

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde:

Infectologia e Medicina Tropical

Yuppiel Franmil Martinez

**“AVALIAÇÃO DE PERFIS DE IMUNOSSENESCÊNCIA EM
CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PESSOAS
VIVENDO COM HIV (PVHIV).”**

Belo Horizonte - MG

2018

Yuppiel Franmil Martinez

**“AVALIAÇÃO DE PERFIS DE IMUNOSSENESCÊNCIA EM
CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PESSOAS
VIVENDO COM HIV (PVHIV).”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de pesquisa: Infecções virais: HIV/AIDS, HTLV I/II, e outros vírus.

Orientador: Prof. Dr. Unaí Tupinambás

Co-orientadores: Dra. Maria Luiza Silva

Prof. Dr. Dirceu B. Greco

Belo Horizonte - MG

2018

Martinez, Yuppiel Franmil.
M385a Avaliação de perfis de imunossenescência em células do sangue periférico de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) [manuscrito]. / Yuppiel Franmil Martinez. - - Belo Horizonte: 2018.
108f.: il.
Orientador: Unai Tupinambás.
Coorientador: Maria Luiza Silva, Dirceu Bartolomeu Greco.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. HIV. 2. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 3. Imunossenescência. 4. Imunofenotipagem. 5. Antígenos CD. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Tupinambás, Unai. II. Silva, Maria Luiza. III. Greco, Dirceu Bartolomeu. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.
NLM: WC 503

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR:

Prof. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA:

Prof^a. Sandra Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

PRÓ-REITORA DE PESQUISA:

Prof^a. Adelina Martha dos Reis

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA:

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA:

Prof. Humberto José Alves

COORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof^a. Ana Cristina Côrtes Gama

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA:

Prof^a. Valeria Maria Augusto

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL:

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof^a. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Unaí Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Thaís Teodoro de Oliveira (Representante discente)

COLABORADORES

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunologia e Biologia Molecular DIP/HC - UFMG, sob a orientação do Prof. Dr. Unai Tupinambás e coorientação da Dra. Maria Luiza Silva e o Prof. Dr. Dirceu B. Greco, e contou com a colaboração da Dra. Agdemir W. Aleixo do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, UFMG, e de Isadora Saraiva e Ismael Artur da Costa Rocha.

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Ministério da Saúde Pública/ Sistema Único de Saúde (SUS)

A minha mãe, Eugenia Martínez.

A minha avó, Cayetana Hiciano.

Ao meu irmão, Renny Hernandez.

Aos meus sobrinhos, William, Emily, Renssel, Jossel e Enzo.

**A todas as pessoas vivendo com HIV, que lutam dia a dia contra a
discriminação e o preconceito.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suportar meu projeto de vida, guiar cada passo que tenho dado e me dar a oportunidade de chegar até aqui;

Aos meus orientadores e mentores intelectuais, Prof. Dr. Unaí Tupinambás, Dra. Maria Luiza Silva e Prof. Dr. Dirceu B. Greco, pela dedicação, disponibilidade, entrega, mas, sobretudo, pelo apoio, confiança e exemplo de profissionalismo;

À UFMG e à OEA, pela acolhida, mas, sobretudo pela oportunidade de poder realizar estudos de pós-graduação no Brasil;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da saúde: Infectologia e medicina tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, agradecendo a todos os docentes e funcionários que contribuíram para a minha formação e fizeram que este trajeto fosse mais leve;

Ao CNPq e ao Ministério da saúde, por viabilizarem a realização desse projeto;

À toda a equipe do CTR DIP – Orestes Diniz, pela ajuda, convivência e amizade;

À maravilhosa equipe do Laboratório DIP – FM UFMG, pelo acolhimento, aprendizados, cordial convivência e amizade;

Aos nossos colaboradores, Dra. Agdemir W. Aleixo, Isadora Saraiva e Ismael Artur da Costa,

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Juliana de Assis Estanislau e Prof. Dr. Mateus Rodrigues Westin, pelas sugestões e grandes contribuições para o aperfeiçoamento do nosso trabalho,

Ao meu grande amigo e cúmplice de aventuras no Brasil, Angel Alessio Rojas Lagos pelo carinho, apoio, amizade, mas, sobretudo, pela irmandade;

A Davi Dorneles Cardoso, pelo carinho, parceria, cumplicidade, mas, acima de tudo, por ser para mim uma fonte inesgotável de paz e apoio nas horas difíceis e turbas;

À Família Dorneles Cardoso, por todo o acolhimento e carinho;

Aos amigos do Brasil e do mundo conhecidos durante esta travessia, em especial a Boris Tejeda, Carlos Martínez, Daniela Górriz, Erick Gómez, Florange Campusano, Karen Franco, Leandro Alves, Liliana Romero, Marcio Castillo, Ramón Brito, Raquel Parra e Viviana Montoya, pela enriquecedora

convivência ao longo destes dois anos. A vocês meu muito obrigado por me fazer sentir em família e em casa apesar da distância e das diferenças culturais;

Aos amigos e aos colegas de profissão, Ana Valenzuela, Claudio Bautista, Emelin Duran, Evelyn González, Hemphill Taveras, João Marcos, Johanna Sánchez, Noel Doñe, Pablo Castillo, Rosangel López, Samuel Sosa e Zuleyka Aponte, que apesar da distância sempre estiveram aí me apoiando, torceram constantemente por mim e vibraram a cada conquista alcançada;

Ao meu irmão Renny Hernandez, e aos meus sobrinhos William, Emily, Renssel, Yossel e Enzo, vocês são a minha fonte de inspiração e a razão que me motiva a sempre perseguir a excelência;

A minha avó Cayetana Hiciano, por ser uma fonte incessante de amor, e um exemplo constante de luta, dedicação e entrega em prol dos que mais precisam;

A todos os tíos e primos das famílias Then Martínez, De la Cruz Martínez e Martínez Escolastico, pelo carinho, apoio e respaldo;

A minha mãe, Eugenia Martínez Hiciano, por ser minha amiga, cúmplice e companheira de batalhas. A você meu muito obrigado pelo amor desmedido, sacrifício constante, apoio incondicional, mas, sobretudo, por ser meu porto seguro nas horas de angustia e tribulação;

Por fim, a todos aqueles que estiveram presentes durante a realização e conclusão deste mestrado;

A todos vocês, meu mais sincero muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

Mudanças relacionadas à imunossenescência estão ocorrendo em PVHIV muito mais cedo do que em indivíduos não infectados pelo HIV. As mudanças mais notáveis ocorrem no sistema imune adaptativo, especialmente no compartimento de células T. Este estudo tem como objetivo avaliar e descrever o perfil de imunossenescência e exaustão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ circulantes em PVHIV, assim como avaliar a correlação existente entre os perfis de imunossenescência e os valores absolutos e percentuais de LTCD4 no tempo zero e após sessenta meses. A imunossenescência e a exaustão foram avaliadas por citometria de fluxo através da expressão dos marcadores de superfície celular: CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas e morte programada-1 (PD-1). Foram coletadas amostras de 46 PVHIV em acompanhamento no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias - CTR-DIP Orestes Diniz, assim como de vinte (20) controles soronegativos (N). Os indivíduos soropositivos foram separados em três grupos de acordo com aspectos laboratoriais em: progressores lentos (PL), replicação ativa (RA) e TARV com sucesso. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da UFMG. Os nossos achados mostram que, quando comparadas com o grupo controle, as PVHIV apresentaram diminuição de células *naïve*, bem como maior frequência e expressão de células efetoras em estádios intermediários e avançados de diferenciação. No entanto, observaram-se diferenças entre os três grupos: a) No grupo RA foram observadas a maioria das alterações imunes; b) as alterações imunofenotípicas observadas nos grupos RA e TARV foram evidenciadas em linfócitos CD4 e CD8; c) No grupo PL, essas alterações ocorreram exclusivamente no compartimento de CD8. Por outro lado, os perfis de imunossenescência se mostraram relacionados de forma negativa com os valores absolutos e percentuais de LTCD4 no tempo zero e sessenta meses depois. Em conclusão, nossos resultados mostram que perfis imunofenotípicos relacionados a imunossenescência se mostraram aumentados em linfócitos CD4 e CD8, em todos os grupos de PVHIV estudados. Por outro lado a expansão dessas células terminalmente diferenciadas teve um impacto negativo na contagem de linfócitos CD4⁺ no tempo de realização dos ensaios e sessenta meses após. Esses achados podem, em parte, explicar o papel prejudicial da imunossenescência no contexto da infecção crônica pelo HIV.

Palavras chave: HIV; AIDS; imunossenescência; imunofenotipagem; CD4; CD8; CD45RA; CD27; CD28; CD57; CD62L; CCR7; CD95/Fas; PD-1.

ABSTRACT

Immunosenescence changes are occurring in PLWH much earlier than in non-HIV infected individuals. The most notable changes happen in the adaptive immune system, especially in the T cell compartment. This study aims to assess the profiles of immunosenescence and exhaustion of circulating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in PLWH, as well as the possible correlation between immunosenescence profiles and absolute values and percentages of T CD4 lymphocytes at time zero and sixty months after. The immunosenescence and exhaustion were evaluated by flow cytometry through the expression of cell surface markers: CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas and programmed death-1 (PD-1). Samples were collected from 46 PLWH on follow up at a Reference Center for Infectious and Parasitic Diseases (*Centro de Treinamento e Referência e Doenças Infecciosas e Parasitárias-Orestes Diniz*) in Belo Horizonte, Brazil. Another 20 HIV seronegative individuals were included as a control group. PLWH were divided into three groups according to laboratory profiles in: slow progressors (SP), active replication (AR) and HAART with success. All subjects signed an informed consent form and this project was approved by the Institutional Research Ethics Committee. Our findings show that when compared to HIV seronegative individuals, PLWH had a decrease in naïve cells, as well as higher frequency and expression of effector cells in intermediate and advanced stages of differentiation. However, differences were observed among the three groups: a) In the AR group we observed the majority of the immune changes; b) CD4 and CD8 Immunophenotypic changes were seen in patients from both the AR and HAART groups; c) In the SP group these changes occurred exclusively in the CD8 compartment. On the other hand, the presence of immunosenescence profiles were negatively correlated with T CD4 absolute values and percentages at time zero and sixty months after. In conclusion our results show an increase in CD4 and CD8 immunosenescence profiles in all groups of PLWH studied and the expansion of these terminally differentiated cells had also a negative impact in the CD4⁺ count at time zero and sixty months after. These findings may in part explain the harmful role of immunosenescence in the chronic HIV infection.

KEYWORDS: HIV; AIDS; immunosenescence; immunophenotyping; CD4; CD8; CD45RA; CD27; CD28; CD57; CD62L; CCR7; CD95/Fas; PD-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo imunopatogênico da infecção pelo HIV. Causas e consequências da ativação imunológica crônica.....	9
Figura 2. Caracterização imunofenotípica de acordo com a expressão dos diferentes marcadores de superfície celular.....	15
Figura 3. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA ⁺ e CD62L ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos totais.....	33
Figura 4. Frequência dos marcadores fenotípicos CCR7 ⁺ e CD62L ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	34
Figura 5. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA ⁺ e CD28 ⁺ em linfócitos CD8 ⁺	34
Figura 6. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27 ⁺ e PD-1 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	35
Figura 7. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁺ e CD57 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺	36
Figura 8. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁺ e CD95 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos totais.....	37
Figura 9. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA ⁻ e CD28 ⁻ em linfócitos CD8 ⁺ e linfócitos totais.....	38
Figura 10. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁻ e CD57 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	38
Figura 11. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁻ e CD57 ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos totais.....	39
Figura 12. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁻ e CCR7 ⁻ em linfócitos CD8 ⁺	40
Figura 13. Frequência dos marcadores fenotípicos CCR7 ⁻ e CD62L ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	40
Figura 14. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA ⁻ e CD62L ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	41
Figura 14. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA ⁻ e CCR7 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	42
Figura 16. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27 ⁺ e CD28 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	42
Figura 17. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27 ⁻ e CD28 ⁻ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos totais.....	43

Figura 18. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27 ⁺ e CD95 ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos totais	44
Figura 19. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28 ⁻ e CD95 ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	44
Figura 20. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27 ⁻ e PD-1 ⁺ em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	45
Figura 21. Expressão dos marcadores de superfície celular CD62L e CD45RA em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	46
Figura 22. Expressão dos marcadores de superfície celular CD95 e PD-1 em linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e dados laboratoriais da coorte	31
Tabela 2 – Esquemas antirretrovirais usados pelas PVHIV	32
Tabela 3 – Correlação entre os perfis de senescência e os valores de LTCD4% e CD4 células/ μ L no tempo zero e 60 meses após	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AR	<i>Active replication</i>
ARV	Antiretroviral
APC	Aloficocianina
ATV/r	Atazanavir/ritonavir
AZT	Zidovudina
BD	<i>Becton Dickinson and Company</i>
CA	California
CCR5	<i>Chemokine Receptor type 5</i>
CCR7	<i>Chemokine Receptor type 7</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CDs	Células Dendríticas
CMV	Citomegalovírus
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CpG	<i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
CTR DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
CV	Carga Viral
CXCR4	<i>Chemokine Receptor type 4</i>
DECS	Descritores em Ciências da Saúde
DIP	Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i>
DRV/r	Darunavir/ritonavir
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EFZ	Efavirenz
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FM	Faculdade de Medicina
FPV/r	Fosamprenavir/ritonavir

g	Gramas
GALT	<i>GUT Associated Lymphoid Tissue</i>
gp	Glicoproteína
GUT	<i>Gastrointestinal tract</i>
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HC	Hospital das clínicas
HCV	Hepatitis C virus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HNK	<i>Human Natural Killer 1</i>
HSH	Homens que fazem Sexo com Homens
HTLV	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
i.e	<i>id est/ isto é</i>
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
IP-10	<i>Interferon Gamma-Induced Protein 10</i>
LAB	Laboratório
LPS	Lipopolissacarídeo
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
LTCD4	Linfócitos T CD4 ⁺
N	Negativo ou soronegativo
NJ	<i>New Jersey</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NVP	Nevirapina
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
mg/dL	Miligrama por decilitro
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
OEA	Organização dos Estados Americanos
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed Death Protein 1</i>

PE	Ficoeretrina
PerCP	Complexo Proteína Clorofila Peridina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PL	Progressor Lento
PLWH	<i>People living with HIV</i>
PVHIV	Pessoas que Vivem com HIV
RA	Replicação Ativa
RAL	Raltegravir
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SI	Sistema Imunológico
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SP	<i>Slow progressors</i>
TARV	Terapia Antirretroviral
TARVc	Terapia Antirretroviral combinada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Tenofovir
T_{CM}	<i>Central Memory T Cell</i>
T_{EM}	<i>Effector Memory T Cell</i>
T_{EMRA}	<i>Effector Memory RA T Cell</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factors</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
USA	<i>United States of America</i>
VHC	Vírus da Hepatites C
µL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMARIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
2.1. Breve histórico da infecção pelo HIV	2
2.2. Epidemiologia.....	2
2.3. Infecção pelo HIV.....	3
2.4. Imunopatogênia da infecção pelo HIV: depleção de células T CD4 ⁺ e inflamação/ativação imunológica crônica.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1. Demografia do envelhecimento na população HIV positiva.....	11
3.2. Envelhecimento do sistema imunológico.....	11
3.3. Infecção pelo HIV e imunossenescência	12
3.4. Imunossenescência nos diversos cenários da infecção pelo HIV	16
4. JUSTIFICATIVA	23
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo geral	24
5.2. Objetivos específicos	24
6. METODOLOGIA.....	25
6.1. Delineamento	25
6.2. Local do estudo.....	25
6.3. Participantes da pesquisa	25
6.3.1. Critérios de inclusão:.....	25
6.3.2. Critérios de exclusão:.....	25
6.4. Seleção dos participantes e plano de inclusão.....	26
6.5. Considerações éticas	27
6.6. Coleta de dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais.....	27
6.7. Imunofenotipagem	28
6.8. Variáveis estudadas.....	29
6.9. Cálculo da amostra	29
6.10. Pesquisa bibliográfica	29
6.11. Análise estatística	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Características demográficas e dados laboratoriais da coorte.....	31

7.2.	Imunofenotipagem	32
7.2.1.	Células <i>naïve</i>	33
7.2.2.	Células de memória efetora e/ou terminalmente diferenciadas	37
7.3.	Intensidade média de fluorescência	46
7.4.	Análise de correlação.....	48
8.	DISCUSSÃO.....	49
9.	CONCLUSÕES.....	55
10.	LIMITAÇÕES.....	56
11.	PERSPECTIVAS	57
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
13.	ANEXOS.....	71
13.1.	Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para pessoas vivendo com HIV.....	71
13.2.	Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para pessoas sem infecção pelo HIV.....	72
13.3.	Anexo 3 - Questionário de inclusão para pessoas vivendo com HIV	73
13.4.	Anexo 4 - Questionário de inclusão para pessoas sem infecção pelo HIV	75
13.5.	Anexo 5 .- Aprovação do projeto pelo comitê de ética.....	76
13.6.	Anexo 6 – Artigo original	77
13.7.	Anexo 7 – Folha de aprovação.....	100

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O sistema imune é responsável pela defesa contra as infecções e pela detecção e destruição de células atípicas e autorreativas. Assim como acontece em outros sistemas e aparelhos, o sistema imune envelhece e suas funções se deterioram, aumentando a susceptibilidade a infecções, tumores e doenças autoimunes. Este processo natural e fisiológico de envelhecimento é denominado imunossenescência e, recentemente, tem ocupado lugar de destaque no campo de pesquisa do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A imunossenescência associada aos fatores de riscos clássicos (*i.e.*: tabagismo, sedentarismo, obesidade, hipertensão arterial sistêmica), possibilita o aumento do risco de ocorrência de comorbidades cardiovasculares, ósseas, metabólicas e neurocognitivas em todas as idades, inclusive em pacientes que apresentam controle virológico. Estas condições têm grande relevância clínica, não somente pela carga de morbidade que adicionam às pessoas vivendo com HIV (PVHIV), mas também porque são a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos. Em geral, a incidência de comorbidades não infecciosas é aproximadamente o dobro entre PVHIV quando comparados com indivíduos não expostos ao HIV (ABERG, 2012; HEARPS *et al.*, 2012; DEEKS, LEWIN, HAVLIR, 2013; DE LEÓN-NARANJO, 2014a).

Pessoas vivendo com HIV experimentam mudanças relacionadas à imunossenescência similares às aquelas apresentadas por idosos sem esta infecção, e que apareceriam na população geral somente 20 a 30 anos depois. Este "envelhecimento acelerado ou precoce" parece estar em grande parte relacionado à inflamação e a ativação imunológica crônica presentes na infecção pelo HIV, o que tem feito desses processos fatores importantes nas decisões terapêuticas. Dessa forma, a imunossenescência no contexto da infecção crônica pelo HIV se mostra como uma linha prioritária de pesquisa, necessitando de mais estudos para o entendimento do processo e, no futuro, tentar propor formas de intervir na ativação celular e inflamação crônica.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Breve histórico da infecção pelo HIV

Os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome*) foram descritos em 1981, quando foram notificados ao CDC (*Centers for Disease Control*) os relatos de homens homossexuais jovens, previamente hígidos, e que no momento sofriam de vários tipos de infecções oportunistas e grave imunodeficiência celular (GOTTLIEB *et al.*, 1981). Dois anos depois, o agente etiológico responsável pela AIDS, o Vírus da Imunodeficiência Humana (*HIV – Human immunodeficiency vírus*) foi isolado e identificado (BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1983; GALLO *et al.*, 1983; MONTAGNIER, 2002).

A epidemia do HIV/AIDS foi pautada pelo medo, morte, preconceito e discriminação. O mundo se deparou com um vírus novo e desconhecido, que estava associado com altas taxas de morbimortalidade. No entanto, a introdução da terapia antirretroviral combinada (TARVc), altamente potente, na segunda metade da década de 1990, determinou extraordinária mudança com relação ao prognóstico da infecção pelo HIV, tornando-a uma doença crônica passível de controle (MAARTENS, CELUM, LEWIN, 2014; GRECO, PIETRA, RODRIGUES, 2015).

2.2. Epidemiologia

A infecção pelo HIV se transformou numa epidemia mundial que tem afetado as vidas de milhões de indivíduos durante as três últimas décadas, com um número estimado de 36,7 milhões de PVHIV no mundo, para o ano 2016 (UNAIDS, 2017).

Segundo dados do mais recente boletim epidemiológico brasileiro de HIV/AIDS (BRASIL 2016), de 1980 a junho de 2016 tinham sido notificados 842,710 casos, o que corresponde a uma taxa de prevalência de 0,4% na população geral. De acordo com esses números, no Brasil a epidemia é classificada como estável. No entanto, a prevalência do HIV varia geograficamente, com níveis mais altos observados no Sul (20,1%) e Sudeste (53%) do país e entre populações mais vulneráveis.

O Brasil possui o maior número de pessoas que vivem com o HIV na América Latina e contabiliza 40% de todas as novas infecções. Isto se deve em parte à sua

grande população em comparação aos outros países da América Latina (UNAIDS, 2016).

A maior concentração dos casos de AIDS no Brasil está em indivíduos com idade entre 25 e 39 anos para ambos os sexos; entre os homens, essa faixa etária corresponde a 53%, e entre as mulheres a 49,4% do total de casos registrados de 1980 a junho de 2016 (BRASIL, 2016). Além disso, conforme esperado, os dados revelam que a infecção está mais concentrada nas populações de maior vulnerabilidade; sendo 5,9% entre usuários de drogas, 10,5% entre homens que fazem sexo com homens (HSH) e 4,9% entre mulheres profissionais do sexo (BRASIL, 2014).

2.3. Infecção pelo HIV

O vírus da imunodeficiência é RNA revestido por um envoltório lipídico da célula hospedeira, pertencente à família *retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. Existem dois tipos conhecidos: o HIV tipo 1 (HIV 1) e o HIV tipo 2 (HIV 2). O HIV 1 é mais prevalente e mais patogênico do que o HIV 2 e é responsável pela grande maioria dos casos da epidemia mundial. A infecção pelo HIV 2 é mais prevalente na África Ocidental, embora pequenas epidemias tenham sido relatadas em Portugal, França, Espanha e Brasil. (DEEKS *et al.*, 2015).

O HIV pode ser encontrado em todos os líquidos corporais, como urina, saliva e lágrima, mas em concentrações subinfectantes, à exceção do sangue e das secreções genitais (WESTON, MARETTO, 2009; GRECO, PIETRA, RODRIGUES, 2015), sendo a exposição às superfícies mucosas retais e genitais a maior responsável pelas infecções atuais e novas (MYRON *et al.*, 2011).

As células dendríticas (CDs) presentes nas mucosas genitais ou nas proximidades da região envolvida desempenham um papel muito importante no começo da infecção pelo HIV (POPE, HAASE, 2003; DE LEÓN-NARANJO, 2014b). Essas células apresentadoras de antígenos exibem uma alta afinidade pela glicoproteína gp120 presente no envelope do vírus, o que permite que possam reter partículas infecciosas por dias, facilitando assim a apresentação do vírus às células suscetíveis (FAUCI, 2007).

O ciclo de vida do HIV-1 é complexo e sua duração e resultado dependem do tipo de célula-alvo e da ativação celular. Nas primeiras etapas da infecção, o HIV-1 penetra nas células sem causar danos letais imediatos, mas o processo de entrada

pode estimular cascatas de sinais intracelulares, o que, por sua vez, pode facilitar a replicação viral (SIMON, D HO, ABDOOL, 2006). Os receptores primários do HIV são os linfócitos T CD4⁺ ativados (FAUCI 2007; LACKNER, LEDERMAN, RODRIGUEZ, 2012; MAARTENS, CELUM, LEWUIN, 2014; DEEKS *et al.*, 2015), que são mais suscetíveis à infecção do que as células em repouso (DEEKS *et al.*, 2015). Além do grau de ativação, a localização destas células favorece que sejam o alvo preferencial do vírus, pois estão situadas imediatamente abaixo e dentro das camadas epiteliais do trato genital e gastrointestinal, onde a transmissão sexual acontece (PICKER, 2006).

No entanto, a presença de moléculas CD4⁺ por si só não é suficiente para permitir a entrada do vírus em outras células como monócitos e células dendríticas (HASSAM, 2013). Portanto, o HIV requer um correceptor para entrar na célula alvo, tipicamente os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (LACKNER, LEDERMAN, RODRIGUEZ, 2012; HASSAM, 2013; MAARTENS, CELUM, LEWUIN, 2014; DEEKS *et al.*, 2015). Estas moléculas são diferencialmente expressas em alguns subtipos de células T. CCR5 é expresso em níveis elevados em linfócitos T de memória, macrófagos e células dendríticas, mas não em linfócitos T *Naïve*, enquanto CXCR4 é expresso em ambos (HASSAN 2013; DEEKS *et al.*, 2015). O HIV geralmente usa um ou outro receptor de quimiocinas, no entanto pode utilizar os dois.

A replicação do HIV na célula alvo começa com a ligação da gp120 à molécula CD4, o seu receptor na superfície da célula hospedeira. Uma vez que gp120 se liga ao CD4, a glicoproteína sofre uma mudança conformacional que possibilita a sua ligação a um correceptor celular. A fusão com a membrana celular do hospedeiro continua e o nucleocapsídeo viral entra no citoplasma (FAUCI, 2007).

Após a entrada em uma célula, o RNA de cadeia simples é transcrito em DNA viral (*Dexociribonucleic acid* – DNA), que é então integrado no DNA do hospedeiro. Aproveitando as enzimas do hospedeiro, o HIV é transcrito, as proteínas são produzidas e clivadas e os vírions maduros são liberados (DEEKS *et al.*, 2015).

O curso clínico da infecção pelo HIV geralmente inclui duas fases ou estádios: a infecção aguda e a infecção crônica, esta última fase pode ser subdividida em um período silencioso, de latência clínica ou paucissintomático e um período sintomático caracterizado pelo aparecimento das doenças definidoras da AIDS (PANTALEO, FAUCI, 1996; DE LEON-NARANJO, 2014b). No entanto, o espaço de tempo entre a

infecção aguda e o desenvolvimento da infecção crônica sintomática pode ser amplo e muito variável.

Existem múltiplos elementos ou fatores virais e do hospedeiro que podem determinar a variabilidade da infecção pelo HIV-1, assim como as taxas de progressão da doença nos indivíduos infectados (HASSAN, 2013; DE LEÓN-NARANJO, 2014b).

Durante a infecção aguda, embora os indivíduos possam estar assintomáticos, o vírus está replicando-se ativamente no organismo. Como resultado, o sistema imunológico pode ficar lentamente danificado pela alta e constante taxa de replicação. O estágio sintomático da infecção indica a sua fase tardia onde os indivíduos podem ser suscetíveis a infecções oportunistas entre outras complicações (OSMOND, 1998; PICKER, 2006; WESTON, MARETTO, 2009; HASSAN, 2013). O advento da terapia antirretroviral combinada na década de 1990 permitiu a supressão da replicação viral e a transformação da infecção pelo HIV de uma doença progressiva fatal em uma doença crônica passível de controle (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; GRECO; PIETRA; RODRIGUES, 2015).

O curso natural da infecção pelo HIV não tratada tem ampla variação, podendo ser de um a mais de 20 anos (OSMOND, 1998; SABIN, LUNDGREN, 2013). A última década tem sido muito importante para o estudo e identificação de PVHIV, que apresentam padrões distintos de progressão da doença (SABIN; LUNDGREN, 2013). No geral, o tempo médio desde a infecção inicial até o desenvolvimento dos sinais clínicos da AIDS é de aproximadamente 8 a 10 anos (progressores típicos), mas pode variar entre os indivíduos e depende da complexa interação entre o vírus e o hospedeiro (PANTALEO, FAUCI, 1996; SILVA *et al.*, 2010).

Apesar das diferentes taxas de progressão da doença, a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV eventualmente progredem para a AIDS. De acordo com a taxa de progressão, três subgrupos principais foram identificados: 1) indivíduos que apresentam uma progressão rápida não usual da doença, onde a AIDS se desenvolve dentro dos três primeiros anos da infecção (progressores rápidos); 2) indivíduos nos quais a AIDS se desenvolve paulatinamente entre um período de três e 10 anos após a soroconversão (progressores lentos); 3) indivíduos que não experimentam doença progressiva por vários anos (8-10) após a infecção

primária (não-progressores ou controladores de elite) (PANTALEO, FAUCI, 1996; KUMAR, 2013; SABIN, LUNDGREN, 2013).

