



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Lívia Ramos Góes

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA
A4B7 NA HISTÓRIA NATURAL E NA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DA
INFECÇÃO POR LENTIVÍRUS NO HOMEM E EM MODELOS ANIMAIS**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Soares

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Lívia Ramos Góes

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA
A4B7 NA HISTÓRIA NATURAL E NA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DA
INFECÇÃO POR LENTIVÍRUS NO HOMEM E EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Soares

**RIO DE JANEIRO
2016**

G598a Góes, Livia Ramos.

Aspectos imunológicos e genéticos da expressão da integrina A4B7 na história natural e na intervenção terapêutica da infecção por lentivírus no homem e em modelos animais. / Livia Ramos Góes. – Rio de Janeiro, 2016.

164 f.: il., tab.

Tese (Doutorado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva, 2016.

Orientadores: Marcelo Alves Soares.

1. Integrinas. 2. HIV. 3. Infecção. 4. Mucosa. 5. Lentivírus. I. Soares, Marcelo Alves (orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.079



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

AUTOR: Lívia Ramos Góes

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA
A4B7 NA HISTÓRIA NATURAL E NA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DA
INFECÇÃO POR LENTIVÍRUS NO HOMEM E EM MODELOS ANIMAIS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Soares

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola

Prof. Dra. Anke Bergmann

Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto

Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda

Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino – Suplente I

Prof. Dr. André Felipe Andrade dos Santos – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2016**

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, Ana Paula e Ricardo Góes, por estarem sempre presentes, por não medirem esforços e sempre investirem na minha educação. Muito obrigada por me incentivarem a não desistir dos meus sonhos e a conquistar meus objetivos. Obrigada por me ensinarem a sempre ver o lado positivo das coisas, mesmo quando ele parece não existir.

Ao meu irmão Vitor Góes pelo companheirismo, por estar presente em todos os momentos em que eu não pude estar, especialmente no último ano, segurando todas as barras sem desanimar.

À minha família, em especial aos meus avós Margarida e Hercílio.

Agradeço em especial, ao meu orientador Dr. Marcelo Soares por ter sido sempre presente durante os quase oito anos em que trabalhamos juntos. Obrigada por todas as oportunidades a mim oferecidas, por acreditar no meu trabalho, por todas as discussões. É um prazer poder fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Agradeço ao meu orientador no exterior Dr. James Arthos, por ter me recebido em seu laboratório e possibilitado o desenvolvimento de parte deste trabalho. Por ter confiado no meu trabalho. Por ter me proposto desafios diários durante o período em que participei do seu grupo de pesquisa no NIH. Foi uma experiência incrível e muito enriquecedora.

Ao Dr. Antony Fauci por ter me permitido fazer parte do *Laboratory of Immunoregulation (LIR) – NIAID – NIH*.

À Dra. Claudia Cicala por todo o apoio, ensinamentos e discussões sempre muito ricas.

Ao Dr. Aftab Ansari pela oportunidade de participar de estudos do seu grupo, por toda a sua sabedoria e gentileza, por todas as ideias compartilhadas e discussões.

Agradeço aos membros do LIR, Alison Doyle, Danlan Wei, Donald Van Ryk, Ian Perrone, Jason Yolitz, Katija Jelcic, Mia Waliszewski e Omozuzi Andrews, por terem me recebido tão bem e proporcionado um ambiente de trabalho alegre e agradável.

À equipe do Laboratório de Retrovirologia do *Military HIV Research Program* (MHRP), em especial Dr. Gustavo Kijak, Dra. Sodsai Tovanabutra e Elizabeth Harbolick por terem me recebido nas dependências do laboratório e por terem me ensinado muito.

À professora Ana Lúcia Giannini e seu aluno, Alan Messala que sempre me receberam de portas e sorrisos abertos, e me ajudaram muito, compartilhando informações, discussões, reagentes e experiências.

Aos colaboradores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), em especial ao Dr. Éspér Kallás, Dayane Costa e aos pacientes que fazem parte da coorte deste trabalho.

À Dra. Elizabeth Machado e seus pacientes do IPPMG - UFRJ e HSE.

Às meninas do grupo de oncovirologia do INCA pela convivência diária.

