neônio (HeNe) 633nm e o Laser de estado sólido 405nm. O equipamento utilizado foi o Sistema Confocal/Zeiss LSM 780-NLO, disponibilizado pelo Centro de Facilidades para Pesquisa - CEFAB- ICB/USP. As imagens foram analisadas por meio do software ZEN Black 2.3 (Zeiss).

Tabela 2 - Relação de anticorpos utilizados na imunofluorescência indireta.

Anticorpos	Especificidade	Espécie	Clone	Diluição Utilizada	Fluoróforo	Fabricante
Primários	P24 HIV-1	Mouse	39/5.4A	1:50	-	Abcam
Secundários	Mouse-IgG1	Donkey	Policlonal	1:300	AF488	Thermo Fisher

5.5 Ensaio para avaliação da produção de IL-12p70 e IL-10

Citocinas IL-12p70 e IL-10 presentes nos sobrenadantes do 7^o dia de cultura de DCs tiveram suas concentrações avaliadas por meio de ELISA, utilizando-se os kits Human IL-12p70 ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience/ USA) e Human IL-10 ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience/ USA) de acordo com as especificações do fabricante.

Resumidamente placas de ELISA meia área high binding (Corning/ USA) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, em seguida foram bloqueadas e as amostras plaqueadas. Anticorpos de detecção foram incubados e a reação foi revelada através de substrato cromógenos, seguida da adição de solução de bloqueio.

A leitura do experimento foi realizada em equipamento Elx800TM Absorbance Microplate Reader (BioTek) com comprimento de onda equivalente a 450nm. A sensibilidade da curva foi de 4 a 500pg/mL para IL-12p70 e 2 a 300 pg/mL para IL-10.

5.6 Protocolo de cocultivo

O perfil funcional das MoDCs foi avaliado através de cocultivo destas células com linfócitos. Para isso PBMCs autóloga foram descongeladas e depletadas de células aderentes (monócitos). As células não aderentes (predominantemente linfócitos) foram mantidas em repouso em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB por aproximadamente 18 horas, tempo após o qual foram co-cultivadas com as MoDCs.

Para tanto, linfócitos foram cultivados com MoDCs maduras, pulsadas ou não com diferentes quantidades de vírus, na proporção de 5:1 (linfócito:MoDC). As células foram cultivadas por 72 ou 96 horas em placa de 96 poços de fundo em U, em meio AIM-V suplementado com 10% de soro AB humano (SAB - Sigma-Aldrich®/ USA) (para IL-4DCs) ou IMDM suplementado com 10% de SFB

(para aDC1) para o co-cultivo entre linfócitos e IL4-DC ou aDC1, respectivamente.

O controle positivo (C+) consistiu em culturas estimuladas com Phorbol 12-Myristate 13-Acetato/ Ionomycin (PMA/IONO - Sigma-Aldrich®/ USA) na concentração de 2 µg/mL e 10 µg/mL respectivamente, por 25 horas. Brefeldina (BFA - Sigma-Aldrich®/ USA) foi acrescentada 24 horas antes do término da cultura, na concentração de 20 µg/ mL em todos os poços.

5.7 Citometria de fluxo

A análise do perfil fenotípico e funcional das MoDCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus e também dos linfócitos estimulados nos ensaios de co-cultivo foi realizada através de citometria de fluxo utilizando-se o equipamento LSRFortessa (Becton, Dickinson and Company - BD). Foram adquiridos no mínimo 50.000 eventos de cada amostra com auxílio do programa DIVA. A análise foi realizada utilizando o software FlowJo®.

5.7.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células manipuladas nos ensaios de caracterização fenotípica e funcional por citometria de fluxo foi monitorada por meio do marcador *Live/Dead Fixable Aqua stain* (Life Technologies®/ USA), constituído por um corante fluorescente capaz de se ligar a proteínas (amina) que se encontram em células mortas, permitindo assim a distinção entre células vivas.

Para tanto, conforme preconizado pelo fabricante células na concentração de $2 \times 10^5/100\mu\text{L}$ foram incubadas por 30 minutos a 4°C com o reagente *Live/Dead* em 500 µL de PBS (tampão fosfato-salina) por tubo. Logo após esse período, as células foram lavadas através de uma centrifugação a 600g por 5 minutos com 500µL de PBS e adquiridas em citômetro de fluxo.

5.7.2 Marcação extracelular

Para a marcação extracelular, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais para avaliação fenotípica de MoDCs (Quadro 1) e linfócitos T (Quadro 2) e mantidas sob refrigeração (4°C) protegidas da luz durante 20 minutos, seguido de uma lavagem a 600g por 5 minutos com 400µL de tampão de coloração (0,2% de BSA em PBS) e, posteriormente, foi adicionada a solução isotônica BD FACS Flow® (BD Biosciences).

A análise dos resultados obtidos foi realizada através do software FlowJo®, em que primeiramente foi realizada a estratégia de *gate* a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras, seguido da delimitação da população de interesse com bases nos parâmetros de tamanho e granulosidade, característicos destas células. Em seguida, um *gate* foi desenhado para delimitar a população de células vivas, com base na marcação por *Live/Dead* e por fim foi selecionada a população de células CD11c+ (para MoDCs) ou CD3+ (para linfócitos) (Figura 3), a partir das quais foram avaliados os marcadores de interesse estudados.

Quadro 1 - Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica de MoDCs.

	Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Função
DCs	Anti-CD11c	Alexa Fluor 700	B-ly6	Marcador de MoDCs mielóides
	Anti-CD80	PE	L307.4	Molécula coestimuladora
	Anti-CD86	FITC	2331	Molécula coestimuladora
	Anti-CD83	APC	HB15e	Marcador de maturação
	Anti-CD40	APC-H7	5C3	Molécula coestimuladora
	Anti-DC-sign	PE-Cy7	eB-h209	Receptor para o HIV-1
	Anti-HLA-DR	FITC	G46-6	Apresentação de antígenos
	Anti-CD14	PE	M5E2	Marcador de monócitos
	Anti-CCR5	V450	2D7	Receptor para o HIV
	Anti-CD4	PE-Cy5	RPA-T4	Receptor para o HIV

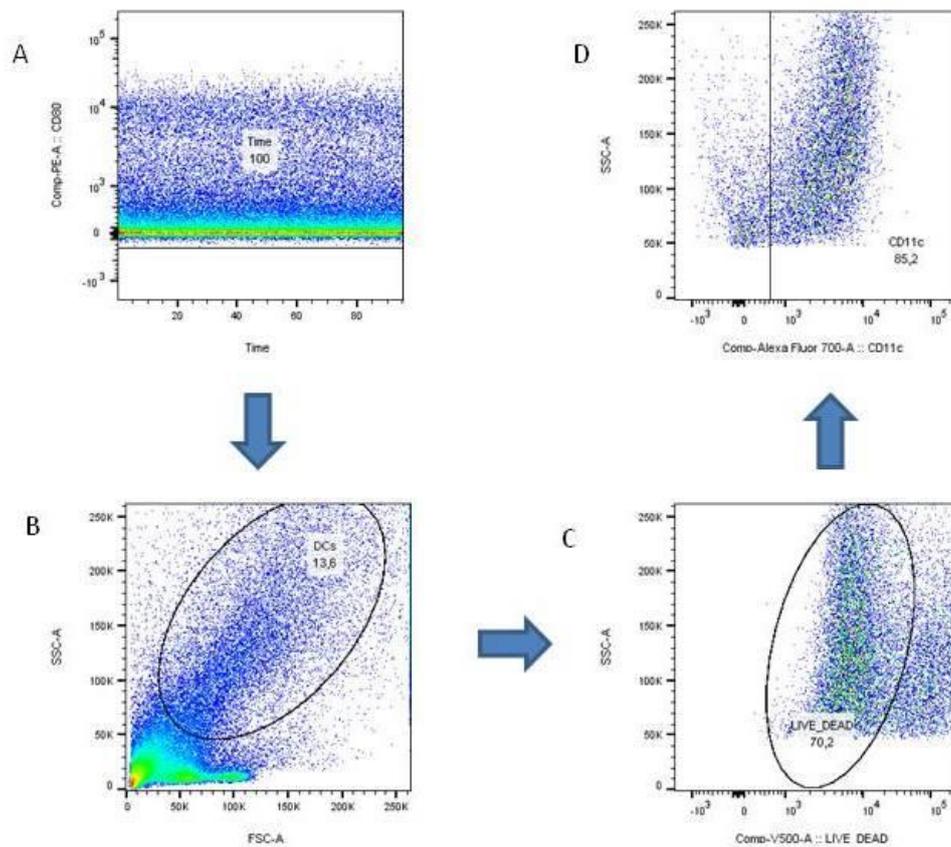


Figura 3 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização fenotípica das MoDCs (IL4-DC). Estratégia de *gate* utilizada para a caracterização da expressão de marcadores de superfície das MoDCs segundo a estratégia de *gate* PE *versus* Time (A), critérios de tamanho *versus* granulosidade (SSC-A x FSC-A) (B), células vivas utilizando a estratégia SSC x *Live-Dead* (C), finalmente um *gate* de células selecionando os marcadores que definem a população de células CD11c+ (D). A partir dessa análise os demais marcadores característicos das MoDCs foram estudados

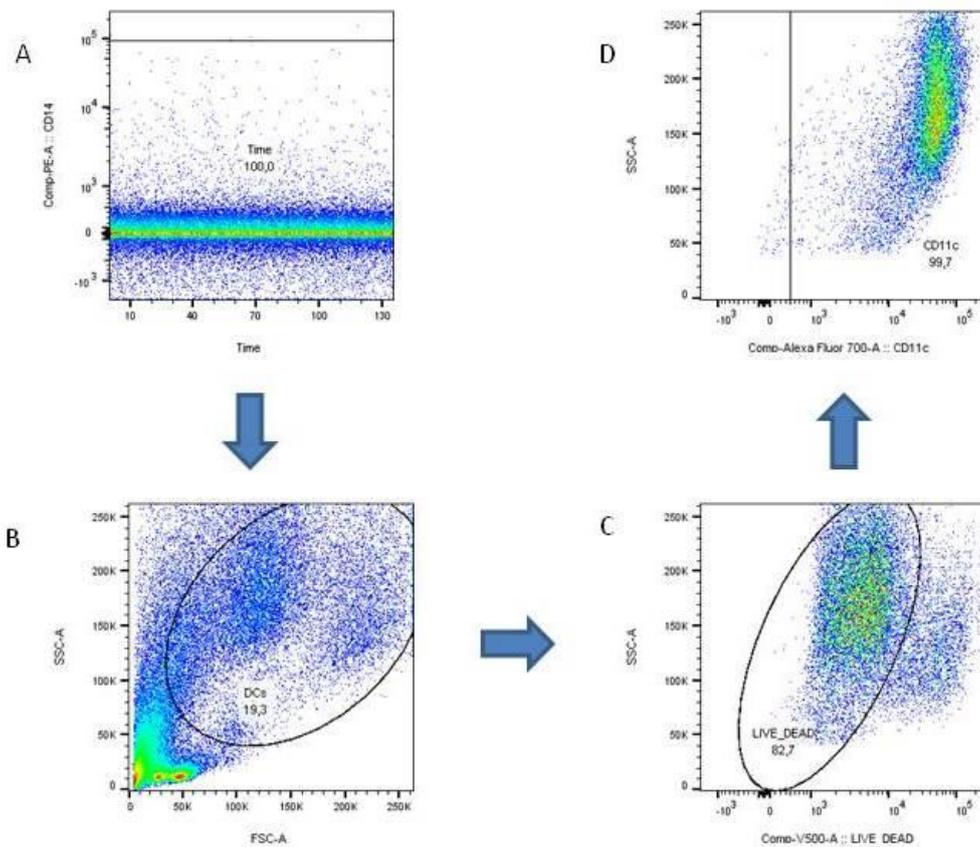


Figura 4 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização fenotípica das MoDCs (aDC1). Estratégia de *gate* utilizada para a caracterização da expressão de marcadores de superfície das MoDCs segundo a estratégia de *gate* PE *versus* Time (A), critérios de tamanho *versus* granulidade (SSC-A x FSC-A) (B), células vivas utilizando a estratégia SSC x Live-Dead (C), finalmente um *gate* de células selecionando os marcadores que definem a população de células CD11c+ (D). A partir dessa análise os demais marcadores característicos das MoDCs foram estudados.

Quadro 2 - Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica de linfócitos.

	Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Função
Linfócitos	Anti-CD3	V450	UCHT1	Correceptor de linfócitos T
	Anti-CD4	PECy5	RPA-T4	Correceptor de linfócitos T auxiliares
	Anti-CD8	APC-H7	SK1	Correceptor de linfócitos T citotóxicos
	Anti-CD38	PE-CF594	HIT-2	Marcador de ativação
	Anti-CD69	PE	FN50	Ativação Precoce de antígeno de célula T
	Anti-HLA-DR	FITC	G46-6	Marcador de ativação

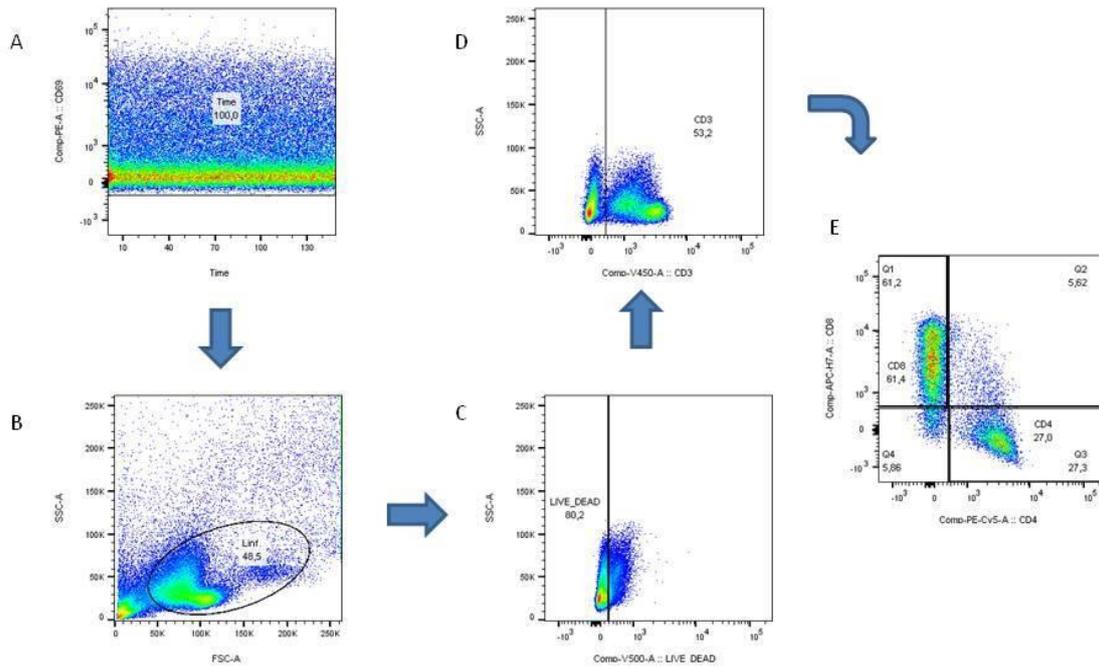


Figura 5 - Esquema representativo da estratégia de análise para a caracterização do perfil de ativação linfocitária com estímulo das MoDCs. Estratégia de *gate* utilizada para a caracterização da expressão do perfil de ativação linfocitária segundo a estratégia de *gate* PE versus Time (A), critérios de tamanho versus granulosidade (SSC-A x FSC-A) (B), células vivas utilizando a estratégia SSC x *Live-Dead* (C), *gate* de células selecionando os marcadores que definem a população de células CD3+ (D) e finalmente gates selecionando a população de células específicas para analisar (E). A partir dessa análise os demais marcadores característicos para ativação foram estudados.

Por meio do marcador de viabilidade *Live/Dead* foi possível analisar a viabilidade das MoDCs durante o cocultivo entre 72 horas e 96 horas. A estratégia de *gates* foi realizada do mesmo modo, primeiramente eliminando possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras, seguido da delimitação da população de MoDCs com bases nos parâmetros de tamanho e granulosidade, por fim um *gate* delimitando a população de células vivas (Figura 6).

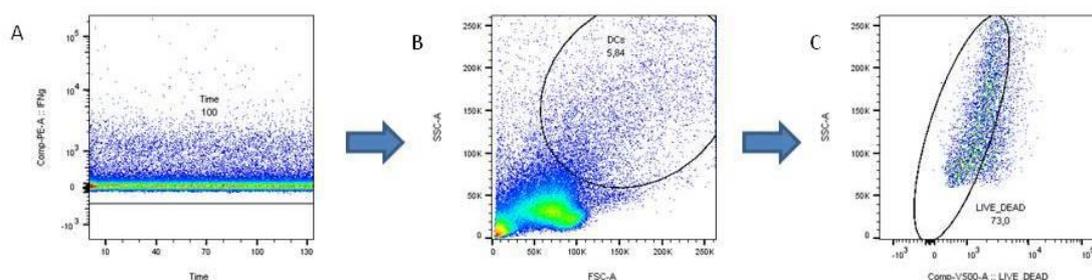


Figura 6 - Esquema representativo da estratégia de análise para a viabilidade das MoDCs durante o cocultivo com linfócitos T. Estratégia de *gate* utilizada para a caracterização da expressão da viabilidade das IL4-DCs e α -DC segundo a estratégia de *gate* PE versus Time (A), critérios de tamanho versus granulosidade (SSC-A x FSC-A) (B), células vivas utilizando a estratégia SSC x Live-Dead (C).

5.7.3 Marcação intracelular

Os linfócitos previamente submetidos à marcação extracelular foram permeabilizados utilizando-se 300 μ L da solução BD *Perm/Wash*[®] (BD Cytofix/Cytorperm[®] Fixation/Permeabilization Kit/ USA) seguida de incubação 20 minutos a 4°C e no escuro. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes (600g a 5 minutos) com 400 μ L da solução BD *Perm/Wash*[®] (BD Cytofix/Cytorperm[®] Fixation/Permeabilization Kit/ USA). Em seguida foi adicionado em cada amostra 25 μ L da solução permeabilizante *Perm/Wash* juntamente com o anticorpo monoclonal intracelular (Quadro 3) e incubados a 4°C e protegidos de luz durante 30 minutos. Por fim, os linfócitos foram ressuspensos em solução isotônica BD FACS Flow[®] (BD Biosciences/ USA).

A análise dos resultados obtidos também foi realizada através do software FlowJo[®], em que primeiramente foi realizada a estratégia de *gate* a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras, seguido da delimitação da população de interesse com bases nos parâmetros de tamanho e granulosidade, característicos destas células. Em seguida, um *gate* foi desenhado para delimitar a população de células vivas e por fim foi selecionado a população de células CD3+, na qual a partir dessa análise foram avaliados os marcadores de interesse estudados, finalizando com uma seleção em que apresentasse positividade para o marcador IFN- γ . Foi

utilizada a mesma estratégia de *gate* realizada para avaliar a ativação celular (Figura 5).

Quadro 3 - Anticorpo monoclonal utilizado para avaliação da produção de citocinas por linfócitos T.

	Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Função
Linfócitos	Anti-IFN- γ	PE	B27	Citocina com atividade antiviral

5.8 Análise Estatística

Os gráficos e a análise estatística foram realizados através do Software Prisma 5.0, versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Foi utilizado o teste *one-way* Anova para comparar as diferentes variáveis sendo dados pareados e não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o p obtido foi $< 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Cultura de vírus

Estoques virais provenientes de três indivíduos infectados pelo HIV foram expandidos separadamente em sistema alogênico para a constituição do *pool* de vírus utilizado para o pulso das MoDCs. A cada semana, as culturas foram alimentadas com PBMCs previamente ativadas, provenientes de indivíduos saudáveis.

Em média cada cultura levou duas semanas para que o sobrenadante apresentasse positividade, para a presença de HIV. Para a obtenção de quantidade suficiente de vírus para os ensaios deste projeto as culturas foram mantidas durante dois meses, em média, como mostra a Tabela 3.

Após a concentração e purificação do vírus foi obtido um total de $85,7 \times 10^9$ partículas virais.

Tabela 3 - Características das culturas de expansão viral

Paciente	Tempo de positividade	Tempo total de cultura	Volume armazenado positivo
1	10 dias	39 dias	20 mL
2	18 dias	60 dias	520 mL
3	11 dias	41 dias	360 mL

6.2 Análise do efeito do pulso viral sobre IL4-DCs

6.2.1 Aspecto morfológico de IL4-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV

A avaliação do aspecto morfológico das IL4-DCs em cada fase do processo de diferenciação e ativação, foi realizada por meio de microscopia óptica. Para tanto, monócitos de 10 indivíduos infectados pelo HIV foram diferenciados em IL4-DCs.