2.4. Imunopatogênica da infecção pelo HIV: depleção de células T CD4⁺ e inflamação/ativação imunológica crônica.

A patogênese da infecção pelo HIV-1 é baseada na interação do vírus com os componentes do sistema imune do hospedeiro (imunidade inata e adaptativa) e tem sido considerada como um processo lento de degradação imunológica e/ou desregulação que pode, em última instância, conduzir a deficiência imunológica e AIDS (MONTROYA, MORENO, RUGELES, 2006; PICKER, 2006; SIMON, D HO, ABDOOL, 2006; ALCAMÍ, COIRAS, 2011).

Os mecanismos pelos quais o HIV induz a disfunção imune têm sido objeto de estudo intenso desde a descoberta do vírus no início da década de 1980. Entretanto, com o decorrer do tempo, foi ficando cada vez mais improvável que o vírus pudesse ser diretamente responsável por induzir a depleção de células T e AIDS, sugerindo que fatores adicionais também deveriam desempenhar um papel na determinação da disfunção imunológica associada ao HIV (PAIARDINI *et al.*, 2004; BRENCHLEY, PRICE, DOUEK, 2006; SODORA, SILVESTRI, 2008).

Em PVHIV, a alta taxa de replicação viral durante a fase aguda da infecção inicia o processo patogênico, resultando em duas consequências patológicas cruciais: 1) a depleção profunda de células T CD4⁺ de memória efetora (T_{EM}), e 2) o estabelecimento de um estado de hiperativação imunológica persistente. Esses eventos, que hoje são reconhecidos como os mais importantes na patogênese da infecção pelo HIV, produzem degradação significativa do sistema imunológico e, posteriormente, estabelecem uma sequência de eventos que levam à descompensação imune final (BRENCHLEY *et al.*, 2004; PICKER, 2006; SIMON, D HO, ABDOOL, 2006; DOUEK, 2007; APPAY, SAUCE, 2008; LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; MIEDEMA *et al.*, 2013; MAARTENS, CELUM, LEWIN, 2014).

O linfotropismo do HIV pelas células CD4⁺ (T_{EM}) confere à infecção pelo HIV uma característica única e peculiar, pois estas células detêm um papel essencial na imunidade. A maioria das células T CD4⁺ residem nos tecidos linfoides, como os linfonodos e, em particular, nos tecidos linfoides associados à mucosa (*Mucosa-associated lymphoid tissue* - MALT), como o trato gastrointestinal, pulmões e trato

genital (PICKER, 2006; APPAY, SAUCE, 2008; KLATT, FUNDERBURG, BRENCHLEY, 2013).

O sistema imunológico intestinal (*Gut-associated lymphoid tissue* – GALT) contém aproximadamente 40% de todos os linfócitos, sendo considerado o maior órgão imunológico do organismo (LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012). Por outro lado, em contraste com o sistema imunológico sistêmico, a maioria das células T CD4⁺ no MALT são células T CD4⁺ de memória ativadas que expressam o correceptor CCR5, e são, portanto, alvos ideais para o vírus (BRENCHLEY *et al.*, 2004; APPAY, SAUCE, 2008; LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; DOUEK, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013). Por essa razão, as mucosas não são apenas os sítios primários de transmissão viral, mas também os principais lugares para a replicação viral e a destruição de células T CD4⁺, independentemente da via de transmissão do vírus (LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012).

O efeito mais importante sobre a homeostase das células T ocorre muito cedo no trato gastrointestinal, que passa por uma depleção maciça de células T CD4⁺ de memória ativadas, antes mesmo que aconteçam alterações significativas nas células T do sangue periférico (NILSON *et al.*, 2007), e está presente em todas as fases da doença (BRENCHLEY *et al.*, 2004), com recuperação mínima após do início da TARV (SIMON, D HO, ABDOL, 2006; APPAY, SAUCE, 2008; DOUEK, ROEDERER, KOUP, 2009; ALCAMÍ, COIRAS, 2011; KLATT *et al.*, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; MAARTENS, CELUM, LEWIN, 2014; DEEKS *et al.*, 2015).

A profunda depleção de células T CD4⁺ da mucosa (que ajudam a manter a integridade da barreira epitelial do intestino) (HATANO, 2013), juntamente com a apoptose dos enterócitos, faz com que o revestimento intestinal seja permeável, permitindo a passagem ou translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, fenômeno denominado translocação microbiana (LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; DOUEK, 2013; MIEDEMA *et al.*, 2013; DE LEÓN-NARANJO, 2014; MAARTENS, CELUM, LEWIN, 2014; DEEKS *et al.*, 2015).

A translocação de produtos bacterianos imunoestimuladores através de uma barreira intestinal permeável contribui na ativação crônica do sistema imune, através da ativação de receptores *Toll-Like* (TLR) de várias populações de leucócitos. O lipopolissacarídeo (LPS) é o indicador de translocação microbiana mais utilizado, no

entanto, outros produtos bacterianos, como flagelina, peptidoglicano e domínios de DNA ricos em CpG bacterianos que são reconhecidos por TLR 2, 5 e 9, respectivamente, também podem contribuir para a ativação do sistema imune (BRENCHLEY *et al.*, 2006; LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; PLAEGER *et al.*, 2012; MIEDEMA *et al.*, 2013).

Durante alguns anos, pensou-se que a patogênese da AIDS estava essencialmente relacionada à destruição direta das células T CD4⁺ pelo HIV. Nos últimos anos, o foco tem sido os modelos patogênicos que enfatizam o papel da ativação do sistema imunológico e o excesso de apoptose de células T não infectadas na indução de depleção de células T CD4⁺ associadas ao HIV (PAIARDINI *et al.*, 2004; MIEDEMA *et al.*, 2013).

O termo "ativação imune" na infecção pelo HIV é uma expressão bastante ampla que abrange uma grande variedade de eventos ou observações envolvidas em processos moleculares e celulares, incluindo o aumento do turnover das células T (*i.e.* aumento das taxas de proliferação e morte de células T), aumento da frequência de células T e B com fenótipos ativados e aumento das concentrações séricas de múltiplos mediadores pró-inflamatórios solúveis [IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF), TGF β , sCD14, sCD163, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e IP-10] (DEEKS *et al.*, 2004; BRENCHLEY, PRICE, DOUEK, 2006; DOUEK, 2007; APPAY, SAUCE, 2008; SODORA, SILVESTRI, 2008; DOUEK, ROEDERER, KOUP, 2009; LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; PLAEGER *et al.*, 2012; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; DE LEÓN-NARANJO, 2014a; APPAY, KELLEHER, 2016).

Dada a complexidade da interação entre o HIV e o sistema imune do hospedeiro, existem múltiplos mecanismos moleculares e celulares pelos quais a infecção pelo HIV pode induzir a ativação imune. E ainda é possível que exista um sinergismo entre esses mecanismos, possibilitando assim a existência de graus variáveis de ativação imune crônica (KLATT, FUNDERBURG, BRENCHLEY, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; RAJASURIAR *et al.*, 2013). Os mecanismos responsáveis pela ativação imunológica sistêmica na infecção crônica pelo HIV incluem o efeito citopático direto do HIV, as respostas imunes inatas e adaptativas ao vírus e seus antígenos, a translocação microbiana (como citado anteriormente), coinfeções com outros patógenos virais persistentes, incluindo o vírus da hepatite C (VHC ou HCV) e vírus do herpes, tais como citomegalovírus (CMV) e vírus do

Epstein-Barr. Além disso, também é possível que algum nível de ativação imune esteja relacionado a mecanismos homeostáticos e à ativação imunológica inespecífica de células B e T, frente à produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (BRENCHLEY, PRICE, DOUEK, 2006; APPAY, SAUCE, 2008; CATALFAMO *et al.*, 2008; SODORA, SILVESTRI, 2008; LANE, 2010; LACKNER, LEDERMAR, RODRIGUEZ, 2012; DOUEK, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; RAJASURIAR *et al.*, 2013; DE LEÓN-NARANJO, 2014a; DEEKS *et al.*, 2015).

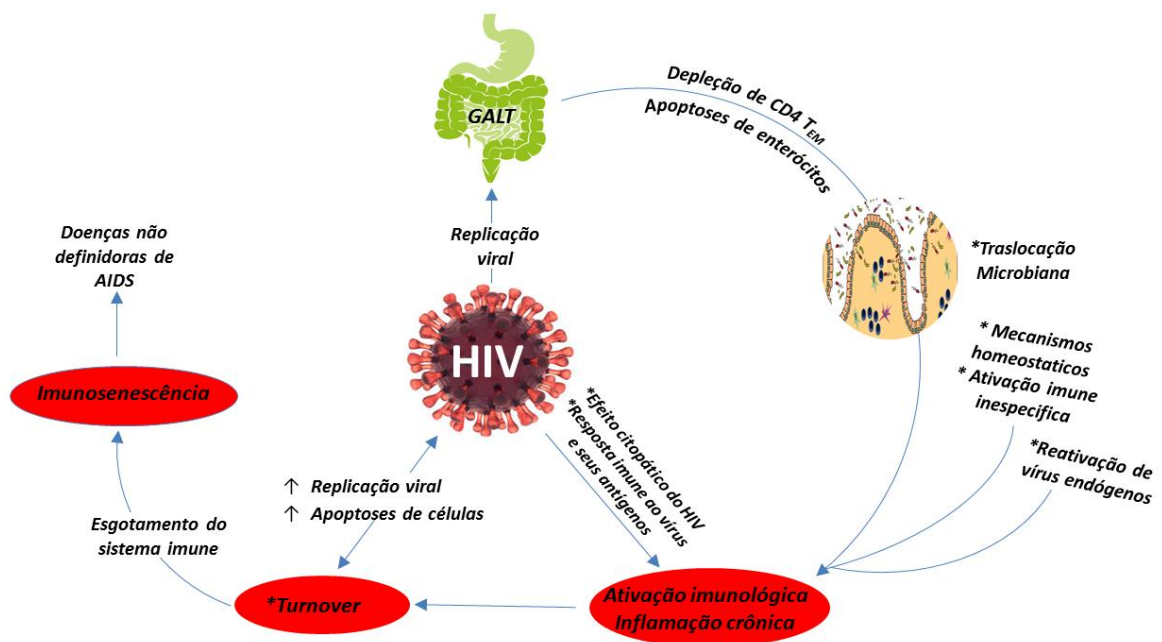


Figura 1: Modelo imunopatogênico da infecção pelo HIV. Causas e consequências da ativação imunológica crônica.

Embora a ativação imune possa ter algumas consequências benéficas, como a restauração da proliferação de células T em graus variáveis e, por inferência, a restauração parcial do pool de células T CD4⁺ de memória, há uma concordância geral de que ela é indiscutivelmente prejudicial para a PVHIV (BRENCHLEY, PRICE, DOUEK, 2006; APPAY, SAUCE, 2008; DOUEK, 2007; DOUEK, ROEDERER, KOUP, 2009).

A ativação imune crônica causa um aumento exacerbado e sustentado na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas e em proliferação, muitas das quais estão destinadas a morrer, mesmo na ausência de infecção, devido ao aumento da sensibilidade à apoptose. Além disso, as células T CD4⁺ ativadas são alvos

principais para a infecção pelo HIV, o que facilita a replicação viral. Neste contexto, a ativação, infecção e morte preferencial de células T CD4 HIV- específicas resulta no esgotamento do sistema imunológico (PAIARDINI *et al.*, 2004; DOUEK, 2007; BRENCHLEY, DOUEK, 2008; SODORA, SILVESTRI, 2008; DOUEK, ROEDERER, KOUP, 2009; SACHDEVA *et al.*, 2010; CATALFAMO *et al.*, 2011; KLATT, FUNDERBURG, BRENCHLEY, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; DEEKS *et al.*, 2015). Esta exaustão imune está implicada no comprometimento das funções das células T efectoras, especialmente as células T CD8⁺ HIV específicas (Figura 1) (SACHDEVA *et al.*, 2010). Além disso, a ativação imune e a inflamação parecem ser importantes contribuintes para a manutenção dos reservatórios virais do HIV, o maior obstáculo para a erradicação do vírus e a cura da doença (SERETI, ALTFELD, 2016).

A inflamação crônica e a ativação imune persistem indefinidamente, apesar da supressão completa ou quase completa da replicação viral com a TARVc, resultando na senescência proliferativa do pool de células T (BRENCHLEY, PRICE, DOUEK, 2006; SODORA, SILVESTRI, 2008; DOUEK, ROEDERER, KOUP, 2009; HATANO, 2013; KLATT *et al.*, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013; MAARTENS, CELUM, LEWIN, 2014). As células T e outros leucócitos normalmente proliferam em resposta a patógenos, mas as células possuem um número máximo de divisões; uma vez que este limite é alcançado, o grupo de células T *Naïve* não pode ser reabastecido de forma eficiente e, portanto, não é capaz de substituir continuamente as células T CD8⁺ e T CD4⁺ senescentes e/ou esgotadas em PVHIV (APPAY, SAUCE, 2008). Isso sustenta a ideia de que, através da indução de ativação e inflamação imune persistente e sustentada, a infecção pelo HIV induz um processo acelerado de imunossenescência e envelhecimento sistêmico (ALCAMÍ, COIRAS, 2011; KLATT *et al.*, 2013; PAIARDINI, MÜLLER-TRUTWIN, 2013).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Demografia do envelhecimento na população HIV positiva

Durante a primeira década da epidemia de HIV/AIDS, foram relatados poucos casos em pessoas acima de 50 anos. No entanto, nos últimos anos este número tem aumentado de forma constante. No Brasil, a incidência de HIV/AIDS nessa faixa etária dobrou entre 1996 e 2006 (CARDOSO *et al.*, 2013). De acordo com a UNAIDS, estima-se que em todo o mundo existem 3,6 [3,2 a 3,9] milhões de pessoas de 50 anos de idade ou mais que vivem com esta condição, constituindo um grupo populacional que aumentou em todas as regiões, embora em ritmos diferentes. (DE LEON-NARANJO 2014a).

O aumento da expectativa de vida nas pessoas vivendo com HIV (PVHIV) é acompanhado de aumento na frequência de comorbidades não relacionadas à esta infecção (*e.g.*: doenças cardiovasculares, neoplasias, infecções, reativações virais crônicas, osteoporose, declínio neurocognitivo e fragilidade) e muitos estudos têm demonstrado que mesmo as PVHIV com bom controle clínico e imunoviológico estão em maior risco de desenvolver essas comorbidades (SKIEST *et al.*, 1996; BAKER *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2008; MOCROFT *et al.*, 2010; HASSE *et al.*, 2011). Como resultado, há aumento da prevalência de doenças crônicas degenerativas nesta população ocorrendo precocemente. Este "envelhecimento acelerado" parece estar em grande parte relacionado com a inflamação crônica, à ativação imunológica e à imunossenescência presentes nesta infecção. (DEEKS, 2009; NIXON, LANDAY, 2010; RICKABAUGH, JAMIESON, 2010; DEEKS, 2011; HEARPS *et al.*, 2012; OAR WORKING GROUP ON HIV AND AGING, 2012; MEIR-SHAFRIR, POLLACK, 2012; ABERG, 2012; HUNT, 2014; TSOUKAS, 2014).

3.2. Envelhecimento do sistema imunológico

O envelhecimento, do ponto de vista biológico, é tipicamente definido como a deterioração progressiva da função fisiológica, que ocorre como uma consequência de dano cumulativo, molecular, celular e dos órgãos. (DEEKS, 2011; FEDARKO, 2011).

Como acontece com qualquer sistema, o imunológico exhibe mudanças características à medida que as pessoas envelhecem. O processo natural de envelhecimento produz alterações na sua estrutura e função que afetam tanto a

imunidade inata quanto a adaptativa. As mudanças mais notáveis ou pelo menos as mais estudadas acontecem no sistema imunológico adaptativo e, especialmente nas células T, que constituem a espinha dorsal da resposta imunitária adaptativa. Essas mudanças invariavelmente resultam em diminuição das respostas ao estresse e maior susceptibilidade a doenças e à morte (DEEKS, 2011; OAR WORKING GROUP ON HIV AND AGING, 2012; FANTAUZZI *et al.*, 2013; FÜLÖP, LARBI, PAWELEC, 2013).

O envelhecimento do sistema imunológico é um processo dinâmico, que pode, pelo menos em parte, refletir a evolução da adaptação da resposta imune frente a agentes patogênicos. Nem todos os compartimentos da resposta imune envelhecem da mesma maneira, à mesma velocidade ou na mesma direção (FÜLÖP, LARBI, PAWELEC, 2013).

As alterações fenotípicas e funcionais observadas nas células T durante o processo de envelhecimento são referidas como imunossenescência, e acredita-se que seja uma consequência da ativação e proliferação persistente das células T, impulsionada pela exposição antigênica crônica experimentada ao longo da vida (DEEKS, 2011; DOCK, EFFROS, 2011; CHOU, EFFROS, 2013; PIRRONE *et al.*, 2013; ROMERO-CABRERA, AMORES-HERNANDEZ, FERNANDEZ-CASTELEIRO, 2013; DE LEON-NARANJO, 2014a; TSOUKAS, 2014; SAAVEDRA, GARCÍA, 2014).

3.3. Infecção pelo HIV e imunossenescência

A ativação imunológica crônica durante a infecção pelo HIV impulsiona gradualmente as células T para uma exaustão da capacidade replicativa tornando-as células senescentes. Isso tem sido amplamente caracterizado pela diminuição de células *naïve*, a perda da expressão de moléculas co-estimuladoras como CD27 e CD28, acumulação de células terminalmente diferenciadas, a expressão de receptores inibitórios, aumento da susceptibilidade a apoptose, bem como pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.*: IL-6, TNF- α e IL-1 β) (APPAY *et al.*, 2007; CHATTOPADYAY, ROEDER, 2010; FANTAUZZI *et al.*, 2013; PIRRONE *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de novas tecnologias (produção de anticorpos monoclonais e a citometria de fluxo) nos permite verificar a exaustão e a senescência a um nível clonal. A identificação desses clones pode então ser associada à avaliação do seu fenótipo (diferenciação, ativação e senescência

usando marcadores de superfície) (CHOU, EFFROS, 2013). Existe uma grande variedade de marcadores que podem ser utilizados, embora haja pouco consenso em relação a quais dos marcadores de superfície celular melhor discriminam os vários estádios da diferenciação de células T. Os marcadores mais comumente considerados para estudos humanos são CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD28, CD57, CD62L, CD95/Fas e PD-1 (HARARI, VALLELIAN, PANTALEO, 2004; APPAY *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY, ROEDERER, 2010) os quais desempenham papel importante na ativação de células T, na proliferação, produção de citocinas e apoptose (APPAY *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY, ROEDERER, 2010; FÜLÖP, LARBI, PAWELEC, 2013; LARBI, FÜLÖP, 2014;).

Embora as células T CD4⁺ (auxiliares) e CD8⁺ (citotóxicas) tenham diferenças funcionais claras, os dois subtipos exibem uma evidente concordância no processo de diferenciação. As semelhanças envolvem mudanças fenotípicas e funcionais que ocorrem ao longo da via de desenvolvimento pós-tímico. Seguindo a seleção positiva e negativa, as células T são liberadas do timo, como células maduras *naïve* que se proliferam e se diferenciam em células efetoras, em resposta a uma estimulação antigênica. Estas em grande maioria migram para tecidos periféricos e locais inflamados para facilitar a destruição de alvos infectados.

As células T *naïve* e de memória (central, efetora) podem ser caracterizadas com base na expressão de moléculas de superfície, incluindo o antígeno leucocitário comum CD45. Diferentes isoformas desse antígeno são expressas na superfície dos linfócitos T durante o processo de diferenciação celular, sendo a isoforma CD45RA típica de linfócitos T *naïve* e a isoforma CD45RO associada aos linfócitos T de memória (MICHIE *et al.*, 1992). As moléculas de superfície CD62L (seletina) e CCR7 (receptor de quimiocinas) também são úteis para identificação das células T *naïve* e de memória. Células *naïve* expressam altos níveis de ambas as moléculas enquanto que durante o processo de diferenciação, as células de memória perdem a expressão do CD62L e/ou CCR7 (SALLUSTO *et al.*, 1999).

Outros marcadores fenotípicos comumente utilizados são as moléculas coestimulatórias CD27 e CD28, a reguladora PD-1, a molécula marcadora de células terminalmente diferenciadas, CD57 e o receptor de morte CD95/Fas (APPAY, ROWLAND-JONES, 2004; MAHNKE *et al.*, 2013). CD28 e CD27 são receptores coestimuladores envolvidos, respectivamente, na regulação da ativação das células T e na geração de células previamente expostas ao antígeno (*antigen-primed cells*).

Esses receptores são diferencialmente expressos na superfície das células T, e uma vez que a expressão é perdida, não há evidência de subsequente reexpressão (APPAY *et al.*, 2002b; APPAY, ROWLAND-JONES, 2004; APPAY *et al.*, 2008). *Programmed-death 1* (PD-1) é um membro da família B7:28 de moléculas inibitórias inicialmente encontradas em um hibridoma de células T submetidas a apoptose, e portanto rotuladas de morte programada-1. Foi um dos primeiros receptores inibitórios associados à exaustão imune. Sua ação reguladora negativa é crítica para o equilíbrio entre a ativação das células T e a tolerância (ISHIDA *et al.*, 1992; KAUFMANN *et al.*, 2008). O CD57 (HNK-1, Leu-7, L-2) é um glicopéptido encontrado em várias glicoproteínas de superfície, proteoglicanos e glicolípidos em subtipos de células NK, células T, também em células neuronais e no olho. Nas células T CD4⁺ e CD8⁺ este marcador fenotípico mostrou estar presente nos estádios tardios da diferenciação. A expressão de CD57 define um estado de senescência replicativa e de apoptoses antígeno induzida em células CD8⁺ (BRENCHLEY *et al.*, 2003). PD-1 e CD57 têm sido associados a senescência replicativa, sendo expressos em níveis variados em células de memória e comumente ausentes em células *naïve* (APPAY *et al.*, 2008; MAHNKE *et al.*, 2013; LARBI, FÜLÖP, 2013). Dados da literatura sugerem que as células da memória efetora são o subtipo mais predisposto para expressar PD1, enquanto o TEMRA exibe níveis mais altos de CD57 (LARBI, FÜLÖP, 2013). Além destes, a expressão de marcadores associados à via apoptótica CD95/Fas tem sido correlacionado a perfil fenotípico de senescência (APPAY *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY, ROEDERER, 2013; MAHNKE *et al.*, 2013).

Assim sendo, as células *naïve* podem ser diferenciadas das células de memória uma vez que esta população é caracterizada pela expressão de: CD45RA, CCR7 e CD62L e as moléculas co-estimuladoras CD28 e CD27, e pela ausência de CD57, CD95 (OKADA *et al.*, 2008; APPAY *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY, ROEDERER, 2010; LARBI, FÜLÖP, 2014; XU, LARBI, 2017).

As células T de memória por sua vez podem ser divididas em dois subconjuntos: as células T de memória central (T_{CM}), que são de longa duração, circulam através dos gânglios linfáticos, apresentam uma maior cinética para a produção de citocinas do que outros subtipos de células de memória e são grandes produtoras de IL-2, e as células de memória efetora (T_{EM}) conhecidas pela produção rápida de citocinas e enzimas citolíticas. As populações de memória central são

tipicamente CD45RA⁻ CD45RO⁺ CCR7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD57⁻ CD62L⁺, enquanto as células de memória efetora podem ser distinguidas pela ausência de CCR7, CD28 e CD62L e a expressão de CD57 e PD-1 (LARBI, FÜLÖP, 2014; UNSOELD, PIRCHER, 2005; OKADA *et al.*, 2008; APPAY *et al.*, 2008; XU, LARBI, 2017). Finalmente as células de memória efetora terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) foram propostas para definir uma população com uma pobre capacidade proliferativa, e fenotipicamente distinta já que podem reexpressar o marcador CD45RA (HARARI, VALLELIAN, PANTALEO, 2004; APPAY *et al.*, 2008; XU, LARBI, 2017).

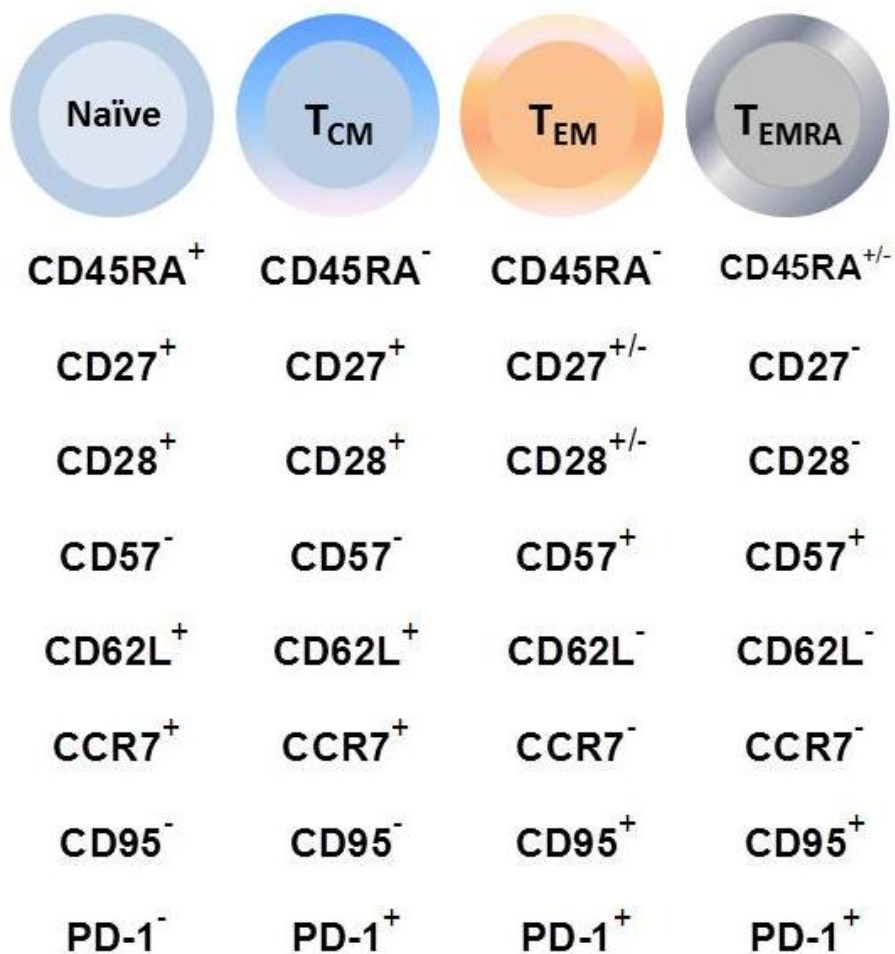


Figura 2. Caracterização imunofenotípica de acordo com a expressão dos diferentes marcadores de superfície celular. T_{CM}: Células T de memória central; T_{EM}: células T de memória efetora; T_{EMRA}: células T de memória efetora terminalmente diferenciadas.

3.4. Imunossenescência nos diversos cenários da infecção pelo HIV

Harr *et al.*, em 1998 publicaram os resultados de estudo no qual foi avaliada a expressão dos marcadores CD95 e CD26 em coorte de PVHIV em diferentes estádios da doença, os mesmos foram classificados em: progressores lentos (11); não progressores (16); indivíduos em estágio A (10) do CDC e pacientes em estágio B/C (10). Os achados demonstraram que a expressão de CD95 é maior em indivíduos infectados pelo HIV quando comparados com indivíduos sem esta infecção. Além disso, foram evidenciadas diferenças entre os grupos de PVHIV, mostrando que a expressão de CD95 em células TCD4⁺ é similar entre progressores lentos e não progressores, assim como em indivíduos em estágio A da infecção. Enquanto que no compartimento de células T CD8⁺ não foram observadas diferenças entre os 4 grupos de indivíduos infectados pelo HIV (HARR *et al.*, 1998).

Appay *et al.*, em 2000 conduziram estudo com o objetivo de caracterizar melhor as diferenças existentes entre as células CD8⁺ específicas para o HIV e o CMV. Foram estudadas 25 pessoas com infecção pelo HIV e 25 pessoas sem esta condição. O status de maturação das células foi avaliado pela expressão dos marcadores CD28, CD27, CD45RA e CD45RO. Os resultados demonstraram que a maioria das células T CD8⁺ específicas contra o HIV e o CMV não expressavam o marcador CD28. No entanto, a expressão de CD27 diferiu entre as células CD8⁺ específicas para o HIV e o CMV, sendo que as células CD8⁺ específicas contra o HIV foram predominantemente CD27⁺ e CD45RA⁻/RO⁺ (APPAY *et al.*, 2000).