Agradeço em especial à Juliana Domett, Isabel Prellwitz, Brunna Misael, Mariana Ferreira, Mirela D'arc e Valdimara Vieira por todos os momentos bons e ruins que passamos juntas, por todo o apoio e ajuda durante estes quatro anos de convivência diária, por todos os lanchinhos e festinhas. Foi um prazer ter vocês por perto durante esta jornada.

Ao Dr. Hector Seuánez pelo espaço cedido no laboratório e aos pesquisadores e funcionários da divisão de genética do INCA pela ajuda e manutenção da ordem no laboratório.

Agradeço à Dra. Carolina Furtado pela ajuda dentro e fora do laboratório, e pela sua amizade.

Ao meu querido namorado Vinicius Vizzoni, pelo companheirismo, por estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos, obrigada por todas as discussões científicas e experiências compartilhadas durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Ministério da saúde, INCA, Cnpq, NIAID-NIH e MHRP pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original.”

Albert Einstein



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA
A4B7 NA HISTÓRIA NATURAL E NA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA DA
INFECÇÃO POR LENTIVÍRUS NO HOMEM E EM MODELOS ANIMAIS**

RESUMO –TESE DE DOUTORADO

Lívia Ramos Góes

Integrinas são proteínas envolvidas na migração e adesão celular. Estudos recentes mostraram que a integrina $\alpha_4\beta_7$ interage com a proteína gp120 do HIV-1, auxiliando a entrada do vírus na célula hospedeira através de sinapses virológicas. Já foi demonstrada uma maior prevalência do genótipo C-C do SNP rs1449263, localizado na região promotora do gene *itga4* (que codifica a subunidade α_4 da integrina), em pacientes com esclerose múltipla. Estes pacientes apresentam uma alta expressão de integrina, sugerindo o envolvimento deste SNP na superexpressão da mesma. A interação de $\alpha_4\beta_7$ com seu ligante natural, MAdCAM, pode ser uma importante fonte de estímulo, capaz de gerar sinais intracelulares culminando com a ativação de linfócitos T. Diversos estudos tem avaliado o papel da integrina $\alpha_4\beta_7$ na transmissão do HIV em mucosas, bem como a utilização de anticorpos bloqueadores desta proteína como novas terapias para prevenção e tratamento da infecção. Neste sentido, a utilização de primatas não-humanos como modelos de estudo da infecção por SIV/HIV é de suma importância e utilidade. Neste estudo, avaliamos a prevalência dos diferentes genótipos do SNP rs1449263 e o perfil de expressão da integrina α_4 em indivíduos de três coortes diferentes que compreendem adultos HIV⁺ e HIV⁻, e em crianças HIV⁺ ou expostas ao vírus e não-infectadas. A partir de PBMCs foram isolados DNA genômico e RNA para a avaliação dos genótipos encontrados e expressão relativa dos genes *itga4*, *itgb7* e *itgae*. Esta última pode também se ligar a subunidade β_7 e competir com α_4 . Não foram observadas associações entre os genótipos e alelos do SNP estudado e a aquisição do HIV ou progressão para a Aids. Em relação à expressão de *itga4*, indivíduos portadores do alelo C apresentaram maior expressão do que os não-portadores. A expressão de *itgb7* foi compatível com a de *itga4* e o mesmo resultado foi observado por citometria de fluxo. Não foi observada expressão de *itgae* em níveis compatíveis aos de *itgb7*. Aplicando técnicas de cultura celular e citometria de fluxo, mostramos que MAdCAM pode atuar como molécula co-estimulatória de células T CD4⁺ naïves. Apesar deste estímulo não induzir proliferação celular, linfócitos cultivados na presença de MAdCAM são capazes de suportar a replicação do HIV *in vitro*. Este efeito mostrou-se mais intenso quando o estímulo foi realizado em presença de ácido retinóico (que induz a expressão de $\alpha_4\beta_7$) ou anti-CD28, induzindo até mesmo a proliferação dos linfócitos naïves. Através de um estudo com primatas não-humanos infectados com SIV e tratados com antirretrovirais em combinação ou não com anti- $\alpha_4\beta_7$, pretendemos utilizar o sequenciamento de nova geração para avaliar a dinâmica das populações virais ao longo da infecção mediante os diferentes tratamentos administrados. Nesta tese, validamos os protocolos necessários para a execução deste projeto, mostrando que protocolos desenvolvidos para o sequenciamento de HIV podem ser adaptados e utilizados para o estudo de SIV. Os resultados desta tese destacam a importância da integrina $\alpha_4\beta_7$ na infecção por HIV sob diferentes aspectos como impacto clínico, estabelecimento de infecção em mucosas e possível alvo terapêutico.