Observamos que houve mudanças no aspecto morfológico das células ao longo do processo de diferenciação. As IL4-DCs maduras (após estímulo com citocinas pró-inflamatórias) apresentaram a um aspecto mais espreado e fusiforme comparadas às imaturas (Figura 1).

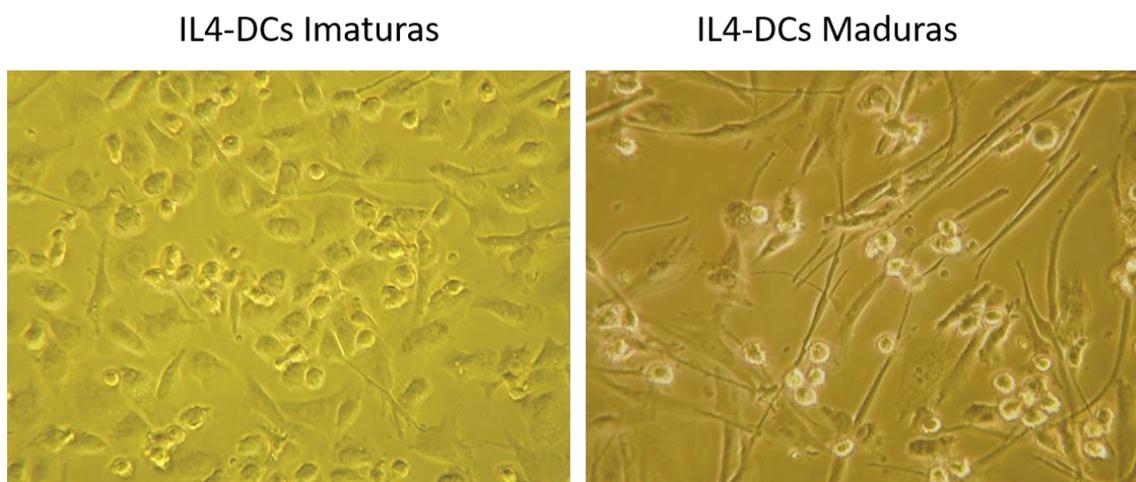


Figura 7 - Análise do aspecto morfológico de IL4-DCs. IL4-DCs imaturas e IL4-DCs maduras. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

Com o objetivo de avaliar se concentrações crescentes de partículas virais poderiam interferir na morfologia das IL4-DCs, partículas virais quimicamente inativadas nas proporções de 3, 30 ou 300 partículas/célula, foram colocadas em contato com as IL4-DCs tendo sido observado um perfil semelhante entre elas, após sua maturação, independentemente da quantidade de partículas virais utilizadas no pulso (Figura 8). Tal fato sugere que o aumento na concentração de vírus utilizado para o pulso não interfere no aspecto morfológico das IL4-DCs.

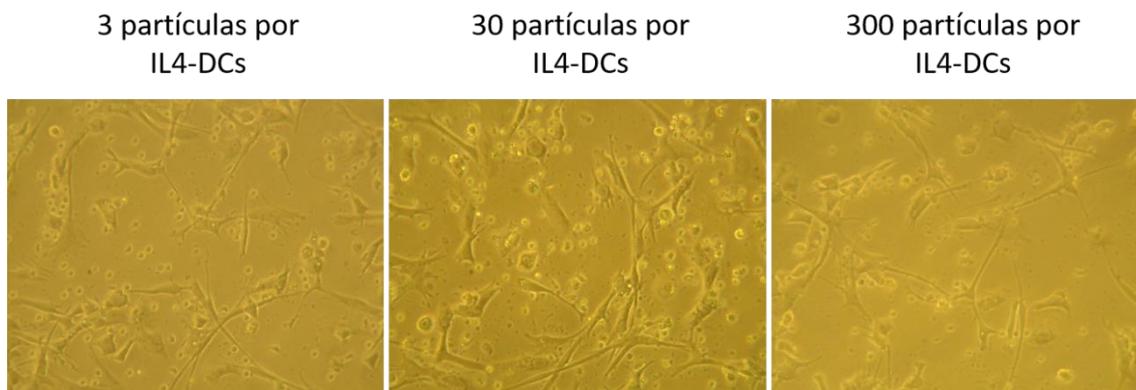


Figura 8 - Análise do aspecto morfológico das IL4-DCs pulsadas com vírus inativado. IL4-DCs maduras pulsadas com diferentes quantidades de vírus inativado pelo AT-2. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

6.2.2 Viabilidade das IL4-DCs

Devido a problemas técnicos, apenas 9 amostras de IL4-DCs imaturas, maduras e/ou pulsadas com diferentes quantidades de partículas virais, derivadas de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, foram analisadas com relação ao perfil fenotípico por meio da técnica de citometria de fluxo. Inicialmente selecionamos as células viáveis utilizando o marcador de viabilidade *Live/Dead* (Figura 9).

Não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais de viabilidade das amostras analisadas, mostrando que o processo de ativação não interferiu na viabilidade das células. Além disso, os dados sugerem que diferenças na quantidade de vírus para o pulso também parecem não ter afetado a viabilidade das IL4-DCs.

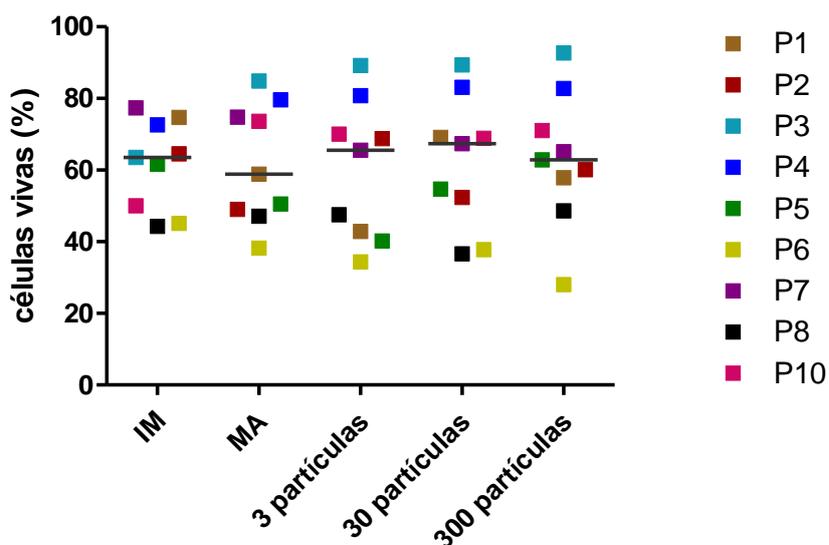


Figura 9 - Análise da viabilidade das IL4-DCs. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. Não foi possível obter resultados do P9 durante o processo de diferenciação devido à falta de material. IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

6.2.3 Análise das moléculas de superfície nas IL4-DCs

Para a análise fenotípica procedemos à avaliação da expressão das moléculas CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-DR, CD40, DC-SIGN, CCR5, CXCR4 e CD4 na população de células expressando a molécula CD11c.

De modo geral observamos que os resultados obtidos tanto referentes ao percentual de células positivas como de intensidade média de fluorescência (MFI) apresentaram grande variabilidade interindividual.

Observamos que a expressão de CD14, marcador típico de monócitos, foi baixa, mostrando que os precursores foram diferenciados em IL4-DCs (Figura 10).

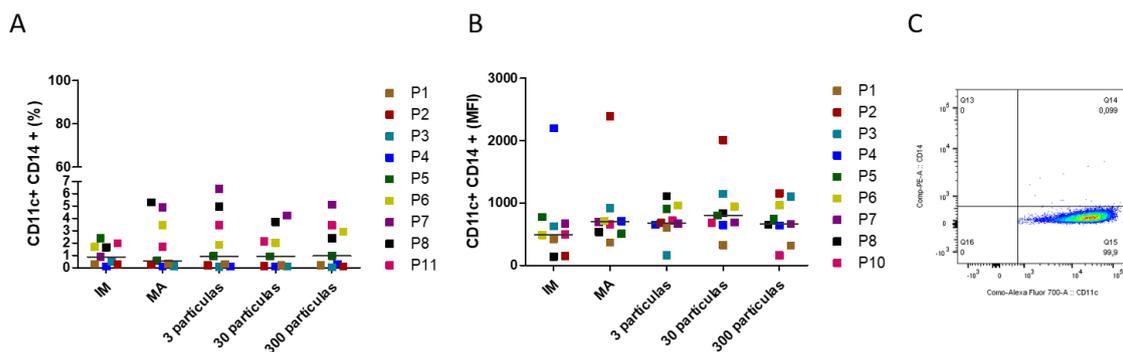


Figura 10 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD14 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD14. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Com relação à expressão de CD80 observamos que o pulso viral e/ou o estímulo para maturação levou a um aumento na mediana da expressão desta molécula em todas as culturas que receberam estímulo para maturação, comparadas ao estágio imaturo nas IL4-DCs. Por sua vez, quantidades diferentes de vírus para o pulso não interferiram no perfil de expressão desta molécula (Figura 11).

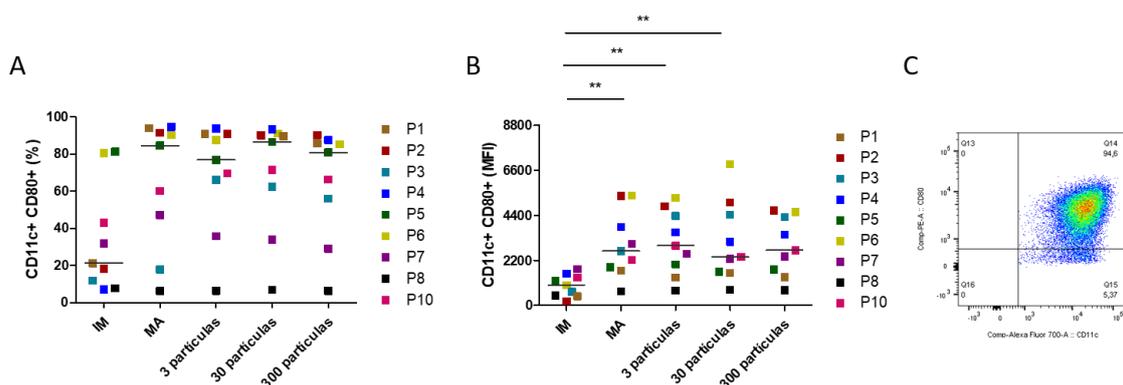


Figura 11 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD80 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD80. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Em relação à expressão da molécula CD83 foi possível observar diferenças significativas entre o percentual de IL4-DCs imaturas e IL4-DCs pulsadas na proporção de 3 e 300 partículas de vírus tendo sido observado um aumento após estímulo para maturação e/ou o pulso viral das IL4-DCs (Figura 12).

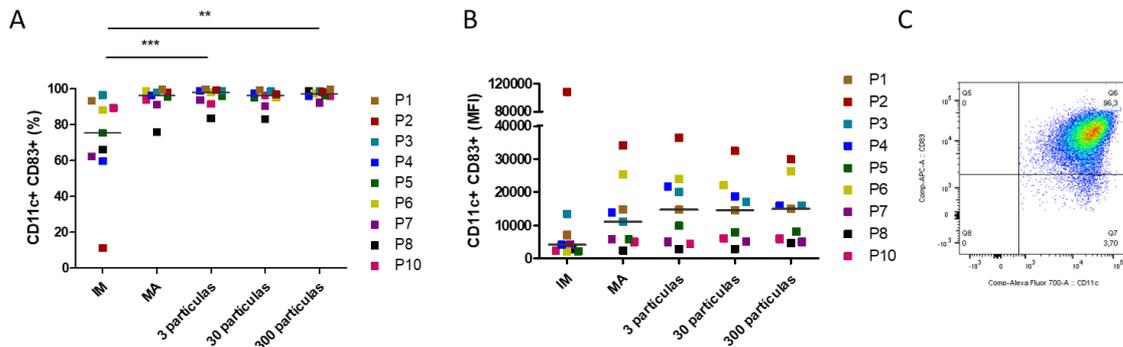


Figura 12 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD83 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD83. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

O mesmo foi observado para a expressão da molécula CD86, para a qual houve um aumento após estímulo para maturação e/ou o pulso viral (Figura 13). A comparação dos níveis de expressão entre culturas estimuladas com diferentes concentrações de vírus não mostrou diferenças entre elas.

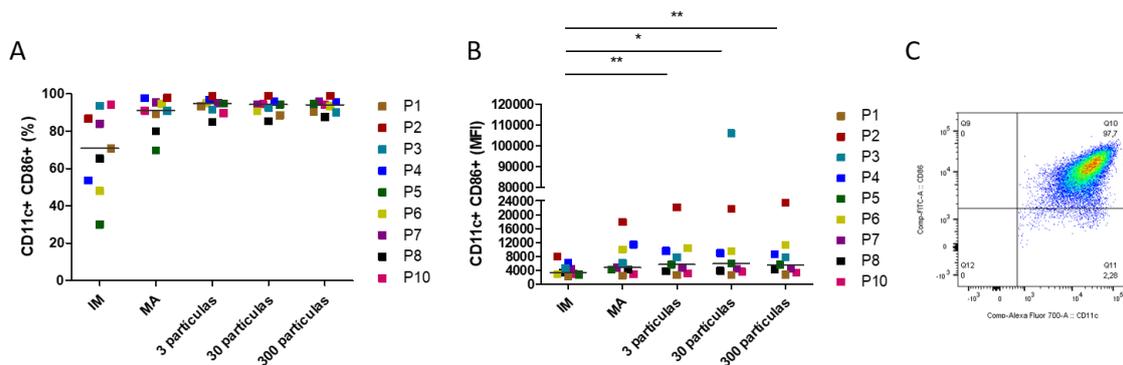


Figura 13 Mediana da expressão da molécula de superfície CD86 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD86. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C).

(C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Com relação a molécula CD40 observamos alto percentual de expressão pelas IL4-DCs independente de seu estágio de maturação e/ou quantidade de vírus para o pulso, não tendo sido observadas diferenças significativas entre as culturas (Figura 14).

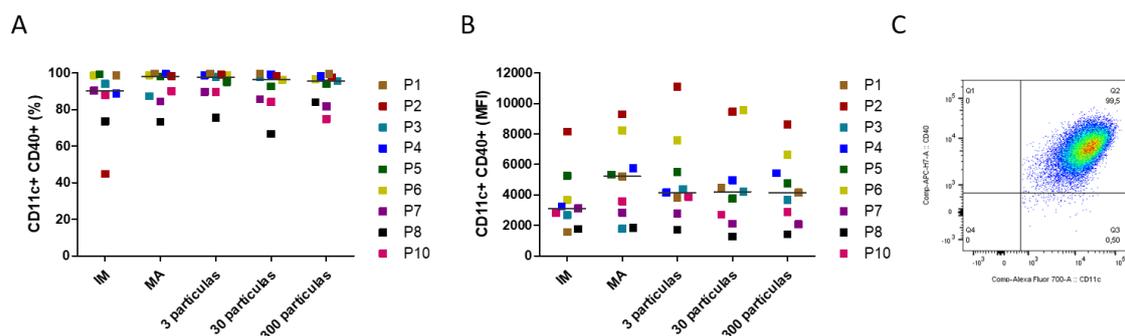


Figura 14 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD40 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD40. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

O mesmo foi observado para a expressão de HLA-DR nas IL4-DCs que em geral apresentou altos níveis de expressão, com ligeiro aumento após o estímulo para maturação e o pulso viral. Quando analisamos a MFI observamos que culturas tratadas com estímulo para maturação apresentaram diferenças com relação ao estágio imaturo, entretanto não observamos diferenças entre as culturas tratadas ou não com diferentes concentrações de vírus (Figura 15).

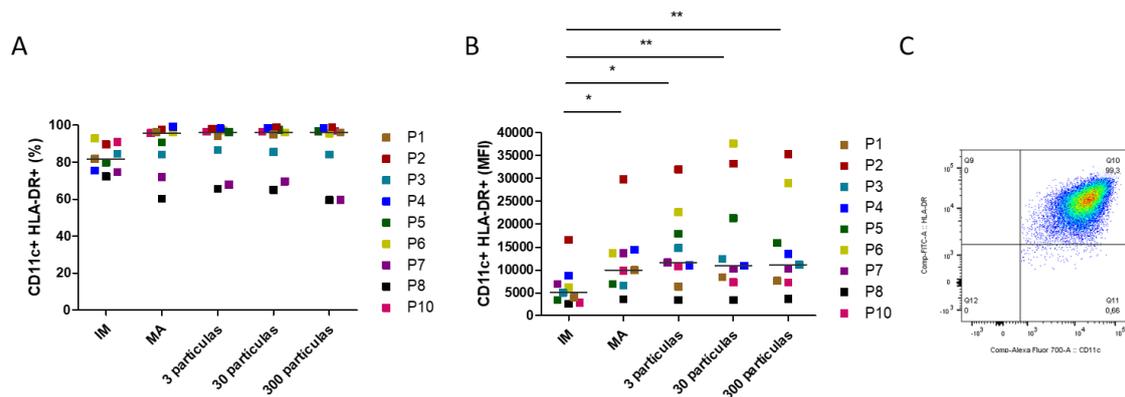


Figura 15 - Mediana da expressão da molécula de superfície HLA-DR pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície HLA-DR. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Analisamos em seguida a expressão de DC-SIGN, na qual observamos uma expressão heterogênea, com grande dispersão interindividual de valores percentuais das IL4-DCs. Embora não tenha havido diferença significativa, observamos que há uma tendência à maior expressão de DC-SIGN por IL4-DCs imaturas, comparadas às ativadas (Figura 16).

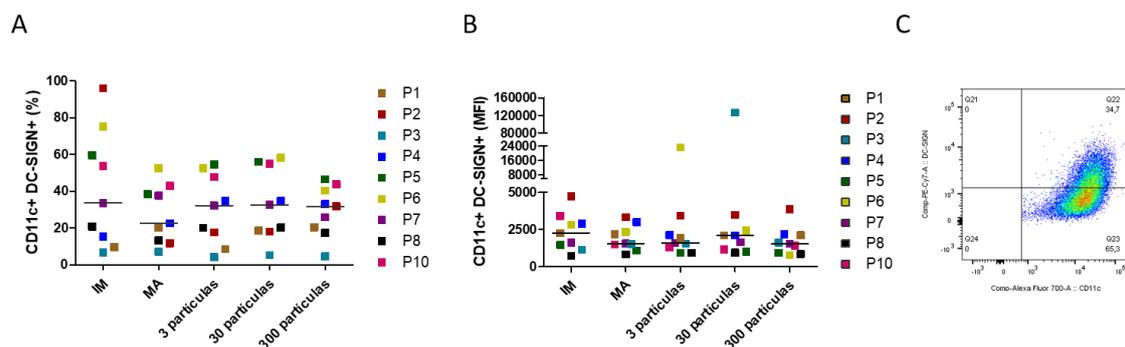


Figura 16 - Mediana da expressão da molécula de superfície DC-SIGN pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície DC-SIGN. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Foram analisadas as expressões de moléculas que exercem a função como co-receptores do HIV, entre elas o CCR5. Os resultados não mostraram diferenças entre IL4-DCs imaturas e ativadas ou entre diferentes quantidades de vírus para o pulso viral (Figura 17).

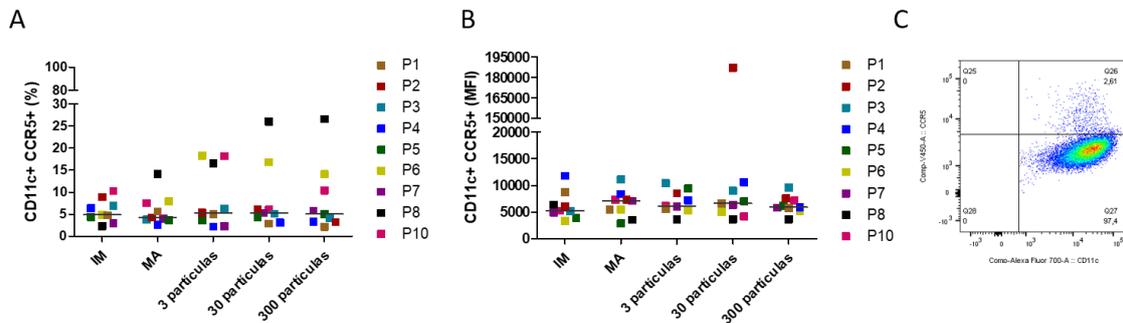


Figura 17 - Mediana da expressão da molécula de superfície CCR5 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CCR5. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Por fim analisamos a molécula CD4, na qual também foi possível observar amostras de três pacientes apresentando nas IL4-DCs alta variabilidade entre os pacientes sendo na expressão ou na intensidade de fluorescência do co-receptor viral (Figura 18).