Choremi-Papadopoulou *et al.*, em 2000 publicaram os resultados de estudo no qual avaliaram a expressão do marcador CD28 em células T CD4⁺ e CD8⁺. Para a realização do estudo foram incluídas 152 PVHIV assintomáticas no início do estudo, além disso, foram incluídas 731 pessoas sem esta condição. Os pacientes foram acompanhados por 3 a 4 anos e no decorrer da pesquisa foram classificados em dois grupos de acordo com a progressão ou não para AIDS. Os achados demonstraram que as PVHIV apresentam um aumento na percentagem de células CD8⁺CD28⁻ quando comparadas com os controles sem esta condição. Este achado esteve presente durante todo o tempo de observação dos pacientes. Além do mais, ao final do tempo de observação foi possível evidenciar diferenças entre os grupos de PVHIV e, que no momento do diagnóstico de AIDS, a percentagem assim como o número absoluto de células T CD4⁺CD28⁺ estavam mais elevadas no grupo de

indivíduos que não progrediram para AIDS, enquanto que a percentagem de CD28⁻CD8⁺ era significativamente baixa (CHOREMI-PAPADOPOULOU *et al.*, 2000).

Champagne *et al.*, 2001, estudaram as diferenças de maturação entre as células T CD8⁺ específicas para o HIV e o CMV baseados na expressão dos marcadores CD45RA e CCR7 numa coorte de 18 indivíduos com infecção pelo HIV. Os resultados demonstraram que nas PVHIV existe acumulação de células CD45RA⁻CCR7⁻CD8⁺, fenótipo celular representativo de estágio preterminal de diferenciação, mostrando esses resultados, distúrbio no processo de maturação das células CD8⁺ HIV específicas (CHAMPAGNE *et al.*, 2001).

Mueller *et al.*, em 2001, realizaram estudo com o objetivo de caracterizar fenotipicamente as células CD8⁺ HIV, CMV e EBV antígeno-específicas de 25 indivíduos com infecção pelo HIV e determinar as diferenças no fenótipo de memória e no potencial apoptótico entre essas células vírus específicas. Eles constataram que a maioria das células T CD8⁺ HIV-específicas expressam o fenótipo CD45RA⁻CD62L⁻ enquanto que muito poucas células expressam o fenótipo CD45RA⁺CD62L⁻. Além disso, foi demonstrado que as células T CD8⁺ HIV-específicas apresentam uma susceptibilidade aumentada à apoptose induzida por CD95/Fas. Para avaliar se esse aumento da sensibilidade à apoptose estava relacionado com diferenças na expressão de CD95/Fas, a expressão do CD95 foi examinada em células CD8⁺ em PVHIV assim como em indivíduos sem infecção pelo HIV, mostrando que de fato existe um aumento na expressão desse marcador em pessoas infectadas pelo HIV (MUELLER *et al.*, 2001).

Appay *et al.*, 2002, avaliaram a expressão dos marcadores CD28, CD27 e CD45RA em diferentes infecções virais crônicas: vírus do Epstein–Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) e vírus da hepatite C (HCV) em 14 PVHIV desde a fase aguda ou inicial da infecção pelo HIV até a fase crônica da doença, com a finalidade de avaliar a diferenciação das células T CD8⁺ específicas para o HIV. O grupo controle foi composto por indivíduos com infecção crônica pelo HIV, com carga viral baixa ($3 \times 10^2 - 1.6 \times 10^5$) durante pelo menos 3 anos, com ou sem TARV. Eles observaram grande quantidade de células CD28⁺CD27⁺ ainda na fase aguda da infecção, as quais se diferenciaram rapidamente (2-4 semanas) em células intermediárias CD28⁺CD27⁻, logo depois, no final da fase aguda, foi observada expressão substancial, mas ainda baixa de células CD28⁻CD27⁻; no entanto, assim que a ativação celular diminui e a fase de expansão termina, é observado um

fenótipo compatível com a fase crônica da infecção CD27⁺CD28⁻. Além disso, foi observado que a maioria das células apresentaram ausência do marcador CD45RA ainda durante a fase aguda da infecção (APPAY *et al.*, 2002a).

Tussey *et al.*, em 2003, investigaram o estado de maturação de células T CD8⁺ antígeno-específicas de vários modelos de infecções virais, bem e mal controladas. No caso das células T CD8⁺ HIV-específicas foi observado um aumento na expressão do fenótipo CD27⁺CD28⁻CD45RO⁺/RA⁻ em indivíduos que fazem uso de TARV e apresentam controle imunoviológico adequado (TUSSEY *et al.*, 2003). Demonstrando que apesar dos efeitos benéficos da TARV, esta não consegue impedir os danos ao sistema imune.

Palmer *et al.*, em 2005 estudaram a frequência, fenótipo e função das células T CD4⁺CD57⁺ em coorte de 25 pessoas infectadas pelo HIV, não tratados, além de 10 controles soronegativos. A percentagem de células T CD4⁺ que expressam o marcador CD57 foi significativamente maior nos indivíduos com HIV não tratados do que nos doadores soronegativos. Cabe destacar que a expressão de CD57⁺ não se normalizou em indivíduos que receberam pelo menos 6 meses de TARV com sucesso (carga viral indetectável). Além disso, o marcador CD57⁺ era predominantemente expresso na fração CCR7⁻ do compartimento de células T CD4⁺ e representou a maioria das células na população CCR7⁻CD45RA⁺ (PALMER *et al.*, 2005)

Trautmann *et al.*, em 2006 usaram uma coorte de 31 indivíduos com infecção crônica pelo HIV, classificados como virêmicos (20) e com carga viral (CV) indetectável (TARV) (18), para monitorar a expressão do marcador de morte programada 1 (*Programmed Death 1* – PD-1) em células CD8⁺ HIV, CMV e EBV-específicas. Os resultados mostraram aumento da expressão do marcador PD-1, o qual se mostrou correlacionado de forma significativa com a CV (TRAUTMANN *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que o acúmulo de células T CD8⁺ HIV-específicas disfuncionais na PVHIV impossibilitaria a renovação de um repertório destas células funcionalmente competentes.

Day *et al.*, em 2006 examinaram a expressão de PD-1 em células CD8⁺ HIV-específicas de 71 indivíduos virgens de TARV. Os resultados demonstraram que PD-1 está significativamente aumentado nestas células, assim como no número total de células T CD8⁺. Além do mais, foi observada correlação positiva entre a CV ea intensidade de fluorescência e a percentagem de PD-1; e correlação inversamente

proporcional destes com a contagem de células T CD4⁺. Cabe destacar que para a realização deste estudo foram utilizados tetrâmeros de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (DAY *et al.*, 2006). No mesmo ano, Petrovas e colaboradores reportaram que PD-1 é preferencialmente expressado em células T CD8⁺ vírus-específicas independentemente do seu estado de maturação. (PETROVAS *et al.*, 2006).

Em 2007, Hoji e colaboradores estudaram a diferenciação das células T CD8⁺ HIV-específicas, através da análise dos marcadores CD27, CD28, CD57 e CD62L em um grupo de 7 PVHIV naive (sem TARV) e 11 pessoas com sorologia negativa para o HIV. Neste estudo foi observado que a maioria das células T CD8⁺ HIV-específicas nos participantes com infecção crônica e não tratada, apresentavam o fenótipo CD27⁻CD28⁻CD57⁻/CD62L^{low} sugestivo de um estágio intermediário a avançado de diferenciação celular (HOJI *et al.*, 2007). Resultado este que revela mais uma vez que a infecção pelo HIV produz uma disfunção do processo de diferenciação de células T.

Zhang *et al.*, em 2007 estudaram as diferenças na expressão do marcador PD-1 entre progressores típicos e progressores lentos. Para a realização deste estudo foram incluídas 63 PVHIV, categorizadas de acordo com aspectos clínicos, laboratoriais e de progressão da doença em: progressores típicos, não progressores e respondedores a TARV. Inicialmente foram avaliados os marcadores de diferenciação de células T e os achados dessa análise revelaram que os progressores típicos apresentaram maior porcentagem de células T de memória efetora (T_{EM}) - CD45RA⁻CCR7⁻CD8⁺ - e mais baixa frequência de células de memória efetora terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) - CD45RA⁺CCR7⁻CD8⁺-, enquanto os não progressores apresentam uma percentagem moderada destas células T_{EM} e maior número de células de T_{EMRA}. Quando avaliada a expressão de PD-1, foi evidenciado que os progressores lentos apresentam expressão marcadamente menor em células TCD8 de memória HIV-específicas. Por outro lado, os progressores típicos apresentaram expressão significativamente maior, a qual estava estreitamente relacionada com redução do número de células T CD4⁺ e elevação dos níveis de carga viral (ZHANG *et al.*, 2007).

Cao *et al.*, em 2009 publicaram um estudo de casos com o objetivo de determinar se a infecção e progressão do HIV-1, não tratada, está associada a envelhecimento prematuro das células T CD4⁺ naive e CD4⁺ e CD8⁺ de memória.

Para a realização deste estudo foram incluídas 60 PVHIV classificadas em dois grupos de acordo com a velocidade de progressão para AIDS em: progressores rápidos (20) e progressores lentos (40); também foram incluídos 9 indivíduos sem esta condição. Os resultados demonstraram um aumento na proporção de células CD57⁺CD8⁺ entre o grupo de pessoas com infecção pelo HIV, sem diferença significativa entre os dois grupos. Posteriormente foi avaliada a distribuição das células T CD8⁺ definidas pelos padrões de expressão de CD28 e CD57, e nesse contexto foi observado que os 2 grupos de PVHIV apresentam clara elevação de CD28⁻CD57⁻CD8⁺ consistente com estágio intermediário de diferenciação. Ainda foi constatada uma diminuição de células em estágio inicial de diferenciação CD28⁺CD57⁻CD8⁺ e aumento de células terminalmente diferenciadas CD28⁻CD57⁺CD8⁺. Comparados com os progressores lentos, os progressores rápidos apresentaram maior declínio de células *naïve* CD28⁺CD57⁻ e aumento de células em estágio intermediário de diferenciação CD28⁻CD57⁻. Em relação ao compartimento de células T CD4⁺, a infecção pelo HIV não causou mudanças significativas em termos da expressão isolada de CD57 ou da coexpressão de CD28 e CD57. Por fim, foi percebido que em comparação com o compartimento de células T CD8⁺, o comportamento de células T CD4⁺ esteve composto em mais de 90% por células *naïve* CD28⁺CD57⁻ seguida de pequena proporção de células em estágio terminal de diferenciação. O estudo sugere que a patogênese do HIV envolve um envelhecimento acelerado das células CD4⁺*naïve* e das células CD4⁺ e CD8⁺ de memória (CAO *et al.*, 2009).

Em 2011, Fernandez e colaboradores, em um estudo que avaliou 18 homens com sorologia positiva para o HIV e o CMV, observaram um aumento na frequência de CD57. Além disso, foi evidenciado que as células T CD4⁺ HIV-específicas que expressavam altos níveis de CD57⁺ não coexpressavam o marcador CD28 (FERNANDEZ *et al.*, 2011).

Em um estudo publicado em 2012 (MOJUMDAR *et al.*, 2012), as células T foram caracterizadas, de acordo com a expressão dos marcadores CD45RA, CCR7, CD27 e CD28. Neste estudo foram incluídos 39 pacientes com sorologia positiva para o HIV, assim como 8 indivíduos HIV negativos. Foi observado que na infecção pelo HIV ocorre um aumento de células T de memória e efetoras, e uma diminuição concomitante de células *naïve*. Nas PVHIV foi observado um acúmulo de células TCD8⁺ num estágio intermediário de diferenciação (CD27⁺CD28⁻) e de células

TCD4⁺ em estádios mais avançados de diferenciação (CD27⁻CD28⁻). Além disso, foi observado aumento na expressão do marcador CD57⁺, predominantemente no compartimento de células T CD8⁺. Estes perfis se mostraram correlacionados de forma negativa com a contagem de células T CD4⁺, e de forma positiva com a concentração plasmática do vírus. Esses resultados destacam o papel da ativação imune induzida pelo HIV no contexto da disfunção de células T.

Tassiopoulos *et al.*, em 2012 estudaram a expressão do marcador CD28⁻ em células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com infecção crônica pelo HIV sem TARV e as mudanças relacionadas com este marcador após o início do tratamento antirretroviral eficaz. Os marcadores foram avaliados no tempo zero e 96 semanas após o início da TARV. Foram avaliadas de forma prospectiva 1291 PVHIV, assim como 48 pessoas sem esta condição. Neste estudo, os níveis baixos de células TCD4⁺ antes da TARV estiveram associados com uma percentagem maior de células CD4⁺CD28⁻ e CD8⁺CD28⁻. Por outro lado, os indivíduos mais velhos apresentaram uma maior percentagem de células T CD28⁻ sobretudo no compartimento de células CD8⁺, quando comparados com indivíduos mais jovens. Além disso, foi observado que após 96 semanas de TARV houve redução da percentagem de células CD28⁻ entre indivíduos que apresentam controle imunoviológico, no entanto, quando comparado com as pessoas sem infecção, as PVHIV exibem níveis significativamente maiores de CD28⁻ (TASSIOPOULOS *et al.*, 2012).

Breton *et al.*, em 2013 realizaram uma análise transversal da expressão de PD-1 em subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ em 51 indivíduos em diferentes estádios da doença, incluindo pessoas que faziam uso de TARV e pessoas soronegativas. Inicialmente foi avaliado o impacto do HIV na distribuição de subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ e os resultados dessa análise demonstraram que durante a fase aguda e crônica da infecção pelo HIV existe um aumento de células de memória efetora (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) e uma diminuição de células *naïve* (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺. No entanto durante o processo de transição da fase aguda para a fase crônica da infecção foi observado um aumento considerável de células *naïve* em ambos os compartimentos. Quando analisada a expressão dos marcadores CD28 e CD57 foi observado que durante o curso da infecção pelo HIV a maioria das células CD4⁺ e CD8⁺ são CD28⁻CD57⁺. Por outro lado, foram observados níveis significativamente elevados da expressão de

PD-1, em ambos os compartimentos de células T CD4⁺ e CD8⁺, tanto em pacientes com infecção aguda, assim como em pacientes com infecção crônica, quando comparados com indivíduos sem a infecção. Contudo a expressão de PD-1 é maior no compartimento de células T CD8⁺, durante a infecção crônica, quando comparado com a fase aguda da infecção. Além disso, a TARV pode restaurar os níveis de expressão de PD-1 para níveis observados em pessoas não infectadas pelo HIV, na maioria, mas não em todos os subtipos de células T CD4 e CD8 (BRETON *et al.*, 2013).

Lee *et al.*, em 2014 publicaram um estudo no qual utilizaram coorte de indivíduos que tinham sido recentemente diagnosticadas com HIV (<6 meses, desde a data estimada de infecção) e que, posteriormente, iniciaram o uso de TARV. O objetivo do estudo foi descobrir se proporções anormalmente baixas de células T CD28⁻CD57⁺CD8⁺ são evidentes durante os primeiros meses de infecção pelo HIV. Os seus achados demonstraram que, pessoas recentemente infectadas apresentam proporções mais baixas de células T CD28⁻CD57⁺CD8⁺ quando comparados com os indivíduos sem esta infecção e essas proporções aumentam com o uso da TARV. Isto quer dizer que apesar de que o HIV levar a aumento na frequência de células CD28⁻CD8⁺, muito poucas células coexpresam o marcador CD57, e esta anormalidade é evidente já nos primeiros meses de infecção pelo HIV e pode ser revertida pelo início precoce da TARV. Por outro lado, níveis anormalmente baixos de CD28⁻CD57⁺CD8⁺ são importantes preditores de mortalidade em PVHIV e que fazem uso de TARV (LEE *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICATIVA

As PVHIV tem experimentado uma melhora dramática na sobrevivência devido à introdução da TARV na segunda metade da década de 1990 (ABERG, 2012; SILVA *et al.*, 2013; GRECO, PIETRA, RODRIGUES, 2015, p.324). Mas apesar do sucesso inquestionável da TARV, esta por si só não é capaz de impedir os danos ao sistema imunológico (DEEKS, 2011).

O aumento da expectativa de vida nas PVHIV está relacionado com aumento na prevalência de doenças características do envelhecimento nesta população. Este "envelhecimento acelerado" parece estar em grande parte relacionado com à inflamação crônica e à ativação imune decorrentes da exposição antigênica crônica ao vírus (NIXON, LANDAY, 2010; RICKABAUGH, JAMIESON, 2010; DEEKS, 2011; HEARPS *et al.*, 2012; MEIR-SHAFRIR, POLLACK, 2012; ABERG, 2012; HUNT, 2014; TSOUKAS, 2014). O estudo de vários marcadores imunológicos envolvidos no processo de ativação e diferenciação celular mostra um desequilíbrio no processo de maturação e diferenciação celular. Esses dados sugerem que na infecção pelo HIV há "esgotamento" ou "envelhecimento" precoce do sistema imune (DEEKS, 2011).

Ainda não está claro como os pacientes devem ser tratados com base nestas informações, ou se esses marcadores devem ser utilizados para avaliar a redução do risco potencial de desenvolvimento de doenças degenerativas nas pessoas vivendo com HIV. Acredita-se, portanto, que uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à senescência imune irá conduzir a uma estratégia de intervenção eficaz destinada a melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Assim sendo, este será um tópico que continuará a ser parte importante da agenda de pesquisa nos próximos anos.

Muitos estudos sobre a imunossenescência em PVHIV têm sido conduzidos nos países desenvolvidos, mas nos países em desenvolvimento e, particularmente no Brasil, muito pouco se sabe sobre o assunto, mostrando uma grande lacuna nesta área. Por tanto, o nosso grupo de pesquisa propôs estudar uma coorte de indivíduos com infecção crônica pelo HIV com o objetivo de avaliar e descrever os perfis de imunossenescência e exaustão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ circulantes, em indivíduos com idade entre 18 e 56 anos. Para tais fins, foi avaliada por citometria de fluxo a expressão dos marcadores de superfície celular: CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas e morte programada-1 (PD-1).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Analisar, por meio de citometria de fluxo, os perfis de imunossenescência e exaustão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ circulantes em pessoas vivendo com HIV (PVHIV), com idade entre 18 e 56 anos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os perfis de imunossenescência e exaustão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ circulantes, com base na frequência celular e intensidade média de fluorescência, em PVHIV, com idade entre 18 e 56 anos.

2. Comparar os valores de imunossenescência e exaustão das PHIV com os valores do grupo controle.

3. Avaliar a correlação entre os perfis de imunossenescência e os valores absolutos e percentuais de linfócitos T CD4⁺ de PVHIV no tempo zero e 60 meses após.

6. METODOLOGIA

6.1. Delineamento

O desenho do presente trabalho foi baseado no estudo de uma série de casos, destinado a avaliar a imunossenescência e exaustão de pessoas vivendo com HIV (PVHIV). Trata-se de pesquisa descritiva, observacional e analítica, avaliada de forma transversal.

6.2. Local do estudo

Os pacientes foram recrutados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP Orestes Diniz – UFMG/PBH), onde fazem o acompanhamento ambulatorial da infecção pelo HIV.

Os exames de imunofenotipagem foram realizados no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Laboratório DIP FM-UFMG).

O ambulatório faz parte da rede de referência no atendimento de indivíduos com infecção pelo HIV e o laboratório, também é uma das referências para os exames de contagem de linfócitos TCD4⁺ da rede pública, na região metropolitana de Belo Horizonte.

6.3. Participantes da pesquisa

Após concordarem em participar e assinar o TCLE, foram incluídas 46 PVHIV, de 18 a 56 anos de idade, de ambos os sexos, em diversos cenários laboratoriais. Além dos pacientes portadores de infecção pelo HIV, foram incluídas, também, 20 pessoas com sorologia negativa para o HIV.

6.3.1. Critérios de inclusão:

- Idade entre 18 e 56 anos;
- Ausência de doença infecciosa ativa.

6.3.2. Critérios de exclusão:

- Infecção pelo vírus da hepatite B ou C;
- Uso de drogas imunossupressoras tais como corticoide sistêmico;
- Vacinação nos últimos 30 dias;
- Doença reumatológica ou autoimune;

- Gestação ou parto no último mês;
- Dislipidemia com dosagem de triglicerídeos acima de 500mg/dl.

6.4. Seleção dos participantes e plano de inclusão

Os pacientes foram recrutados enquanto aguardavam consulta ambulatorial de rotina com médico assistente no CTR-DIP Orestes Diniz. Todos os médicos assistentes foram comunicados sobre o projeto e estavam de acordo com a possível inclusão de seus pacientes.

Os prontuários foram avaliados conforme ordem de chegada e os dois primeiros pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e não apresentavam critérios de exclusão eram abordados. Devido ao fluxo do laboratório na realização dos exames, apenas dois pacientes ao dia eram incluídos. O convite para participar do projeto se deu em sala fechada, por pesquisador médico ou estudante de medicina em estágio de iniciação científica, de forma a não atrasar a consulta programada. Aqueles que aceitaram participar do estudo, responderam um questionário e foram, na sequência, encaminhados para a coleta de sangue no próprio ambulatório, em setor adequado e por profissional qualificado. Foram coletadas duas amostras de 5mL de sangue periférico em tubo com EDTA.

A seguir, as amostras foram prontamente encaminhadas para o laboratório e processadas em até 24 horas.

Os indivíduos sem infecção pelo HIV foram selecionados também no ambulatório do CTR-DIP Orestes Diniz. A abordagem e coleta de sangue seguiu o mesmo padrão utilizado para os pacientes com sorologia positiva para o HIV.

Os pacientes com infecção pelo HIV foram caracterizados nos seguintes grupos conforme com aspectos laboratoriais:

1. Progressores-lentos (PL): indivíduos com infecção pelo HIV, que nunca usaram TARV, com Carga viral (CV) menor que 5.000 cópias/mL e contagem de linfócitos TCD4⁺ maior que 500 células/mm³ há mais de 7 anos;
2. Replicação ativa (RA): indivíduos com infecção pelo HIV, com ou sem uso de TARV, que apresentavam CV acima de 5.000 cópias/mL nos últimos 2 exames consecutivos;
3. TARV com sucesso: indivíduos com infecção pelo HIV, em uso de TARV, com CV menor que 50 cópias/mL nos últimos 2 exames consecutivos.

Das 46 PVHIV, os grupos de replicação ativa e TARV com sucesso contaram, com pelo menos 20 participantes em cada. No grupo de progressores lentos foram incluídos 6 participantes. Já era esperado um menor número nesse grupo, tendo em vista a raridade de pacientes que apresentam controle viral e imunológico sustentado sem TARV (DEEKS, WALKER, 2007).

6.5. Considerações éticas

Este estudo integra-se à linha de pesquisa sobre Infecções virais: HIV/AIDS, HTLV I/II, e outros vírus, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a execução deste projeto foram utilizadas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução N^o. 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 26 de abril de 2011, conforme o parecer N^o. ETIC 0636.0.203.000-10 (Anexo 5), de modo que fossem salvaguardados os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. Os exames propostos só foram realizados após obtenção do consentimento, por escrito, das pessoas que aceitaram participar voluntariamente do estudo. Foram tomadas todas as medidas possíveis e recomendadas para redução de qualquer tipo de risco ou desconforto inerente à pesquisa. Os resultados dessa investigação serão divulgados assegurando que nenhuma forma de identificação individual seja exposta.

6.6. Coleta de dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais

A coleta de dados do estudo ocorreu no período de novembro de 2012 a junho de 2014, e foi realizada através de preenchimento de questionário específico para cada paciente, abordando aspectos gerais, clínicos e laboratoriais (Anexos 3 e 4 respectivamente) durante a entrevista. Alguns dados imunoviológicos foram coletados através do Sistema de controle de exames laboratoriais (SISCEL), com a prévia autorização da coordenação do Lab. DIP.

6.7. Imunofenotipagem

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar os perfis de imunossenescência e exaustão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ circulantes, em um grupo de indivíduos com infecção crônica pelo HIV, atendidos no Centro de Treinamento e Referência em doenças infecciosas e parasitárias (CTR DIP) – Orestes Diniz. Analisamos de forma comparativa as subpopulações de linfócitos baseados no uso de marcadores de ativação e diferenciação celular (CD45RA, CCR7, CD27, CD28, CD62L, CD95/Fas), exaustão PD-1 e imunossenescência CD57 em PVHIV em comparação com pessoas sem esta infecção.

Os ensaios de imunofenotipagem foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante com pequenas modificações conforme descrito a seguir: em tubos de poliestireno 12x75 mm foram adicionadas quantidades pré-estabelecidas de anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície celular de interesse (acima descritos), marcados com os fluorocromos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeretrina (PE), Complexo Proteína Clorofila Peridina (PerCP) e alofocianina (APC) - BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Para cada combinação de anticorpos monoclonais prediluídos foram adicionadas alíquotas 50 µl de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, procedeu-se a lise dos eritrócitos, utilizando 0,45 mL de solução de lise comercial FACS *Lysing Solution*TM (*Becton, Dickinson and Company* - BD Biosciences - 2350 Qume Drive. San Jose, CA 95131 USA) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e então foram submetidas à centrifugação (400g, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados, duas vezes, com 4mL de tampão salino PBS (0,015M pH 7,4), empregando as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas, numa etapa final, foram acrescentados 300 µl de PBS. Foram adquiridos três mil eventos/tubo dentro do *gate* de linfócitos usando um citômetro de fluxo FACSCalibur® (*Becton Dickinson and company* - BD Biosciences - 2350 Qume Drive. San Jose, CA 95131 USA), utilizando o programa software Cell-QuestTM (Franklin Lakes, NJ, EUA) para aquisição e armazenamento dos dados e Flowjo® (Tree Star, San Carlos, Califórnia) para análise primária dos dados.

6.8. Variáveis estudadas

- Idade;
- Sexo;
- Tempo de diagnóstico;
- Contagem de linfócitos TCD4⁺: no tempo zero e 60 meses após.
- Carga viral do HIV;
- Porcentagem de linfócitos que expressam os marcadores CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas e PD1.

6.9. Cálculo da amostra

Devido à ausência de dados sobre a imunossenescência e exaustão de linfócitos em pessoas vivendo com HIV na nossa população e dados de estudos estrangeiros muito diversos em relação ao número de pacientes incluídos, optou-se por incluir amostra de conveniência de 80 pacientes.

6.10. Pesquisa bibliográfica

O levantamento bibliográfico foi feito a partir da base de dados MEDLINE Interface PubMed e do Google acadêmico. A pesquisa foi limitada à literatura de línguas portuguesa, inglesa e espanhola. Inicialmente foram estabelecidos os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) ou Medical Subjects Headings (MeSH terms). O acesso aos descritores foi realizado através de Consulta ao DeCS da Biblioteca Virtual em Saúde [<http://decs.bvs.br/>]. Foram utilizados os seguintes termos e palavras chaves: HIV/AIDS, ativação imunológica, ativação celular, imunossenescência, envelhecimento prematuro, esgotamento imunológico, exaustão imune, imunofenotipagem, citometria de fluxo, diferenciação de células T, caracterização de células T, células T CD4⁺, células T CD8⁺, CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas e PD1.

As citações no texto foram indicadas pelo sistema autor/data e as referências bibliográficas foram organizadas em ordem alfabética, de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

6.11. Análise estatística

O banco de dados foi feito no software Excel 2010 de Microsoft Office e posteriormente esses dados foram importados ao software *GraphPad Prism, version 7.0* (*GraphPad Software, Inc. 7825. Fay Avenue, Suite 230 La Jolla, CA 92037 USA*) para a correspondente análise.

A análise das variáveis qualitativas foi avaliada através da distribuição de frequência absoluta e relativa, enquanto que as variáveis quantitativas foram analisadas com base nas medidas de tendência central e medidas de dispersão mais apropriadas para a distribuição dos dados. Para testar a normalidade da distribuição dos dados numéricos, foram usados os testes D'Agostino-Pearson e Kolmogorov-Smirnov. Para variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada a análises através do teste One Way ANOVA e para variáveis com distribuição não normal foi empregado o teste Kruskall Wallis.

A correlação dos valores de LTCD4⁺ com os perfis de imunossenescência e exaustão foi avaliada através dos testes de correlação de Spearman ou Pearson de acordo com a distribuição dos dados.