IMMUNOLOGICAL AND GENETIC ASPECTS OF INTEGRIN A4B7 EXPRESSION IN THE NATURAL HISTORY AND IN THERAPEUTIC INTERVENTIONS OF LENTIVIRAL INFECTIONS IN HUMANS AND IN ANIMAL MODELS

ABSTRACT –TESE DE DOUTORADO

Integrins are transmembrane glycoproteins found in many vertebrate cell types. Recent studies show that HIV gp120 can bind the $\alpha_4\beta_7$ integrin, providing a favorable environment for virus transmission between cells. $\alpha_4\beta_7$ is a homing molecule to the gut-associated lymphocyte tissue (GALT). This protein has an important role during the initial course of HIV infection, since intense viral replication and lymphocyte depletion is observed in the GALT during this phase. A higher prevalence of the C-C genotype in the SNP rs1449263, located in the promoter region of the *itga4* gene (that encodes α_4 integrin), has been shown in multiple sclerosis patients, possibly related to a higher expression of this gene. The interaction between $\alpha_4\beta_7$ and its natural ligand MAdCAM can lead to cell activation, promoting proliferation of T lymphocytes. Several studies highlight the role of $\alpha_4\beta_7$ in the mucosal transmission of HIV as well as its possible use as a target for HIV prevention and antiviral therapy. Studies with non-human primates are useful in this field, as these animals have similarities with humans and can be infected with SIV. In the present study, we assessed the prevalence of different SNP rs1449263 genotypes in three different cohorts harboring HIV⁺ and HIV⁻ adults, as well as HIV⁺ or exposed-uninfected children. SNP genotyping and gene expression analysis were carried out from DNA and RNA isolated from PBMCs. No association between SNP genotype and HIV acquisition or progression to AIDS was observed in the cohorts. With respect to *itga4*, *itgb7* (β_7) and *itgae* (α_E) gene expression, a higher level of *itga4* mRNA was observed in allele C carriers, compared to non-carriers. The *itgb7* expression was compatible to *itga4* levels and this result was confirmed by cell surface expression through flow cytometry. In some cases, the *itgb7* levels were higher than *itga4*, raising the question whether β_7 could be pairing with its other partner, α_E , but *itgae* levels were too low, and not compatible with *itgb7* levels. Using T cell culture with different ligands and flow cytometry, we showed that MAdCAM can act as a co-stimulatory molecule on CD4⁺ naïve T cells. Despite the lack of cell proliferation under these conditions, naïve T lymphocytes cultured in presence of MAdCAM supported HIV replication *in vitro*. This effect was even more pronounced when retinoic acid (which upregulates $\alpha_4\beta_7$ expression) or anti-CD8 was added to the culture, and in this case cell proliferation was observed. In a study using non-human primates infected with SIV and treated to antiretroviral therapy (ART) in combination or not with anti- $\alpha_4\beta_7$ monoclonal antibody, some of the anti- $\alpha_4\beta_7$ treated animals were able to control viral replication when ART was discontinued. With this in mind, we aim to assess the viral population dynamics along the infection. This analysis will be done by next-generation sequencing (NGS). In this Thesis, we describe a protocol to be used with SIV samples, that was adapted and tested from two different protocols designed to HIV NGS sequencing. The results of this Thesis highlight the importance of integrin $\alpha_4\beta_7$ in HIV infection in different aspects such as clinical impact, establishment of infection in mucosal tissues and its use as a possible therapeutic target.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA AIDS	24
1.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO HIV	25
1.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HIV	27
1.3.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV E SEUS PRODUTOS GÊNICOS	27
1.3.2. A PARTÍCULA VIRAL	30
1.3.3. CICLO REPLICATIVO	32
1.4. HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO POR HIV	35
1.5. O GALT.....	37
1.6. INTEGRINAS	40
1.6.1. A INTEGRINA $\alpha_4\beta_7$	43
1.6.2. A INTEGRINA A4B7 E O HIV	45
1.7. A TRANSMISSÃO DO HIV EM MUCOSAS	49
1.8. MODELOS ANIMAIS DE ESTUDO DO HIV	57
2. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DA TESE.....	61
3. OBJETIVO PRINCIPAL	62
4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA A4 E ASSOCIAÇÃO COM DADOS GENOTÍPICOS.....	62