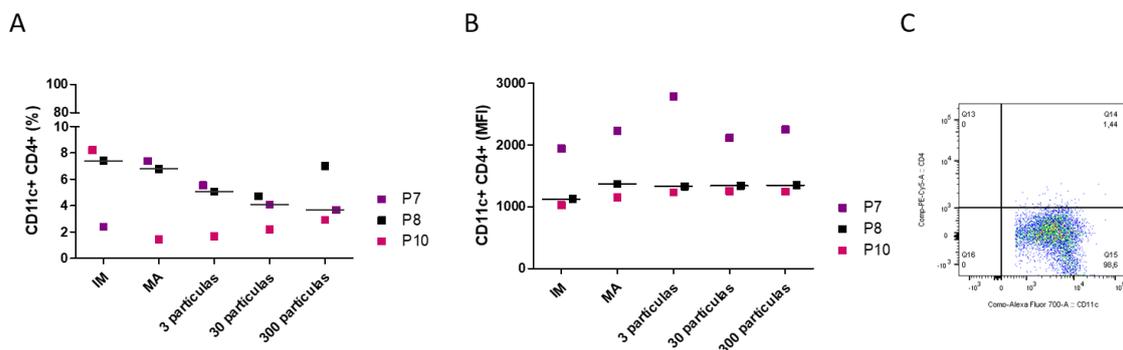


Figura 18 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD4 pelas IL4-DC expressas em porcentagem e MFI. IL4-DCs imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD4. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p < 0,05$). IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

6.2.4 Avaliação da internalização de partículas do HIV por IL4-DCs

6.2.4.1 Avaliação quantitativa

Este ensaio foi realizado com o objetivo de se avaliar a capacidade de internalização de partículas do HIV pelas IL4-DCs imaturas, expostas a diferentes quantidades de vírus. A avaliação foi realizada de forma indireta, através de método quantitativo por ELISA.

Para tanto, IL4-DCs pulsadas com diferentes proporções de vírus foram lisadas e o sobrenadante quantificado com relação à presença da proteína p24 do HIV. Como controle positivo as células foram pulsadas com o vírus AD8. Também avaliamos a presença de p24 em IL4-DCs não pulsadas, provenientes destes mesmos indivíduos infectados.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 19. Observamos níveis similares de proteína p24 em todas as condições testadas. Parece haver um declínio na quantidade de p24 internalizada pela IL4-DC conforme a quantidade de vírus aumenta. Chama a atenção a presença de p24 também em células não pulsadas, mostrando a presença de vírus já nas células precursoras.

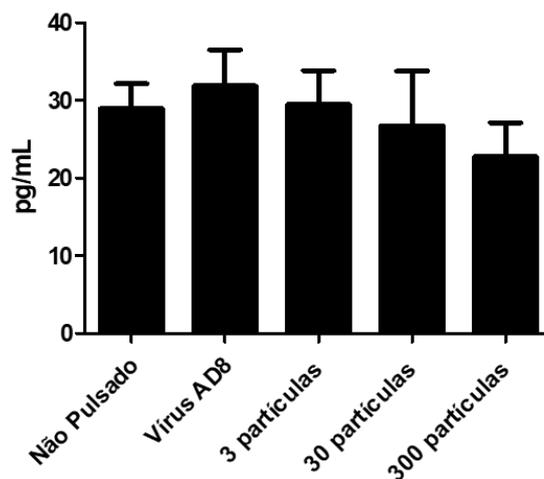


Figura 19 - Quantificação da p24 em IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus. IL4-DCs imaturas de pacientes HIV pulsadas ou não com diferentes quantidades de vírus inativado. A expressão foi avaliada por meio de pg/mL pela técnica de Elisa.

6.2.4.2 Avaliação por imagem

Com o objetivo de visualizar a internalização de partículas de HIV inativado pelas IL4-DCs imaturas utilizamos a técnica de imunofluorescência, seguida de análise por microscopia confocal. Importante salientar que embora a avaliação por imagem tenha sido realizada anteriormente com amostras de indivíduos saudáveis (Apêndice), para paciente HIV+ este ensaio foi realizado com apenas uma amostra, sendo necessária a confirmação destes resultados que serão apresentados a seguir.

As partículas virais foram marcadas com anticorpo dirigido a proteína p24 do HIV. O controle negativo foi constituído por IL4-DCs não pulsadas, mas igualmente manipuladas. O controle positivo foi constituído pelo vírus AD8 não inativado (vírus vivo) MOI de 0,5.

A Figura 20 representa as imagens obtidas para o controle negativo, constituído por células não pulsadas. Embora tenhamos constatado a presença de proteína p24 em IL4-DCs não pulsadas por meio de ensaio quantitativo (item 6.4.2.1), no presente ensaio não houve marcação para proteína p24. Vale salientar que os campos da lamínula foram exaustivamente analisados, para se ter certeza de que não havia nenhuma marcação para p24.

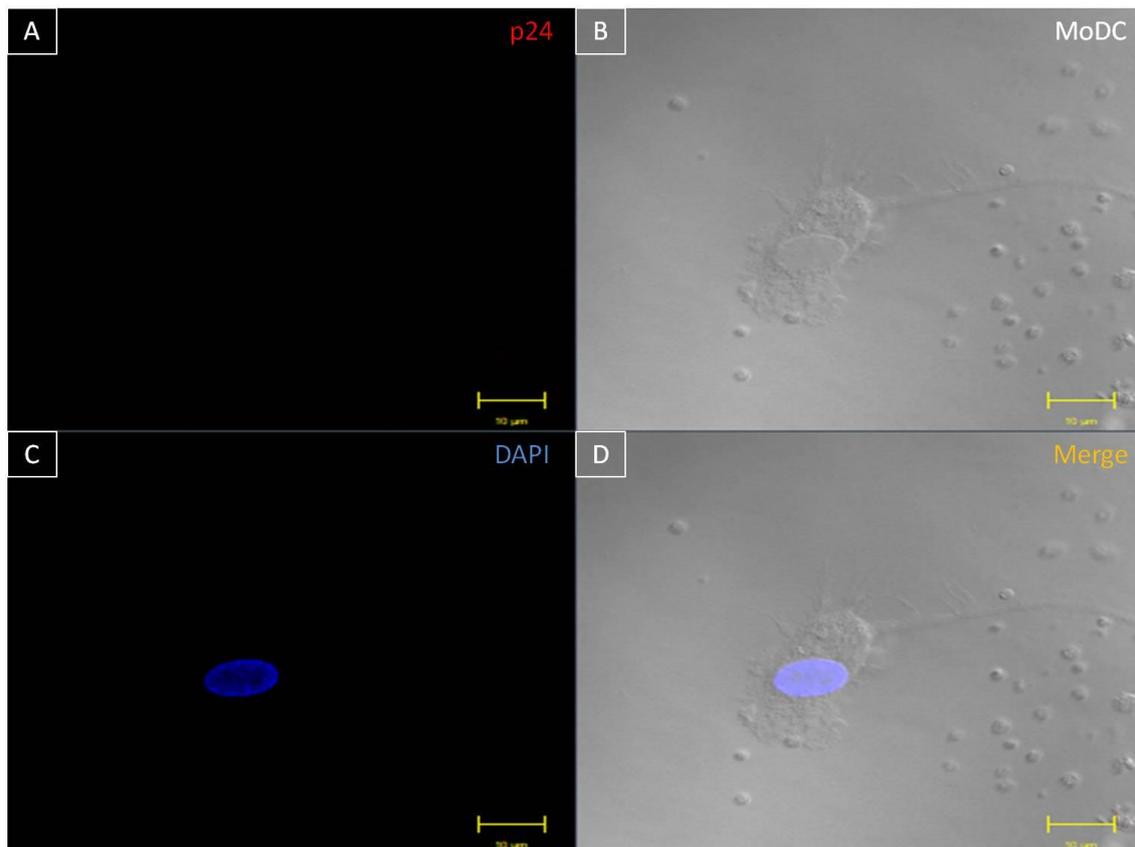


Figura 20 - Análise de IL4-DCs de paciente HIV+ sem o pulso adicional de vírus. IL4-DCs sem o pulso adicional de vírus em meio com presença de DAPI. Sem presença de p24 (A), morfologia das IL4-DCs (B), marcação de DAPI em IL4-DCs (C) e IL4-DCs com marcação para DAPI mas sem presença de p24 (D).

Em seguida analisamos nosso controle positivo, constituído por IL4-DCs pulsadas com vírus AD8, cujas imagens estão representadas na figura 21. Observamos que amostras pulsadas com AD8 apresentaram positividade para p24 o que mostra que a técnica foi bem-sucedida.

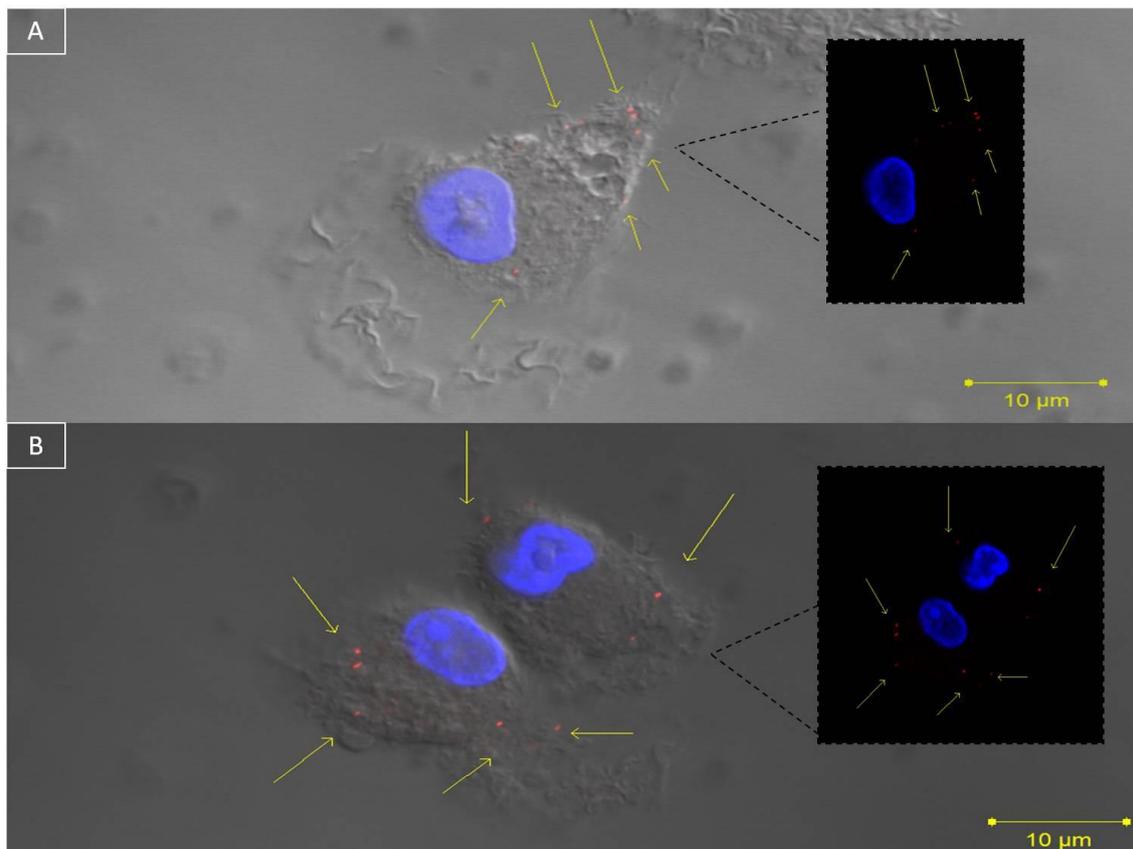


Figura 21 - Análise de IL4-DCs de paciente HIV+ com o pulso adicional de vírus vivo. IL4-DCs com o pulso adicional de vírus em meio com presença de DAPI e marcação de p24. Campo 1 (A) e Campo 2 (B). Foi possível analisar a morfologia da IL4-DC com suas respectivas marcações.

Com relação ao vírus inativado, testamos as proporções de 3, 30 e 300 partículas/célula, representados nas figuras 22A, B, e C, respectivamente. Neste ensaio, diferentemente do observado no ensaio quantitativo, observamos que a internalização de HIV inativado aconteceu em menor proporção com relação ao AD8. Não observamos diferenças entre as IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus.

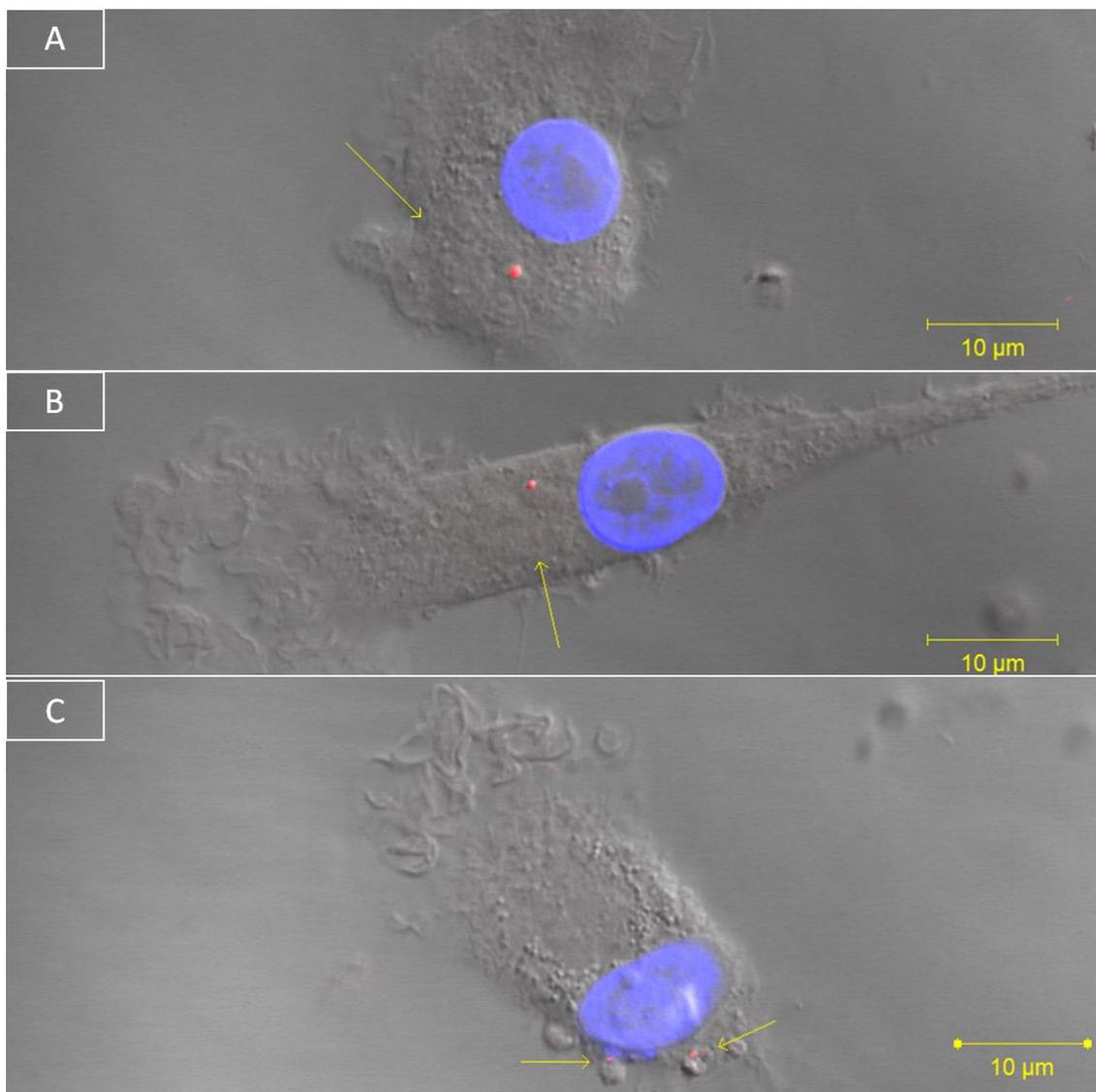


Figura 22 - Análise de IL4-DC de paciente HIV+ com pulso de vírus na proporção de 3, 30 e 300 partículas/célula. IL4-DCs pulsadas na proporção de 3 partículas/célula (A) 30 partículas/célula (B) e 300 partículas/célula (C) em meio com presença de DAPI e marcação de p24.

6.2.5 Produção de IL-12p70 e IL-10

Mensuramos a secreção de IL-12p70 e IL-10 no sobrenadante do 7º dia de cultura de IL4-DC de indivíduos HIV+.

Os resultados obtidos ilustrados na Figura 23 mostram que parece haver uma tendência a aumento da produção de IL-12p70 a partir do aumento da concentração de vírus usado para pulsar as IL4-DCs, entretanto não há significância estatística.

Com relação à IL-10 também não foi possível alcançar significância estatística, entretanto observamos tendência a produção de maiores níveis desta citocina por IL4-DCs imaturas.

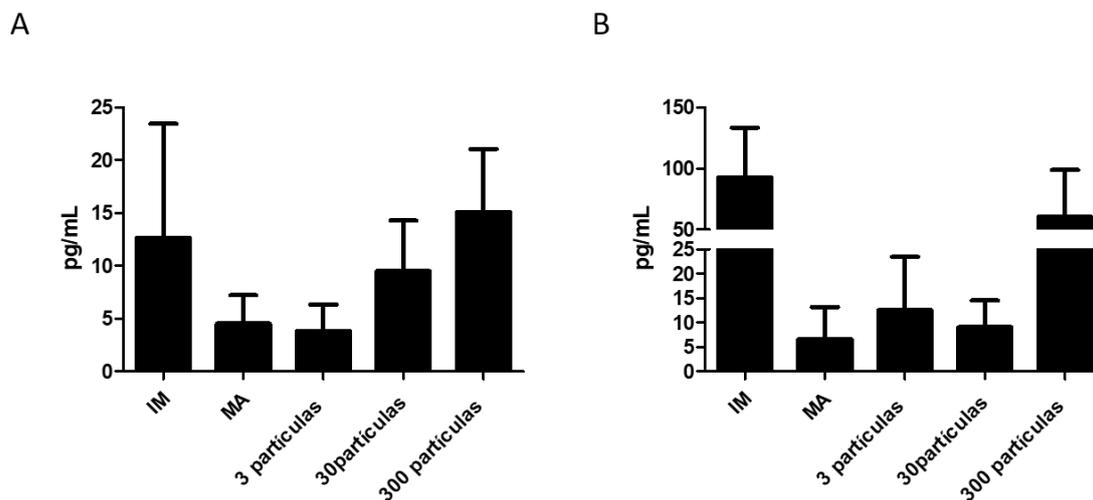


Figura 23 - Produção de IL-12p70 e IL-10 dosada em sobrenadantes de cultura de IL4-DCs. Sobrenadantes de cultura do 7º dia de cultivo de IL4-DCs imaturas, maduras e pulsadas de diferentes quantidades de vírus inativado de pacientes HIV (n= 8). IL-12p70 (A) IL-10 (B). Os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-12p70 por meio da técnica de Elisa. IM: IL4-DC imatura e MA: IL4-DC madura não pulsada.

6.2.6 Efeito do pulso de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T

6.2.6.1 Monitoramento da viabilidade celular durante cocultivo de linfócitos e IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus

Com o objetivo de verificar se o pulso com diferentes concentrações de vírus poderia interferir na viabilidade das IL4-DCs ou se IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus poderiam interferir na viabilidade de linfócitos por elas estimuladas, a viabilidade foi monitorada nestas duas populações celulares após 72 e 96 horas do cocultivo.

Com relação às IL4-DCs, cujos resultados estão representados na figura 24A observamos que o pulso com quantidades crescentes de vírus, não interferiu

na viabilidade destas células, que mantiveram nos mesmos níveis, cerca de 60%, observados no início do cocultivo (Figura 9).

Com relação à viabilidade dos linfócitos (Figura 24B), também não observamos diferenças entre as variáveis estudadas, independente do estímulo para maturação ou diferentes concentrações de vírus para o pulso.