Para todos os testes, foi considerado como nível de significância estatística as variáveis que tiveram o valor de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Características demográficas e dados laboratoriais da coorte

Para a realização deste trabalho foram incluídos 66 participantes, 46 PVHIV e 20 pessoas com sorologia negativa para o HIV. Ao serem analisadas as características gerais dos participantes, observou-se que a coorte esteve composta pela mesma quantidade de homens e mulheres. No entanto quando a frequência de sexo foi separada segundo o status sorológico, observou-se que no grupo de PVHIV houve um predomínio de homens (60,87%). Nas PVHIV a média de idade foi de 43 anos, com desvio padrão de 8 anos e mínima e máxima de 23 e 56 anos, respetivamente. Já no grupo controle a média de idade foi de 37 anos, com desvio padrão de 9 anos e mínima e máxima de 20 e 56 anos, a pesar de que o grupo controle era um pouco mais jovem, quando realizada a comparação entre as idades dos grupos não foram observadas diferenças estatisticamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Características demográficas e dados laboratoriais

Sexo	HIV negativo n=20	Progressores lentos n=6	Replicação ativa n=20	TARV com sucesso n=20
Masculino	5 (25%)	5 (83,3%)	9 (45%)	14 (70%)
Feminino	15 (75%)	1 (16,7%)	11 (55%)	6 (30%)
Média de idade	37 (20-56)	44.33 (37-55)	43 (23-56)	43 (25-54)
Média de anos de diagnostico	N/A	12 (5-21)*	9 (0-24)	9 (1-23)
Media de CV copias/ml	N/A	742	37,625	46
Média de CD4%	41,9 (29,2 - 53,9)*	31.68 (21,3 - 39,2)	17.80 (3,8 - 34,8)	23.93 (7,3 - 39,9)
Média de CD8%	29,1 (13,3 - 43,3)*	44.71 (31,1 - 58,7)	50.43 (0,39 - 75,8)	48.80 (30,8 - 68,2)

*Intervalo

A grande maioria das PVHIV estavam em uso de TARV, sendo que 58,8% pertenciam ao grupo de TARV com sucesso e os 41,2% restante ao grupo de replicação ativa. O esquema mais empregado foi a combinação de Zidovudina,

Lamivudina e Efavirenz (AZT+3TC+EFZ) usado por 23,5% dos pacientes, seguido pela associação de Zidovudina, Lamivudina e Nevirapina (AZT+3TC+NVP) e Tenofovir, Lamivudina, Atazanvir e Ritonavir com 14,7% cada um (Tabela 2).

Tabela 2 –Esquemas antirretrovirais usados pelas PVHIV

	Replicação ativa	TARV com sucesso
AZT + 3TC + ATV/r	0	1
AZT + 3TC + EFZ	2	6
AZT + 3TC + LPV/r	2	0
AZT + 3TC + NVP	2	3
TDF + 3TC + ATV/r	4	1
TDF + 3TC + ATV/r + RAL	1	0
TDF + 3TC + DRV/r + RAL	0	2
TDF + 3TC + EFZ	1	2
TDF + 3TC + FPV/r	0	1
TDF + 3TC + LPV/r	1	3
TDF + 3TC + NVP	1	1
TOTAL	14	20

7.2. Imunofenotipagem

Inicialmente serão apresentados os resultados nos quais as células foram caracterizadas de acordo com os perfis imunofenotípicos em: células *naïve*, células de memória efetora e/ou células altamente diferenciadas. Estes resultados serão descritos considerando as análises nas subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e linfócitos totais.

Em seguida serão apresentadas as análises de intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores fenotípicos avaliados e, por fim, as análises de correlação entre os perfis fenotípicos observados e os valores percentuais e absolutos de células TCD4, na época dos testes, e sessenta meses após.

Para a apresentação dos dados, os diferentes grupos avaliados: HIV negativo, Progressores-lentos, Replicação ativa e TARV, serão expressos como N, PL, RA e TARV, respectivamente, e as diferenças estatisticamente significativas serão identificadas nas figuras pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” em comparação com N, PL, RA e TARV, respectivamente.

7.2.1. Células *naïve*

As análises dos dados demonstraram uma diminuição de células *naïve* em todos os grupos PVHIV, embora diferenças estatisticamente significativas tenham sido observadas, mais frequentemente, no grupo RA.

Os perfis fenotípicos utilizados para caracterizar este estágio de maturação celular estão descritos a seguir.

7.2.1.1. Perfis fenotípicos CD45RA⁺ e CD62L⁺

Uma queda na frequência de células CD45RA⁺CD62L⁺ é observada no grupo RA, em linfócitos CD4⁺ (mediana em %: N = 41; PL = 35,8; RA = 21,7 e TARV = 34,25) (Figura 2A) e em linfócitos CD8⁺ (mediana em %: N = 38,45; PL = 20,1; RA = 15,6 e TARV = 26) (Figura 2B).

Quando considerados os **linfócitos totais**, este achado foi corroborado para o marcador CD45RA⁺, demonstrado pela queda na frequência destas células nos grupos RA e TARV (mediana em %: N = 19,5; NP= 10,3; RA = 5,38 e TARV = 10,3) (Figura 2C).

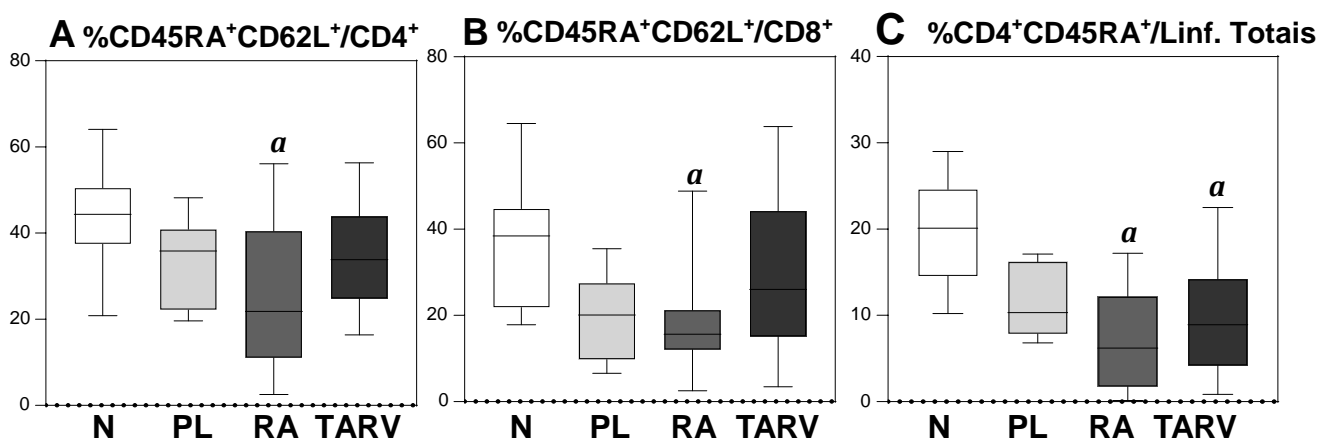


Figura 3. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA⁺ e CD62L⁺ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra "a" em comparação com o grupo N.

7.2.1.2. Perfis fenotípicos CCR7⁺ e CD62L⁺

Foi avaliada a frequência dos marcadores CCR7 e CD62L em linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos totais. Os dados demonstraram uma diminuição de células CCR7⁺CD62L⁺/CD4⁺ nos grupos RA e TARV (mediana em %: N = 59,15; PL = 40,1;

RA = 30,1 e TARV = 44,8) (Figura 3A) e **CCR7⁺CD62L⁺/CD8⁺** no grupo RA (mediana em %: N = 20,95; PL = 11,05; RA = 6,62 e TARV = 16,4) (Figura 3B).

Não foram observadas alterações significativas na análise destes marcadores em linfócitos totais.

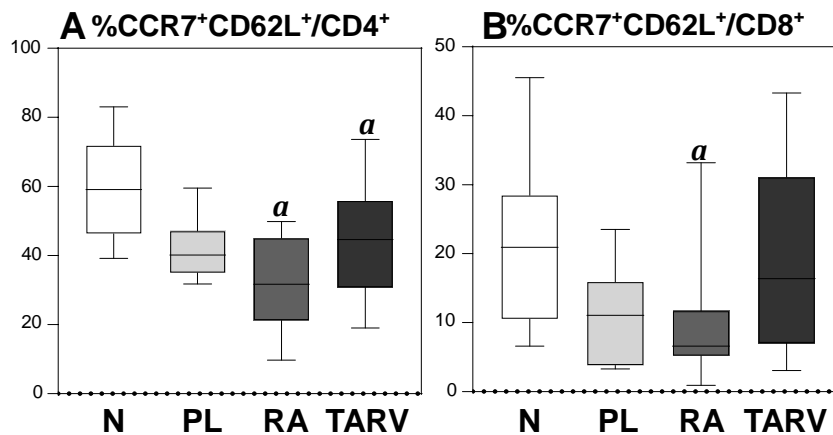


Figura 4. Frequência dos marcadores fenotípicos CCR7⁺ e CD62L⁺ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.1.3. Perfil fenotípico CD45RA⁺ e CD28⁺

Foi observada uma diminuição do fenótipo **CD45RA⁺CD28⁺** no grupo RA em células **CD8⁺** (media na em %: N = 28,7; PL = 14; RA = 16,15 e TARV= 27) (Figura 4). Excepcionalmente, foi realizada a marcação deste perfil somente em células CD8.

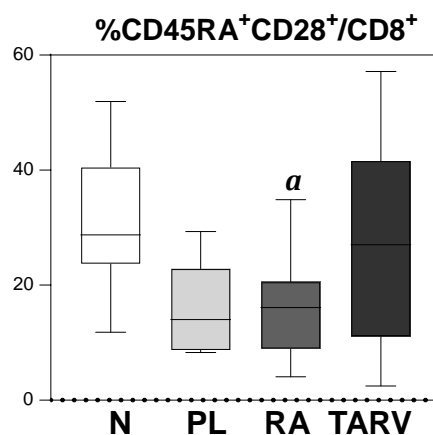


Figura 5. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA⁺ e CD28⁺ em linfócitos CD8⁺. A diferença significativa está identificada, na figura, pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.1.4. Perfis fenotípicos CD27⁺ e PD-1⁻

Quando analisada a frequência de células **CD27⁺PD-1⁻** foi evidenciada uma diminuição deste fenótipo em linfócitos **CD8⁺** nos grupos **LP** e **RA** (mediana em %: N= 56,6; PL = 28,35; RA = 33,7 e TARV = 44,5) (Figura 5B). Por outro lado, quando analisada a sua frequência em linfócitos **CD4⁺** não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas (Figura 5A). O mesmo foi observado na análise dos linfócitos totais.

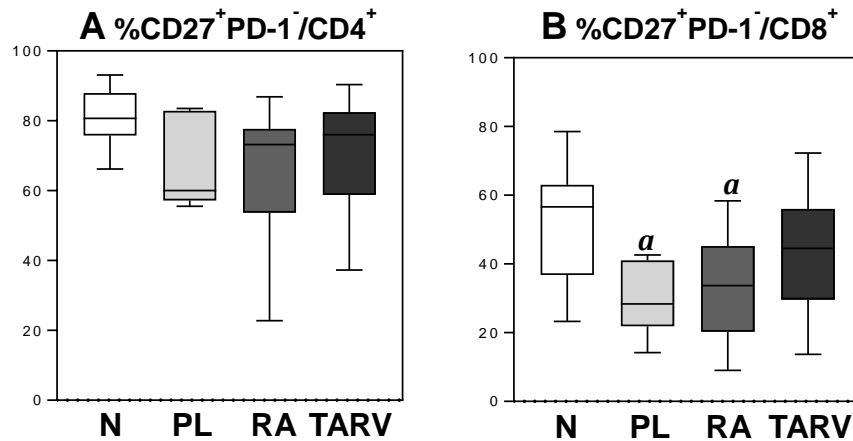


Figura 6. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27⁺ e PD-1⁻ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.1.5. Perfis fenotípicos CD28⁺ e CD57⁻

Uma queda na frequência de células **CD28⁺CD57⁻** é observada no grupo **RA**, em linfócitos **CD4⁺** (mediana em %: N = 87,4; PL = 83,5; RA = 44,4 e TARV = 69,3) (Figura 6A) e em linfócitos **CD8⁺** (mediana em %: N = 52,15; PL = 33,15; RA = 28,3 e TARV = 43,8) (Figura 6B).

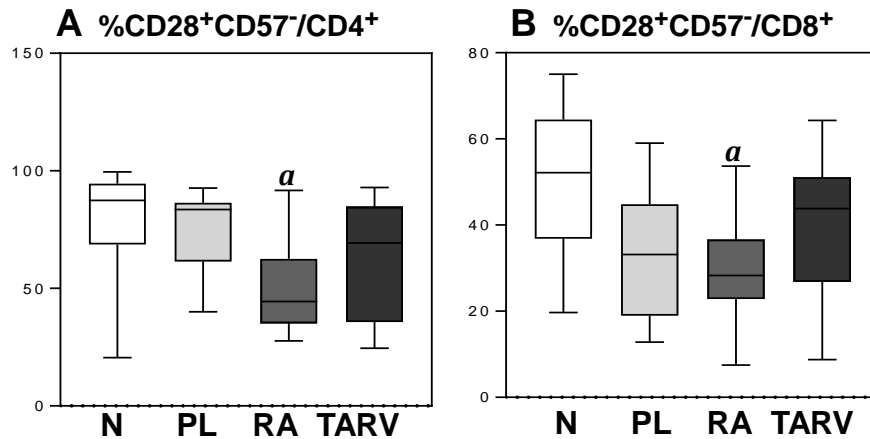


Figura 7. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28⁺ e CD57⁻ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.1.6. Perfis fenotípicos CD28⁺ e CD95⁻

Foi observada uma diminuição acentuada da frequência de **CD28⁺CD95⁻** no grupo **RA** quando comparado com os demais grupos, tanto em linfócitos **CD4⁺** (mediana em %: N = 38,7; PL = 36,8; RA = 12 e TARV = 27,5) (Figura 7A), quanto em linfócitos **CD8⁺** (mediana em %: N = 24,7; PL = 9,3; RA = 11,3 e TARV = 13,6) (Figura 7B).

De forma semelhante foi observada uma queda na frequência do marcador **CD95⁻** nos grupos **RA** e **TARV**, quando foram analisados os **linfócitos totais** (mediana em %: N = 17,9; PL = 13,13; RA = 6,35 e TARV = 9,63) (Figura 7C).

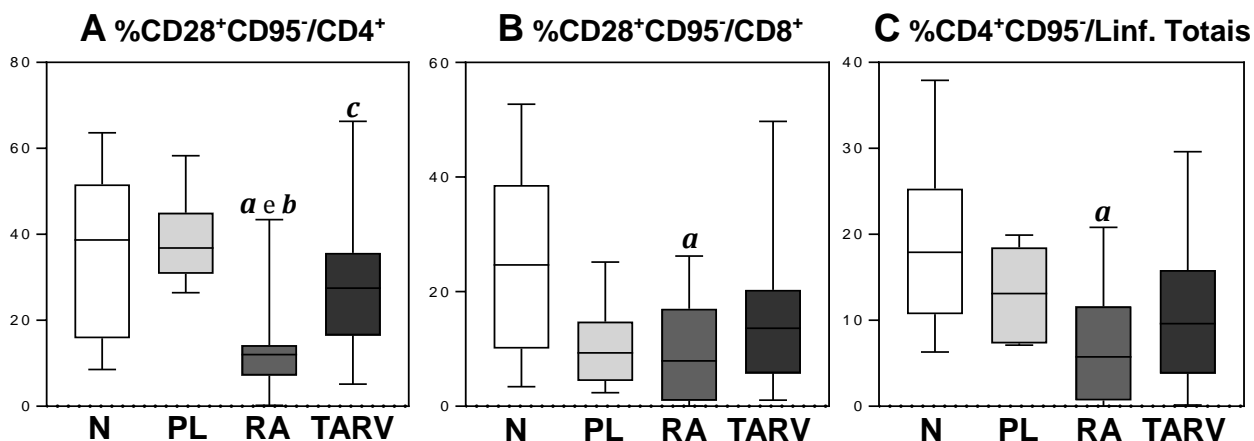


Figura 8. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28⁺ e CD95⁻ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pelas letras “a” e “b” em comparação com os grupo N e PL, respectivamente.

Resumindo, observamos que no grupo de PVHIV, a frequência de células *naïve* mostrou-se diminuída tanto no subtipo de linfócitos CD4⁺ quanto no subtipo de linfócitos CD8⁺. Porém, esta diminuição foi muito mais significativa no grupo de indivíduos que apresentam replicação ativa.

7.2.2. Células de memória efetora e/ou terminalmente diferenciadas

Quando analisamos os perfis células de memória efetoras e/ou terminais observamos um aumento destas células em todos os grupos de PVHIV, embora diferenças significativas tenham sido observadas, mais frequentemente, no grupo de replicação ativa.

7.2.2.1. Perfis fenotípicos CD45RA⁻ e CD28⁻.

Um aumento na frequência de células **CD45RA⁻CD28⁻** é observada nos grupos **PL, RA e TARV** quando foram analisados nos linfócitos **CD8⁺** (mediana em %: N = 11; PL = 25,1; RA = 34,7 e TARV = 24,9) (Figura 8A). Nos **linfócitos totais**, este achado foi semelhante para o perfil **CD28⁻**, evidenciado pelo aumento da frequência deste fenótipo nos grupos **PL, RA e TARV** (mediana em %: N = 11; PL = 25,1; RA = 34,7 e TARV = 24,9) (Figura 8B). No entanto, não foi possível avaliar este perfil em linfócitos CD4⁺, pois não foi realizada a marcação destes fenótipos nestas células.

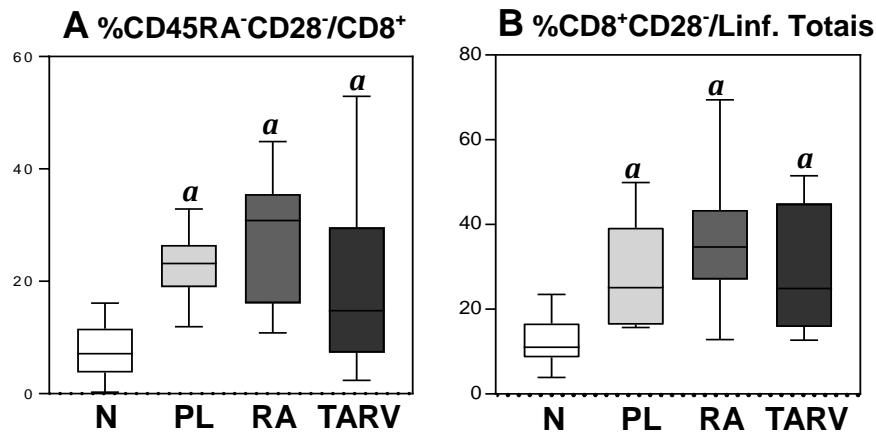


Figura 9. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA⁻ e CD28⁻ em linfócitos CD8⁺, (A) e linfócitos totais (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.2. Perfis fenotípicos CD28⁻ e CD57⁻

No compartimento de células CD4⁺ foi observado um aumento da frequência de CD28⁻CD57⁻ no grupo RA, quando comparado com os grupos N e PL (mediana em %: N = 1,6; PL = 6,2; RA = 41,3 e TARV = 11,8) (Figura 9A). Já na população de células CD8⁺ (Figura 9B) e nos linfócitos totais, não foram notadas mudanças estatisticamente significativas.

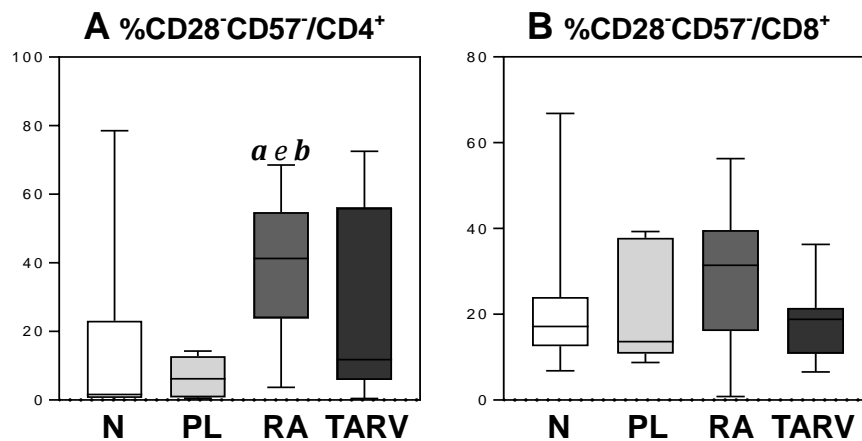


Figura 10. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28⁻ e CD57⁻ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pelas letras “a” e “b” em comparação com os grupos N e PL, respectivamente.

7.2.2.3. Perfis fenotípicos CD28⁻ e CD57⁺

Quando analisado o fenótipo CD28⁻CD57⁺ nos compartimentos de linfócitos CD4⁺ não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Porém, quando foram estudadas as células CD8⁺, observou-se diferença significativa. No entanto, após tratamento estatístico estas alterações não se mostraram significantes (Figuras 10A e 10B, respetivamente).

Já na análise de **linfócitos totais** evidenciou-se um aumento da percentagem de CD57⁺ em todos os grupos de PVHIV (mediana em %: N = 20,4; PL = 21,8; RA = 32,3 e TARV = 28,3) (Figura 10C).

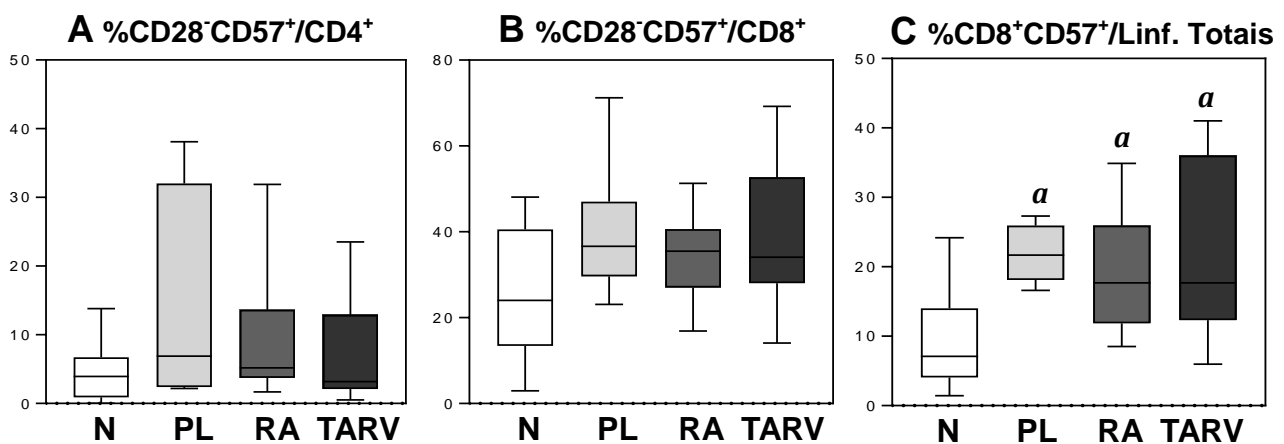


Figura 11. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28⁻ e CD57⁺ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.4. Perfil fenotípico CD28⁻ e CCR7⁻.

A frequência das células CD28⁻CCR7⁻ mostrou-se aumentada no grupo RA, no compartimento de linfócitos CD8⁺ (mediana em %: N = 36,5; PL = 57,65; RA = 62,6 e TARV = 48,3) (Figura 11). No entanto, não foi possível avaliar este perfil em linfócitos CD4⁺, pois não foi realizada a marcação destes fenótipos nestas células.

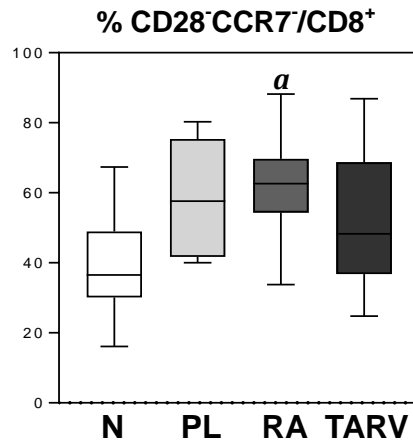


Figura 12. Frequência dos marcadores fenotípicos **CD28⁻** e **CCR7⁻** em linfócitos **CD8⁺** A diferença significativa está identificada na figura pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.5. Perfis fenotípicos **CCR7⁻** e **CD62L⁻**

Em ambos os compartimentos **CD4⁺** e **CD8⁺**, foi observado um aumento do fenótipo **CCR7⁻CD62L⁻** no grupo **RA** quando comparado ao grupo N (mediana em %: N = 15,55; PL = 20,4; RA = 25,2 e TARV = 18,6) (Figura 12A); (mediana em %: N = 49,85; PL = 66,1; RA = 70,4 e TARV = 53,5) (Figura 12B), respectivamente. Não foram observadas alterações significativas quando o perfil **CD28⁻CCR7⁻** foi avaliado em linfócitos totais.

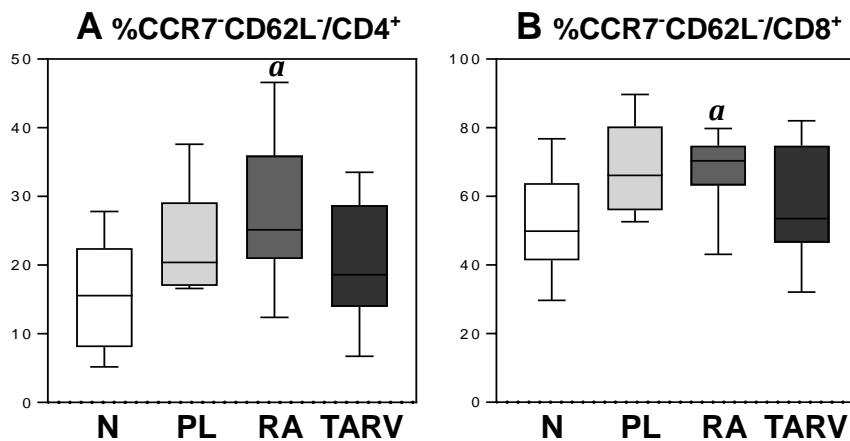


Figura 13. Frequência dos marcadores fenotípicos **CCR7⁻** e **CD62L⁻** em linfócitos **CD4⁺** (A) e linfócitos **CD8⁺** (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.6. Perfis fenotípicos CD45RA⁻ e CD62L⁻

Um aumento da porcentagem de linfócitos CD45RA⁻CD62L⁻, no grupo RA, foi observado tanto no compartimento de linfócitos CD4⁺ (mediana em %: N = 19,9; PL = 22,1 ; RA = 28,8 e TARV = 20,7) (Figura 13A) quanto no compartimento de linfócitos CD8⁺ (mediana em %: N = 22,45 ; PL = 30,9 ; RA = 38,15 e TARV = 27) (Figura 13B). Não foram observadas alterações significativas quando o perfil CD45RA⁻CD62L⁻ foi avaliado em linfócitos totais.

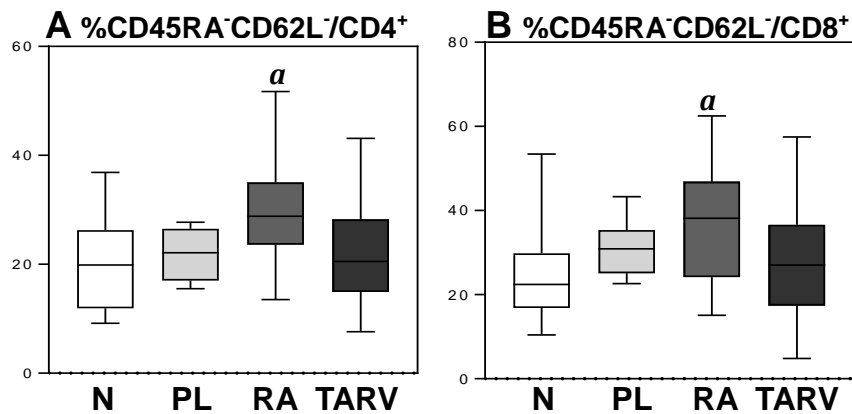


Figura 14. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA⁻ e CD62L⁻ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.7. Perfis fenotípicos CD45RA e CCR7⁻

Um aumento na porcentagem de CD45RA⁻CCR7⁻ foi evidenciado no compartimento de células CD8⁺, no grupo RA (mediana em %: N = 24,5; PL= 38,3; RA = 42,5 e TARV = 35) (Figura 14B). Enquanto que na subpopulação de células CD4⁺ e nos linfócitos totais não foram observadas alterações estatisticamente significativas.