4.1.	OBJETIVOS	63
4.2.	METODOLOGIA	64
4.2.1.	EXTRAÇÃO DE PBMC	64
4.2.2.	EXTRAÇÃO DE DNA E RNA.....	65
4.2.3.	QUANTIFICAÇÃO DO DNA E RNA EXTRAÍDOS	65
4.2.4.	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA	66
4.2.5.	SÍNTESE DE CDNA	66
4.2.6.	DETECÇÃO DO SNP RS1449263 NO PROMOTOR DE <i>ITGA4</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	66
4.2.7.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	67
4.2.8.	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR.....	68
4.2.9.	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	68
4.2.10.	ANÁLISE DE EXPRESSÃO.....	69
4.2.11.	MARCAÇÃO DE PBMC PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	70
4.2.12.	CITOMETRIA DE FLUXO.....	71
4.2.13.	ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E ESTATÍSTICAS.....	72
4.3.	RESULTADOS.....	72
4.3.1.	ANÁLISE DO SNP RS1449263 NO PROMOTOR DO GENE <i>ITGA4</i> 72	
4.3.2.	EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE <i>ITGA4</i> NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP RS1449263.....	76
4.3.3.	EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>ITGB7</i> E <i>ITGAE</i>	79

4.3.4. EXPRESSÃO DE A4B7 NA SUPERFÍCIE CELULAR EM DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP RS1449263	83
4.3.5. ASSOCIAÇÃO DE DADOS GENÉTICOS COM DADOS CLÍNICOS	85
5. ESTÍMULO DE CÉLULAS T CD4 ⁺ A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE A ₄ B ₇ E MADCAM.....	92
5.1. OBJETIVOS	92
5.2. METODOLOGIA	93
5.2.1. IMOBILIZAÇÃO DE PLACA COM LIGANTES.....	93
5.2.2. EXTRAÇÃO DE PBMC.....	93
5.2.3. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	94
5.2.4. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ NAÏVE (CD45RO ⁻)	95
5.2.5. FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS PURIFICADAS	96
5.2.6. MARCAÇÃO DE CÉLULAS COM CFSE E ENSAIO DE PROFILERAÇÃO CELULAR	97
5.2.7. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	98
5.2.8. ENSAIO DE INFECÇÃO VIRAL.....	99
5.2.9. MEDIÇÃO DE P24 POR ALPHALISA.....	99
5.3. RESULTADOS.....	100
5.3.1. RESULTADOS PRÉVIOS.....	100
5.3.2. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ NAÏVE VIA MADCAM NÃO É CAPAZ DE INDUZIR ALTOS NÍVEIS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	104
5.3.3. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ NAÏVE VIA MADCAM INDUZ REPLICAÇÃO VIRAL	107

5.3.4. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+ NAÏVE VIA MADCAM INDUZ CICLO CELULAR	109
6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO TDS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-A4B7 EM MACACOS RESOS INFECTADOS POR SIV	112
6.1. OBJETIVOS	115
6.2. METODOLOGIA	116
6.2.1. DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES	116
6.2.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	117
6.2.3. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL	117
6.2.4. SÍNTESE DE CDNA	118
6.2.5. AMPLIFICAÇÃO DE CDNA POR PCR MULTIPLEX (1° <i>ROUND</i>) .	118
6.2.6. SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO DE CDNA POR PCR (2° <i>ROUND</i>) ...	119
6.2.7. TITULAÇÃO DO CDNA	120
6.2.8. SÍNTESE DE CDNA PARA A PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS .	120
6.2.9. PRIMEIRA ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO PARA BIBLIOTECAS (1° <i>ROUND</i> MULTIPLEX).....	121
6.2.10. SEGUNDA ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO PARA BIBLIOTECAS (2° <i>ROUND</i>)	121
6.2.11. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE COM CRISTAL VIOLETA	122
6.2.12. NORMALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	123