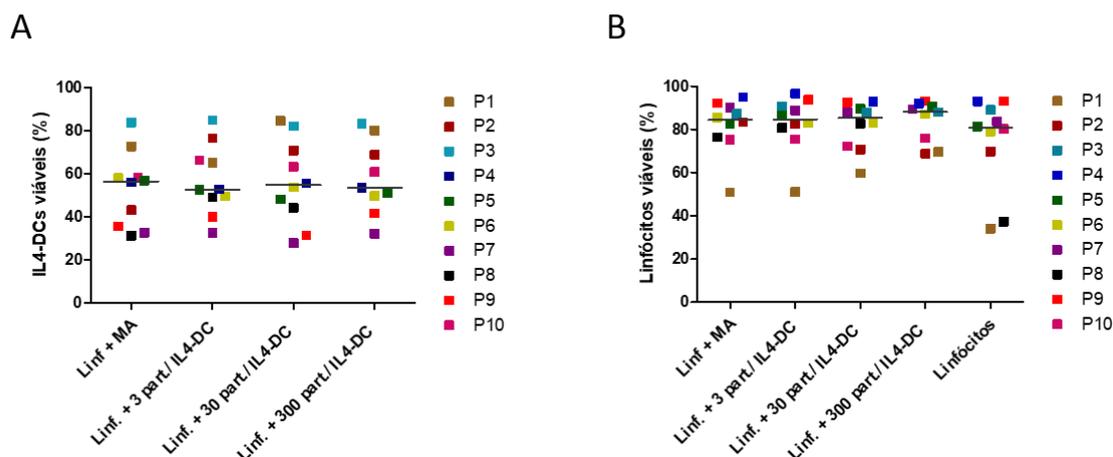


Figura 24 - Análise da viabilidade celular após 72 horas de cocultivo pelas IL4-DCs. Viabilidade dos linfócitos (A) em cocultivo com IL4-DCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado (B) avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de 70% e 60% nos linfócitos e IL4-DCs, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). Linf: linfócitos e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Com relação ao monitoramento após 96 horas de cocultivo, as amostras de linfócitos apresentaram-se moderadamente mais heterogêneas com ligeira redução no percentual de células viáveis em comparação à análise em 72 horas. Embora apresentando percentual de viabilidade menor com relação a viabilidade dos linfócitos, as IL4-DCs mantiveram os mesmos níveis de viabilidade, cerca de 60%, observados no início do cocultivo (Figura 25B).

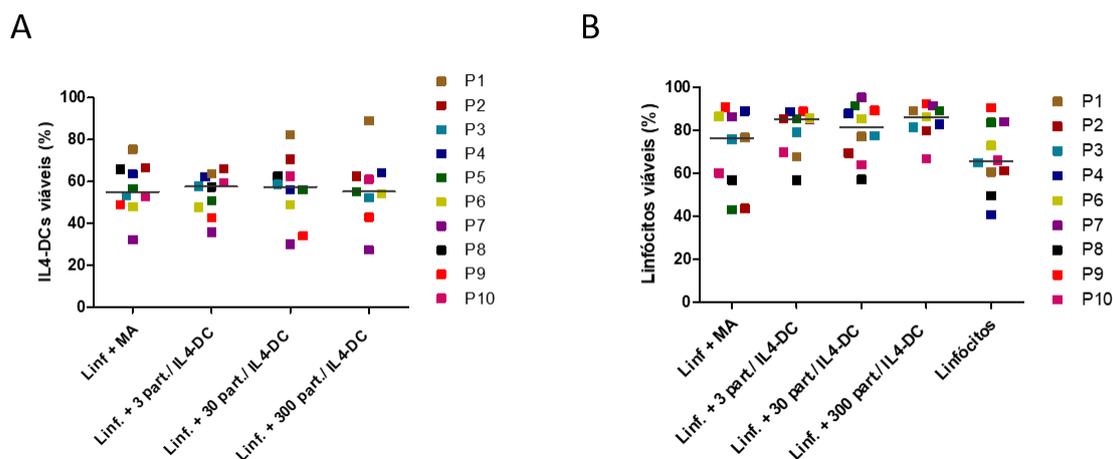


Figura 25 - Análise da viabilidade celular após 96 horas de cocultivo pelas IL4-DCs. Viabilidade dos linfócitos (A) em cocultivo com IL4-DCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado (B) avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 60% e 50% nos linfócitos e nas IL4-DCs, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). Linf: linfócitos e MA: IL4-DC madura não pulsada.

6.2.6.2 Efeito do pulso das IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T

Este ensaio de cocultivo foi realizado para avaliar o efeito do estímulo de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, mensurados através da expressão de CD38, HLADR e CD69 após 72h de co-cultivo.

Em relação à expressão de CD38+/HLA-DR+ os resultados obtidos mostraram que os níveis de expressão foram similares, sugerindo que o pulso de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus (Figura 26A e B) não alterou o perfil de ativação dos linfócitos.

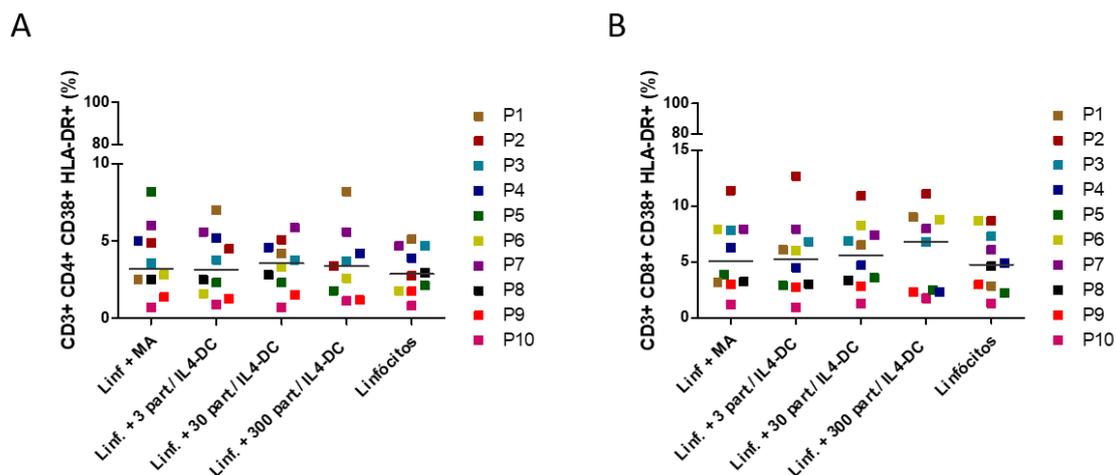


Figura 26 - Mediana da expressão dos marcadores de superfície CD38 e HLA-DR em linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 72 horas. Linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante aos marcadores CD3+ CD4+ CD38+ HLA-DR+ (A), CD3+ CD4+ CD38+ HLA-DR+ (B) analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 15% em células CD4+ e CD8+. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). Linf: linfócitos e MA: IL4-DC madura não pulsada.

Em seguida analisamos o marcador CD69 o qual também está associado a proliferação e ativação de células T. Observamos baixa expressão deste marcador por linfócitos T CD4+ e T CD8+ estimulados pelas IL4-DCs. Os níveis de expressão desse marcador foram semelhantes em todas as variáveis analisadas (Figura 27).

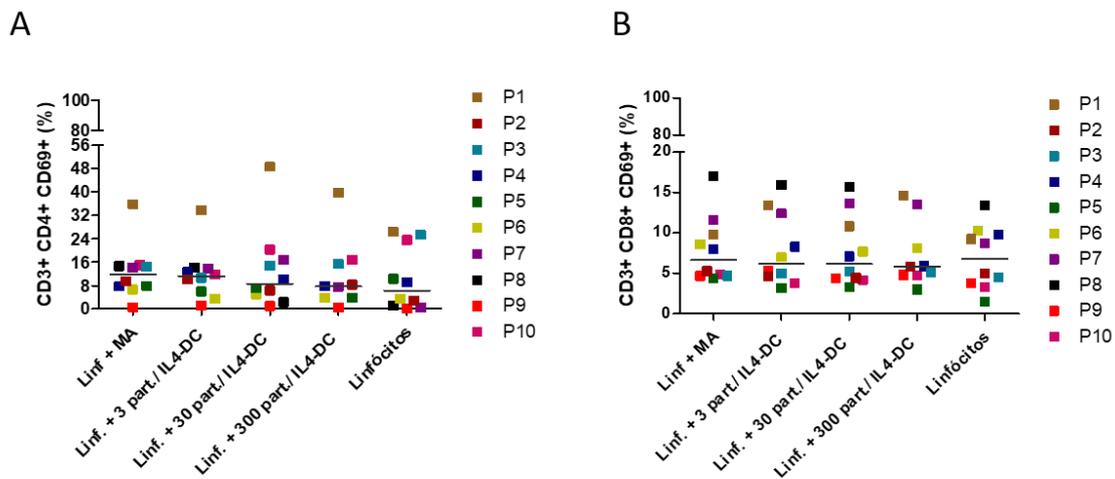


Figura 27 - Mediana da expressão do marcador de superfície CD69 em linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 72 horas. Linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante os marcadores CD3+ CD4+ CD69+ (A), CD3+ CD8+ CD69+ (B) analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 60% em células CD4+ e CD8+. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$ Linf: linfócitos e MA: IL4-DC madura não pulsada).

6.2.7 Análise da expressão de IFN- γ por linfócitos T estimulados por IL4-DCs pulsadas com HIV inativado

A capacidade funcional das IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus em capturar, processar e apresentar antígenos do HIV para linfócitos T estimulando uma resposta específica foi realizada avaliando a produção da citocina IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8 co-cultivados com IL4-DCs durante 96 horas.

De modo geral os resultados obtidos apresentaram uma grande variabilidade interindividual, tanto para a análise de linfócitos TCD4 quanto CD8.

Com relação aos linfócitos T CD4+, diferente do esperado, observamos uma redução significativa na produção de IFN- γ por linfócitos estimulados com IL4-DCs pulsadas com a maior concentração de vírus, 300 partículas/célula, com relação aos linfócitos estimulados por IL4-DCs não pulsadas.

Não observamos quaisquer diferenças com relação a produção de IFN- γ por linfócitos TCD8 estimulados com IL4-DCs pulsadas ou não com as outras concentrações de vírus.

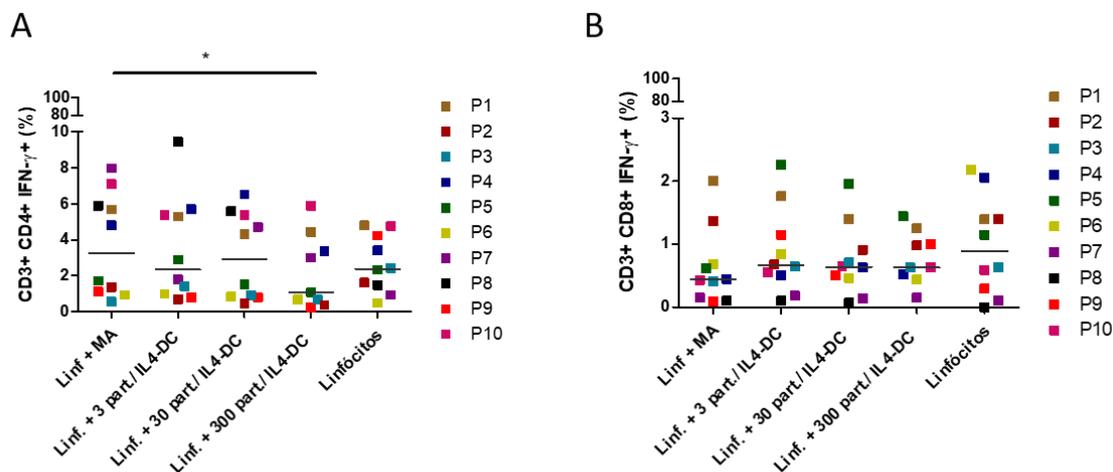


Figura 28 - Mediana da expressão de IFN- γ por linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs por 96 horas. Linfócitos T em cocultivo com IL4-DCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante aos marcadores CD3+ CD4+ IFN- γ + (A), CD3+ CD8+ IFN- γ (B) analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 5% e 8% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* p <0,05). Linf: linfócitos e MA: IL4-DC madura não pulsada.

6.3 Análise do efeito do pulso viral sobre aDC1

6.3.1 Aspecto morfológico de aDC1 derivadas de indivíduos infectados pelo HIV

A avaliação do aspecto morfológico das aDC1 foi realizado da mesma forma que para as IL4-DCs, por meio de microscopia óptica. Monócitos de 04 indivíduos infectados pelo HIV foram diferenciados em aDC1.

Foram observadas mudanças no aspecto morfológico das células ao longo do processo de diferenciação da cultura. Observamos que o estímulo para maturação promove um aspecto mais espreado e fusiforme com relação às aDC1 imaturas, mais arredondadas (Figura 29).

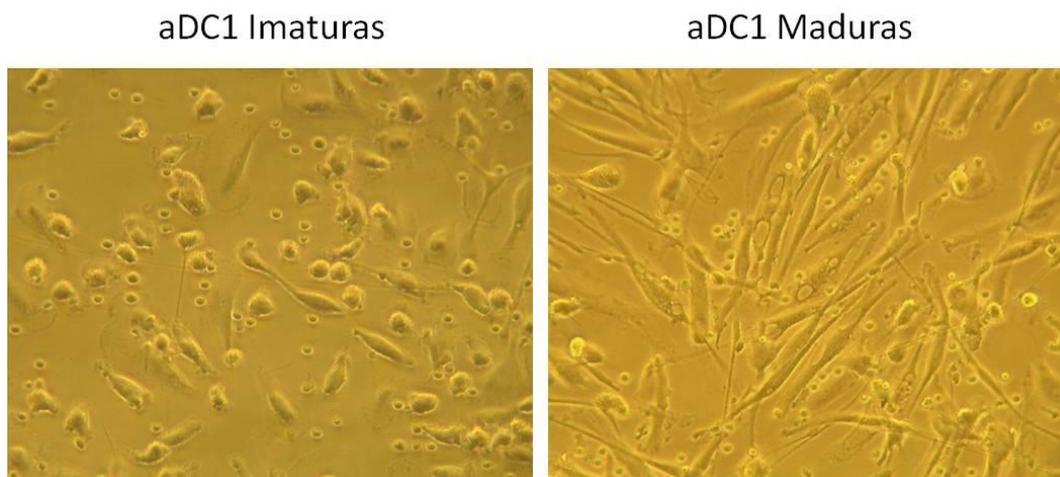


Figura 29 - Análise do aspecto morfológico das aDC1 sem o pulso do vírus. aDC1 imaturas e aDC1 maduras. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

Em se tratando das aDC1 pulsadas com diferentes concentrações de vírus (3, 30 ou 300 partículas/MoDC) foi observado um aspecto semelhante entre elas, independentemente da quantidade de partículas virais utilizadas no pulso (Figura 30).

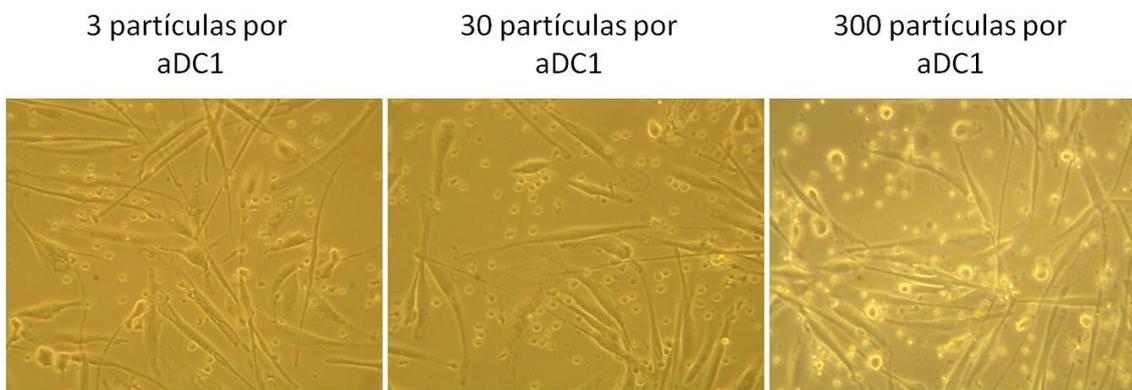


Figura 30 - Análise do aspecto morfológico das aDC1 pulsadas com vírus inativado. MoDCs maduras pulsadas com diferentes quantidades de vírus inativado pelo AT-2. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

6.3.2 Viabilidade das aDC1

aDC1 imaturas, maduras e/ou pulsadas com diferentes quantidades de partículas virais, derivadas de 4 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV

foram analisadas com relação ao perfil fenotípico por meio da técnica de citometria de fluxo. Inicialmente selecionamos as células viáveis utilizando o marcador de viabilidade *Live/Dead* (Figura 31).

Da mesma forma em que foi visto observado para as IL4-DCs a quantidade de partículas virais presentes no pulso adicional parece não influenciar na viabilidade das aDC1, não tendo sido observadas diferenças significativas entre o percentual de viabilidade das amostras analisadas.

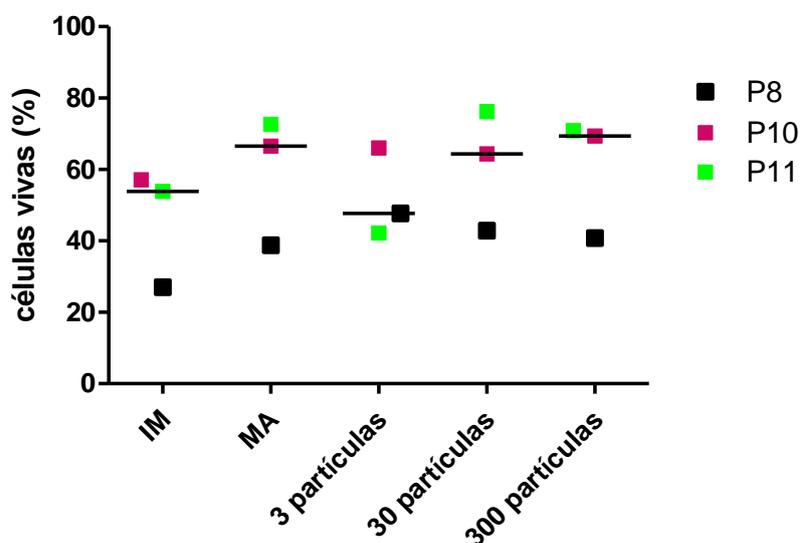


Figura 31 - Análise da viabilidade das aDC1. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. Não foi possível obter resultados do P9 durante o processo de diferenciação devido à falta de material. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

6.3.3 Análise das moléculas de superfície nas aDC1

Após a análise de viabilidade seguimos com a avaliação da expressão dos marcadores CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-DR, CD40, DC-SIGN, CCR5, CXCR4 e CD4 na população de células expressando CD11c.

De modo geral observamos que os resultados obtidos tanto referentes ao percentual de células positivas como de intensidade média de fluorescência (MFI) apresentaram grande variabilidade interindividual.

Podemos sugerir que houve a diferenciação de monócitos em aDC1 devido à baixa expressão do marcador CD14 (Figura 32).

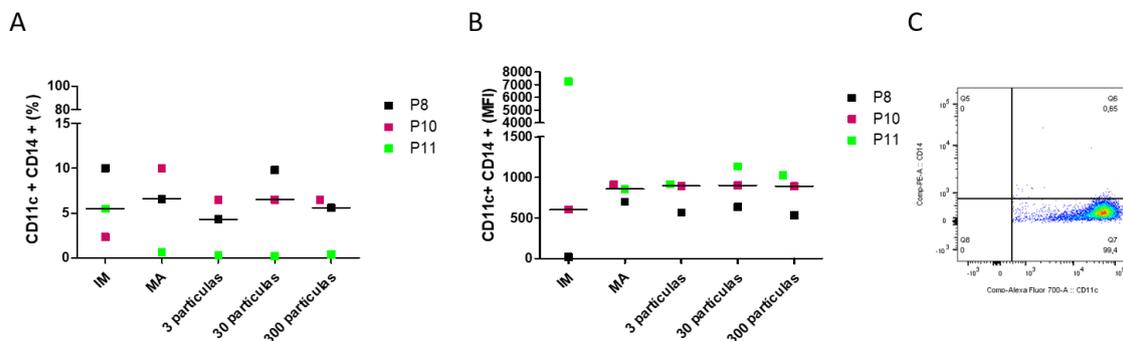


Figura 32 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD14 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD14. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

A molécula CD80 apresentou um aumento após o estímulo para maturação e/ou o pulso, comparado ao estágio imaturo. Por sua vez, quantidades diferentes de vírus para o pulso das aDC1 não interferiram no perfil de expressão desta molécula (Figura 33). Foi possível observar diferenças significativas quando analisamos o perfil de intensidade média de fluorescência entre aDC1 imatura e aDC1 madura.