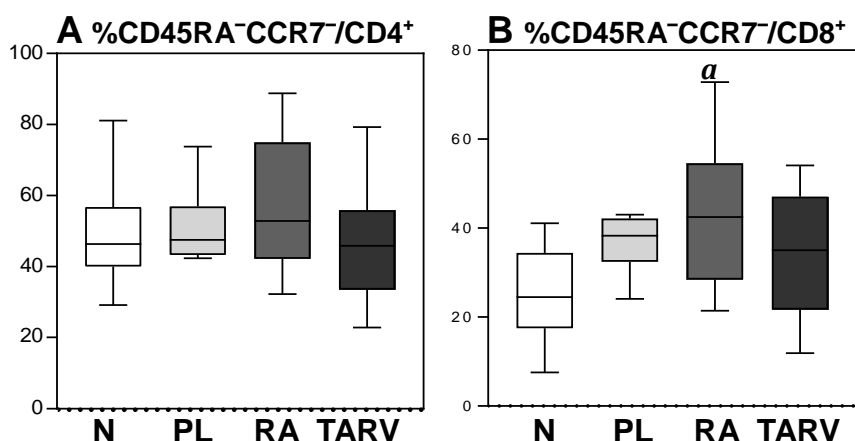


Figura 15. Frequência dos marcadores fenotípicos CD45RA⁻ e CCR7⁺ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B). A diferença significativa está identificada na figura pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.8. Perfis fenotípicos CD27⁺ e CD28⁻

Foi evidenciando um aumento da porcentagem de células **CD27⁺CD28⁻**, no grupo **RA**, tanto no compartimento de linfócitos **CD4⁺** quanto no compartimento de linfócitos **CD8⁺**, sendo que em CD4⁺ este aumento foi observado quando comparado aos grupos N e PL (mediana em %: N = 1,79; PL = 4,54; RA = 25,6 e TARV = 3,14) (Figura 15A) e, em CD8⁺, quando comparado aos grupos N e TARV (mediana em %: N = 8,28; PL = 16; RA = 26,9 e TARV = 10,3) (Figura 15B). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas análises em linfócitos totais.

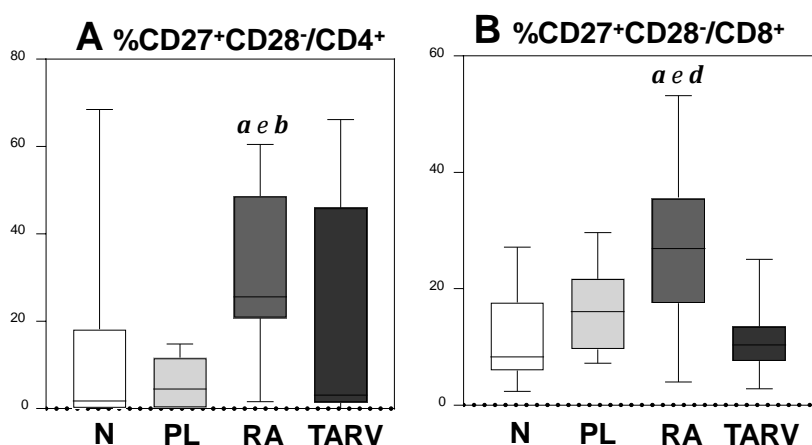


Figura 16. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27⁺ e CD28⁻ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pelas letras “a”, “b” e “d” em comparação com os grupos N, PL e TARV, respectivamente.

7.2.2.9. Perfis fenotípicos CD27⁻ e CD28⁻

No compartimento de células **CD4⁺** foi observado um aumento do fenótipo **CD27⁻CD28⁻**, no grupo **RA** (mediana em %: N = 2,38; PL = 3,45; RA = 10,9 e TARV = 6,07) (Figura 16A). Porém, quando foi analisada a frequência deste fenótipo em células **CD8⁺**, não foram notadas alterações estatisticamente significativas (Figura 16B).

Em **linfócitos totais**, observa-se um aumento na frequência de células **CD27⁻** nos grupos **RA** e **TARV** (mediana em %: N = 9,25; PL = 20,65; RA = 21,7 e TARV = 24,6) (Figura 16C).

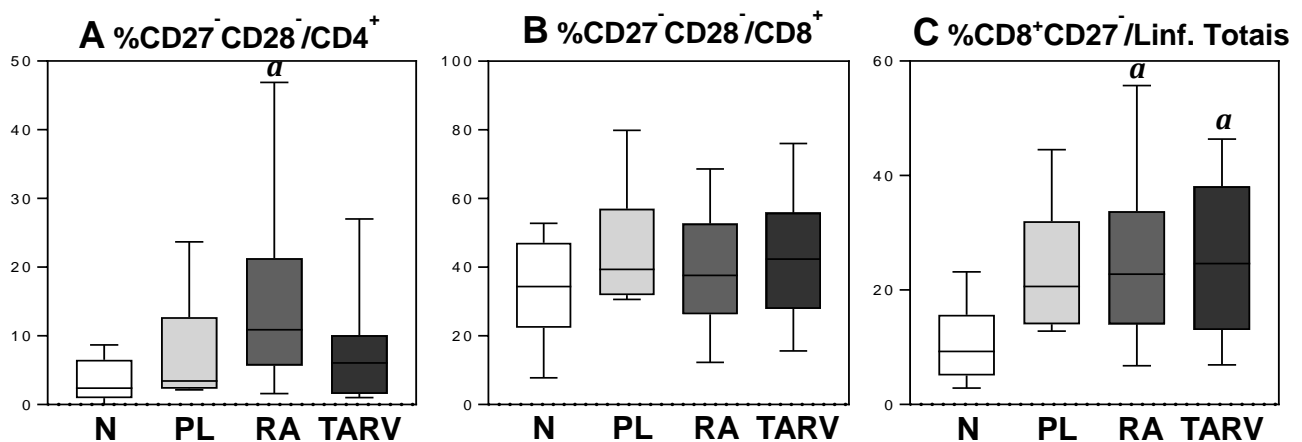


Figura 17. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27⁻ e CD28⁻ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.10. Perfis fenotípicos CD27⁻ e CD95⁺

Na subpopulação de linfócitos **CD4⁺** é observado um aumento da frequência de células **CD27⁻CD95⁺**, no grupo **RA** (mediana em %: N = 2,38; PL = 3,45; RA = 10,9 e TARV = 6,07) (Figura 17A). Já no compartimento de linfócitos **CD8⁺** este aumento foi observado, porém, foi estatisticamente significativo somente no grupo **TARV** (mediana em %: N = 18,9; PL = 43,35; RA = 41,4 e TARV = 41,09) (Figura 17B).

Em **linfócitos totais** foi evidenciado um aumento da frequência de células **CD95⁺** em todos os grupos de PVHIV (mediana em %: N = 16,9; PL = 39,8; RA = 50,7 e TARV = 40,5) (Figura 17C).

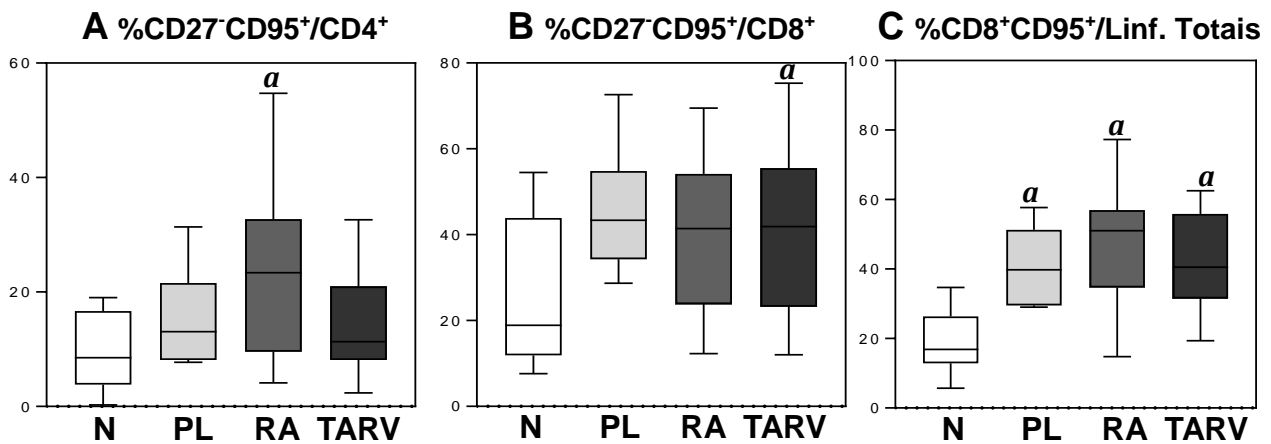


Figura 18. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27⁻ e CD95⁺ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

7.2.2.11. Perfis fenotípicos CD28⁻ CD95⁺

Um aumento na frequência de células **CD28⁻CD95⁺** foi evidenciado em linfócitos **CD4⁺**, no grupo **RA**, quando comparado aos grupos N e TARV (mediana em %: N = 4,47; PL = 5,33; RA = 17,65 e TARV= 5,53) (Figura 18A). Quando foram analisados os linfócitos **CD8⁺**, este resultado foi reproduzido. Porém, neste compartimento, foi observando um aumento de células **CD28⁻CD95⁺** nos grupos **RA** e **PL**, quando comparado ao grupo N (mediana em %: N = 25,6; PL = 56; RA = 61,2 e TARV = 48,5) (Figura 18B). Não foram observadas alterações significativas nas análises em linfócitos totais.

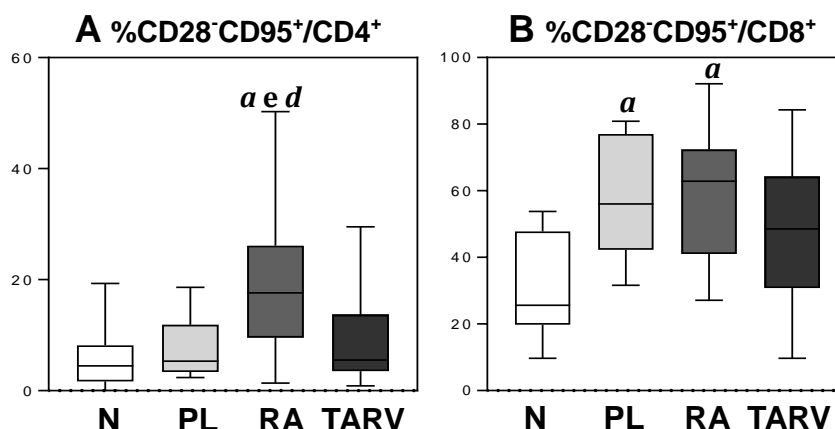


Figura 19. Frequência dos marcadores fenotípicos CD28⁻ e CD95⁺ em linfócitos CD4⁺ (A) e linfócitos CD8⁺ (B) As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pelas letras “a” e “d” em comparação com os grupos N e TARV, respectivamente.

7.2.2.12. Perfis fenotípicos CD27⁺ e PD-1⁺

A frequência das células **CD27⁺PD-1⁺** mostrou-se aumentada no compartimento de linfócitos **CD8⁺**, no grupo **PL** e **RA** (mediana em %: N = 2,03; PL= 10,25; RA = 7,56 e TARV = 3,41) (Figura 19B). Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em linfócitos **CD4⁺** (Figura 19A).

Quando foram analisados os **linfócitos totais**, foi demonstrado um aumento da expressão de **PD-1⁺** em todos os grupos de PVHIV (mediana em %: N = 4,1; PL = 11,45; RA = 15,7 e TARV = 7,1) (Figura 19C).

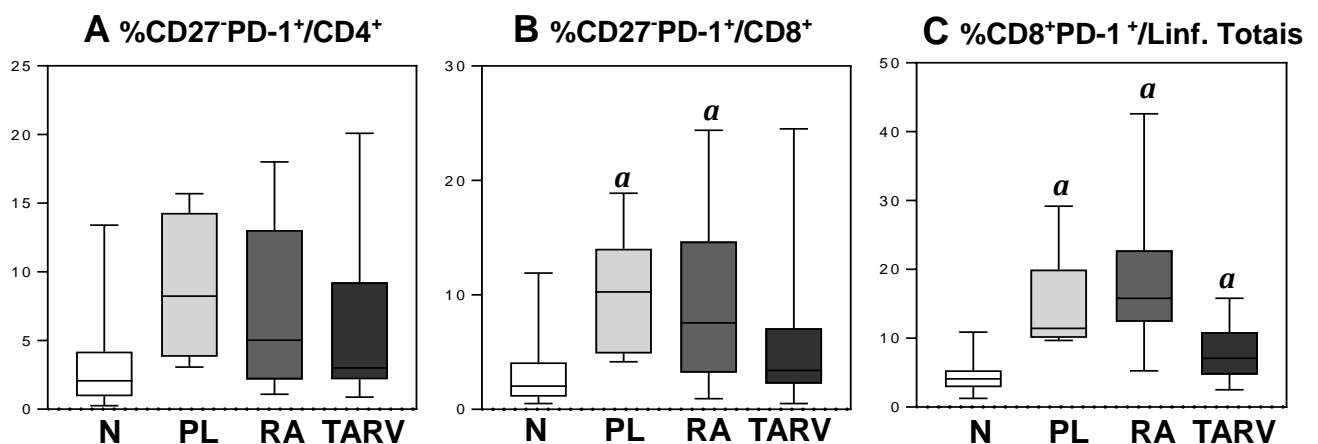


Figura 20. Frequência dos marcadores fenotípicos CD27⁺ e PD-1⁺ em linfócitos CD4⁺ (A), linfócitos CD8⁺ (B) e linfócitos totais (C). As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com o grupo N.

Em síntese, nos grupos de PVHIV, a frequência de células de memória efetora e/ou terminalmente diferenciadas mostrou-se aumentada nos compartimentos de células CD4⁺ e CD8⁺, embora mais frequentemente, nos linfócitos CD8⁺. Este aumento foi observado para muitos fenótipos, também, em linfócitos totais. Porém, as alterações mais acentuadas foram demonstradas no grupo RA.

7.3. Intensidade média de fluorescência

Os marcadores fenotípicos também foram avaliados em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) e os fenótipos nos quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas serão mostrados a seguir.

A expressão dos marcadores **CD62L** e **CD45RA** mostrou-se estatisticamente diminuída no grupo **RA**, sendo que **CD62L** mostrou-se diminuído, tanto em linfócitos **CD4⁺** (mediana em %: N = 60; PL = 48,35; RA = 42,30 e TARV = 52,35) (Figura 21A), quanto em linfócitos **CD8⁺** (mediana em %: N = 37,25; PL = 21,6; RA = 19,9 e TARV = 24,5) (Figura 21B); e **CD45RA** só no compartimento de linfócitos **CD8⁺** (mediana em %: N = 182; PL = 130; RA = 104 e TARV = 123) (Figura 21D).

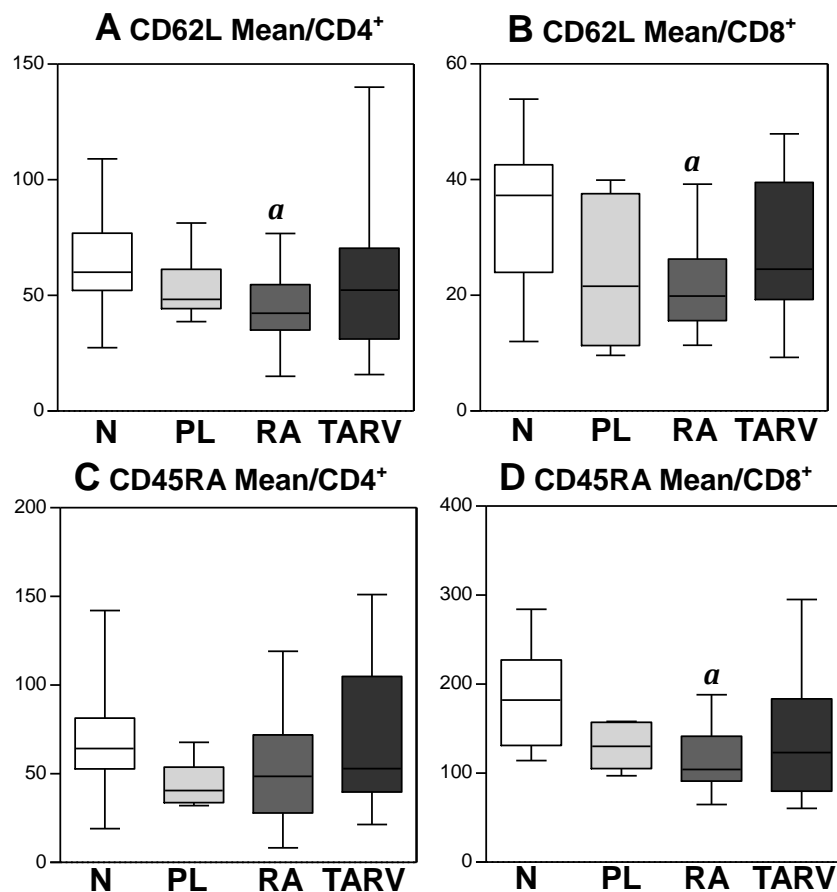


Figura 21. Expressão dos marcadores de superfície celular CD62L e CD45RA em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. (A) Expressão de CD62L em linfócitos CD4⁺. (B) Expressão de CD62L em linfócitos CD8⁺. (C) Expressão de CD45RA em linfócitos CD4⁺. (D) Expressão de CD45RA em linfócitos CD8⁺. As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pela letra “a” em comparação com os grupos N.

Por outro lado, nas células **CD4⁺** ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência dos marcadores **CD95** e **PD-1**, no grupo **RA** (medianas em %: N = 98,2; PL = 123; RA = 172 e TARV = 146, e N = 6,93; PL = 8,26; RA = 10,55 e TARV = 10,24, respectivamente) (Figuras 20A e 20C, respectivamente). Já na subpopulação de linfócitos **CD8⁺**, notamos uma maior expressão de **CD95**, nos grupos **PL, RA** e **TARV** (mediana em %: N = 52,60; PL = 86,05; RA = 82,70 e TARV = 75,70) (Figura 20B) e do marcador **PD-1**, no grupo **RA** quando comparado aos grupos **N** e **TARV** (mediana em %: N = 6,2; PL = 12,4; RA = 16,35 e TARV = 7,92) (Figura 20D).

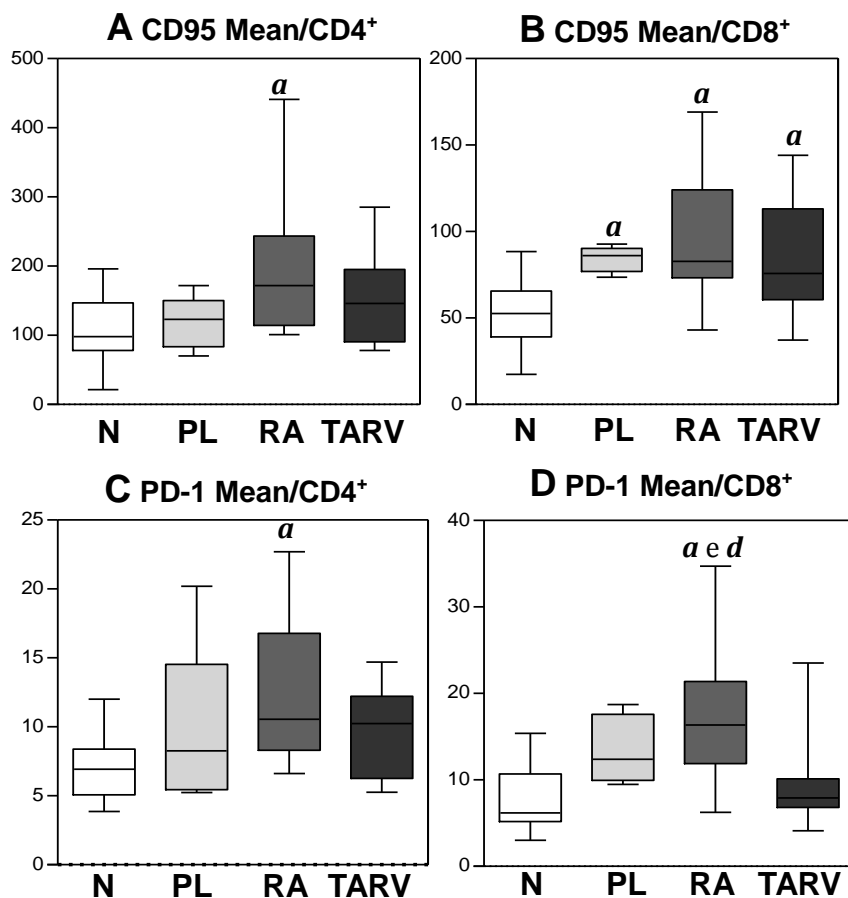


Figura 22. A expressão de CD95 e PD-1 em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi analisada por meio da intensidade média de fluorescência. (A) Expressão de CD95 em linfócitos CD4⁺. (B) Expressão de CD95 em linfócitos CD8⁺. (C) Expressão de PD-1 em linfócitos CD4⁺. (D) Expressão de PD-1 em linfócitos CD8⁺. As diferenças significativas estão identificadas nas figuras pelas letras “a” e “d” em comparação com os grupos N e TARV.

7.4. Análise de correlação

Baseados nos resultados obtidos na imunofenotipagem, foi conduzida a análise de correlação, para verificar se os perfis observados apresentavam alguma relação com os valores percentuais e absolutos de linfócitos TCD4, na época do estudo (tempo zero) e 60 meses após.

Os nossos achados nos permitiram evidenciar uma relação inversamente proporcional entre os perfis de imunossenescência e a percentagem de linfócitos T CD4⁺, no tempo zero e 60 meses após (Tabela 3). Em relação aos valores absolutos de células CD4⁺, somente os fenótipos CCR7⁻CD62L⁻/CD4⁺ e CD45RA⁻CD62L⁻/CD4⁺ demonstraram relação estatisticamente significativa, apresentando de forma semelhante correlação negativa (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre os perfis de senescência e os valores de LTCD4% e CD4 células/ μ L no tempo zero e 60 meses após.

Perfil	CD4% no tempo zero		CD4% após 60 meses	
	Coefficiente de correlação	Valor de p	Coefficiente de correlação	Valor de p
CD28 ⁻ CD95 ⁺ /CD4 ⁺	$r = -0,55$	$p = 0,0003$	$r = -0,43$	$p = 0,0027$
CD28 ⁻ CD95 ⁺ /CD8 ⁺	$r = -0,48$	$p = 0,0022$	$r = -0,42$	$p = 0,0094$
CCR7 ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	$r = -0,53$	$p = 0,0004$	$r = -0,53$	$p = 0,0004$
CCR7 ⁻ CD62L ⁻ /CD8 ⁺	$r = -0,51$	$p = 0,0010$	$r = -0,38$	$p = 0,0195$
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	$r = -0,54$	$p = 0,0003$	$r = -0,53$	$p = 0,0004$
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ /CD8 ⁺	$r = -0,41$	$p = 0,0102$	$r = -0,41$	$p = 0,0112$
	CD4 cels/ μ L no tempo zero		CD4 cels/ μ L após 60 meses	
CCR7 ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	$r = -0,32$	$p = 0,0350$	$r = -0,36$	$p = 0,0215$
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	$r = -0,38$	$p = 0,0122$	$r = -0,41$	$p = 0,0080$

8. DISCUSSÃO

O presente estudo expande estudos iniciais que tem investigado a associação entre o HIV e o envelhecimento do sistema imune. Um elemento importante foi o uso de uma ampla variedade de marcadores de superfície celular que nos permitiram a identificação de diferentes fenótipos celulares relacionados ao estado de maturação das células, além da caracterização desses fenótipos em linfócitos CD4⁺ do sangue periférico, que tem sido pouco estudada. A imunossenescência dos linfócitos durante a infecção pelo HIV é fundamentada nos nossos achados que revelam que em indivíduos com infecção crônica pelo HIV existe uma diminuição de células *naïve* caracterizada pela baixa expressão de CD45RA⁺CD62L⁺; CCR7⁺CD62L⁺; CD28⁺CD57⁻; CD28⁺CD95⁻ em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, CD45RA⁺CD28⁺; CD27⁺PD-1⁻ em CD8 e de CD45RA⁺; PD-1⁻; CD95⁻ nos linfócitos totais.

A diminuição de células *naïve* CD28⁺CD57⁻ nos linfócitos de PVHIV está de acordo com o achado de Cao e colaboradores (CAO *et al.*, 2009) que evidenciaram uma diminuição de células CD28⁺CD57⁻ nos linfócitos T CD8⁺ em uma coorte de indivíduos progressores rápidos e não progressores. No nosso trabalho esse achado foi observado no compartimento de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em todos os grupos de PVHIV, embora estatisticamente significativo no grupo de replicação ativa.

Embora vários trabalhos relatam (MOJUMDAR *et al.*, 2012; BRETON *et al.*, 2013) uma diminuição de células *naïve* durante a infecção crônica pelo HIV, não especificam quais fenótipos celulares se acham diminuídos, dificultando dessa forma a comparação dos nossos resultados.

Além da diminuição de células *naïve*, outro fator que sustenta a ideia de que as PVHIV apresentam envelhecimento precoce, é o aumento ou acumulação de células efetoras e/ou terminalmente diferenciadas, fator esse que está presente durante o envelhecimento fisiológico do sistema imune.

No nosso estudo esse fato foi caracterizado pelo aumento de células efetoras em estádios intermediários de diferenciação; CD27⁺CD28⁻; CD45RA⁻CD62L⁻ em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, CD28⁻CD57⁻; CD45RA⁻CD28⁻; CD45RA⁻CCR7⁻ em linfócitos CD8⁺, e pelo incremento na frequência de células terminalmente diferenciadas; CCR7⁻CD62L⁻; CD27⁻CD28⁻; CD27⁻CD95⁺; CD28⁻CD95⁺ em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, CD28⁻CCR7⁻; CD27⁻PD-1⁺ em CD8⁺ e de CD27⁻; CD28⁻; CD57⁺; CD95⁺; PD-1⁺ nos linfócitos totais.

A imunossenescência tem sido frequentemente associada com a expressão aumentada de CD57 e com diminuição na expressão de CD28 nas subpopulações de células T. Por isto, avaliamos o nível de expressão destes marcadores em linfócitos CD4 e CD8. Os nossos achados demonstraram aumento estatisticamente significativo de CD57⁺ e CD28⁻ nos linfócitos totais de todos os grupos de PVHIV, embora significativo apenas no compartimento de células CD8⁺. Estes resultados são semelhantes aos reportados em diversos estudos (CHOREMI-PAPADOPOULOU, 2000; CAO *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011; MOJUMDAR *et al.*, 2012) e ao mesmo tempo diferem dos resultados observados por (PALMER *et al.*, 2005; TASSIOPOULOS *et al.*, 2012) quem acharam um aumento destes marcadores em linfócitos CD4.

Posterior às análises isoladas dos marcadores acima citados procedemos a estudar a sua marcação conjunta, já que estas células são em grande parte co-expressadas na superfície dos linfócitos T CD4 e CD8. Os resultados desta análise demonstraram que nos grupos de replicação ativa e TARV com sucesso ocorre aumento de células efectoras em um estágio intermediário de diferenciação CD28⁻CD57⁻/CD4⁺, embora este achado tenha sido estatisticamente significativo só no grupo de replicação ativa. Quando analisado o compartimento de linfócitos CD8, foi observado também aumento destas células no grupo de PVHIV, não entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Esses resultados são parcialmente semelhantes aos achados por CAO e colaboradores (CAO *et al.*, 2009), onde evidenciaram aumento ou acumulação de células CD28⁻CD57⁻, no entanto, este achado foi evidenciado só no compartimento de células CD8.

Por outro lado, foi observado aumento de células efectoras terminalmente diferenciadas CD28⁻CD57⁺ em células CD4 e CD8 em todos os grupos de PVHIV, porem, este aumento não foi estatisticamente significativo. O fato do nosso estudo contar com número amostral baixo pode ter influenciado na ausência ou falta de significância estatística entre os grupos. Apesar da falta de força estatística do nosso grupo de estudo, estes resultados são similares aos apresentados por (CAO *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011; BRETON *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014) que também observaram este aumento de células terminais.