6.2.13. ADIÇÃO DE ÍNDICES PARA SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA.....	124
6.2.14. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS EM BIOANALYZER.....	124
6.3. RESULTADOS.....	125
6.3.1. DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES.....	125
6.3.2. TITULAÇÃO DO CDNA.....	130
6.3.3. AMPLIFICAÇÃO DE CDNA PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS.....	133
6.3.4. PURIFICAÇÃO DA PCR.....	134
6.3.5. NORMALIZAÇÃO, ADIÇÃO DE ÍNDICES E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS.....	136
7. DISCUSSÃO.....	138
8. CONCLUSÕES.....	149
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Iniciadores utilizados nas PCR e nas reações de sequenciamento...	67
Tabela 4.2 Frequência dos diferentes alelos para o SNP rs1449263 nas diferentes coortes estudadas	76
Tabela 5.1 Anticorpos utilizados na marcação de células para fenotipagem.	97
Tabela 6.1 . Iniciadores desenvolvidos para amplificação das regiões virais V1/V2, V3 e V4/V5	125
Tabela 6.2 Combinações de iniciadores utilizadas para validação dos mesmos	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estimativa de pessoas vivendo com HIV ao redor do mundo	25
Figura 1.2 Organização genômica e função dos produtos gênicos do HIV-1.....	28
Figura 1.3 Estrutura de uma particular de HIV-1 madura	31
Figura 1.4 Ilustração do ciclo replicativo do HIV-1.....	33
Figura 1.5 História natural da infecção por HIV	36
Figura 1.6 Organização do GALT	39
Figura 1.7 Organização das integrinas na membrana celular	41
Figura 1.8 Diferentes estados de afinidade das integrinas.....	42
Figura 1.9 Estrutura do heterodímero.....	44
Figura 1.10 Esquema mostrando a interação da gp120 do HIV-1 com a integrina $\alpha_4\beta_7$	46
Figura 1.11 Ilustração da integrina $\alpha_4\beta_7$	47
Figura 1.12 Barreiras fisiológicas do trato reprodutor feminino - TRF (A) e trato gastrointestinal (B)	51
Figura 1.13 Disponibilidade de células-alvo e produção de vírus por células T CD4 ⁺ em repouso e ativadas durante a transmissão do vírus.....	52
Figura 1.14 Esquema mostrando o papel fundamental de $\alpha_4\beta_7$ no rolamento e adesão de linfócitos ao longo das vênulas endoteliais.....	55
Figura 1.15 O esquema mostra exemplos de moléculas coestimulatórias	57
Figura 1.16 Mecanismos de restrição de células-alvo em hospedeiros naturais do SIV	60

Figura 4.1 Gel de eletroforese representativo das amostras amplificadas para o SNP rs1449263.....	73
Figura 4.2 Cromatogramas representativos dos genótipos para o SNP rs1449263.	74
Figura 4.3 Distribuição dos genótipos para o SNP rs1449263 nos diferentes grupos estudados.....	75
Figura 4.4 Expressão relativa do gene <i>itga4</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos para o SNP rs1449263.	77
Figura 4.5 Expressão relativa do gene <i>itga4</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.....	78
Figura 4.6 <i>Fold change</i> da expressão relativa do gene <i>itga4</i> para indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos para o SNP rs1449263.	79
Figura 4.7 Expressão relativa do gene <i>itga4</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.....	80
Figura 4.8 Expressão relativa do gene <i>itgb7</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.....	81
Figura 4.9 Expressão relativa do gene <i>itgae</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.	82
Figura 4.10 Expressão relativa do gene <i>itgae</i> em relação ao gene endógeno <i>gapdh</i> para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.....	82
Figura 4.11 Gráfico de dispersão mostrando controles	83
Figura 4.12 Gráfico de dispersão mostrando células de indivíduos representativos dos diferentes genótipos para o SNP rs1449263 marcadas com ACT-1.	84
Figura 4.13 Histograma mostrando células de indivíduos dos diferentes genótipos marcadas com ACT-1	85