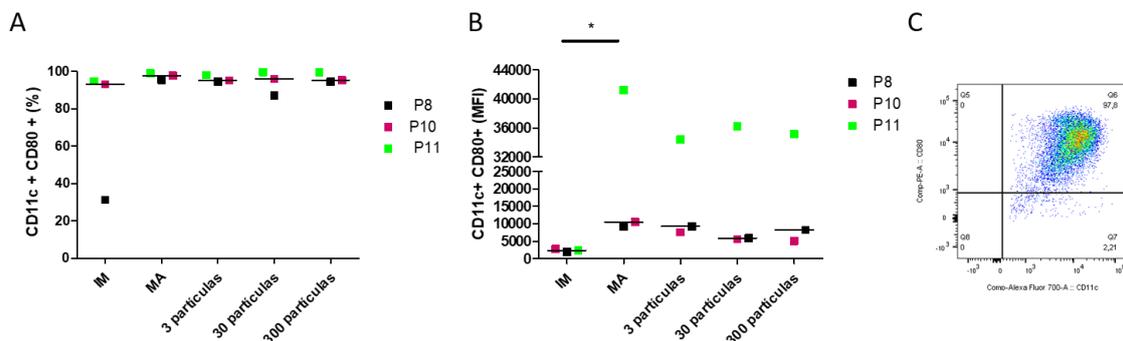


Figura 33 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD80 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD80. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

O mesmo foi possível observar quando comparamos a mediana da expressão da molécula CD83 após estímulo para maturação e/ou o pulso viral das aDC1 (Figura 34).

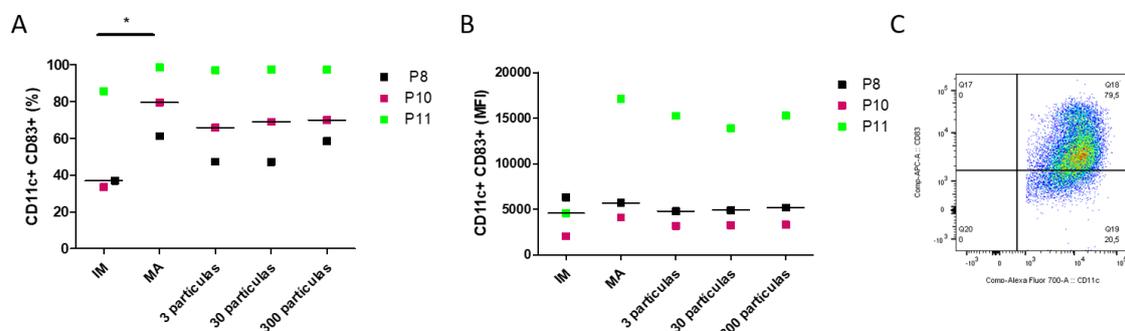


Figura 34 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD83 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD83. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

Com relação a molécula CD86 observamos níveis percentuais similares ao longo do processo de diferenciação (Figura 35).

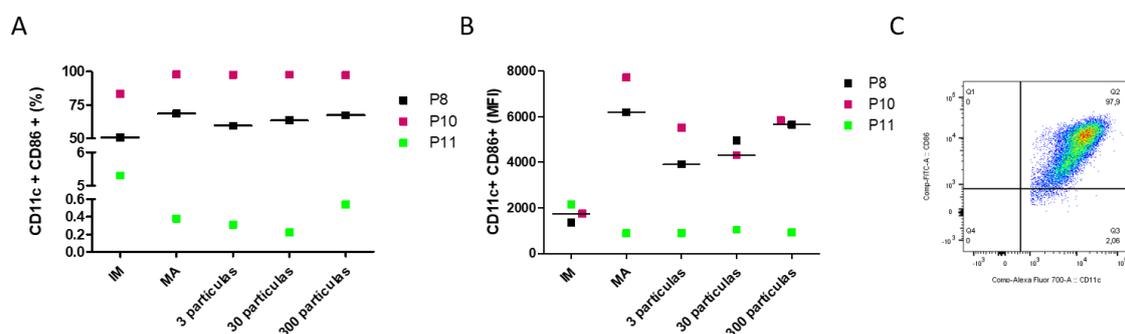


Figura 35 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD86 pelas aDC1 expressas em porcentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD86. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

A molécula CD40 apresentou alto percentual de expressão pelas aDC1 independentemente de seu estágio de maturação (Figura 36).

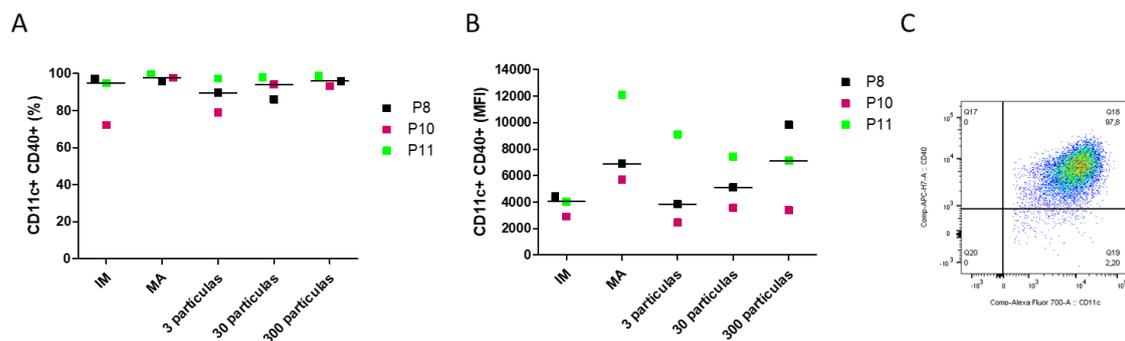


Figura 36 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD40 pelas aDC1 expressas em percentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD40. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

O mesmo foi observado para a molécula de HLA-DR a qual apresentou altos níveis de expressão (Figura 37).

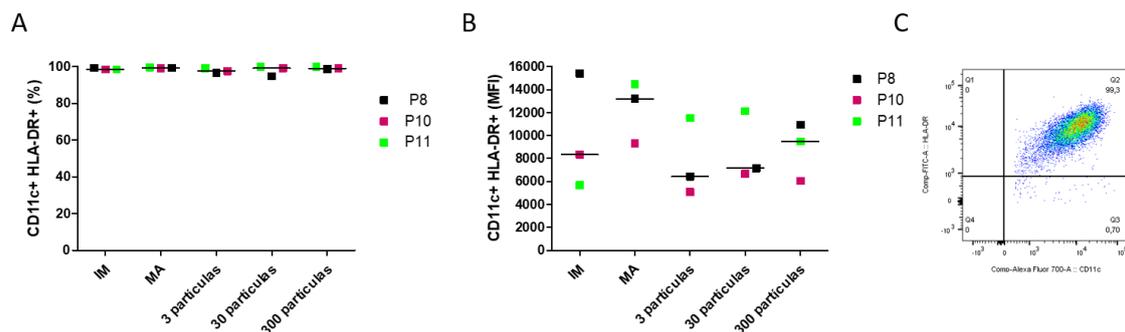


Figura 37 - Mediana da expressão da molécula de superfície HLA-DR pelas aDC1 expressas em percentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície HLA-DR. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

Analisamos em seguida a expressão de DC-SIGN que apresentou variabilidade entre os pacientes, tendo sido observado altos níveis de expressão independente do estágio de maturação e/ou pulso adicional (Figura 38).

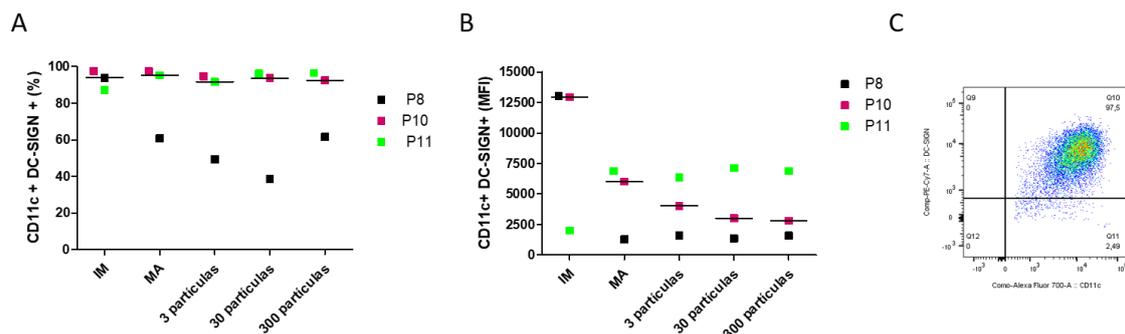


Figura 38 - Mediana da expressão da molécula de superfície DC-SIGN pelas aDC1 expressas em percentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície DC-SIGN. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p<0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

Iniciando a análise dos co-receptores para o vírus entre eles o CCR5 podemos observar alta variabilidade entre os pacientes, não tendo sido observadas diferenças entre aDC1 imaturas e ativadas ou entre diferentes quantidades de vírus para o pulso viral (Figura 39).

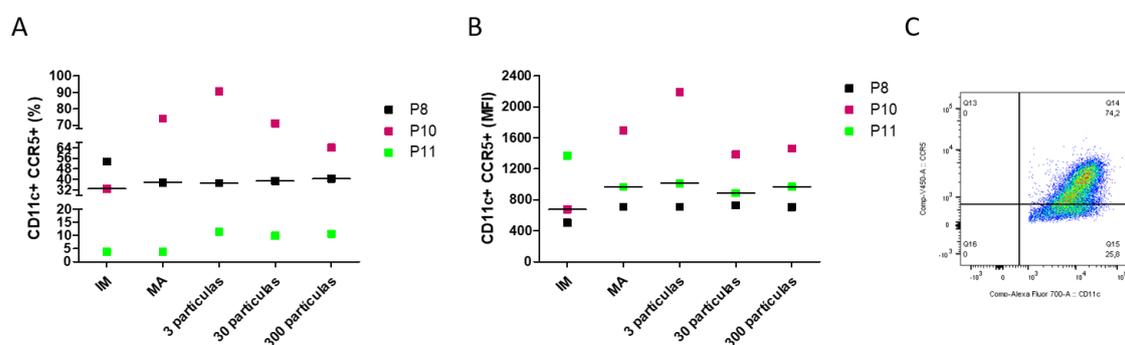


Figura 39 - Mediana da expressão da molécula de superfície CCR5 pelas aDC1 expressas em percentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CCR5. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação ($*p<0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

Por fim, a molécula CD4 apresentou média percentual maior nas aDC1 sem o pulso adicional comparada com as demais variáveis. Apesar do número amostral ser pequeno parece haver uma tendência na medida que aumenta a

quantidade de partículas virais pulsadas nas aDC1, a expressão do co-receptor viral é diminuída (Figura 40).

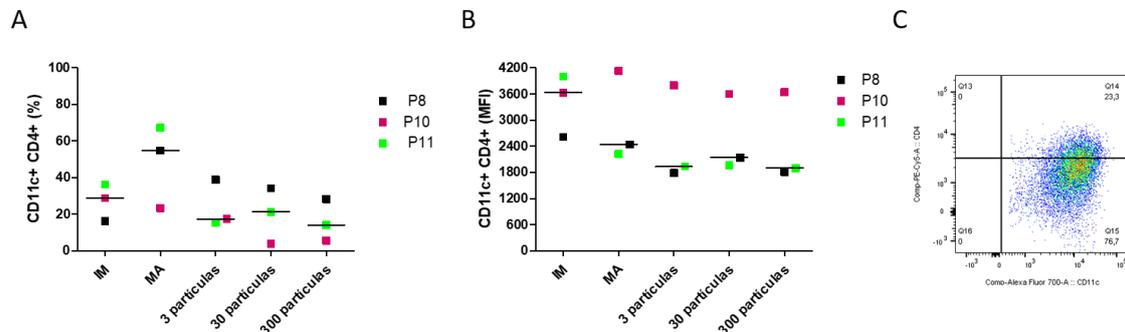


Figura 40 - Mediana da expressão da molécula de superfície CD4 pelas aDC1 expressas em percentagem e MFI. aDC1 imaturas e maduras com ou sem o pulso com diferentes quantidades de vírus inativado, foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos para molécula de superfície CD4. Os resultados foram expressos em forma de percentual de células positivas (A) e MFI (B). A expressão da molécula foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (C). Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

6.3.4 Avaliação da internalização de partículas do HIV por aDC1

6.3.4.1 Avaliação quantitativa

A quantificação da proteína p24 de pacientes HIV após o pulso das aDC1 imaturas com diferentes concentrações de vírus, foi mensurada por meio da técnica de ELISA.

Observamos não haver diferenças entre as diferentes variáveis testadas, tendo sido novamente observado que células não pulsadas, derivadas de pacientes, apresentaram positividade para a proteína p24 (Figura 41).

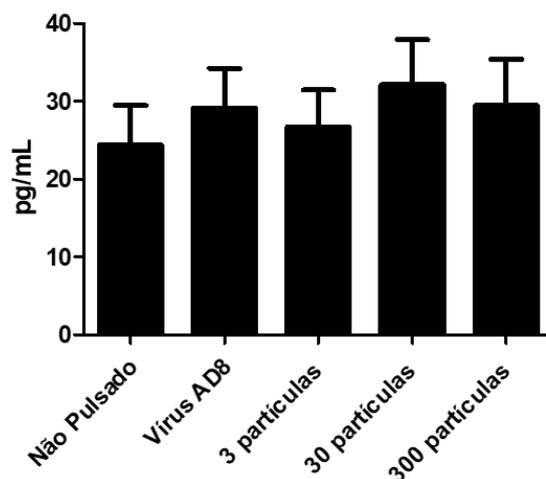


Figura 41 - Quantificação da p24 em aDC1 pulsadas com diferentes quantidades de vírus. aDC1 imaturas de pacientes HIV pulsadas ou não com diferentes quantidades de vírus inativado. A expressão foi avaliada por meio de pg/mL pela técnica de Elisa. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$).

6.3.5 Produção de IL-12p70 e IL-10

Mensuramos a secreção de IL-12p70 e IL-10 no sobrenadante do 7º dia de cultura de aDC1 de indivíduos HIV+.

Foi possível observar uma maior produção de IL-12p70 e IL-10 nas aDC1. Parece haver uma tendência em aumentar a produção de IL-12p70 conforme aumenta a quantidade de partículas virais, e do mesmo modo parece haver uma tendência em diminuir a produção de IL-10 conforme aumenta a quantidade de vírus pulsados nas aDC1, entretanto não observamos qualquer significância estatística entre os valores.

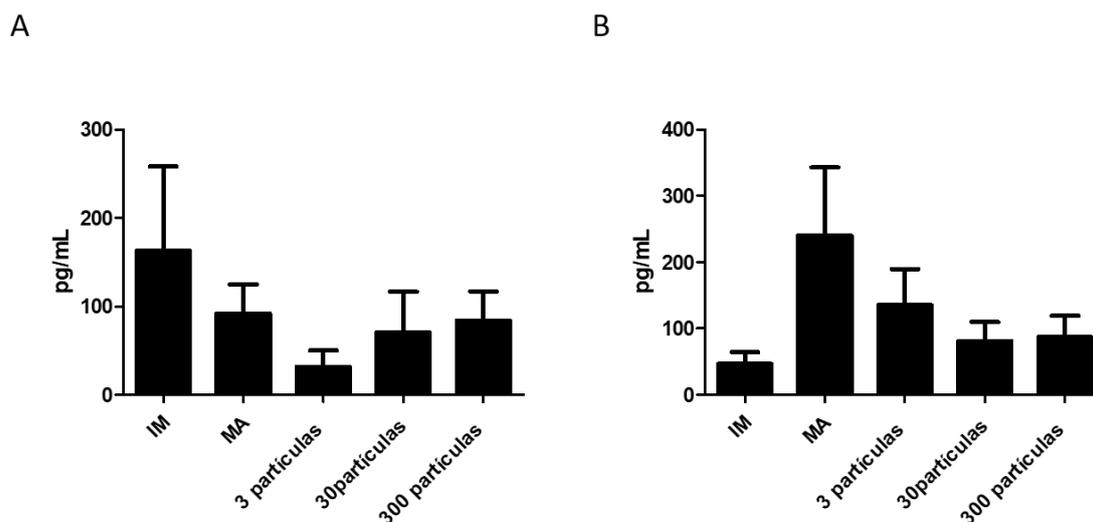


Figura 42 - Produção de IL-12p70 e IL-10 dosada em sobrenadantes de cultura de aDC1. Sobrenadantes de cultura do 7º dia de cultivo de aDC1 imaturas, maduras e pulsadas de diferentes quantidades de vírus inativado de pacientes HIV (n= 4). IL-12p70 (A) IL-10 (B). Os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-12p70 por meio da técnica de Elisa. IM: aDC1 imatura e MA: aDC1 madura não pulsada.

6.3.6 Efeito do pulso de IL4-DCs com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T

6.3.6.1 Monitoramento da viabilidade celular durante co-cultivo de linfócitos e IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus

Analizamos o perfil de viabilidade das culturas, após 72 horas e 96 horas de co-cultivo, tendo sido demonstrado que aDC1 pulsadas com quantidades crescentes de vírus, não interferiram na viabilidade dos linfócitos estimulados pelas aDC1 (Figura 43A). As aDC1 mantiveram os mesmos níveis de viabilidade, cerca de 60%, observados no início do co-cultivo (Figura 31). Foi possível observar diferenças significativas entre culturas estimuladas com aDC1 sem o pulso adicional e aDC1 pulsadas com 3 partículas de vírus.

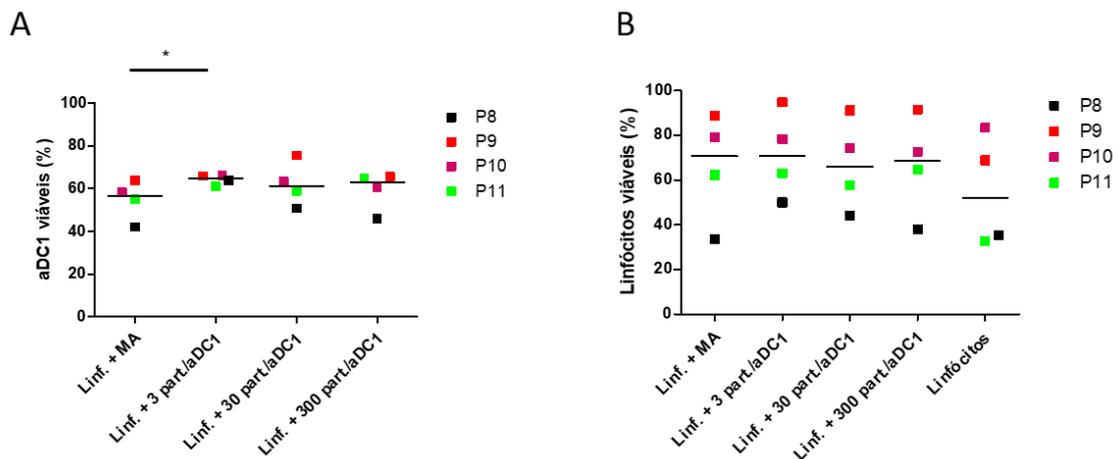


Figura 43 - Análise da viabilidade celular após 72 horas de cocultivo pelas aDC1. Viabilidade dos linfócitos (A) em cocultivo com aDC1 maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado (B) avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 50% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). MA: aDC1 madura não pulsada.

Após 96h as amostras apresentaram-se com ligeira redução no percentual de células viáveis, sendo possível observar níveis semelhantes de viabilidade nas aDC1 pulsadas com diferentes quantidades de vírus (Figura 44B).

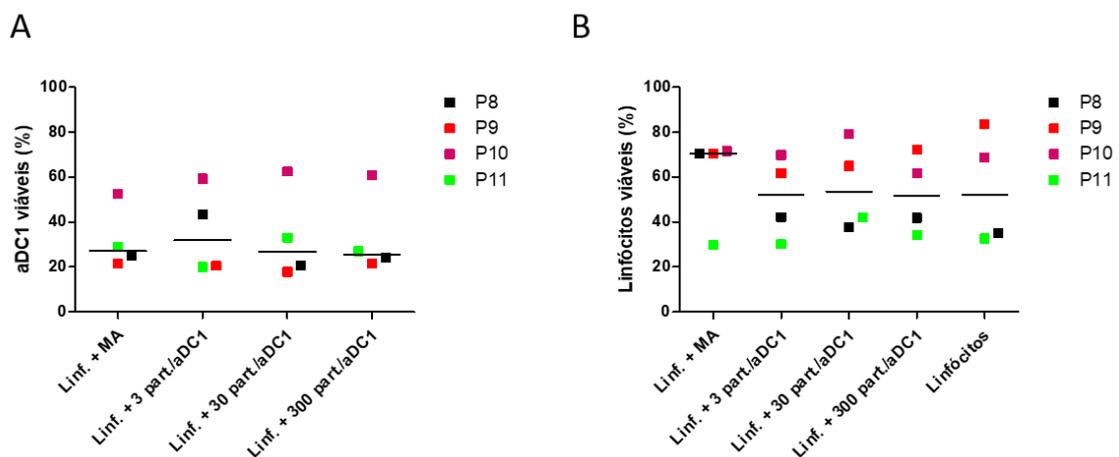


Figura 44 - Análise da viabilidade celular após 96 horas de cocultivo pelas aDC1. Viabilidade dos linfócitos (A) em cocultivo com aDC1 maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado (B) avaliadas pelo marcador *Live/Dead* e pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 50% e 30% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). MA: aDC1 madura não pulsada.