O mecanismo relacionado com a perda acelerada de expressão de CD28 durante a infecção pelo HIV continua a ser elucidado. No entanto, a sua acumulação

durante a infecção pelo HIV pode ser um resultado combinado da diferenciação acelerada devido à estimulação antigênica persistente. Semelhantemente, a expressão aumentada de CD57⁺ define um subtipo de células de fase tardia derivadas de células CD57⁻, que foram submetidas a várias rodadas de divisões celulares, sendo considerado um marcador da história proliferativa que apresenta limitada capacidade proliferativa e maior resistência a apoptose, fatos que facilitam a sua acumulação (CAO *et al.*, 2009; FOCOSI *et al.*, 2010; STRIOGA, PASUKONIENE, CHARACIEJUS, 2011).

Em relação à marcação conjunta dos marcadores CD27 e CD28, no nosso grupo de estudo foi observado aumento das células CD27⁺CD28⁻ nos compartimentos de linfócitos CD4 e CD8, predominantemente no grupo de replicação ativa. Este fenótipo de células de memória efetora em estágio intermediário tem sido amplamente descrito como uma célula característica da infecção crônica pelo HIV. Segundo diversos estudos, a acumulação destas células nas PVHIV está relacionada a alterações no processo de maturação das células, que levaria à diferenciação menos efetiva e/ou acumulação dessas células (APPAY *et al.*; 2000; APPAY *et al.*, 2002a; YUE *et al.*, 2004; TUSSEY *et al.*, 2006; MOJUMDAR *et al.*, 2012), sendo esta uma provável estratégia patogênica do vírus que impediria estas células de alcançar funções efetoras completas, diminuindo conseqüentemente a efetividade do sistema imune para controlar a infecção. Cabe destacar que apesar da concordância com estudos anteriores, a maioria deles foram realizados após estimulação antigênica e, portanto os resultados são referentes a células CD4 e CD8 HIV-específicas.

Paralelo ao aumento de células CD27⁺CD28⁻ foi observado também aumento da expressão ou acumulação de células CD27⁻CD28⁻ em todos os grupos de PVHIV e em ambos os compartimentos de linfócitos, embora estas observações tenham sido estatisticamente significativas apenas no grupo RA e na subpopulação de células CD4. Estes dados coincidem com os reportados por Mojumdar e colaboradores (MOJUMDAR *et al.*, 2012), que observaram aumento de células terminalmente diferenciadas em uma coorte de indivíduos com infecção pelo HIV. A acumulação de células terminais no contexto da infecção pelo HIV é um marcador de disfunção do sistema imune e ao mesmo tempo uma característica do envelhecimento dos linfócitos, em vista de que estas células apresentam baixa capacidade funcional e proliferativa.

Além destes, a expressão de marcadores associados à via apoptótica CD95/Fas tem sido correlacionado a perfil fenotípico de senescência. Nesse sentido, no nosso trabalho foi observado um aumento na expressão de CD95 nos linfócitos totais em todos os grupos de PVHIV quando analisada a frequência celular e a intensidade média de fluorescência. Estes dados são similares aos encontrados por Harr e colaboradores e Mueller e colaboradores (HARR *et al.*, 1998; MUELLER *et al.*, 2001) os quais sugerem que este aumento pode estar relacionado com o compromisso na sobrevivência e diferenciação dos linfócitos.

Posterior à análise isolada do marcador de superfície celular CD95, foi avaliada a marcação conjunta de CD95/Fas e das moléculas coestimuladoras CD27 e CD28. O resultado desta análise demonstrou que nas PVHIV existe aumento do fenótipo CD27⁻CD95⁺ nos compartimentos de células CD4 e CD8, estatisticamente significativo no grupo RA, em CD4 e, no grupo TARV, em CD8. Por outro lado, foi observado também aumento da expressão de CD28⁻CD95⁺ no grupo RA em linfócitos CD4 e nos grupos RA e PL em linfócitos CD8. Isto demonstra que os linfócitos das PVHIV apresentam maior susceptibilidade a apoptoses, mas essa susceptibilidade pode variar dependendo do grau de viremia do indivíduo. Conseqüentemente essa maior predisposição das células à apoptoses levará o sistema imune a diminuir sua capacidade proliferativa e à conseqüente imunossenescência.

O marcador de morte programada PD-1 foi um dos primeiros receptores inibitórios associados à exaustão do sistema imune. No presente trabalho foi avaliada a sua expressão em linfócitos CD4 e CD8, observando um aumento deste marcador em todos os grupos de pessoas vivendo com HIV quando analisada a frequência das células e a intensidade média de fluorescência. Além do mais, foi observado aumento da frequência do fenótipo CD27⁻PD-1⁺ nos compartimentos de células CD4 e CD8, no grupo de PVHIV, embora só significativo nos grupos PL e RA nos linfócitos CD8. Estes resultados são semelhantes aos relatados em estudos prévios (DAY *et al.*, 2006; PETROVAS *et al.*, 2006; TRAUTMANN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; BRETON *et al.*, 2013), que mostram que no contexto da infecção pelo HIV existe aumento de PD-1. Esta alteração está relacionada com distúrbios na distribuição dos linfócitos o que resulta na acumulação de células disfuncionais que impedem a renovação de células funcionalmente competentes. Cabe destacar que as observações realizadas nos trabalhos acima citados foram

feitas em células T CD8 HIV-específicas e, os nossos resultados apesar de ter sido obtidos em análises *ex vivo*, confirmam ou corroboram esses achados.

Posteriormente foi avaliada a expressão dos marcadores CD45RA, CCR7 e CD62L, os resultados desta análise demonstraram um aumento dos fenótipos CCR7⁻CD62L⁻ em CD4⁺, CD45RA⁻CD62L⁻ em CD8⁺ e de CD45RA⁻CCR7⁻ em CD4⁺ e CD8⁺, em todos os grupos de PVHIV, embora estatisticamente significativo no grupo RA quando comparado ao grupo N. Estes dados coincidem com os reportados anteriormente por vários autores (CHAMPAGNE *et al.*, 2001; MUELLER *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2007; BRETON *et al.*, 2013) que também observaram aumento de células efetoras nos indivíduos com infecção crônica pelo HIV. Apesar das similitudes existem diferenças entre os estudos, que estão relacionadas ao uso conjunto de outros marcadores de superfície celular. Por exemplo, Breton e colaboradores (BRETON *et al.*, 2013), também observaram aumento de células CD45RA⁻CCR7⁻, porém, estas células também eram CD27⁻, elemento que não foi possível analisar no nosso estudo. Por outro lado, estes dados também são semelhantes aos evidenciados por Mueller e colaboradores (MUELLER *et al.*, 2001), que notaram aumento de células em estádios intermediários do processo de diferenciação CD45RA⁻CCR7⁻CD62L⁻. No entanto, por questões técnicas não podemos falar que são exatamente as mesmas células porque no nosso estudo não foi possível analisar a marcação conjunta dos três marcadores, mas apesar disso no nosso trabalho foram identificados três fenótipos compatíveis com o fenótipo identificado por eles. A perda de CD62L no contexto da infecção pelo HIV resultará em relativa ineficiência para a condução dessas células aos linfonodos onde o vírus está presente.

Analisados de forma conjunta, esses dados demonstram que PVHIV apresentam distúrbios no processo de maturação celular, que levam a acumulação de células efetoras em estádios intermediários a avançados do processo de diferenciação.

Apesar de que no nosso estudo foi feita análise *ex vivo* dos linfócitos CD4 e CD8, os nossos achados corroboram resultados de estudos anteriores. Estes estudos demonstraram que durante a infecção pelo HIV o sistema imune apresenta mudanças funcionais e fenotípicas, que em parte podem ser decorrentes do processo acelerado de diferenciação impulsionado pela estimulação antigênica, ativação e inflamação crônica, e que podem eventualmente levar a esgotamento do

sistema imune. Por outro lado, o acúmulo de células efetoras e terminalmente diferenciadas ocasiona diminuição de células em estádios iniciais de diferenciação e subpopulações mais funcionais, devido ao processo de regulação homeostático do sistema imune.

Posterior à análise de frequência e expressão dos marcadores de imunossenescência e exaustão dos linfócitos utilizados neste estudo, foi realizada correlação dos perfis característicos de imunossenescência com os valores absolutos e percentuais de LTCD4⁺. Os nossos achados nos permitiram evidenciar uma relação inversamente proporcional entre os perfis de imunossenescência e a percentagem de LTCD4⁺, no tempo zero e 60 meses após. Em relação aos valores absolutos de células CD4⁺ com os perfis, somente os perfis CCR7⁻CD62L⁻/CD4⁺ e CD45RA⁻CD62L⁻/CD4⁺ demonstraram correlação estatisticamente significativa, apresentando de forma semelhante uma relação negativa. Estes resultados são similares aos reportados em alguns estudos que têm correlacionado a expressão de fenótipos característicos do envelhecimento imune com os valores de LTCD4⁺ e a carga viral plasmática (MOJUMDAR *et al.*, 2012; DAY *et al.*, 2006). Esta observação fundamenta o papel prejudicial dessas células no contexto da infecção pelo HIV.

9. CONCLUSÕES

- Perfis imunofenotípicos relacionados a imunossenescência se mostraram aumentados no grupo de pessoas vivendo com HIV (PVHIV), predominantemente no grupo RA;
- Os pacientes progressores lentos apresentaram perfis relacionados a senescência de forma exclusiva no compartimento de células CD8;
- As alterações imunofenotípicas observadas nos grupos RA e TARV foram evidenciadas em linfócitos CD4 e CD8;
- Pacientes em uso de TARV apresentam maior número de células senescentes que os indivíduos sem infecção pelo HIV;
- A expansão de células senescentes esteve relacionada com uma diminuição de LTCD4⁺ no tempo zero e sessenta meses após.

10. LIMITAÇÕES

Os resultados de qualquer estudo devem ser avaliados considerando-se suas limitações. No presente estudo foi adotado um desenho observacional e transversal, o que traz limitações importantes e inerentes as suas características.

Primeiro, o tipo de desenho do estudo não nos permitiu avaliar o impacto da acumulação das células senescentes e a diminuição de células *naïve* no desenvolvimento de doenças e/ou enfermidades características do envelhecimento em pessoas vivendo com HIV.

Segundo, o fato do projeto ter sido concebido e seus dados coletados numa época diferente ao momento da divulgação dos resultados, pode funcionar como uma limitante em vista de que posteriormente foram realizados estudos que utilizaram tecnologias mais avançadas e que realizaram análises muito além das concebidas ou usadas no presente trabalho. Um fator importante a elencar é o uso de citômetro de quatro cores, já que na atualidade diversos estudos e grupos de pesquisa utilizam citômetros com seis ou mais cores que permitem um estudo mais amplo e diverso de linfócitos CD4 e CD8. Apesar disso a nossa casa de estudos não conta com tecnologia superior a utilizada.

Terceiro, o Citomegalovírus é um dos patógenos relacionados com o processo de imunossenescência dos linfócitos, e apesar de que o envelhecimento induzido por estimulação antigênica crônica e persistente do CMV tem como resultado células em estádios avançados do processo de diferenciação (LEE *et al.*, 2014), a falta de sorologia para CMV da nossa coorte pode atuar como um fator confundidor na hora de realizar a interpretação dos dados.

Finalmente, o fato do nosso trabalho contar com um número amostral pequeno pode ter influenciado a falta de significância ou força estatística de alguns fenótipos estudados. Além disso, o fato de ser uma amostra não probabilística impede a extrapolação dos nossos resultados para a população geral. Mas temos certeza de que os nossos achados serviram de ponto de referência para estudos futuros na área.

11.PERSPECTIVAS

O efeito combinado do envelhecimento prematuro e a infecção pelo HIV nos linfócitos representa um imenso desafio para o cuidado clínico da crescente população de indivíduos mais idosos com infecção pelo HIV. Portanto se faz necessário:

- Avaliar a correlação existente entre os marcadores de imunossenescência e a incidência de doenças características do envelhecimento numa coorte de PVHIV;
- Realizar avaliação adicional dos mecanismos por trás da imunossenescência de forma que possam ser desenvolvidas estratégias para melhorar a saúde e o bem-estar das PVHIV que estão envelhecendo e começarão a envelhecer nos próximos anos;
- Avaliar a correlação existente entre o aumento dos marcadores de imunossenescência e o uso de TARV;
- Estudar futuramente em células T CD4 e CD8 HIV específicas a presença dos diferentes perfis fenotípicos observados no presente estudo. Assim como estudar a expressão de outros marcadores e ligantes relacionados ao envelhecimento do sistema imune, tais como: CD25; CD95L e PD-1L.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERG, J. A. Aging, Inflammation, and HIV. *Topics in Antiviral Medicine*, v.20, n. 3, p. 101-105, Aug/Sep. 2012.

ALCAMÍ, J., COIRAS, M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *EnfermInfeccMicrobiolClin*, v. 29, n. 3, p. 216–226, 2011.

APPAY, V. et al. HIV-Specific CD8⁺ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *The Journal of experimental medicine*, v. 192, n. 1, p. 63-75, Jul. 2000.

APPAY, V. et al. Dynamics of T Cell Responses in HIV. *J Immunol*, v. 168, p. 3660-3666, 2002a.

APPAY, V. et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature*, v. 8, n. 4, p. 379-385, 2002b.

APPAY, V., ROWLAND-JONES, S. L. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. *Seminars in immunology*, v. 16, p. 205-212, 2004.

APPAY, V. et al. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Experimental Gerontology*, v. 42, p. 432-437, Jan. 2007.

APPAY, V. et al. Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: *Consensus and Issues. Cytometry Part A*, v. 73^a, p. 975-983, Sept. 2008.

APPAY, V., SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*, v. 214, p. 231–241, 2008.

APPAY, V., KELLEHER, A. D. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 11, p. 242–249, 2016.

BAKER, J. V. et al. CD4⁺ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *AIDS*, v. 22, n. 7, p. 841–848, Apr. 2008.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v.220, p. 868–871, 1983.

BELTRÁN, L. M. et al. Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus. *Vascular Health and Risk Management*, v. 11, p. 35-48, 2015.

BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico AIDS e DST. Brasília 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico AIDS e DST. Brasília 2016.

BRENCHLEY, J. M. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*, v. 101, n. 7, p. 2711–2720, 2003.

BRENCHLEY, J. M. et al. CD4 T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 6, p. 749–759, Sep. 2004.

BRENCHLEY, J. M., PRICE, D. A., DOUEK, D. C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology*, v. 7, n. 3, p. 235-239, Mar. 2006.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, v. 12, n. 12, p. 1365-1371, Dec. 2006.

BRENCHLEY, J. M., DOUEK, D. C. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 3, n. 3, p. 356–361, May. 2008.

BRETTON, G. et al. Programmed Death-1 Is a Marker for Abnormal Distribution of Naive/Memory T Cell Subsets in HIV-1 Infection. *J Immunol*, v. 191, p. 2194-2204, Aug. 2013.

CAO, W. et al. Premature Aging of T cells Is Associated With Faster HIV-1 Disease Progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 50, n. 2, p. 137–147, Feb. 2009.

CARDOSO, S. W. et al. Aging with HIV: a practical review. *Braz J Infect Dis*, v.17, n. 4, p. 464–479, 2013.

CATALFAMO, M. et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *PNAS*, v. 105, n. 50, p. 19851–19856, Dec. 2008.

CATALFAMO, M. et al. CD4 and CD8 T Cell Immune Activation during Chronic HIV Infection: Roles of Homeostasis, HIV, Type I IFN, and IL-7. *J Immunol*, v. 186, p. 2106-2116, 2011.

CHAMPAGNE, P. et al. Skewed maturation of memory HIV specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, v. 410, p. 106-111, Mar. 2001.

CHATTOPADHYAY, P. K., ROEDERER, M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T cell subsets important in HIV disease. *Cytometry A*, v. 77, n. 7, p. 614-622, Jul. 2010.

CHOREMI-PAPADOPOULOU, H. et al. CD28 costimulation and CD28 expression in T lymphocyte subsets in HIV-1 infection with and without progression to AIDS. *ClinExp Immunol*, v. 119, p. 499-506, 2000.

CHOU, J. P., EFFROS, R. B. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des*, v. 19, n. 9, p. 1680-1698, 2013.

COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*, v. 364, n. 20, p. 1943-1954, 2011.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, v, 443, p. 350-354, Sept. 2006.

DE LEÓN-NARANJO, F. L. Envejecimiento prematuro y comorbilidades relacionadas con la edad en los pacientes con infección por el VIH. *Monográfico*, v. 1, n. 3, p. 18-32, 2014a.

DE LEÓN-NARANJO, F. L. Infección por el VIH (I). *Medicine*, v. 11, n. 49, p.2893-901, 2014b.

DEEKS, S. G. et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood*, v. 104, n. 4, p. 942- 947, Aug. 2004.

DEEKS, S. G., WALKER, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*, v. 27, p. 406–416, 2007.

DEEKS, S. G. Immune dysfunction, inflammation, and accelerated aging in patients on antiretroviral therapy. *Topics in HIV Medicine*, v. 17, n. 4, p.118-123, Sep/Oct. 2009.

DEEKS, S. G. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med*, v. 62, p. 141-155, 2011.

DEEKS, S. G., LEWIN, S. R., HAVLIR, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*, v. 382, n. 9903, p. 1525-33, Nov. 2013.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. *Nature Reviews*, v. 1, p. 1–22, 2015.

DOCK, J. N., EFFROS, R. B. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging Dis*, v. 2, n. 5; p. 382-397, Oct. 2011.

DOUEK, D. HIV Disease Progression: Immune Activation, Microbes, and a Leaky Gut. *Topics in HIV Medicine*, v. 15, n. 4, p. 114-117, Aug/Sep. 2007

DOUEK, D. C., ROEDERER, M., KOUP, R. A. Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*, v. 60, p. 471–484, 2009.

DOUEK, D. Immune Activation, HIV Persistence, and the Cure. *Topics in Antiviral Medicine*, v. 21, n. 4, p. 128-132, Sep/Oct. 2013.

FANTAUZZI, A. et al. Microbial translocation, residual viremia and immune senescence in the pathogenesis of HIV-1 infection. *World J Clin Infect Dis*, v. 3, n. 4, p. 47-57, Nov. 2013.

FAUCI, A. S. Pathogenesis of HIV Disease: Opportunities for New Prevention Interventions. *CID*, v. 45, n. 4, p. s206-s212, 2007.

FEDARKO, N. S. The Biology of Aging and Frailty. *Clin Geriatr Med*, v. 27, n. 1, p. 27–37, Feb. 2011.

FERNANDEZ, S., FRENCHA, M. A., PRICE, P. Immunosenescent CD57⁺CD4⁺ T-cells accumulate and contribute to interferon- γ responses in HIV patients responding stably to ART. *Disease Markers*, v. 31, p. 337–342, 2011.

FÜLÖP, T., LARBI, A., PAWELEC, G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in Immunology*, v. 271, n.4, Sept. 2013

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, p. 865–867, 1983.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, v.305, p. 1425–1431, 1981.

GRECO, D. B., PIETRA, E. R., RODRIGUES, M. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. PIETRA, E. R, DA COSTA, M. O. (Orgs) Série Medicina Interna. 1era ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio Ltda; 2015: p. 324.

HARARI, A., VALLELIAN, F., PANTALEO, G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur. J. Immunol*, v. 34, p. 3525–3533, 2004.

HARR, T. et al. Is CD95 or CD26 expression on T-cells a marker for HIV non- or slow-progressor status? *ClinMicrobiol Infect*, v. 4, p. 464-465, 1998.

HASSAN, M. N. Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports*, v. 5, p. 26-30, 2013.

HASSE, B. et al. Morbidity and Aging in HIV-Infected Persons: The Swiss HIV Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 11, p. 1130–1139, 2011.

HATANO, H. Immune Activation and HIV Persistence: Considerations for Novel Therapeutic Interventions. *CurrOpin HIV AIDS*, v. 8, n. 3, p. 211-216, May. 2013.

HEARPS, A. C. et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*, v. 11, p. 867-875, 2012.

HLADIK, F., MCEL RATH, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 447-57, 2008.

HOJI, A. et al. CD27 and CD57 Expression Reveals Atypical Differentiation of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Memory CD8⁺ T Cells. *Clinical and vaccine immunology*, v. 14, n. 1, p. 74–80, Jan. 2007.

HUNT, P. W. HIV and Ageing: Emerging Research Issues. *CurrOpin HIV AIDS*, v. 9, n. 4, p. 302–308, Jul. 2014.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, v. 11, n. 11, p. 3887–95, Nov. 1992.

JEYAPALAN, J. C., SEDIVY, J. M. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev*, v. 129, n. 7-8, p. 467–474, 2008.

KAUFMANN, D. E., WALKER, B. D. Programmed death-1 as a factor in immune exhaustion and activation in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 3, n.3, p. 362–367, May. 2008.

KLATT, N. R., FUNDERBURG, N. T., BRENCHLEY, J. M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends in Microbiology*, v.21, n. 1, p. 6 -13, Jan. 2013.

KLATT, N, R. et al. Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev*, v. 254, n. 1, p. 326–342, Jul. 2013.

KUMAR, P. Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. *Indian J Med Res*, v. 138, n. 3, p. 291–293, Sep. 2013.

LACKNER, A. A., LEDERMAN, M. M., RODRIGUEZ, B. HIV Pathogenesis: The Host. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 2, p.1-23, 2012.

LANE, C. Pathogenesis of HIV Infection: Total CD4⁺ T-Cell Pool, Immune Activation, and Inflammation. *Topics in HIV Medicine*, v. 18, n. 1, p. 2-6, Feb/Mar 2010.

LEBRASSEUR, N. K., TCHKONIA, T., KIRKLAN, J. L. Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty. *Nestle NutrInst Workshop Ser*, v. 83, p. 11–18, 2015.

LARBI, A., FÜLÖP, T. From “Truly Naïve” to “Exhausted Senescent” T Cells: When Markers Predict Functionality. *Cytometry Part A*, v. 85A, p. 25-35, Sept. 2013.

LÉCURoux, C. et al. Identification of a particular HIV-specific CD8⁺ T-cell subset with a CD27⁺CD45RO⁻/RA⁺ phenotype and memory characteristics after initiation of HAART during acute primary HIV infection. *Blood*, v. 113, n. 14, p. 3209-3217, 2009.

LEE, S. A. et al. Low Proportions of CD28⁻CD8⁺ T cells Expressing CD57 Can Be Reversed by Early ART Initiation and Predict Mortality in Treated HIV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 210, p. 374–82, 2014.

MAARTENS, G., CELUM, C., LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*, v. 19, n. 384(9939), p. 258-271, Jul. 2014.

MAHKEN, Y. D. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol*, v. 43, p. 2797-2809, 2013.

MEIR-SHAFRIR, K., POLLACK, S. Accelerated Aging in HIV Patients. *Rambam Maimonides Medical Journal*, v. 3, n. 4, p. 1-8, 2013.

MICHIE, C. A. et al. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, v. 360, p. 264–265, 1992.

MIEDEMA, F. et al. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Frontiers in immunology*, v. 4, n. 298, p. 1-14, Sep. 2013.

MOCROFT, A. et al. Serious Fatal and Nonfatal Non–AIDS-Defining Illnesses in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.55, n. 2, p. 262-270, Oct. 2010.

MOJUMDAR, K. et al. Altered T Cell Differentiation Associated with Loss of CD27 and CD28 in HIV Infected Indian Individuals. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, v.82B, p. 43–53, 2012.

MONTAGNIER, L. A History of HIV Discovery. *Science*, v. 298, n. 29, p. 1727-1728. Nov. 2002.

MONTOYA, C. J., MORENO, M. E., RUGELES, M. T. Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por el VIH-1. *Infectio*, v.10, n. 4, p. 250-265, 2006.

MOORE, R. D. et al. Rate of Comorbidities Not Related to HIV Infection or AIDS among HIV-Infected Patients, by CD4 Cell Count and HAART Use Status. *Clin Infect Dis*, v. 47, n. 8, p. 1102–1104, Oct. 2008.

MUELLER, Y. N. Increased CD95/Fas-Induced Apoptosis of HIV-Specific CD8⁺ T Cells. *Immunity*, v. 15, p. 871-882, Dec. 2001.

NILSON, J. et al. Early immune activation in gut-associated and peripheral lymphoid tissue during acute HIV infection. *AIDS*, v. 21, n. 5 p. 565-574, 2007.

NIXON, D. E., LANDAY, A. L. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 5, n. 6, p. 498-503, 2010.

OAR Working Group on HIV and Aging. HIV and Aging: State of Knowledge and Areas of Critical Need for Research. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 60(Suppl 1), p. S1-18, 2012.

OKADA, R. et al. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *International Immunology*, v. 20, n. 9, p. 1189–1199, Sept. 2008.

OSMOND, D. H. Epidemiology of Disease Progression in HIV. HIV InSite Knowledge Base Chapter, 1998. Disponible en: <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-03-01-04>.

PAIARDINI, M. et al. Cell-Cycle Dysregulation in the Immunopathogenesis of AIDS. *Immunologic Research*, v. 29, n. 1–3, p. 253–267, 2004.

PAIARDINI, M., MÜLLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev*, v. 254, n. 1, p. 78–101, Jul. 2013.

PALMER, B. E. et al. Functional and Phenotypic Characterization of CD57⁺CD4⁺T Cells and Their Association with HIV-1-Induced T Cell Dysfunction. *J Immunol*, v. 175, p. 8415-8423, 2005.

PANTALEO, G., FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu.Rev. Microbiol*, v. 50, p. 825–54, 1996.

PETROVAS, C. et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *The Journal of experimental medicine*, v. 203, n. 10, p. 2281-2292, Oct. 2006.

PICKER, L. J. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 399–405, 2006.

PIRRONE, V. et al. Impact of age on markers of HIV-1 disease. *Future Virol*. v. 8, n. 1, p. 81-101, Jan. 2013.

PLAEGER, S. F. et al. Immune Activation in the Pathogenesis of Treated Chronic HIV Disease: A Workshop Summary. *AIDS research and human retroviruses*, v. 28, n. 5, p. 469-477, 2012.

POPE, M., HAASE, A. T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*, v. 9, p. 847–52, 2003.

RAJASURIAR, R. et al. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? *AIDS*, v. 27, n. 8, p. 1199–1208, May. 2013.

RICKABAUGH, T. M., JAMIESON, B. D. A Challenge for the Future: Aging and HIV Infection. *Immunol Res*, v. 48, n. 1-3, p. 59-71, 2010.

ROMERO-CABRERA, A. J., AMORES-HERNÁNDEZ, L., FERNÁNDEZ-CASTELEIRO, E. Inmunosenescencia y fragilidad: unamirada actual. *MedIntMex*, v. 29: n. 6, p. 605-611, Nov/Dec. 2013.

SAAVEDRA H, D., GARCIA, B. Inmunosenescencia: efectos de la edad sobre el sistema inmune. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter*, v. 30, n. 4, p. 332-345, 2014.

SABIN, C. A., LUNDGREN J. D. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 8, p. 311–317, 2013.

SACHDEVA, M. et al. Immune Exhaustion Occurs Concomitantly with Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1 Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 54, n. 5, p. 447–454, Aug. 2010.

SALLUSTO, F. et al .Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, v. 401, p. 708–12, Dec.1999.

SERETI, I., ALTFELD, M. Immune activation and HIV: An enduring relationship. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 11, n. 2, p. 29–130, Mar. 2016.

SILVA, M., et al. Acute HIV infection with rapid progression to AIDS. *Braz J Infect Dis*, v. 14, n. 3, p. 291-293, 2010.

SIMON, V., D HO, D., ABDOOL, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, v. 368, n. 9534, p.489–504, Aug. 2006.

SKIEST, D. J. et al. The Importance of Comorbidity in HIV infected Patients over 55: A Retrospective Case-Control Study. *The American journal of medicine*, v. 1, p. 605-611, Dec. 1996.

SODORA, D. L., SILVESTRI, G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*, v. 22, p. 439–446, 2008.

STRIOGA, M., PASUKONIENE, V., CHARACIEJUS, D. CD8⁺ CD28 and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology*, v. 134, p. 17-32, 2011.

TASSIOPOULOS, K. et al. CD28-Negative CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in antiretroviral Therapy–Naive HIV-Infected Adults Enrolled in Adult Clinical Trials Group Studies. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 205, p. 1730–8, Mar. 2012.

TRAUTMANN, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature*, v. 12, n. 10, p. 1198-1202, Oct. 2006.

TSOUKAS, C. Immunosenescence and aging in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 9, p. 398–404, 2014.