Figura 4.14 Box plots com valores de carga viral do HIV (A) e contagem de células T CD4 ⁺ (B) para indivíduos carregando diferentes genótipos para o SNP rs1449263.	86
Figura 4.15 Contagem de células T CD8 ⁺ para indivíduos carregando diferentes genótipos para o SNP rs1449263.	87
Figura 4.16 Contagem de células T CD8 ⁺ para indivíduos dos grupos de portadores (Sim) ou não (Não) do alelo C para o SNP rs1449263	88
Figura 4.17 Contagem de células T CD8 ⁺ para indivíduos dos grupos de portadores (Sim) ou não (Não) do alelo T para o SNP rs1449263.....	89
Figura 4.18 Análise de sobrevida livre de tratamento (Kaplan-Meier) para pacientes portando os diferentes genótipos do SNP rs1449263.....	90
Figura 4.19 Análise de sobrevida livre de tratamento (<i>Kaplan-Meier</i>) para os portadores de diferentes alelos do SNP rs1449263.	91
Figura 5.1 A) Replicação do HIV em linfócitos T CD4 ⁺ estimulados apenas com anti-CD3, ou em combinação MAdCAM na presença de anticorpos monoclonais controle (ctrl mAb), e anti- $\alpha_4\beta_7$ (mAb $\alpha_4\beta_7$). B) Resultados do AlphaLISA p24 de 7 doadores diferentes avaliados. C) Dot plot representativo da marcação de p24 intracelular em linfócitos T CD4 ⁺ estimulados sob as mesmas condições apresentadas em A.....	102
Figura 5.2 A) Resultado representativo da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ estimulados com anti-CD3 em combinação ou não com MAdCAM na presença, ou não, de anticorpos monoclonais controle (ctrl mAb), e anti- $\alpha_4\beta_7$ (mAb $\alpha_4\beta_7$). B) Análise representativa da expressão de CD45RO por citometria de fluxo, após 5 dias de estímulo com anti-CD3, ou em combinação com MAdCAM. C) Resultado da análise de proliferação celular realizada com amostras de cinco doadores.	103
Figura 5.3 A) Resultado representativo da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁻ estimulados com diferentes combinações de moléculas co-estimulatórias. B) Resultado da análise de proliferação celular realizada com amostras de quatro	

doadores. C) Análise representativa da expressão de β_7 (eixo Y) por citometria de fluxo, após 5 dias de estímulo com anti CD3 + MAdCAM, na presença de RA ou anti-CD28 106

Figura 5.4 Resultado da análise de replicação viral para os seis doadores avaliados. Todos os doadores foram submetidos aos estímulos com anti-CD3, anti-CD3 + MAdCAM, anti-CD3 + MAdCAM + RA, anti-CD3 + anti-CD8, e anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD8. Para os doadores 4 e 5 também foi incluído o estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD8 + RA..... 108

Figura 5.5 A) Histograma representativo com sobreposição da análise de ciclo celular para as diferentes condições avaliadas. B) Porcentagem de células na fase S do ciclo celular para cada condição avaliada.. 110

Figura 5.6 A) Histograma representativo com sobreposição da análise de ciclo celular para as diferentes condições avaliadas. B) Porcentagem de células na fase S do ciclo celular para cada condição avaliada. 111

Figura 6.1 Esquema mostrando o desenho do estudo e tratamento administrado nos animais avaliados 113

Figura 6.2 Carga viral plasmática do SIV mensurada nos diferentes animais ao longo do tempo. A) Valores de carga viral em escala logarítmica para animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$. B) Valores de carga viral em escala linear para animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$ da semana 18 a 48. C) Valores de carga viral em escala logarítmica para animais-controle 114

Figura 6.3 Disposição das reações de PCR em placas de 96 poços 117

Figura 6.4 Gel de eletroforese representativo da PCR de validação de iniciadores. 128

Figura 6.5 Esquema da estratégia de amplificação utilizada..... 129

Figura 6.6 Gel de eletroforese representativo da PCR (2^o round) de validação de iniciadores a partir de cDNA..... 130

Figura 6.7 Gel de eletroforese da titulação do cDNA (2 ^o round).....	131
Figura 6.8 Esquema ilustrando os cálculos e procedimentos realizados a partir dos resultados obtidos na titulação do cDNA.....	133
Figura 6.9 Gel de eletroforese da amplificação do cDNA (2 ^o round).....	134
Figura 6.10 Gel de eletroforese do material purificado.....	135
Figura 6.11 Gel de eletroforese resultante da corrida do <i>Bionalyzer</i>	136
Figura 6.12 Eletroferogramas resultantes da corrida do <i>Bionalyzer</i>	137