6.3.6.2 Efeito do pulso das aDC1 com diferentes quantidades de vírus sobre o perfil de ativação de linfócitos T

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar o perfil de ativação de linfócitos T estimulados por aDC1 pulsadas com diferentes quantidades de vírus, por meio da expressão de CD38, HLADR e CD69 após 72h de co-cultivo.

Em relação aos marcadores CD38+/HLA-DR+ os resultados mostraram que diferentes quantidades de vírus para o pulso de aDC1 (Figura 45A e B) não alterou o perfil de ativação dos linfócitos. Vale ressaltar que os níveis de expressão foram similares, e por vezes ligeiramente inferiores, aos de culturas cujas aDC1 não foram pulsadas com vírus.

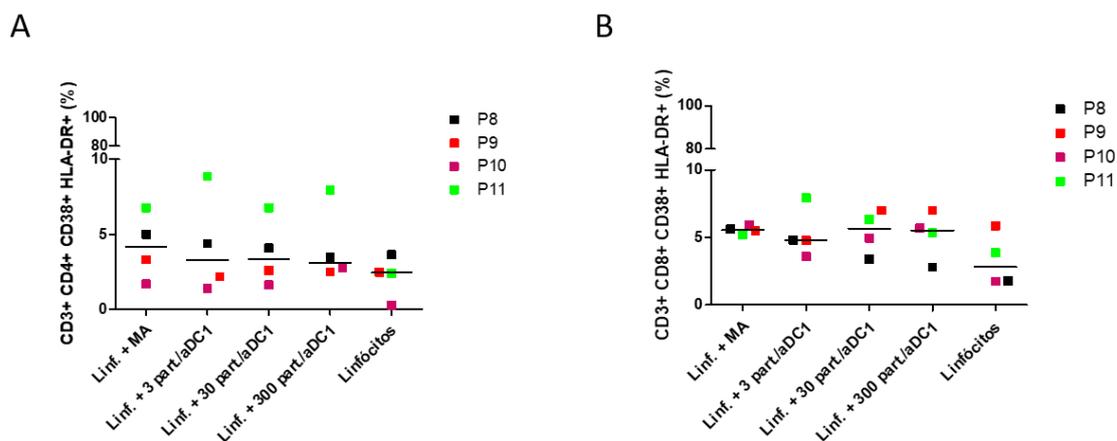


Figura 45 - Mediana da expressão dos marcadores de superfície CD38 e HLA-DR em linfócitos T em cocultivo com aDC1 por 72 horas. Linfócitos T em cocultivo com MoDCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante aos marcadores CD3+ CD4+ CD38+ HLA-DR+ (A), CD3+ CD4+ CD38+ HLA-DR+ (B) analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 15% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). MA: aDC1 madura não pulsada.

Analisamos a molécula CD69 na qual foi possível observar baixa expressão por linfócitos T CD4+ e T CD8+ estimulados por aDC1 pulsadas ou não com diferentes quantidades de vírus inativado (Figura 46B).

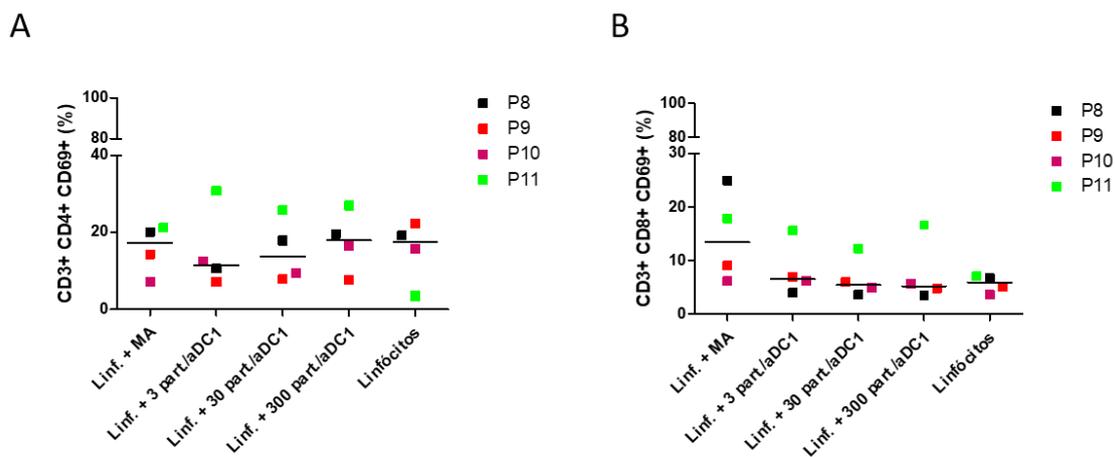


Figura 46 - Mediana da expressão do marcador de superfície CD69 em linfócitos T em cocultivo com aDC1 por 72 horas. Linfócitos T em cocultivo com MoDCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante aos marcadores CD3+ CD4+ CD69+ (A), CD3+ CD8+ CD69+ (B) analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 40% e 50% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). MA: aDC1 madura não pulsada.

6.3.7 Análise da expressão de IFN- γ por linfócitos T estimulados por aDC1 pulsadas com HIV inativado

Analisamos a capacidade das aDC1 pulsadas ou não com diferentes quantidades de vírus em estimular uma resposta específica por meio de cocultivo com linfócitos T durante 96 horas.

Com relação a expressão de IFN- γ ao estímulo com aDC1, ainda que sem apresentar diferenças significativas, parece haver maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ em cocultivo com aDC1 estimuladas com 3 partículas virais. Ao mesmo tempo, linfócitos sem o estímulo de aDC1 apresentam média percentual ligeiramente maior quando comparado com linfócitos em cocultivo com aDC1 (Figura 47A).

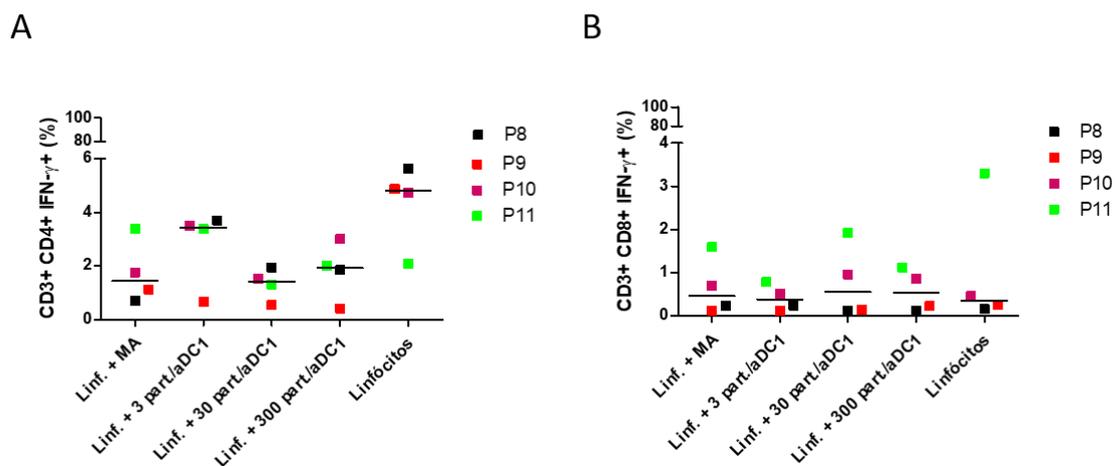


Figura 47 - Produção de IFN- γ por linfócitos estimulados por aDC1 durante 96 horas. Linfócitos T em cocultivo com MoDCs maduras com ou sem o pulso de diferentes quantidades de vírus inativado, foram selecionados mediante os marcadores CD3+ CD4+ IFN- γ + (A), CD3+ CD8+ IFN- γ + (B), analisados pela técnica de citometria de fluxo. O controle positivo foi constituído de PMA/IONO, apresentando média de expressão em 6% e 20% em células T CD4+ e T CD8+, respectivamente. Foi utilizado a análise *one-way* Anova para comparação (* $p < 0,05$). MA: aDC1 madura não pulsada.

7. DISCUSSÃO

Vacinas terapêuticas baseadas em MoDCs constituem ferramentas potenciais para complementar a terapia antirretroviral e auxiliar na restauração da resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV. Além disso, recentemente a utilização de MoDCs tem sido proposta para reativar reservatórios virais (van Montfort e colaboradores 2017⁽⁴³⁾; van der Sluis e colaboradores 2013⁽⁴⁴⁾), que juntamente com uma terapia antirretroviral altamente potente poderia levar à cura esterilizante da infecção pelo HIV.

Para a composição de uma vacina terapêutica muitos aspectos devem ser considerados, tais como o tipo de MoDCs empregado, o estímulo para sua ativação e a definição do antígeno carregado pela DC para o qual se quer direcionar a resposta imune efetora. No cenário do HIV diversos antígenos são utilizados para pulsar MoDCs, dentre esta variedade, destacamos o uso do vírus inteiro e quimicamente inativado pelo AT-2, pela disponibilidade do repertório completo dos antígenos do HIV. Além disso, o processo de inativação química preserva a integridade e a conformação estrutural das proteínas virais⁽⁴⁰⁾.

Poucos trabalhos utilizam o vírus inteiro inativado para o pulso das MoDCs e além disso não há relatos na literatura sobre os critérios utilizados para a definição da proporção de vírus/MoDC para a produção da vacina. Neste sentido, utilizando partículas virais circulantes, isoladas por plasmáfereze e inativadas pelo calor Garcia e colaboradores (2005)⁽³⁹⁾ produziram uma vacina de MoDCs pulsadas com a proporção de 2 vírus/MoDC. O nosso trabalho tem como base o protocolo de Lu e colaboradores (2004)⁽³⁸⁾ que em ensaio clínico utilizou para o produto vacinal vírus isolados, expandidos em sistema autólogo e quimicamente inativados, na proporção de 10^9 partículas virais para pulsar 3×10^7 MoDCs, o que resulta em cerca de 30 partículas virais para cada MoDC.

Para a obtenção de partículas virais é necessário realizar o isolamento do vírus a partir de amostras de sangue periférico e uma vez isolados, os vírus

devem ser expandidos *in vitro* utilizando células CD4+ autólogas (sistema autólogo de expansão) ou provenientes de indivíduos saudáveis (sistema alogênico de expansão).

A produção das doses de vacina para uso em protocolo clínico requer grandes quantidades de HIV, de modo que a obtenção dos vírus constitui um processo laborioso e demorado que pode durar meses, até se obter a quantidade necessária.

Assim, com o objetivo de otimizar e racionalizar a etapa de produção viral, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes concentrações de vírus inativados para pulsar MoDCs. Assim, propusemos o pulso com concentrações 10 vezes menor e 10 vezes maior do que a utilizada na vacina de Lu e colaboradores (2004)⁽³⁸⁾, quais sejam de 3, 30 ou 300 partículas virais/MoDCs a fim de analisar as células pulsadas com relação ao perfil fenotípico e funcional.

Com relação à metodologia empregada para a obtenção das partículas virais, anteriormente nosso grupo avaliou o rendimento das culturas virais expandidas em sistema autólogo e alogênico, tendo sido constatado que a cultura alogênica apresenta vantagens em termos de rendimento viral e imunogenicidade quando comparada ao sistema autólogo⁽⁴¹⁾. Com base nesta evidência e devido à limitação na quantidade de células dos pacientes, em nosso projeto não seria possível a expansão viral em células autólogas. Sendo assim, para este trabalho as culturas virais foram expandidas em células de indivíduos saudáveis tendo sido obtido um rendimento de aproximadamente 80×10^9 partículas virais, suficientes para a condução de todos os ensaios. Além disso, optamos pelo uso de *pool* de vírus devido à dificuldade em expandir isolados de alguns dos pacientes incluídos.

Uma vez tendo disponíveis as partículas virais iniciamos os ensaios para obtenção das MoDCs, sendo que inicialmente estudamos as IL4-DCs. A morfologia das IL4-DCs imaturas revela um aspecto celular mais arredondado e quando comparadas com as IL4-DCs maduras, sem o pulso adicional de vírus, observamos a presença de prolongamentos mais longos e delgados. Tais perfis estão de acordo com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Por sua vez, quando comparamos IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus não observamos diferenças, o que sugere que diferenças na concentração de vírus não interferem na morfologia destas células.

Em relação à viabilidade das IL4-DCs nossos resultados não demonstraram alterações entre as IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de partículas virais, visto que em toda a fase do processo a média de viabilidade ficou em torno de 60%, de modo que parece não haver uma tendência do vírus inativado em causar morte celular, já que a viabilidade das IL4-DCs com o pulso adicional é bastante similar com os índices observados para as IL4-DCs não pulsadas. Neste sentido, em ensaios clínicos referentes a vacinas terapêuticas utilizando vírus autólogos Macatangay e colaboradores (2016)⁽⁴⁵⁾ e Garcia e colaboradores (2011)⁽¹³⁾ demonstraram por citometria de fluxo aproximadamente 80% de viabilidade das MoDCs.

A fenotipagem das IL4-DCs considerando os marcadores de ativação, receptores de padrão molecular e receptores de quimiocinas foi similar independente do estímulo adicionado.

Com relação ao marcador CD14, nossos resultados corroboram com a literatura uma vez que a expressão está reduzida em IL4-DCs, mostrando que houve a diferenciação de monócitos para IL4-DCs, como esperado ⁽⁴⁶⁾.

Além disso, o estímulo para maturação foi capaz de aumentar a expressão das moléculas HLA-DR, CD83, CD86, CD80 e CD40, confirmando o estágio de maturação das IL4-DCs. Considerando que além do pulso viral as IL4-DCs foram estimuladas com um potente coquetel de citocinas inflamatórias e que as porcentagens destes marcadores foram próximas de 100% podemos especular que eventuais diferenças que poderiam ter sido provocadas por diferentes quantidades de vírus poderiam ter sido equalizadas pelo estímulo inflamatório. Outro fator a ser considerado é que as diferenças de proporção utilizadas no pulso adicional podem não ter sido suficientes para modificar o perfil fenotípico.

A molécula HLA-DR é expressa nos diferentes estágios de maturação tendo a IL4-DC madura uma maior expressão quando comparada à IL4-DC imatura, sendo possível observar nos níveis de porcentagem e no MFI. Seus

níveis de expressão tendem a aumentar conforme a IL4-DC é ativada, uma vez que sua capacidade de internalização de antígenos é diminuída em favor do aumento na função de apresentação antigênica ⁽⁴⁷⁾.

Com relação à molécula CD83 sua função ainda não é bem compreendida, mas sabe-se que no contexto das IL4-DCs ela está envolvida com a maturação e ativação dessas células, desempenhando um papel coestimulador na estimulação de células T *naive* e de memória ^(48, 49).

Moléculas como CD40, CD80 e CD86 presentes nas APCs em contato com os ligantes presentes nos linfócitos CD40L e CD28 respectivamente, promovem a coestimulação de células T CD4+, promovendo a apresentação antigênica e conduzindo a uma resposta específica ⁽⁵⁰⁾. A interação do CD40 com o CD40L além de induzir o aumento da expressão de CD80 e CD86, induz a liberação de IL-12 ⁽⁵¹⁾. Ambos CD28 e CD86 são expressos constitutivamente, enquanto CD80 somente é expresso na ativação de células T e APCs ⁽⁵²⁾.

Em relação ao DC-SIGN não observamos diferenças na expressão do receptor entre as diferentes concentrações de vírus, entretanto quando comparamos o perfil das IL4-DCs imaturas com as IL4-DCs maduras nossos resultados demonstram grande variabilidade. DC-SIGN é um receptor de membrana presente também nas IL4-DCs, na qual a sua interação com glicanos patogênicos leva a internalização e apresentação antigênica ⁽⁵³⁾. No contexto da infecção pelo HIV, Engering e colaboradores (2002)⁽⁵⁴⁾ demonstraram a alta afinidade entre DC-SIGN e a gp120, promovendo a captura do vírus levando a infecção dos linfócitos T CD4+.

A entrada do HIV na célula requer interações com a glicoproteína viral do envelope (Env), molécula de superfície CD4 e o correceptor para o HIV CCR5 ⁽⁵⁵⁾. Além disso, o CCR5 direciona a migração dessas células para sítios inflamatórios ^(56, 57). Nossos resultados mostraram não haver diferença quando comparamos as diferentes concentrações de vírus e/ou IL4-DCs imaturas e maduras. Steiman e colaboradores (1996)⁽⁵⁸⁾ e Turville e colaboradores (2001)⁽⁵⁹⁾ demonstraram expressões relativamente baixas dos correceptores nas MoDCs o que corrobora com os nossos resultados. Entretanto o baixo perfil de

expressão, também pode sugerir que partículas virais tenham sido internalizadas pelas vias DC-SIGN, CCR5 e CD4 mas não podemos afirmar se a concentração de vírus interfere nas vias.

Em resumo, com relação ao perfil fenotípico observamos que houve diferenciação de monócitos em IL4-DCs imaturas e posteriormente em IL4-DCs maduras, utilizando estímulo inflamatório e/ou pulso viral. Estas células apresentaram características comumente conhecidas, entretanto a avaliação de diferentes quantidades de vírus para o pulso não mostrou diferenças no perfil fenotípico.

Com o objetivo de avaliar a internalização de partículas virais após o pulso de DCs, analisamos a presença da proteína p24 nas IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de antígeno. Por meio do método de ELISA não conseguimos observar um aumento na proteína p24 conforme o acréscimo da quantidade de vírus. Curiosamente, IL4-DCs não pulsadas também apresentaram positividade para p24, sugerindo a presença de vírus endogenamente produzido, o que é um fato razoável, considerando que o precursor utilizado foi o monócito, reconhecido reservatório de HIV. Estamos cientes que nossos ensaios devem ser interpretados com cautela, visto que falhamos em não incluir um controle de células não pulsadas derivadas de indivíduo não infectado

Em paralelo, analisamos a internalização da proteína p24, por meio de microscopia confocal. Diferente do observado no ensaio quantitativo em relação ao vírus AD8, foi possível analisar uma maior internalização de p24 nas IL4-DCs pulsadas. Não identificamos diferenças entre as IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus.

Turville e colaboradores (2004)⁽⁶⁰⁾ demonstrou que a meia vida de p24 em MoDCs imaturas pulsadas com AT-2 HIV-1_{BAL} é de aproximadamente 4 horas podendo ser encontradas em vesículas. Nossos resultados demonstram haver similaridade visto que observamos marcações de p24 localizadas em posições que se aparenta serem vesículas, entretanto devido à falta de uma marcação

específica não é possível confirmar. Novos ensaios já estão sendo elaborados pelo grupo.

Citocinas como IL-12p70 e IL-10 possuem funções fundamentais na interação entre células apresentadoras de antígenos e células T durante a resposta imune. Por meio da técnica de ELISA foi possível mensurar a produção destas citocinas a partir do sobrenadante do 7º dia de cultura.

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por DCs, macrófagos e células B em resposta a patógenos. Ao ser secretada, induz a produção de IFN- γ por linfócitos T promovendo a diferenciação para o perfil Th1 (revisto por Vignali e Kuchroo, 2012)⁽⁶¹⁾. Por outro lado, a produção de IL-10 leva à inibição do desenvolvimento de resposta Th1⁽⁶²⁾. Quando comparamos a produção de IL-12p70 nas IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus, houve um aumento gradual desta citocina.

A seguir analisamos o perfil funcional das IL4-DCs com relação à capacidade de ativar linfócitos T, por meio da análise da expressão de marcadores de ativação CD38/HLADR e CD69 e produção de IFN- γ .

A partir do monitoramento de viabilidade celular durante 72 e 96 horas observamos que concentrações crescentes de vírus não interferiram na viabilidade das IL4-DCs. Presicce e colaboradores (2012)⁽⁶³⁾ demonstraram não haver morte celular após três dias de co-cultivo entre linfócitos T e MoDCs infectadas por SIV, estimuladas por LPS. Em nossos ensaios, foi possível observar uma menor viabilidade celular quando comparamos a variável composta apenas por linfócitos entre as demais compostas por linfócitos e IL4-DCs, corroborando com os resultados também demonstrados por Presicce e colaboradores (2012)⁽⁶³⁾.