TUSSEY, L. G. et al. Antigen Burden Is a Major Determinant of Human Immunodeficiency Virus–Specific CD8⁺T Cell Maturation State: Potential Implications for Therapeutic Immunization. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187, p. 364-74, 2003.

UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. GLOBAL HIV STATISTICS, July 2017. Disponible em: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/UNAIDS_FactSheet.

UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Prevention Gap Report, 2016. Disponible em: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/prevention-gap>.

UNSOELD, H., PIRCHER, H. Complex Memory T-Cell Phenotypes Revealed by Coexpression of CD62L and CCR7. *J. Virol*, v. 79, n. 7, p. 4510-4513, Apr. 2005.

WESTON, R., MARETTO, B. HIV infection pathology and disease progression. *Clinical Pharmacist*, v.1, p.387-392, 2009.

XU, W., LARBI, A. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int. J. Mol. Sci*, v. 18, n. 18, p. 1742-54, Aug. 2017.

YUE, F. Y. et al. HIV-1-Specific Memory CD4⁺T Cells Are Phenotypically Less Mature Than Cytomegalovirus-Specific Memory CD4⁺T Cells. *J Immunol*, v. 172, p. 2476-2486, 2004.

ZHANG, J. et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, v. 109, n.11, p.4671-4678, Jun. 2007.

13. ANEXOS

13.1. ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Paciente portador de infecção pelo HIV)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa para avaliar alguns aspectos do seu sistema de defesa, como por exemplo, o quanto as células do seu sistema imunológico estão ativas devido a infecção pelo HIV. Esta pesquisa se chama "Ativação celular em pessoas saudáveis e pacientes infectados pelo HIV", está sob a coordenação dos pesquisadores AgdemirWaléria Aleixo e Unai Tupinambás (Telefones: 3409-98-22 e 3409-9825) e já foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

O objetivo deste estudo é entender como a ativação das células do seu sistema imunológico está relacionada com a evolução da infecção pelo HIV e com a resposta ao tratamento antirretroviral. Para isto, serão utilizados reagentes que marcam a superfície da célula para detectar a sua atividade.

O risco na participação deste estudo é mínimo e a pessoa que vai colher seu sangue é experiente. Você deverá colher 2 amostras de sangue e isso poderá causar algum desconforto como pequeno sangramento, dor leve ou manchas onde a agulha penetra no corpo.

A sua participação é voluntária e você não receberá nenhum benefício financeiro para isto. Se você não quiser participar você não será prejudicado por causa disto. Você continuará a ser atendido no serviço sem nenhum prejuízo no seu acompanhamento médico. A confidencialidade dos dados estará garantida uma vez que será utilizado apenas um número de registro da pesquisa.

Caso você queira participar, você e seu médico receberão os resultados obtidos.

Para maiores esclarecimentos você poderá entrar em contato com o pesquisador principal a qualquer hora através dos telefones acima.

Declaro que tive oportunidade de ler e discutir o projeto de pesquisa e que todas as perguntas e dúvidas foram respondidas e esclarecidas pelo pesquisador.

Belo Horizonte, _____

Voluntário

Nome: _____

Assinatura: _____

Testemunhas

Testemunha 1– Nome e assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Antônio Carlos, 6672
Unidade Administrativa II – 2º Andar
Belo Horizonte CEP 31270-901
Telefones: 3499-4592
Email: coep@prpq.ufmg.br

13.2. ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Participante sem infecção pelo HIV)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa porque você não apresenta nenhum sintoma de infecção ativa. Essa pesquisa vai avaliar alguns aspectos do seu sistema de defesa, como por exemplo, se as células do seu sistema imunológico estão ativas e se elas apresentam diferenças quando comparadas com pessoas portadoras de infecção pelo HIV. Esta pesquisa se chama "Ativação celular em pessoas saudáveis e pacientes infectados pelo HIV", está sob a coordenação dos pesquisadores AgdemirWaléria Aleixo e Unai Tupinambás (Telefones: 3409-98-22 e 3409-9825) e já foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

O objetivo deste estudo é entender se a ativação das células do sistema imunológico em indivíduos infectados pelo HIV, com diferentes números de células de defesa, indica a necessidade de iniciar o tratamento antirretroviral, quando comparado com o perfil das células encontradas em você, que não apresenta nenhuma infecção ativa. Para isto, serão utilizados reagentes que marcam a superfície da célula para detectar a sua atividade. Esta informação poderá contribuir futuramente para indicar o início do uso de medicamentos para o tratamento do HIV com maior rapidez, sem esperar que o número de células de defesa devido a infecção pelo HIV.

O risco na participação deste estudo é mínimo e a pessoa que vai colher seu sangue é experiente. Você deverá colher 2 amostras de sangue e isso poderá causar algum desconforto como pequeno sangramento, dor leve ou manchas onde a agulha penetra no corpo.

Caso você não tenha um resultado de exame anti-HIV nos últimos seis meses, será solicitado este exame. Se o resultado for positivo, você será encaminhado para o serviço de saúde CTR/DIP. A sua participação é voluntária e você não receberá nenhum benefício financeiro para isto. A confidencialidade dos dados estará garantida uma vez que será utilizado apenas um número de registro da pesquisa.

Declaro que tive oportunidade de ler e discutir o projeto de pesquisa e que todas as perguntas e dúvidas foram respondidas e esclarecidas pelo pesquisador.

Belo Horizonte, _____

Voluntário

Nome: _____

Assinatura: _____

Testemunhas

Testemunha 1– Nome e assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Antônio Carlos, 6672
Unidade Administrativa II – 2º Andar
Belo Horizonte CEP 31270-901
Telefones: 3499-4592
Email: coep@prpq.ufmg.br

13.3. ANEXO 3

QUESTIONÁRIO PROJETO ATIVAÇÃO CELULAR – PACIENTE PORTADOR DE INFECÇÃO PELO HIV

Responsável pelo preenchimento: _____

Data:

GRUPO	PCTE
Crítérios de exclusão:	
Vacinação no último mês	
Quadro infeccioso atual ou no último mês	
Dislipidemia com triglicérides > 500mg/dl	
Gestação ou parto no último mês	
Uso de corticóide sistêmico ou outros imunossupressores	
Doença reumatológica ou autoimune	
Coinfecções: hepatite B ou C	
Crítérios de inclusão:	
Idade entre 18 e 55 anos	
Sorologia anti-HIV positiva	
Sem infecção atual	

Grupo	
(1) Progressores lentos* (2) TARV em sucesso virológico **	_____
(3) TARV em falha virológica***	

* Sem TARV, CV < 50000 cópias/mL e CD4 > 500 há mais de 7 anos; ** Uso regular de TARV e CV < Lmin nos últimos 2 exames; *** Uso de TARV e CV > 500 cópias/mL nos últimos 2 exames

1 – Identificação	
Nome:	
Prontuário:	
Data de nascimento	/ /
Idade:	
Sexo: M (1) F (2)	
Endereço:	
Telefones de contato:	
2 – História da infecção pelo HIV	
Data do diagnóstico:	/ /
Via de transmissão: (1) heterossexual (_____ 2) homossexual (3) acidente perfuro-	
Último CD4 (valor absoluto):	
Data do último CD4:	/ /
CD4 mais alto (valor absoluto):	
Data do CD4 mais alto:	/ /
CD4 mais baixo (valor absoluto):	
Data do Cd4 mais baixo:	/ /
Última carga viral (log):	
Data da última carga viral:	/ /

Carga viral mais alta (log)		
Data da carga viral mais alta:	/ /	
Carga viral mais baixa (log):		
Data da carga viral mais baixa:	/ /	
Carga viral indetectável desde:	/ /	
Classificação do CDC:		
Infecções oportunistas prévias? Quais?		
Em uso de TARV? (1) Sim (2) Não		
Se em uso de TARV, qual esquema?		
Data de início da TARV:	/ /	
Uso regular dos ARV? (1) Sim (2) Não (Você tomou todas as doses dos últimos 3 dias?)		
3 – Dados clínicos		
Peso:	Kg	
Altura:	cm	
IMC		
PA:	/ mmHg	
Vacinação no último mês: (1) sim (2) não (3)		
Sintomas no último mês: (marque todas as opções necessárias) (1) febre (2) tosse (3) sudores noturna	_____	
Se outros, descrever:		
Usou no último mês? (marque todas as opções necessárias) (1) antibióticos (2) corticóide (3) imunossupressores (4) anti-HAS (5) hipoglicemiante (6) 4 + 5 (7) ACO (8) outros (9) nenhum	(5) _____	
Se outros, quais? (Anotar todos os medicamentos em uso)		
Comorbidades: (marque todas as opções necessárias) (1) HAS (2) DM (3) Doença reumatológica (4) Hipo ou hipertireoidismo (5)) outras (6) 1+2 (7) 1 + 2+5 (9) nenhuma comorbidade	_____	
Se outras, quais?		
Teve alguma infecção nos últimos 6 meses? (marque todas as opções necessárias) (1) IVAS (2) PNM (3) TBC (4) ITU (5) Outras (9) nenhuma		
Data da última infecção, se aplicável:	/ /	
Se outra infecção, qual?		
Se mulher, data da última menstruação:	/ /	
4 – Exames laboratoriais (se disponíveis com o paciente)		
Hb:	Ht:	VCM:
GL:	L:	PLQ:
LDL:	HDL:	TGC:
HbsAg:	Anti-HBs:	Anti-HBc
Anti-HCV:	AST:	ALT:
Bb D/I:	Uréia:	Creatinina:

Observações:

13.4. ANEXO 4

QUESTIONÁRIO PROJETO ATIVAÇÃO CELULAR – PESSOA SEM INFECCÃO PELO HIV

Responsável pelo preenchimento: _____

Data: _____

GRUPO PCTE

Critérios de exclusão:	
Vacinação no último mês	Gestação ou parto no último mês
Uso prévio ou atual de anti-retrovirais	Uso de corticóide sistêmico ou outros imunossuppressores
Quadro infeccioso atual ou no último mês	Doença reumatológica ou auto-imune
Dislipidemia com triglicérides > 500	Hepatite B ou C ativa
Critérios de inclusão:	
Idade entre 18 e 50 anos	Sem infecção atual
Sorologia anti-HIV negativa nos últimos 6 meses ou consentir em realizar exame anti-HIV	Nunca ter recebido tratamento anti-retroviral

1 - Identificação		
Nome:		
Prontuário:		
Data de nascimento:	/ /	
Idade:		
Sexo: M (1) F (2)		
Endereço:		
Telefones de contato:		
2 – Dados clínicos		
Data do último exame anti-HIV negativo	/ /	
Peso:	Kg	
Altura:	cm	
IMC		
PA:	/ mmHg	
Vacinação no último mês: (1) sim (2) não (3) não sabe		
Sintomas no último mês: (marque todas as opções necessárias) (1) febre (2) tosse (3) sudores noturna		
Se outros, descrever:		
Usou no último mês? (marque todas as opções necessárias) (1) antibióticos (2) corticóide (3) imunossuppressores (4) anti-HAS (5) hipoglicemiante (6) 4 + 5 (7) ACO (8) outros		
Se outros, quais? (Anotar todos os medicamentos em uso)		
Comorbidades: (marque todas as opções necessárias) (1) HAS (2) DM (3) Doença reumatológica (4) Hipo ou hipertireoidismo (5) outras (6) 1+2 (7) 1 + 2 + 5 (9)		
Se outras, quais?		
Teve alguma infecção nos últimos 6 meses? (marque todas as opções necessárias) (1) IVAS (2) PNM (3) TBC (4) ITU (5) Outras (6)		
Data da última infecção, se aplicável:	/ /	
Se outra infecção, qual?		
Se mulher, data da última menstruação:		
3 – Exames laboratoriais (se disponíveis com o paciente)		
Hb:	Ht:	VCM:
GL:	L:	PLQ:
LDL:	HDL:	TGC:
HbsAg:	Anti-HBs:	Anti-HBc
Anti-HCV:	AST:	ALT:
Bb D/I:	Uréia:	Creatinina:

13.5. ANEXO 5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0636.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Dirceu Bartolomeu Greco
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de abril de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Ativação celular em pessoas saudáveis e pacientes infectados pelo HIV assintomáticos em diferentes faixas de contagem de linfócitos T CD4+"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral".

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

13.6. ANEXO 6 – Artigo original

Title: Evaluation of immunosenescence profiles in peripheral blood cells of people living with HIV (PLWH) on follow up in a Brazilian cohort

Authors: Yuppiel Franmil Martinez¹, Ismael A C Rocha², Agdemir W Aleixo³, Maria Luiza Silva³, Dirceu B Greco^{1,4}, Unaí Tupinambás^{1,4}.

1. Programa de Pós-graduação em Ciências da saúde: Infectologia e medicina tropical, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte, Brazil.
2. Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais – Brazil.
3. Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais – Brazil.
4. Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais – Brazil.

Abstract

Immunosenescence changes are occurring in PLWH much earlier than in non-HIV infected individuals. The most notable changes happen in the adaptive immune system, especially in the T cell compartment. This study aims to assess the profiles of immunosenescence and exhaustion of circulating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in PLWH, as well as the possible correlation between immunosenescence profiles and absolute values and percentages of T CD4 lymphocytes at time zero and sixty months after. The immunosenescence and exhaustion were evaluated by flow cytometry through the expression of cell surface markers: CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas and

programmed death-1 (PD-1). Samples were collected from 46 PLWH on follow up at a Reference Center for Infectious and Parasitic Diseases (*Centro de Treinamento e Referência e Doenças Infeciosas e Parasitárias-Orestes Diniz*) in Belo Horizonte, Brazil. Another 20 HIV seronegative individuals were included as a control group. PLWH were divided into three groups according to laboratory profiles in: slow progressors (SP), active replication (AR) and HAART with success. All subjects signed an informed consent form and this project was approved by the Institutional Research Ethics Committee. Our findings show that when compared to HIV seronegative individuals, PLWH had a decrease in naïve cells, as well as higher frequency and expression of effector cells in intermediate and advanced stages of differentiation. However, differences were observed among the three groups: a) In the AR group we observed the majority of the immune changes; b) CD4 and CD8 Immunophenotypic changes were seen in patients from both the AR and HAART groups; c) In the SP group these changes occurred exclusively in the CD8 compartment. On the other hand, the presence of immunosenescence profiles were negatively correlated with T CD4 absolute values and percentages at time zero and sixty months after. In conclusion our results show an increase in CD4 and CD8 immunosenescence profiles in all groups of PLWH studied and the expansion of these terminally differentiated cells had also a negative impact in the CD4⁺ count at time zero and sixty months after. These findings may in part explain the harmful role of immunosenescence in the chronic HIV infection.

KEYWORDS: HIV; AIDS; immunosenescence; immunophenotyping; flow cytometry.

Introduction

As with any organ system, the immune system gets old and their functions deteriorate, increasing the susceptibility to infections, tumors, and autoimmune diseases. This natural and physiological age process is often referred to as immunosenescence,¹⁻³ which has recently come to the forefront in the field of HIV as a factor that together with classic factors (*i.e.*: smoking, sedentary lifestyle, obesity, systemic arterial hypertension), would increase the risk of cardiovascular, bone, metabolic and neurocognitive comorbidities in all ages, including in who are virologically suppressed.⁴⁻⁷

People living with HIV experience changes related to immunosenescence similar to those presented by uninfected elderly people, which would appear in the general population only 20 to 30 years later.⁷ This "accelerated or early aging" seems to be largely related to inflammation and chronic immune activation driven by chronic antigenic exposure to HIV.⁴⁻⁵

The term 'immune activation' in the HIV infection is a rather broad expression that covers a large range of events or observations involved in active molecular and cellular processes.⁸ Given the complexity of the interaction between HIV and the host immune system, there are multiple molecular and cellular mechanisms by which HIV infection can induce immune activation. To make things even more complicated, it is possible that those mechanisms synergistically contribute to cause aberrant chronic immune activation.⁹⁻¹¹

The aberrant immune activation causes a dramatic and sustained increase in the frequency of activated and proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cells, many of which are destined to die even in the absence of infection, due to the increased sensitivity to apoptosis. Furthermore activated CD4⁺ T cells are prime

targets for HIV-1 infection which helps drive viral replication. In this context, the preferential activation, infection and killing of HIV CD4 T cells is detrimental as it results in the exhaustion/failure of the immune system, resulting in the proliferative senescence of the T-cell pool. This sustained the idea that through the induction of persistent, sustained immune activation and inflammation, HIV-1 infection induces an accelerated process of immunosenescence and systemic ageing.^{9,10,12-18}

The proliferative senescence of the T-cell pool involve several factors, including loss of costimulatory molecules, accumulation of terminally differentiated cells, expression of inhibitory receptors, and induction of apoptosis. In addition, the accumulation of activated and/or senescent cells in PLWH suggests that less differentiated cells are progressively lost meaning that there is a numerical decrease in naïve T cells.¹⁹⁻²²

The development of new technologies (*i.e.*: production of monoclonal antibodies and flow cytometry) allow us to verify the immunosenescence and exhaustion at a clonal level.³ There is a wide variety of markers that can be used to verify senescence at a clonal level, and although there is little consensus as to which cell surface markers best discriminate the various stages of T cell differentiation. The most commonly used markers for human studies are CD45RA, CCR7, CD27, CD28, CD57 and CD62L, CD95 and PD-1,^{20,23,24} that play an important role in T cell activation, proliferation and cytokine production.^{25,26}

It is therefore believed that a better understanding of the mechanisms underlying immune senescence will lead to an effective interventional strategy aimed at improving the health span of individuals.

In this study was measure in leukocytes of peripheral blood using the methodology of flow cytometry the expression of cell surface markers: CD45RA, CD27, CD28, CD57, CD62L, CCR7, CD95/Fas and programmed death protein 1 (PD-1), in order to characterize and evaluate the profiles of immunosenescence and exhaustion in a cohort of People Living with HIV aged between 18 and 55 years.

Materials and methods

Study groups

Forty-six (46) PLWH on follow up at a Reference Center for Infectious and Parasitic Diseases (*Centro de Treinamento e Referência em Doenças infecciosas e Parasitárias-Orestes Diniz*) in Belo Horizonte, Brazil were included. Another 20 HIV seronegative healthy individuals were also included as a control group (N). The PLWH were characterized in three groups according to clinical and laboratory aspects in: slow progressors (SP – patients who never used ART with viral load (VL) lower than 5,000 copies/ml and CD4⁺ count greater than 500 cells/mm³ for more than 7 years); active replication (AR - patients that could or couldn't be using ART and had a VL above 5,000 copies/ml in the last two consecutive laboratory measurements) and HAART with success (HAART – HIV-1 infected individuals that where using ART and had a VL lower than 50 copies/ml in the last two consecutive measurements). All subjects signed an informed consent form that was approved by the Ethical Committee of UFMG (N^o. ETIC 0636.0.203.000-10), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Blood Samples

Peripheral blood samples (5 and 5 ml) were collected by a trained professional at the *Centro de Treinamento e Referência em Doenças infecciosas e Parasitárias-Orestes Diniz* and placed into Vacutainer™ tubes containing EDTA as an anticoagulant, clot activator and gel for serum separation (both purchased from Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Flow cytometric analysis of the peripheral blood leukocyte immunophenotype was performed as recommended by Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) with the following modifications. First, 50- μ l aliquots of EDTA-anticoagulated blood were dispensed into 5-ml polystyrene tubes (Falcon®, B.D. Pharmingen San Diego, CA). Then, the samples were individually stained for specific cell-surface markers using four-color immunocytometric assays with cell surface marker monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD4 (clone SK3), anti-CD8 (clones SK1), anti-CD45RA (HI100), anti-CD27 (M-T271), anti-CD28 (CD28.2), anti-CD57 (NK-1), anti-CD62L (DREG-56), anti-CCR7 (3D12), anti-CD95 (DX2), anti-PD-1 (M1H4). These antibodies were conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll protein (PerCP), R-phycoerythrin or cyanine dye Cy5 (PE Cy5.0) or allophycocyanin (APC) and were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The samples were treated gently under vortex homogenization and incubated in the dark for 30 min at room temperature. Following incubation, erythrocytes were lysed using 0.45 ml of fluorescence-activated cell sorter (FACS) lysing solution (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) and re-incubated for an additional 15 min at room temperature in the dark. After incubation, the cells were washed twice with 2 ml of phosphate-buffered saline

containing 0.01% sodium azide. After erythrocyte lysis was completed, the samples were centrifuged at 600 x g for 7 min at room temperature. The supernatants were discarded, and the cell pellets were washed twice with 2 ml of phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide and stored at 4°C in the dark prior to flow cytometry analysis. FACS samples were acquired within 4 h after staining.

Flow cytometry acquisition and analysis

Three thousand events/tube were acquired within the lymphocyte gate using a FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson) that was properly set up to measure forward (FSC) and side (SSC) light scatters, FITC (FL-1), PE (FL-2), PerCP or PE Cy5.0 (FL-3) and APC (FL4). The CELLQuest™ software (Franklin Lakes, NJ, USA), which was provided by the manufacturer, was used for data acquisition and analysis, and the data were prepared using the FlowJo software (Tree Star, San Carlos, California). Selective analysis of lymphocytes was carried out by first placing an electronic gate on the FSC versus SSC dot plot to select small blood lymphocytes based on their morphometric features. The gated lymphocyte population was further characterized based on its relative fluorescent properties to quantify the percentage of fluorescent-positive subpopulations. The results were expressed as the percentage of positive cells within the selected gates. Cell-surface markers presenting a bimodal distribution and/or single-color histograms were used to evaluate the density or expression of cell-surface markers presenting a unimodal distribution, which was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI), within the gated lymphocytes or monocytes.

Statistical analysis

The data analysis was performed using One Way ANOVA and Kruskal Wallis tests depending on the distribution of the data. The correlations between the senescence profiles and the CD4 count were determined by the Spearman or Pearson rank correlation tests. The analysis was performed using the GraphPad Prism software, version 7.0 (San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when the probabilities of equality, i.e., p values, were < 0.05.

Results

Participant characteristics

The study population consisted of 46 PLWH, divided into 3 groups according to laboratory and clinical aspects in: slow progressors (SP) (n=6); active replication (AR) (n = 20) and HAART with success (HAART) (n=20), also were included 20 people with negative serology for HIV as a control group (N). The cohort was integrated for the same number of man and women. However, when the sex frequency was separated according to the serological status, it was observed that in the group of PLWH there was a predominance of men (60.87%). The median age of the HIV infected individuals was 44 years, with a minimum and maximum of 23 and 56 years, respectively. In the control group, median age was 31 years, and a minimum and maximum of 20 and 56 years respectively was observed. This and other sociodemographic characteristics and laboratory data of the cohort are presented in Table 1.

Table 1 – Sociodemographic characteristics and laboratory data of the cohort

Sociodemographic characteristics				
	N (n=20)	SP (n = 6)	AR (n=20)	HAART (n=20)
Male	5 (25%)	5 (83,3%)	9 (45%)	14 (70%)
Female	15 (75%)	1 (16,7%)	11 (55%)	6 (30%)
Median age	31 (20-56)	44 (37-55)	42 (23-56)	40 (25-54)
Median years of infection	DNA	12 (5-21)	9 (0-24)	9 (1-23)
Laboratory data				
Median CD4%	41,9 (29,2 - 53,9)	31.68 (21,3 - 39,2)	17.80 (3,8 – 34,8)	23.93 (7,3 – 39,9)
Median CD8%	29,1 (13,3 - 43,3)	44.71 (31,1 – 58,7)	50.43 (0,39 - 75,8)	48.80 (30,8 – 68,2)

The results are expressed as median percentage – minimum (Min) and maximum (Max).
DNA: Does Not Apply.

Senescent profiles in CD4⁺ and CD8⁺ Lymphocytes

Ex vivo analysis of leukocyte subsets (frequency, senescence profiles and markers expression) present in the peripheral blood, was performed using four-color flow cytometry assays and panels of cell surface markers (CD45RA, CCR7, CD27, CD28, CD62L, CD95/Fas, PD-1, CD57) to characterize the phenotype of CD4 and CD8 lymphocytes in HIV-1-infected and uninfected individuals. An important element was the use of a wide variety of cell surface markers that allowed us to identify different cell phenotypes related to the maturation stage of the cells, besides the characterization of these phenotypes in peripheral blood CD4⁺ lymphocytes, that was been poorly studied. The results are showed in table 2.

Table 2 – Senescence profiles in CD4 and CD8 lymphocytes of people living with HIV.