Lista de Abreviaturas

ART - *Antiretroviral Therapy*

CA – Proteína do capsídeo viral

CCR5 – Receptor de quimiocina CC do tipo 5

cDNA – DNA complementar

CD3 - Grupamento de diferenciação 3

CD4 – Grupamento de diferenciação 4

CD8 – Grupamento de diferenciação 8

CD28 – Grupamento de diferenciação 28

CD45 - Grupamento de diferenciação 45

CDC – *Center for Diseases Control and Prevention* – EUA

CFSE - *5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*

CXCR4 – Receptor de quimiocina CXC do tipo 4

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal

HAART –*Highly Active Antiretroviral Therapy*

HBS - HEPES Buffered Saline

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSH – Homens que fazem sexo com homens

HTLV – Vírus T-linfotrópico humano

IN – Integrase

Kb – quilobase

LFA-1 – Antígeno Associado à Função de Linfócitos 1

LSM - *Lymphocyte Separation Medium*

LTR – Repetições Terminais Longas

MA – Proteína de matriz viral

mAb – Anticorpo monoclonal

MAdCAM-1 –*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1*

MHC – Molécula de histocompatibilidade

mL – mililitro

µL – microlitro

mM – milimolar

mm³ – milímetro cúbico

min – minuto

NC – Proteína do nucleocapsídeo viral

ng – nanograma

NK –*Natural Killer*

nm – nanômetro

pb – pares de base

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIC – Complexo pré-integrativo

pmol – picomol

PR – Protease

RA – Ácido retinóico

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

rpm – rotações por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RT – Transcriptase Reversa

seg – segundo

SIV – Vírus de imunodeficiência Símia

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

UNAIDS – Organização das Nações Unidas para a Aids

UV – Ultravioleta

V - Volts

VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VLA – *Very Late Antigen*

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA AIDS

Descoberta em 1981, a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) foi inicialmente observada através da incidência de infecções raras em indivíduos homossexuais em Los Angeles e Nova Iorque, nos Estados Unidos. Infecções por *Candida albicans* e neoplasias como sarcoma de Kaposi eram observadas exclusivamente em pacientes com imunossupressão severa (GOTTLIEB *et al.*, 1981; MASUR *et al.*, 1981). A existência destes casos levantou a hipótese da ocorrência de alguma disfunção imune relacionada a algum fator comum a estes indivíduos e que os deixava vulneráveis a infecções oportunistas.

No início da epidemia, a doença era majoritariamente relatada em homens que fazem sexo com homens (HSH) e usuários de drogas via parenteral. Com o passar dos anos foram relatados novos casos da doença, e esta já acometia indivíduos submetidos à transfusão sanguínea ou de hemoderivados (JETT *et al.*, 1983), caracterizando sua transmissão por contato com fluidos corporais contaminados, tanto por via parenteral como sexual.

Em 1983, Barre-Sinoussi e colaboradores isolaram e caracterizaram o agente etiológico da Aids (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983). A detecção de atividade de uma transcriptase reversa mostrava que o agente em questão se tratava de um retrovírus. Neste mesmo estudo foi mostrada a similaridade deste retrovírus com o HTLV (do inglês, *Human T-cell Leukemia Virus*). No mesmo ano, Gallo e colaboradores também isolaram o vírus de um paciente com Aids e a ele deram o nome de HTLV- III (GALLO *et al.*, 1983). Em 1984, outros grupos isolaram o vírus em pacientes com Aids (LEVY *et al.*, 1984; POPOVIC *et al.*, 1984). Em 1986 foi definido consensualmente denominar o vírus da Aids de vírus da imunodeficiência humana – HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*.

Desde sua descoberta até os dias de hoje, a Aids continua sendo um motivo de grande preocupação para a saúde pública mundial. O último boletim da Organização das Nações Unidas para a Aids, divulgado em 2015, estima que até o final de 2014, 36,9 milhões de pessoas viviam com HIV/Aids no mundo. Deste total, 2 milhões de indivíduos foram infectados somente em 2014 e 1,2 milhões foram vítimas fatais da

doença naquele mesmo ano. Ao analisarmos países em desenvolvimento, a situação pode ser ainda mais alarmante. A região da África sub-Saariana abriga apenas 12% da população mundial, porém nela encontram-se cerca de 70% dos infectados e 70% das novas infecções mundiais, evidenciando a distribuição heterogênea do vírus ao redor do mundo (Fig. 1.1) (UNAIDS, 2015).