Com relação à expressão de CD38 e HLA-DR, observamos que mesmo utilizando concentrações crescentes de vírus para o pulso viral obtivemos baixos níveis de expressão, independentemente da quantidade de vírus e os valores foram similares à condição basal, composta por culturas estimuladas por IL4-

DCs não pulsadas. Resultados similares também foram obtidos para a avaliação da expressão de CD69 em células TCD4+ e TCD8+.

No contexto de estímulo antígeno específico por meio de DCs, a ativação do sistema imune é essencial para uma resposta eficiente. Neste sentido, Lucas e colaboradores (2016)⁽⁶⁴⁾ demonstraram que MoDCs transfectadas com plasmídeo LAMP/gag foram capazes de promover aumento na ativação celular antígeno-específica, avaliada pela expressão de CD38/HLADR, CD69 e granzima B, tanto em células T CD4 quanto CD8.

Em seguida avaliamos a capacidade das IL4-DCs pulsadas em induzir produção de IFN- γ por linfócitos autólogos.

No contexto da infecção pelo HIV células T (*naïve* e memória) são ativadas durante o reconhecimento de antígenos apresentados durante a interação MHC e TCR, em seguida clones de células T efectoras, específicos ao antígeno apresentado, proliferam ⁽⁶⁵⁾. Tais células (CD4+) podem induzir uma resposta Th1, produzindo citocinas como IFN- γ , importante para ativação de macrófagos pois potencializa a sua capacidade fagocítica contra agentes intracelulares infecciosos através da fagocitose, como vírus e bactérias, assim como células infectadas ⁽⁶⁶⁾. Sabendo-se que o controle da infecção resulta em uma melhor resposta específica, Deeks e colaboradores (2007)⁽⁶⁷⁾ demonstraram que pacientes que controlam a infecção (controladores de elite) apresentam linfócitos T CD4+ que expressam altos níveis de IFN- γ e IL-2 em resposta ao HIV.

Em nossos ensaios, observamos que o pulso de IL4-DCs com diferentes concentrações de vírus resultou em níveis similares de produção de IFN- γ pelos linfócitos estimulados. Por sua vez, tais valores foram relativamente equiparáveis aos níveis apresentados pelo controle basal, constituído por culturas estimuladas por IL4-DCs não pulsadas, apresentando diferenças significativas quando comparadas com IL4-DCs pulsadas com 300 partículas de vírus.

Neste sentido, nossos resultados de quantificação de p24 em IL4-DCs sugerem que as culturas estimuladas por IL4-DCs, ainda que não pulsadas, poderiam ter sido capazes de induzir uma resposta específica nos ensaios de

cocultivo, eventualmente mascarando o resultado de estímulo por IL4-DCs pulsadas com concentrações crescentes de vírus. Também podemos especular a possibilidade de que a menor concentração de vírus utilizada poderia corresponder ao máximo potencial de internalização de vírus em nosso modelo. Conforme já mencionado, são resultados apenas sugestivos, que carecem de novos ensaios para confirmação.

De modo geral os resultados apresentados até o presente mostraram que concentrações crescentes de vírus parecem não interferir na viabilidade das IL4-DCs. Também não observamos diferenças referentes ao perfil fenotípico, produção de citocinas e capacidade de ativar ou induzir a produção de IFN- γ estimulados por estas IL4-DCs.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho nosso grupo passou a se envolver com a pesquisa de um novo tipo MoDC, denominada aDC1, que apresenta a capacidade de polarizar para uma resposta Th1, e que já foi estudada no contexto de imunoterapia para tumores.

Mailliard e colaboradores (2004)⁽⁶⁸⁾ demonstraram haver uma maior produção de IL-12p70 pelas aDC1 o que aumenta a capacidade migratória para os órgãos linfoides secundários e promover uma maior indução de resposta CTL *in vitro*.

Assim, considerando o objetivo deste trabalho em avaliar o efeito de diferentes concentrações de vírus no perfil de MoDCs, resolvemos analisar nas aDC1 os parâmetros estudados para as IL4-DCs. Devemos enfatizar, entretanto, que infelizmente não houve tempo suficiente para processar um número maior de amostras, o que limita consideravelmente a interpretação destes resultados. Tratam-se, portanto, de dados preliminares, cujos ensaios deverão ser retomados pelo grupo.

De modo geral, observamos ser possível a diferenciação de monócitos de indivíduos infectados em aDC1. Concentrações crescentes de vírus parecem não afetar a viabilidade ou o perfil fenotípico das aDC1, assim como observado para as IL4-DCs. Também não observamos diferenças quanto a capacidade de

internalização de vírus. Como esperado, níveis maiores de produção de IL-12 p70 foram registradas para as aDC1 com relação as IL4-DCs, entretanto quantidades diferentes de vírus não interferiram de forma significativa na produção destas, embora pareça haver uma tendência a maior produção desta citocina à medida que aumenta a concentração viral. Não observamos diferenças quanto à capacidade de induzir ativação ou produção de IFN- γ por linfócitos estimulados por aDC1.

Novos ensaios estão sendo feitos e padronizados pelo grupo com foco nas aDC1, como a utilização de um protocolo alternativo de cocultura autóloga entre DCs e linfócitos T podendo suprir algumas dúvidas que ainda temos. Também podemos destacar como outro ensaio a ser padronizado, a avaliação da capacidade de internalização de p24, visto por microscopia confocal. No momento foi realizado apenas um experimento a partir de amostra de indivíduo saudável pulsadas com 30 partículas de vírus/ aDC1, parecendo haver algum mecanismo mais permissivo à infecção nas aDC1 do que as IL4-DCs. Ensaios como a avaliação do melhor tempo de incubação do vírus com a MoDC juntamente com co-localização de marcadores específicos como EEA1 (marcador de endossomo inicial) ou LAMP-2 (marcador de endossomo tardio) estão sendo planejados, podendo fornecer informações necessárias sobre a via endocítica do HIV inativado pelo AT-2 nas MoDCs.

8. CONCLUSÕES

- Concentrações crescentes de vírus parecem não interferir na viabilidade das IL4-DCs.
- Diferentes quantidades de partículas virais parecem não alterar a capacidade de internalização de vírus pelas IL4-DCs.
- A avaliação da capacidade funcional das IL4-DCs em estimular linfócitos T por meio da expressão de CD38/HLA-DR e CD69 não demonstrou diferenças entre IL4-DCs pulsadas e não pulsadas.
- Pulso de IL4 -DCs com 300 partículas/célula parece reduzir a produção de IFN- γ por linfócitos estimulados por estas células.

9. ANEXOS

Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

**“INFLUÊNCIA DE DIFERENTES QUANTIDADES DE ANTÍGENO NA
COMPOSIÇÃO DE UMA VACINA ANTI-HIV BASEADA EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS.”**

PESQUISADORA: Telma Miyuki Oshiro **CARGO/FUNÇÃO:** Pesquisadora Científica

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

2. **AValiação DO RISCO DA PESQUISA:**

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 24 MESES

- Estudo e objetivo(s):

Na infecção pelo HIV, sabe-se dos benefícios da terapia anti-retroviral para o tratamento, porém efeitos colaterais são relatados. Novos métodos de tratamento estão sendo desenvolvidos, para aumentar a resposta de defesa do organismo contra o vírus. Uma destas novas estratégias é o fortalecimento do sistema imune, através da utilização de uma vacina composta de células de defesa do próprio indivíduo infectado, conhecidas como células dendríticas em combinação com o vírus inativado. O Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar como diferentes concentrações de vírus autólogo (ou seja, do próprio indivíduo), podem influenciar na composição desta vacina, melhorando sua eficácia.

- Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Os voluntários que participarão desta pesquisa fazem parte do “Estudo de fase II da vacina terapêutica para HIV com células dendríticas autólogas primadas com vírus autólogos inativados”, registrado e aprovado no Comitê de Ética do HC sob número 0791/09. Estes pacientes já assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde consta uma autorização para estocar as células mononucleares para possíveis estudos posteriores. Desta forma, nesta pesquisa serão utilizadas as células estocadas, excedentes do processo de preparo da vacina que estão armazenadas em nosso laboratório. Para este estudo não haverá, portanto, nenhuma coleta de sangue. Estamos solicitando sua autorização para utilizar as células que já estão armazenadas no nosso laboratório.

- Descrição dos desconfortos e riscos esperados:

Os riscos envolvidos nesta pesquisa relacionados à manipulação dos dados e das amostras estocadas. A equipe responsável pela condução do estudo procederá dentro das normas de biossegurança, boas práticas de laboratório e aquelas inseridas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde.

- Benefícios para o participante:

Sua participação será importante, pois estará colaborando com o desenvolvimento de novos métodos de tratamento contra o HIV. Não haverá nenhum outro benefício adicional.

- Garantia de Acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, bem como cancelamento do seu consentimento, sem qualquer tipo de prejuízo na assistência à sua saúde. A investigadora principal é a Dra Telma Miyuki Oshiro que pode ser encontrada no endereço Av Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470 prédio 2 – 3º andar, Cerqueira César – São Paulo; Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá também entrar 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 – Email: cappesq@hcnet.usp.br

- Retirada de Consentimento:

É garantida a sua liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento, bem como deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

- Direito de confidencialidade:

Os dados e resultados da pesquisa serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

- Despesas e compensações:

A única despesa prevista é a vinda do participante para o processo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para este procedimento, está prevista uma ajuda de custo no valor R\$ 20,00 (vinte reais). Não está prevista nenhuma outra compensação financeira relacionada à sua participação.

- Compromisso:

Os pesquisadores envolvidos assumem o compromisso de utilizar os dados e o material armazenado somente para esta pesquisa.

DECLARAÇÃO

Eu discuti com a equipe da pesquisa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que não terei despesas com minha participação. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

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 ____ / ____ / ____

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

1. NOME:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

**“INFLUÊNCIA DE DIFERENTES QUANTIDADES DE ANTÍGENO NA
COMPOSIÇÃO DE UMA VACINA ANTI-HIV BASEADA EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS.”**

PESQUISADORA: Telma Miyuki Oshiro **CARGO/FUNÇÃO:** Pesquisadora Científica

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 MESES

- Estudo e objetivo(s):

Na infecção pelo HIV, sabe-se dos benefícios da terapia anti-retroviral para o tratamento, porém efeitos colaterais são relatados. Novos métodos de tratamento estão sendo desenvolvidos, para aumentar a resposta de defesa do organismo contra o vírus. Uma destas novas estratégias é o fortalecimento do sistema imune, através da utilização de uma vacina composta de células de defesa do próprio indivíduo infectado, conhecidas como células dendríticas em

combinação com o vírus inativado. O Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar como diferentes concentrações de vírus autólogo (ou seja, do próprio indivíduo), podem influenciar na composição desta vacina, melhorando sua eficácia.

- Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Os voluntários que participarão desta pesquisa serão encaminhados para coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, quando serão coletados 70 mL de sangue, cerca de 7 colheres de sopa.

- Descrição dos desconfortos e riscos esperados:

O maior desconforto será dor no local no momento da coleta de sangue, porém este procedimento não deverá trazer nenhum risco à saúde. Todos os materiais utilizados serão estéreis e descartáveis.

- Benefícios para o participante:

Sua participação será importante, pois estará colaborando com o desenvolvimento de novos métodos de tratamento contra o HIV. Não haverá nenhum outro benefício adicional.

- Garantia de Acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, bem como cancelamento do seu consentimento, sem qualquer tipo de prejuízo na assistência à sua saúde. A investigadora principal é a Dra Telma Miyuki Oshiro que pode ser encontrada no endereço Av Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470 prédio 2 – 3º andar, Cerqueira César – São Paulo; Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá também entrar 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 – Email: cappesq@hcnet.usp.br

- Retirada de Consentimento:

É garantida a sua liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento, bem como deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

- Direito de confidencialidade:

Os dados e resultados da pesquisa serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

- Despesas e compensações:

A única despesa prevista é a vinda do participante para o processo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para este procedimento, está prevista uma ajuda de custo no valor R\$ 20,00 (vinte reais). Não está prevista nenhuma outra compensação financeira relacionada à sua participação.

- Compromisso:

Os pesquisadores envolvidos assumem o compromisso de utilizar os dados e o material armazenado somente para esta pesquisa.

DECLARAÇÃO

Eu discuti com a equipe da pesquisa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que não terei despesas com minha participação. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

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 ____ / ____ / ____

Anexo III - Aprovação do Comitê de Ética



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

PROJETO DE PESQUISA

Título: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES QUANTIDADES DE ANTÍGENO NA COMPOSIÇÃO DE UMA VACINA ANTI-HIV BASEADA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Pesquisador Responsável: Telma Miyuki Oshiro

Versão: 2

Pesquisador Executante: Nathalia Teixeira Romani

CAAE: 34748514.5.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Telma Miyuki Oshiro

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12544

Número do Parecer: 1.192.234.

Data da Relatoria: 19/08/2015.

Apresentação do Projeto: Projeto propõe desenvolver um estudo para avaliar se diferentes concentrações de vírus HIV para pulso de células dendríticas podem influenciar a resposta específica in vitro. Solicita aumento da amostra de 3 para 15 pacientes, em face dos resultados obtidos, ampliar o prazo para 24 meses e modificar a finalidade acadêmica para mestrado.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar o efeito de diferentes quantidades de vírus, para o pulso de DCs sobre sua capacidade em estimular resposta celular específica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos envolvidos nesta pesquisa relacionados à manipulação dos dados e das amostras estocadas. A equipe responsável pela condução do estudo procederá dentro das normas de biossegurança, boas práticas de laboratório e aquelas inseridas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde. Não há risco ao participante da pesquisa.

A participação do paciente será importante, pois estará colaborando com o desenvolvimento de novos métodos de tratamento contra o HIV. Não haverá nenhum outro benefício adicional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Projeto adequado e sem problemas no que se refere à Ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Considero que as solicitações de ampliar o número de pacientes e o prazo para o desenvolvimento do projeto, bem como a mudança da finalidade acadêmica para mestrado procedem e devem ser atendidas.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

São Paulo, 19 de Agosto de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. WHO. Geneva.
2. 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.
3. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*. 1999;285(1):1-32.
4. Haseltine WA. MOLECULAR-BIOLOGY OF THE HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1. *Faseb Journal*. 1991;5(10):2349-60.
5. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(4):279-90.
6. Pinto ME. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. In: Struchiner CJ, editor. *Cadernos de Saúde Pública* 2006.
7. VIRAIS I-AH. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.
8. Carcelain G, Autran B. Immune interventions in HIV infection. *Immunological Reviews*. 2013;254:355-71.
9. Andrieu JM, Lu W. A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection: background and preliminary results. *Journal of Internal Medicine*. 2007;261(2):123-31.
10. Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, Ananworanich J, Benkirane M, Cannon P, et al. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nature Medicine*. 2016;22(8):839-50.
11. Katlama C, Carcelain G, Duvivier C, Chouquet C, Tubiana R, De Sa M, et al. Interleukin-2 accelerates CD4 cell reconstitution in HIV-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: the ILSTIM study - ANRS 082. *Aids*. 2002;16(15):2027-34.
12. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelievre JD, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(4):997-1007.
13. Garcia F, Routy JP. 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.

14. Tsunetsugu-Yokota Y, Muhsen M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4.
15. Miller E, Bhardwaj N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological Reviews*. 2013;254:170-89.
16. Figdor CG, de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine*. 2004;10(5):475-80.
17. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YT, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:767-+.
18. Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF, Barth H. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(5):350-60.
19. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
20. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Sousa CRE. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*. 2009;227:234-47.
21. Paiardini M, Muller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunological Reviews*. 2013;254:78-101.
22. Ernst IMA, Fliegert R, Guse AH. Adenine dinucleotide second messengers and T-lymphocyte calcium signaling. *Frontiers in Immunology*. 2013;4.
23. Corneau A, Cosma A, Even S, Katlama C, Le Grand R, Frachet V, et al. Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2017;92(1):21-32.
24. Pitsios C, Dimitrakopoulou A, Tsalimalma K, Kordossis T, Choremi-Papadopoulou H. Expression of CD69 on T-cell subsets in HIV-1 disease. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2008;68(3):233-41.
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª edição ed2011.
26. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma-production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in Immunology*. 2001;22(10):556-60.
27. Kedzierska, K. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. In: CROWE, M S, editors. 2001. p. 133-50.

28. Chehimi J, Starr SE, Frank I, Dandrea A, Ma XJ, Macgregor RR, et al. IMPAIRED INTERLEUKIN-12 PRODUCTION IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED PATIENTS. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(4):1361-6.
29. Louis S, Dutertre CA, Vimeux L, Fery L, Henno L, Diocou S, et al. IL-23 and IL-12p70 production by monocytes and dendritic cells in primary HIV-1 infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;87(4):645-53.
30. Soufian S. No Evidence of the Th1 to Th2 Cytokine Shift during the Course of HIV Infection. In: Aghakhani A, editor. *Iranian Journal of Pathology* 2011. p. 80-5.
31. Macatangay BJ. Regulatory T cells in HIV immunotherapy. In: Rinaldo CR, editor. *NIH Public Access* 2010. p. 639-47.
32. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(3):170-81.
33. Prendergast A, Prado JG, Kang YH, Chen FB, Riddell LA, Luzzi G, et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161(+) Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *Aids*. 2010;24(4):491-502.
34. Sallusto F. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor α . In: Lanzavecchi A, editor. *J. Exp. Med* 1994. p. 1109-18.
35. Coelho AVC, de Moura RR, Kamada AJ, da Silva RC, Guimaraes RL, Brandao LAC, et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapies to Fight HIV: How Far from a Success Story? A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):15.
36. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, et al. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial. *Journal of Medical Virology*. 2006;78(6):711-8.
37. Oshiro TM, de Almeida A, Duarte AJD. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. *Immunotherapy*. 2009;1(6):1039-51.
38. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature Medicine*. 2004;10(12):1359-65.
39. 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.
40. 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.

41. SILVA, L. Autologous and allogenic systems of HIV expansion: what is the better choice for clinical application in therapeutic vaccine? . *Immunotherapy* 2013. p. 1305-11.
42. Gil C, Climent N, Garcia F, Hurtado C, Nieto-Marquez S, Leon A, et al. Ex vivo production of autologous whole inactivated HIV-1 for clinical use in therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2011;29(34):5711-24.
43. van Montfort T, Speijer D, Berkhout B. Dendritic cells as natural latency reversing agent: A wake-up call for HIV-1. *Virulence*. 2017;8(8):1494-7.
44. 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).
45. Macatangay BJC, Riddler SA, Wheeler ND, Spindler J, Lawani M, Hong F, et al. Therapeutic Vaccination With Dendritic Cells Loaded With Autologous HIV Type 1-Infected Apoptotic Cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;213(9):1400-9.
46. Zhou LJ, Tedder TF. CD14(+) blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83(+) dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(6):2588-92.
47. van Haren SD, Herczenik E, ten Brinke A, Mertens K, Voorberg J, Meijer AB. HLA-DR-presented Peptide Repertoires Derived From Human Monocyte-derived Dendritic Cells Pulsed With Blood Coagulation Factor VIII. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(6).
48. Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DNJ. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *International Immunology*. 2001;13(7):959-67.
49. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *European Journal of Immunology*. 2007;37(3):686-95.
50. Bugeon L, Dallman MJ. Costimulation of T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162(4):S164-S8.
51. Cella M, Scheidegger D, PalmerLehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):747-52.
52. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. COEXPRESSION AND FUNCTIONAL COOPERATION OF CTLA-4 AND CD28 ON ACTIVATED LYMPHOCYTES-T. *Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(6):1595-604.
53. Menon S, Rosenberg K, Graham SA, Ward EM, Taylor ME, Drickamer K, et al. Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(28):11524-9.

54. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of Immunology*. 2002;168(5):2118-26.
55. Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, et al. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. 1997;71(9):6305-14.
56. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(9):5215-20.
57. Rossi R, Lichtner M, De Rosa A, Sauzullo I, Mengoni F, Massetti AP, et al. In vitro effect of anti-human immunodeficiency virus CCR5 antagonist maraviroc on chemotactic activity of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011;166(2):184-90.
58. GranelliPiperno A, Moser B, Pope M, Chen DL, Wei Y, Isdell F, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(6):2433-8.
59. 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.
60. 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.
61. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*. 2012;13(8):722-8.
62. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 2008;180(9):5771-7.
63. Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Rusie LK, Fichtenbaum C, Chougnnet CA. In Vitro HIV Infection Impairs the Capacity of Myeloid Dendritic Cells to Induce Regulatory T Cells. *Plos One*. 2012;7(8).
64. Lucas C, Matassoli FL, Pecanha LMT, Santillo BT, Oliveira LMD, Oshiro TM, et al. Dendritic cells primed with a chimeric plasmid containing HIV-1-gag associated with lysosomal-associated protein-1 (LAMP/gag) is a potential therapeutic vaccine against HIV. *Faseb Journal*. 2016;30(8):2970-84.
65. Kaiko GE. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? . In: Horvat JC, editor. *IMMUNOLOGY2007*. p. 326-38.
66. Kidd P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease *Alternative Medicine Review*2003. p. 223-46.