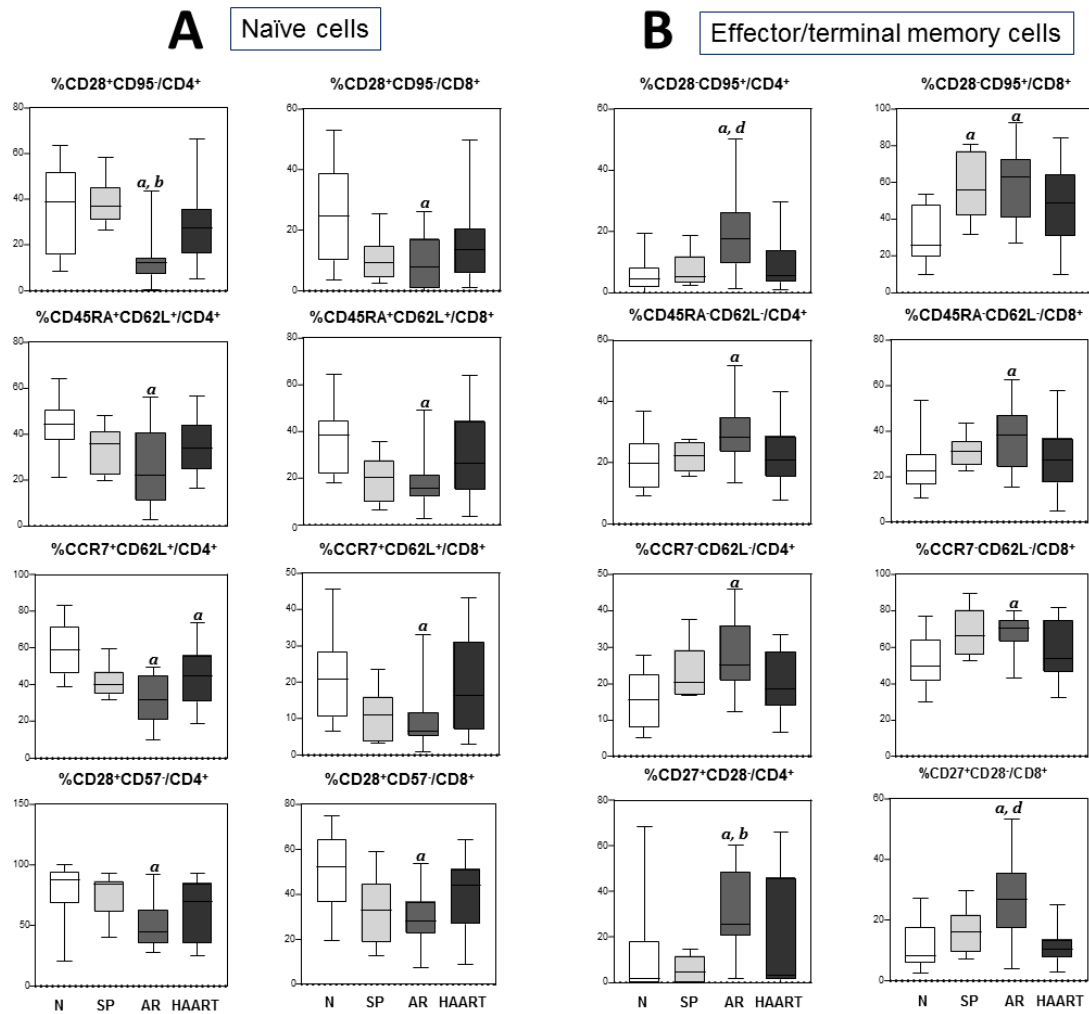
Cell Phenotype	Groups			
	N	SP	RA	TARV
CD4 NAIVE CELLS				
CD45RA ⁺ CD62L ⁺	41 (9,01-64,1)	35,8 (19,6 - 48,2)	21,7 (2,55 - 56,1) *	34,25 (8,62 - 66,7)
CCR7 ⁺ CD62L ⁺	59,15 (39,2 – 83)	40,1 (31,8 – 59,5)	30,1 (9,67 -49,9) *	44,8 (19 – 73,6) *
CD28 ⁺ CD57 ⁻	87,4 (20,5 -99,5)	83,5 (40,1 – 92,7)	44,4 (27,7 – 91,7) *	69,3 (24,6 – 92,9)
CD28 ⁺ CD95 ⁻	38,7 (8,56 – 63,6)	36,8 (26,4 – 58,3)	12 (0,24 – 43,4) *	27,5 (5,15- 66,3)
CD4 EFFETOR MEMORY CELLS				
CD45RA ⁻ CD62L ⁻	19,9 (9,2 – 36,9)	22,1 (15,5 – 27,7)	28,8 (13,5 – 51,7) *	20,7 (7,63 – 53,4)
CCR7 ⁻ CD62L ⁻	15,55 (5,17 – 27,8)	20,4 (16,6 – 37,6)	25,2 (12,4 – 46,6) *	18,6 (6,71 – 49,6)
CD28 ⁻ CD57 ⁻	1,6 (0 – 78,5)	6,2 (0,53 – 14,3)	41,3 (3,72 – 68,5) *	11,8 (0,46 – 72,5)
CD27 ⁺ CD28 ⁻	1,79 (0 – 68,5)	4,5(0 – 14,9)	25,6 (1,63 – 60,5) *	3,14 (0 – 66,2)
CD27 ⁻ CD28 ⁻	2,38 (0 – 8,67)	3,45 (2,15 – 23,7)	10,9 (1,62 – 46,9) *	6,07 (1,01 – 27)
CD27 ⁻ CD95 ⁺	8,5 (0,29 – 19)	13,08 (7,73 – 31,4)	23,4 (4,12 – 54,7) *	11,3 (2,38 – 32,6)
CD28 ⁻ CD95 ⁺	4,47 (0 – 19,3)	5,33 (2,38 – 18,6)	17,65 (1,37 – 50,3)*	5,53 (0,87 – 29,5)
CD8 NAIVE CELLS				
CD45RA ⁺ CD62L ⁺	38,45 (17,8 – 64,5)	20,1 (6,57 – 35,4)	15,6 (2,53 – 48,8) *	26 (3,42 – 63,8)
CD45RA ⁺ CD28 ⁺	28,7 (11,8 – 51,9)	14 (8,25 – 29,3)	16,15 (4,07 – 34,9)*	27 (2,47 – 57,1)
CCR7 ⁺ CD62L ⁺	20,95 (6,62 – 45,5)	11,05 (3,31 – 23,5)	6,62 (0,95 – 33,2) *	16,4 (3,06 – 43,3)
CD28 ⁺ CD57 ⁻	24 (2,94 – 48,1)	36,65 (23,1 – 71,2)	35,5 (16,9 – 51,3) *	34,1 (14,1 – 69,2)
CD27 ⁺ PD-1 ⁻	56,6 (23,3 – 78,5)	28,35 (14,2 – 42,6)*	33,7 (9,06 – 58,4) *	44,5 (13,7 – 72,3)
CD8 EFFETOR MEMORY CELLS				
CD45RA ⁻ CD62L ⁻	22,45 (10,4 – 53,4)	30,9 (22,6 – 43,3)	38,15 (15,1 – 62,5)*	27 (4,83 – 57,5)
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	24,5 (7,55 – 41,1)	38,3 (24,1 – 43)	42,5 (21,4 – 72,8) *	35 (11,9 – 54,1)
CD45RA ⁻ CD28 ⁻	7,1 (0,3 – 16,1)	23,2 (11,9 – 32,9) *	30,8 (10,8 – 44,9) *	14,75 (2,4 – 52,9) *
CCR7 ⁺ CD62L ⁺	20,95 (6,62 – 45,5)	11,05 (3,31 – 23,5)	6,62 (0,95 – 33,2) *	16,4 (3,06 – 43,3)
CD28 ⁻ CCR7 ⁻	36,55 (16,1 – 67,4)	57,65 (40 – 80,3)	62,6 (33,8 – 88,2) *	48,3 (24,8 – 86,9)
CD27 ⁺ CD28 ⁻	8,28 (2,35 – 27,1)	16 (7,17 – 29,6)	26,9 (3,96 – 54,7) *	10,3 (2,84 – 25)
CD27 ⁻ CD95 ⁺	18,9 (7,62 – 54,5)	43,35 (28,7 – 72,6)	41,4 (12,3 – 69,5)	41,9 (12 – 75,3)*
CD28 ⁻ CD95 ⁺	25,6 (9,68 – 53,8)	56 (31,6 – 80,9) *	61,2 (27,1 – 90,5)*	48,5 (9,68 – 84,3)
CD27 ⁻ PD-1 ⁺	2,03 (0,52 – 11,9)	10,25 (4,16 – 18,9)*	7,56 (0,94 – 24,4)*	3,41 (0,5 – 24,5)
LYMPHOCYTES				
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	19,5 (3,59 – 29)	10,3 (6,81 -17,1)	10,9 (0,16 – 17,2) *	10,3 (0,85 – 29,1) *
CD4 ⁺ CD95 ⁻	17,9 (6,33 – 37,9)	13,13 (7,11- 19,9)	6,35 (0,08 – 20,8) *	9,63 (0,16 – 29,6)
CD8 ⁺ CD27 ⁻	9,25 (2,88 – 23,2)	20,65 (12,8 – 44,5)	21,7 (6,76 – 53,9) *	24,6 (6,94 – 46,4) *
CD8 ⁺ CD28 ⁻	13,15 (5,21 – 28,7)*	26,1 (14,7 – 49,5)	31,8 (13,2 – 70)	23,9 (12,2 -52,4) *
CD8 ⁺ CD57 ⁺	7,1 (1,42 – 24,2) *	17,25 (9,94 – 37,6)	17,7 (8,53 -34,9) *	17,7 (5,96 – 41) *
CD8 ⁺ CD95 ⁺	16,9 (5,74 – 34,7) *	39,8 (29 – 57,7)	50,7 (14,8 – 76) *	40,5 (19,4 – 62,5) *
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	4,1 (1,25 – 10,9) *	11,45 (9,69 – 29,2)	15,7 (5,29 – 31,9) *	7,1 (2,51 – 15,8) *

The results are expressed as median percentage – minimum (Min) and maximum (Max) of positive cells for a given cell surface marker expression within gated lymphocytes. Symbol (*) represents significant differences at $p < 0.05$ for comparisons between seronegative participants and the HIV infected individuals.

Naïve and effector memory cells

We first assessed the impact of HIV-1 in CD4 and CD8 effector memory cells. Our data showed changes in the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes compartments, demonstrated by the increase in the proportion of intermediated and terminally differentiated cells among HIV-1 infected individuals when compared with uninfected individuals, in our study this finding was more pronounced in the active replication group and it was characterized for the accumulation of the following cells phenotypes profiles: CD28⁻CD95⁺, CD45RA⁻CD62L⁻, CCR7⁻CD62L⁻, CD27⁺CD28⁻ in CD4⁺ and CD8 lymphocytes (Figure. 1B).

The accumulation of effector memory or senescent cells leads to a decrease of lymphocytes in early stages of differentiation. As show in figure 1A, the HIV-1 infected individuals have a diminish in the frequency of naïve cells characterized for the following phenotype cell profiles: CD45RA⁺CD62L⁺, CCR7⁺CD62L⁺, CD28⁺CD57⁻, CD28⁺CD95⁻ in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes; CD45RA⁺/Lym and CD95⁻/Lym in the total lymphocytes population. These data are consistent with previous studies reported in scientific literature.



C Correlation of senescence profiles and CD4 count

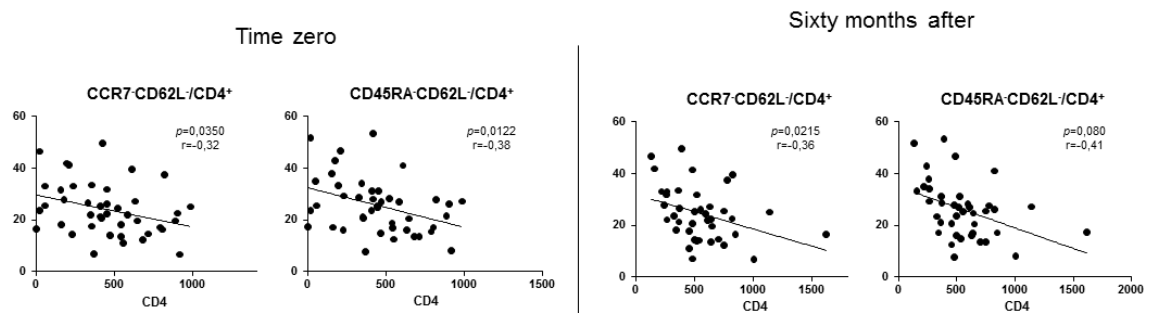


Figure 1 – A, percentage of naïve cells in CD4, CD8 and total lymphocytes. B, percentage of effector memory and terminally differentiated cells in CD4, CD8 and total lymphocytes. C, negative correlation between CCR7⁻CD62L⁻, CD45RA⁻CD62L⁻ and the absolute CD4 values in HIV infected individuals, at time zero on the left and sixty months after on the right.

Expression of senescent markers

The expression of cell surface markers was also evaluated, as the mean fluorescence intensity (MFI) and the phenotypes, in which statistically significant differences were observed, are described below.

We found a decrease in the fluorescence intensity of the CD45RA and CD62L markers in the peripheral blood cells of PLWH. The expression of CD62L was decreased in the RA group, in both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, (median in %: N = 60; SP = 48.35; AR = 42.30 e HAART = 5.35 and N = 37.25; SP = 21.6; AR = 19.9 e HAART = 24.5) (Figure 2C and 2D, respectively) (Figure 2). While the CD45RA expression was decreased only in the CD8⁺ lymphocytes (median in%: N = 182; SP = 130; AR = 104 and ART = 123) (Figure 2B).

On the other hand, it was demonstrated an increase expression of CD95 and PD-1 senescence surfaces markers, in the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes compartments. It was observed an increased in the MFI of CD95 in the AR group when compared with the N group in CD4 lymphocytes (median in%: N = 98,2; SP = 123; AR = 172 and HAART = 146) (Figure 2E) and in the SP, AR and HAART groups in comparison to the N group in CD8 lymphocytes (median in%: N = 52.60; SP = 86.05; AR = 82.70 and ART = 75.70) (Figure 2F). As well the expression of PD-1 was higher in the AR group when compared with the N group in the CD4 compartment (N = 6.93; SP = 8.26; AR = 10.55 and HAART = 10.24 (Figure 2G), and in the RA and HAART groups in comparison to the N group in CD8 cells (median in %: N = 6.2; SP = 12.4; AR = 16.35 and HAART = 7.92) (Figure 2H).

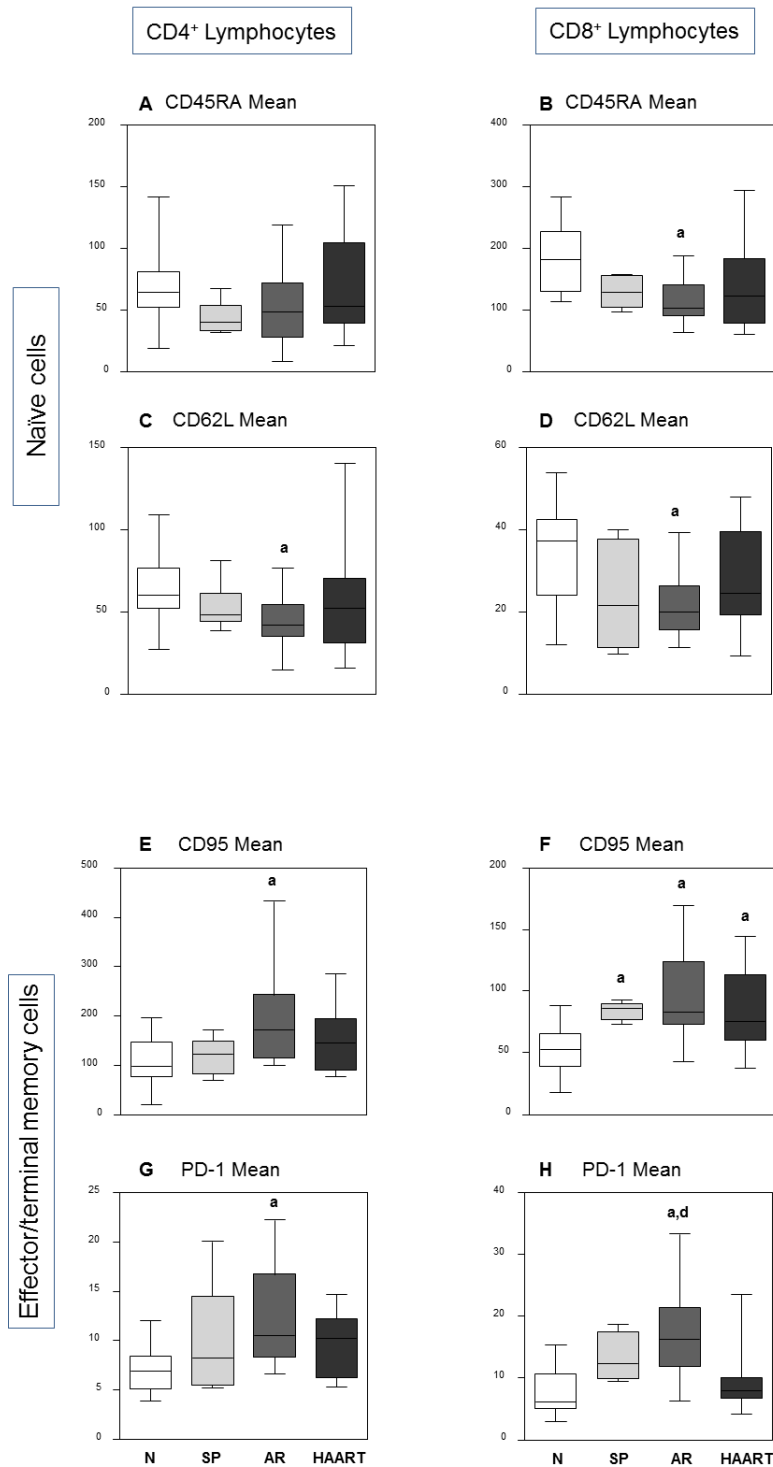


Figure 2 – Expression of senescence surface markers evaluated through the mean fluorescence intensity. In the upper site are the naïve cell phenotypes: A, CD45RA expression on CD4 lymphocytes. B, CD45RA expression on CD8 lymphocytes. C, CD62L expression on CD4 lymphocytes. D, CD62L expression on CD8 lymphocytes. In the lower site are shown the memory and terminal memory cells. E, CD95 expression on CD4 lymphocytes. F, CD95 expression on CD8 lymphocytes. G, PD-1 expression on CD4 lymphocytes. H, PD-1 expression on CD8 lymphocytes.

Correlation between the ex vivo senescent profiles and CD4 count

After the analyses of the frequency of lymphocyte exhaustion markers, was performed correlation analysis between the immunosenescent profiles observed and the absolute and percentage CD4 T lymphocytes at the time of the study and sixty months after. Interestingly, our data demonstrated a negative correlation between the frequency of CCR7⁻CD62L⁻/CD4⁺ and CD45RA⁻CD62L⁻/CD4⁺ cells and the percentage (Table 3) and absolute CD4⁺ T lymphocytes at time zero and 60 months after (Figure 1C). Correlations were also observed between other senescent profiles and the percentage of CD4 T lymphocytes, at time zero and 60 months after. These data are showed in the table 3.

Table 3 – Correlation of senescence profiles and CD4 T lymphocytes count at time zero and sixty months after.

Cell phenotype	CD4% at time zero		CD4% sixty months after	
	Correlation coefficient	<i>p</i> value	Correlation coefficient	<i>p</i> value
CD27 ⁻ CD95 ⁺ /CD4 ⁺	<i>r</i> = -0,47	<i>p</i> = 0,0020	<i>r</i> = -0,43	<i>p</i> = 0,0052
CD28 ⁻ CD95 ⁺ /CD4 ⁺	<i>r</i> = -0,55	<i>p</i> = 0,0003	<i>r</i> = -0,43	<i>p</i> = 0,0027
CD28 ⁻ CD95 ⁺ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,48	<i>p</i> = 0,0022	<i>r</i> = -0,42	<i>p</i> = 0,0094
CCR7 ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	<i>r</i> = -0,53	<i>p</i> = 0,0004	<i>r</i> = -0,53	<i>p</i> = 0,0004
CCR7 ⁻ CD62L ⁻ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,51	<i>p</i> = 0,0010	<i>r</i> = -0,38	<i>p</i> = 0,0195
CD28 ⁻ CCR7 ⁻ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,52	<i>p</i> = 0,0008	<i>r</i> = -0,70	<i>p</i> = 0,0070
CD27 ⁻ PD-1 ⁺ /CD4 ⁺	<i>r</i> = -0,53	<i>p</i> = 0,0020	<i>r</i> = -0,41	<i>p</i> = 0,0220
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,34	<i>p</i> = 0,0037	<i>r</i> = -0,36	<i>p</i> = 0,0293
CD45RA ⁻ CD28 ⁻ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,47	<i>p</i> = 0,0028	<i>r</i> = -0,44	<i>p</i> = 0,0071
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ /CD4 ⁺	<i>r</i> = -0,54	<i>p</i> = 0,0003	<i>r</i> = -0,53	<i>p</i> = 0,0004
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ /CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,41	<i>p</i> = 0,0102	<i>r</i> = -0,41	<i>p</i> = 0,0112
CD95 ⁺ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,60	<i>p</i> < 0,0001	<i>r</i> = -0,61	<i>p</i> < 0,0001
CD27 ⁻ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,53	<i>p</i> = 0,0007	<i>r</i> = -0,46	<i>p</i> = 0,0042
CD28 ⁻ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,65	<i>p</i> < 0,0001	<i>r</i> = -0,63	<i>p</i> < 0,0001
CD57 ⁺ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,42	<i>p</i> = 0,0093	<i>r</i> = -0,40	<i>p</i> = 0,0148
PD-1 ⁺ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,52	<i>p</i> = 0,0007	<i>r</i> = -0,48	<i>p</i> = 0,0023
CCR7 ⁻ CD8 ⁺	<i>r</i> = -0,68	<i>p</i> = 0,0001	<i>r</i> = -0,70	<i>p</i> = 0,0001

DISCUSSION

Much is known about immunosenescence in PLWH in developed countries, but in developing countries, and particularly in Brazil, very little is known about the subject. Furthermore few studies have study the impact of the HIV in the CD4 lymphocytes senescence. Aiming to assess and describe the profile of immunosenescence and exaustation of circulating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in PLWH, as well as assess the possible correlation between the profiles of immunosenescence and the absolute values and percentages of CD4⁺ T lymphocytes in time zero and 60 months after, this study enrolled 46 HIV-1 infected individuals on follow up at a Reference Center for Infectious and

Parasitic Diseases (*Centro de Treinamento e Referência em Doenças infecciosas e Parasitárias-Orestes Diniz*) in Belo Horizonte, Brazil, as well as 20 seronegative individuals.

In our study, the immunosenescence of lymphocytes during HIV infection was characterized by the increase of effector cells in intermediate stages of differentiation; CD27⁺CD28⁻; CD45RA⁻CD62L⁻ on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, and by the increase in the frequency of terminally differentiated cells; CD28⁻CD95⁺; CCR7⁻CD62L⁻ on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. These findings are similar to those reported by several studies which have shown that PLWH present alterations in the cell maturation process, leading to less effective differentiation and consequent accumulation of intermediate and terminally differentiated effector memory cells.^{27,28,31-37} The accumulation of these cells is thought to be a probable pathogenic strategy of the virus, which would prevent these cells from achieving complete effector functions.

The immunophenotypic and functional changes observed during the HIV chronic infection could be consequences of the accelerated process of cell differentiation driven by antigenic stimulation, immune activation and chronic inflammation, which may eventually lead to the exhaustion of the immune system.^{1,3}

On the other hand, the accumulation of effector or senescent cells leads to a decrease of cells in the initial stages of differentiation and more functional subpopulations due to the homeostatic regulation process of the immune system.²⁷ This fact was also observed in our study and characterized for the decrease in the frequency of the following cell phenotypes: CD28⁺CD95⁻ ;

CD45RA⁺CD62L⁺; CCR7⁺CD62L⁺; CD28⁺CD57⁻ on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes.

The decrease of the CD28⁺CD57⁻ cell phenotype was also reported by CAO et al.,²⁷ on CD8 T Cells in a cohort of rapid and non progressors HIV infected individuals. Besides that other studies has report the depletion of *naïve* cells during the HIV chronic infection, but they didn't specify the cell surface phenotypes that are depleted, making it difficult the comparison of the data.^{28,29}

In addition to the frequency and expression analysis of the immunosenescence and lymphocyte exhaustion markers used in this study, a correlation of the characteristic immunosenescence profiles with absolute and percentage values of LTCD4⁺ was performed. Our findings allowed us to show an inversely proportional relationship between the immunosenescence profiles and the percentage of CD4⁺ T lymphocytes at time zero and 60 months after. When analysed the relation between the immunosenescence profiles and the absolute values of CD4⁺ T lymphocytes it was observed that only the CCR7⁻CD62L⁻/CD4⁺ e CD45RA⁻CD62L⁻/CD4⁺ have a statistical significant correlation, presenting a negative relation. These results are analogous to the findings of some studies that have correlated the expression of senesce phenotypes with the CD4 count and the plasmatic viral.^{28,30} At the same time our data differs a little because we didn't see a statistical significant correlation between those cell surface markers and the viral load. This observation supports the detrimental role of these cells in the context of the chronic HIV infection.

In conclusion, our results corroborate that PLWH have a higher frequency of senescent cells. The expansion of terminal cells produces homeostatic contraction of the cells that are less differentiated or in the early

stages of differentiation and which are by inference more functional. Although the use of HAART decreases the activation and chronic inflammation process by decreasing chronic antigenic stimulation related to high levels of plasma viral load, ART is unable to stop the aging process because it is not able to inhibit the persistence of immunological chronic activation and this simultaneously acts accentuating and accelerating the natural and physiological aging process of the immune system. However, some studies have demonstrated the role of ART in the reduction of these cells, and this was also observed in our study, but despite this reduction these patients have a higher risk of developing non-AIDS diseases related to the accumulation of senescent cells. Additionally, our results demonstrated that the expansion of terminally differentiated cells produces a decrease in the percentage and absolute values of CD4⁺ T lymphocytes, showing in this way the harmful role of the immunosenescence in the context of chronic HIV infection

References

1. DEEKS SG: HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med* 2011;62:141-155.
2. DOCK JN, EFFROS RB: Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging Dis* 2011;2:382-397.
3. CHOU, JP, EFFROS, RB: T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des* 2013;19:1680-1698.
4. ABERG, JA: Aging, Inflammation, and HIV. *Topics in Antiviral Medicine* 2012;2:101-105.

5. HEARPS AC, MARTIN GE, ANGELOVICH TA, *et al.*: Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell* 2012;11:867-875.
6. DEEKS SG, LEWIN SR, HAVLIR DV: The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 2013;382:1525-33.
7. DE LEÓN-NARANJO FL: Envejecimiento prematuro y comorbilidades relacionadas con la edad en los pacientes con infección por el VIH. *Monográfico* 2014;1:18-32.
8. BRENCHLEY JM, PRICE DA, DOUEK DC: HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology* 2006;7:235-239.
9. KLATT NR, FUNDERBURG NT, BRENCHLEY JM: Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends in Microbiology* 2013;21:6 -13.
10. PAIARDINI M, MÜLLER-TRUTWIN M: HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev* 2013;254:78–101.
11. RAJASURIAR R, KHOURY G, KAMARULZAMAN A, *et al.*: Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? *AIDS* 2013;27:1199–1208.
12. PAIARDINI M, CERVASI B, DUNHAM R, *et al.*: Cell-Cycle Dysregulation in the Immunopathogenesis of AIDS. *Immunologic Research* 2004;29:253–267.
13. BRENCHLEY JM, DOUEK DC: The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* 2008;3:356–361.
14. SODORA DL, SILVESTRI G: Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 2008;22:439–446.

15. DOUEK DC, ROEDERER M, KOUP RA: Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 2009;60:471–484.
16. SACHDEVA M, FISCHL MA, PAHWA R, *et al.*: Immune Exhaustion Occurs Concomitantly with Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1 Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54:0447–454.
17. CATALFAMO M, WHILHELM C, TCHEUNG L, *et al.*: CD4 and CD8 T Cell Immune Activation during Chronic HIV Infection: Roles of Homeostasis, HIV, Type I IFN, and IL-7. *J Immunol* 2011;186:2106-2116.
18. DEEKS SG, OVERBAUGH J, PHILLIPS A, *et al.*: HIV infection. *Nature Reviews* 2015;1:1–22.
19. APPAY V, ALMEIDA JR, SAUCE D, *et al.*: Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Experimental Gerontology* 2007;42:432-437.
20. CHATTOPADHYAY PK, ROEDERER M: Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T cell subsets important in HIV disease. *Cytometry A* 2010;77:614-622.
21. FANTAUZZI A, FALASCA F, d'ETORRE G, *et al.*: Microbial translocation, residual viremia and immune senescence in the pathogenesis of HIV-1 infection. *World J Clin Infect Dis* 2013;3:47-57.
22. PIRRONE V, LIBON DJ, SELL C, *et al.*: Impact of age on markers of HIV-1 disease. *Future Virol* 2013;8:81-101.
23. HARARI A, VALLELIAN F, PANTALEO G: Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur. J. Immunol* 2004;34:3525–3533.

24. APPAY V, VAN LIER RA, SALLUSTO F, *et al.*: Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. *Cytometry Part A* 2008;73^a:975-983.
25. FÜLÖP T, LARBI A, PAWELEC G: Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in Immunology* 2013;271:1-9,
26. LARBI A, FÜLÖP T: From “Truly Naïve” to “Exhausted Senescent” T Cells: When Markers Predict Functionality. *Cytometry Part A* 2013;85A:25-35 2013.
27. CAO W, JAMIESON BD, HULTIN LE, *et al.*: Premature Aging of T cells Is Associated With Faster HIV-1 Disease Progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50:137–147.
28. MOJUMDAR K, VAJPAYEE M, CHAUHAN KN, *et al.*: Altered T Cell Differentiation Associated with Loss of CD27 and CD28 in HIV Infected Indian Individuals. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2012;82B:43–53.
29. BRETON G, CHOMONT N, TAKATA H, *et al.*: Programmed Death-1 Is a Marker for Abnormal Distribution of Naive/Memory T Cell Subsets in HIV-1 Infection. *J Immunol* 2013;191:2194-2204.
30. DAY CL, KAUFMANN DE, KIEPIELA P, *et al.*: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;443:350-354.
31. APPAY V, NIXON DF, DONAHOE SM, *et al.*: HIV-Specific CD8⁺ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *The JEM* 2000;192:63-75.
32. MUELLER YN. Increased CD95/Fas-Induced Apoptosis of HIV-Specific CD8⁺ T Cells. *Immunity* 2001;15:871-882.

33. APPAY V, PAPAGNO L, SPINA CA, et al.: Dynamics of T Cell Responses in HIV. *J Immunol* 2002;168:3660-3666.
34. CHAMPAGNE P, OGG GS, KING AS, et al.: Skewed maturation of memory HIV specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001;410:106-111.
35. TUSSEY LG, NAIR US, BACHINSKY M, et al.: Antigen Burden Is a Major Determinant of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8⁺T Cell Maturation State: Potential Implications for Therapeutic Immunization. *The Journal of Infectious Diseases* 2003;187:364-74.
36. PALMER BE, BLYVEIS N, FONTENOT AP, et al.: Functional and Phenotypic Characterization of CD57⁺CD4⁺T Cells and Their Association with HIV-1-Induced T Cell Dysfunction. *J Immunol* 2005;175:8415-8423.

13.7. ANEXO 7 – Folha de aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

UFMG

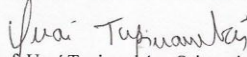
FOLHA DE APROVAÇÃO


“Avaliação de perfis de imunossenescência em células do sangue periférico de pessoas vivendo com HIV (PVHIV)”

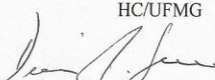
YUPIEL FRANMIL MARTINEZ

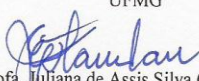
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

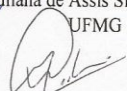
Aprovada em 07 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Unai Tupinambás - Orientador
UFMG


Dra. Maria Luiza Silva - Coorientadora
HC/UFMG


Prof. Dirceu Bartolomeu Greco - Coorientador
UFMG


Profa. Juliana de Assis Silva G Estanislau
UFMG


Prof. Mateus Rodrigues Westin
UFMG

Belo Horizonte, 7 de fevereiro de 2018.