67. 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.
68. Robbie B. Mailliard, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, et al. α -Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity. *Cancer Research*. 2004.

APÊNDICE - Padronização de ensaios de internalização viral com amostras de indivíduos saudáveis

1.0 Detecção da proteína p24 em IL4-DCs imaturas de indivíduos saudáveis

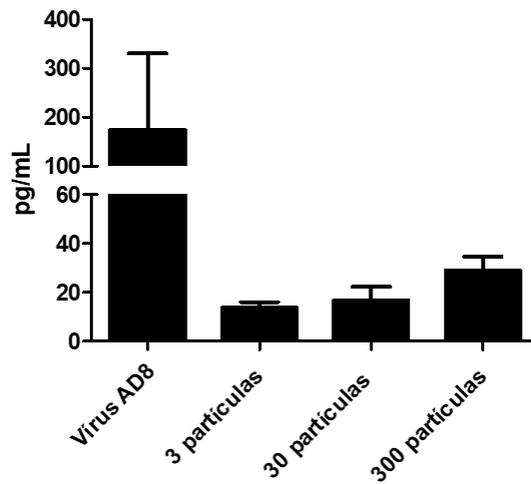
1.1 Elisa de p24

Selecionamos amostras de 5 indivíduos saudáveis para analisar a quantificação da proteína p24 após o pulso das IL4-DCs imaturas com diferentes concentrações de vírus.

Características dos indivíduos saudáveis participantes do estudo com relação ao gênero e idade.

Sujeitos da pesquisa	Gênero	Idade
1	F	37
2	F	26
3	M	53
4	M	38
5	M	30

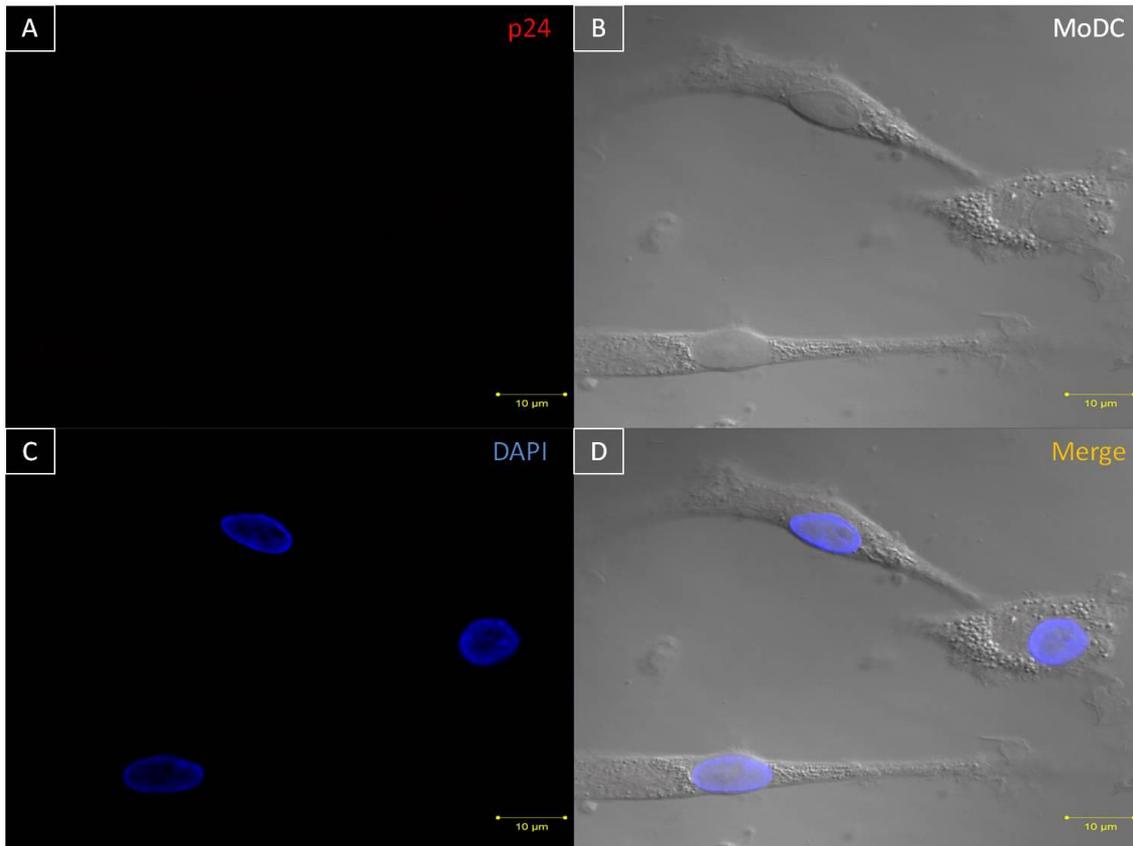
Não foi possível relacionar os resultados apresentados com as quantidades de partículas virais utilizadas para pulsar as IL4-DCs, sendo necessário aumentar o número amostral. Foi utilizado como controle positivo o vírus AD8.



Quantificação da p24 em IL4-DCs pulsadas com diferentes quantidades de vírus. IL4-DCs imaturas de indivíduos saudáveis pulsadas com diferentes quantidades de vírus inativado e vírus AD8. A expressão foi avaliada por meio de pg/mL pela técnica de Elisa.

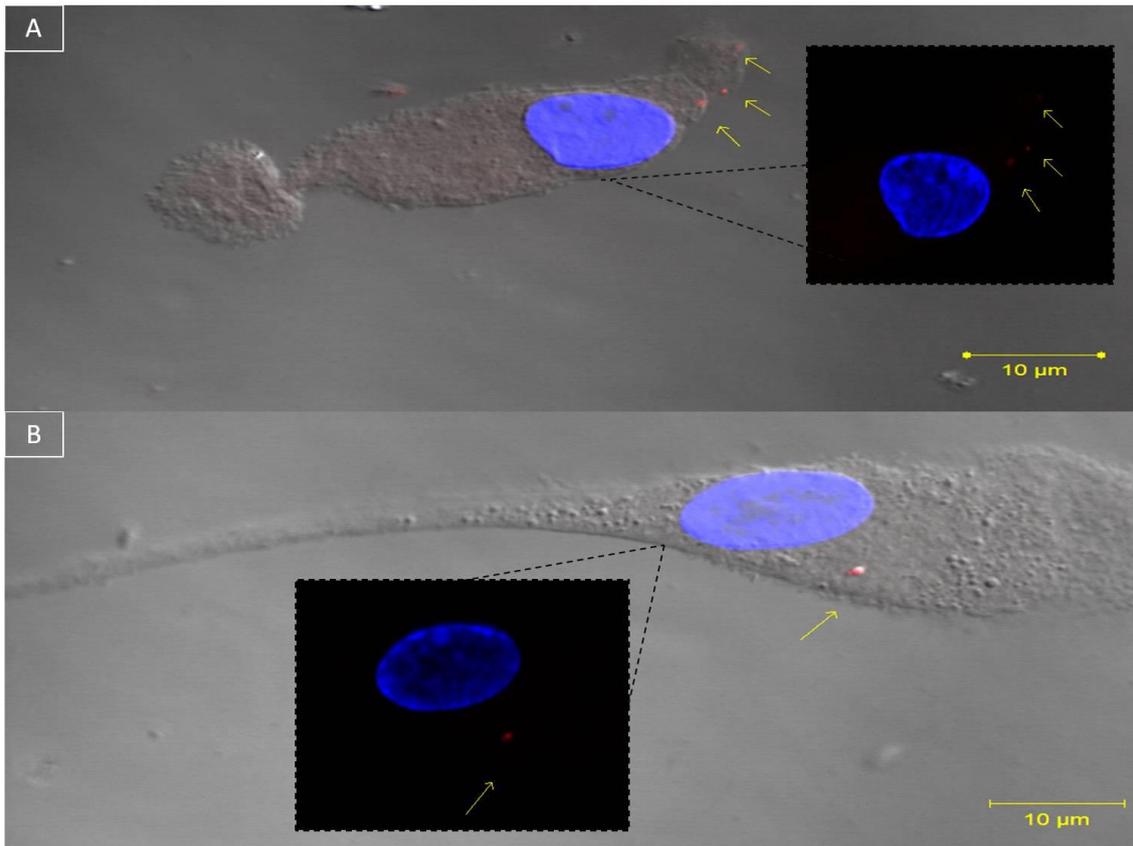
1.2 Padronização do ensaio de internalização das partículas virais

Foi utilizado como controle negativo IL4-DCs imaturas sem o pulso de vírus manipuladas igualmente, como já era esperado não foi possível observar marcação de p24. Todas as imagens foram fotografadas com um aumento de 63x/1.40 Oil DIC M27.



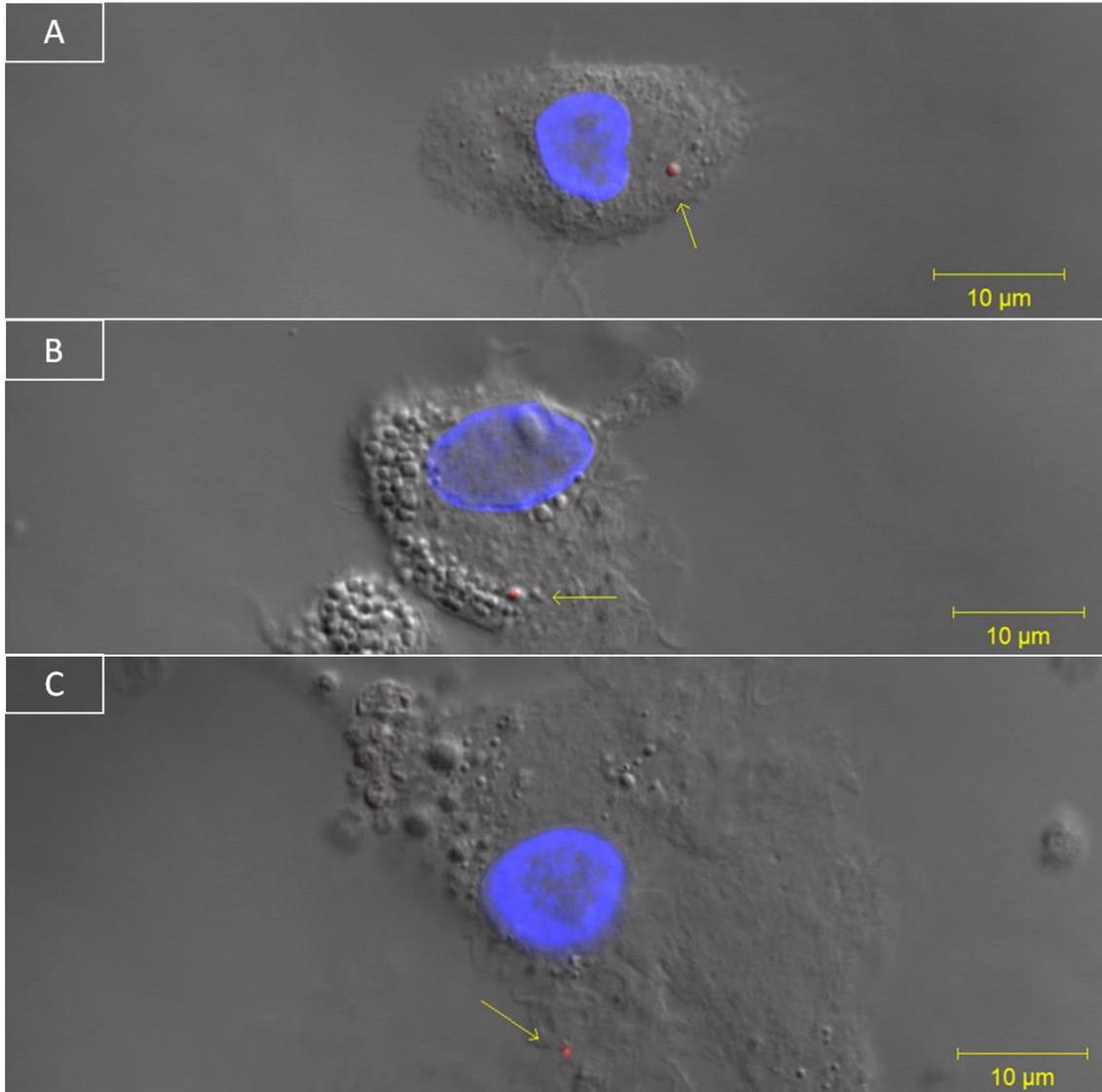
Análise de MoDCs de indivíduo saudável sem o pulso de vírus. MoDCs sem o pulso de vírus em meio com presença de DAPI. Sem presença de p24 (A), morfologia das MoDCs (B), marcação de DAPI em MoDCs (C) e MoDCs com marcação para DAPI mas sem presença de p24 (D).

Em seguida analisamos as IL4-DCs pulsadas com vírus AD8 não inativado, cujas imagens estão representadas na figura acima. Foi possível analisar fotos de diversos campos da lamínula, podendo destacar ter um maior número de partículas virais internalizadas por IL4-DCs pulsadas com vírus vivo em relação as IL4-DCs pulsadas com o vírus inativado.



Análise de MoDCs de indivíduo saudável com o pulso de vírus AD8. MoDCs com o pulso de vírus em meio com presença de DAPI e marcação de p24. Campo 1 (A) e Campo 2 (B). Foi possível analisar a morfologia da MoDC com suas respectivas marcações.

Com relação ao vírus inativado, testamos as proporções de 3, 30 e 300 partículas/MoDCs (A, B e C, respectivamente) e neste caso observamos que a detecção foi menor do que vírus vivo. Foi possível analisar diversos campos das lamínulas na qual, não foi possível observar diferenças entre as IL4-DCs pulsadas com diferentes concentrações de vírus.



Análise de MoDCs com pulso de vírus na proporção de 3, 30 e 300 partículas/MoDC. MoDCs com o pulso de vírus na proporção de 3 partículas/MoDC (A) 30 partículas/MoDC (B) e 300 partículas/MoDC (C) em meio com presença de DAPI e marcação de p24. Foi possível analisar a morfologia da MoDC com suas respectivas marcações.

2.0 Detecção da proteína p24 em aDC1 imaturas de indivíduos saudáveis

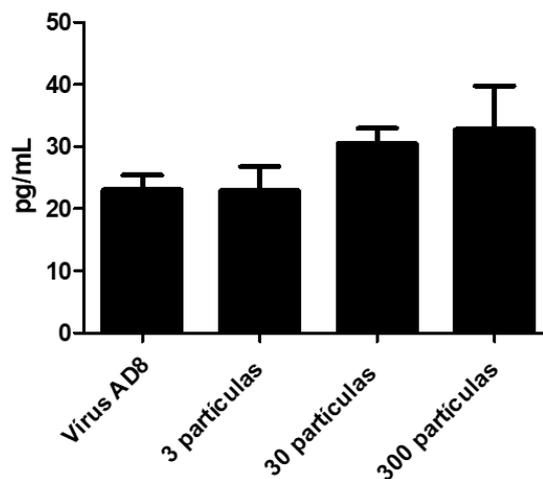
2.1 Elisa de p24

Selecionamos amostras de 3 indivíduos saudáveis para analisar a quantificação da proteína p24 após o pulso das aDC1 imaturas com diferentes concentrações de vírus.

Características dos indivíduos saudáveis participantes do estudo com relação ao gênero e idade.

Sujeitos da pesquisa	Gênero	Idade
1	M	53
2	M	38
3	M	38

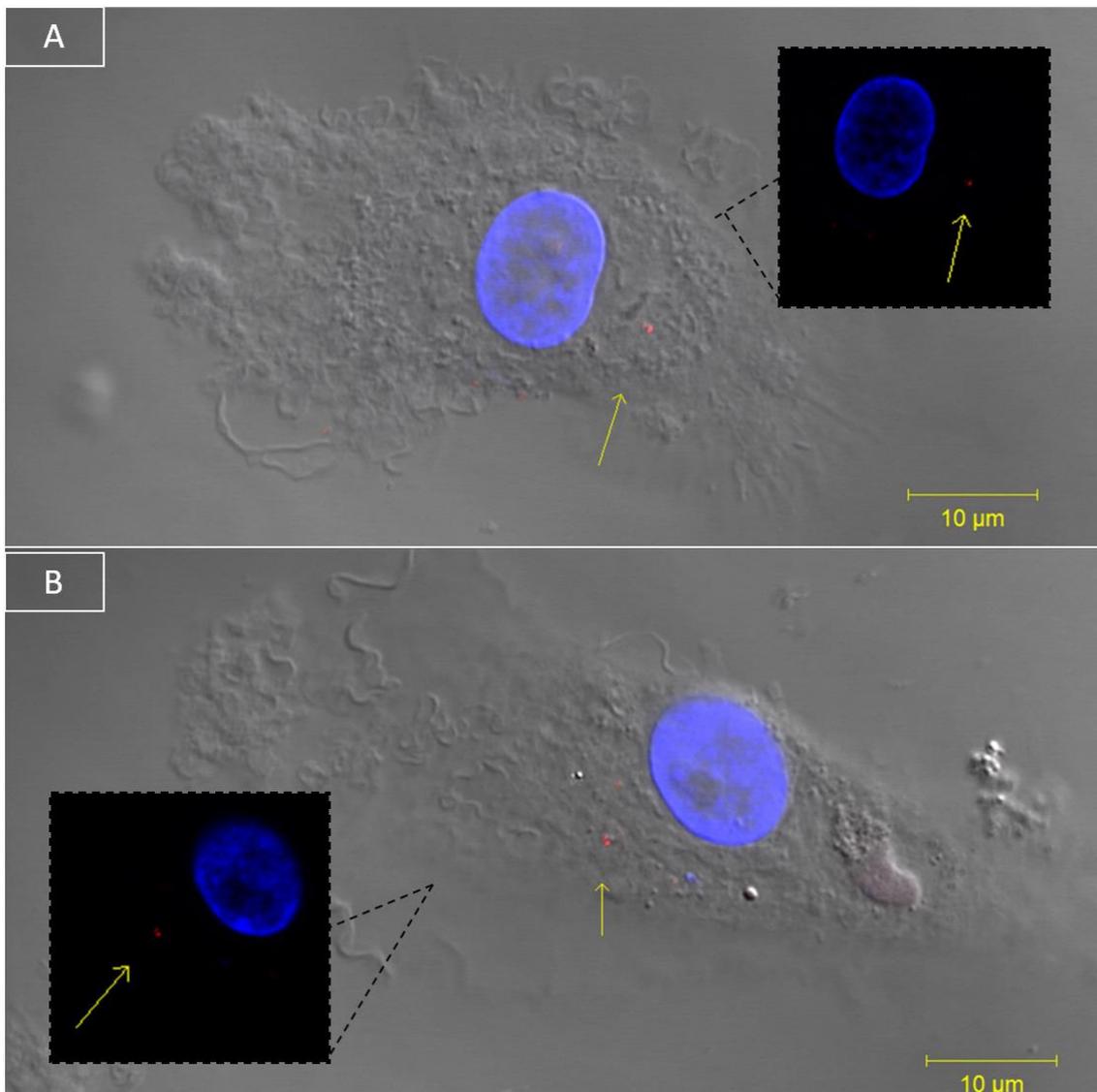
Parece haver uma tendência entre o aumento de partículas virais pulsadas nas aDC1 e a detecção da p24, sugerindo maior internalização de partículas virais.



Quantificação da p24 em aDC1 pulsadas com diferentes quantidades de vírus. aDC1 imaturas de indivíduos saudáveis pulsadas com diferentes quantidades de vírus inativado e vírus AD8. A expressão foi avaliada por meio de pg/mL pela técnica de Elisa.

2.2 Padronização do ensaio de internalização das partículas virais

Considerando aplicação em ensaios futuros iniciamos com a padronização do ensaio de imunofluorescência nas aDC1, pulsadas com 30 partículas de vírus/MoDC (A e B). Foi possível analisar diversos campos da lamínula na qual, percebendo um maior número de células infectadas comparada a mesma condição das IL4-DCs.



Análise de aDC1 com pulso de vírus na proporção de 30 partículas/MoDC. MoDCs com o pulso de vírus na proporção 30 partículas/MoDC em meio com presença de DAPI e marcação de p24. Campo 1 (A) e Campo 2 (B). Foi possível analisar a morfologia da MoDC com suas respectivas marcações.