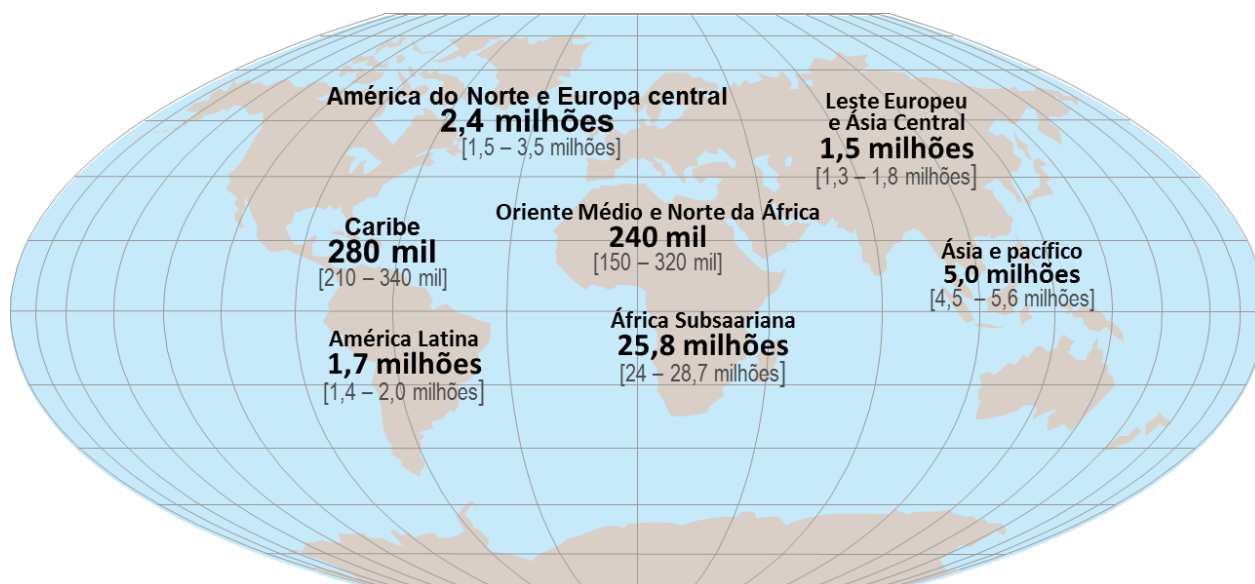


Figura 1.1 Estimativa de pessoas vivendo com HIV ao redor do mundo (extraído e modificado de UNAIDS, 2015).

Em relação à epidemia no Brasil, desde sua descoberta no início dos anos 80, estima-se que o HIV tenha infectado mais de 700 mil pessoas até junho de 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Conforme observado no mundo, as infecções encontram-se distribuídas de forma heterogênea ao longo do país, sendo a região Sudeste a que apresenta maior número de casos, 429.227 (61% de todos os casos do país), seguida pela região Sul, com 159.898 casos notificados (23%). Neste mesmo período foram notificados mais de 290 mil óbitos por HIV/Aids no Brasil.

1.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO HIV

O HIV pertence à família *Retroviridae*, e como característico desta família, apresenta seu material genético na forma de RNA viral, que deve ser retrotranscrito em

um DNA complementar, pela ação da enzima transcriptase reversa, para que possa então ser integrado ao genoma da célula hospedeira (COFFIN *et al.*, 1997).

Dentro da família *Retroviridae*, o HIV é membro do gênero *Lentivirus*. Os lentivirus são caracterizados por provocarem infecções com sintomatologia lenta em seu hospedeiro. O HIV pode ser classificado em dois tipos genéticos distintos, embora pertencentes ao mesmo gênero, HIV-1 e HIV-2 (CAVALLO & CAVALLO, 1986). Dentre os retrovírus, podemos destacar ainda os vírus da imunodeficiência símia – SIV (do inglês *simian immunodeficiency virus*), que infectam símios (primatas evolutivamente mais próximos aos humanos) *in natura* (TAKEMURA *et al.*, 2005) e diferem do HIV em alguns aspectos como organização genômica e relações filogenéticas. Além disto, os SIV parecem não induzir Aids em seus hospedeiros naturais, salvo em alguns casos (GORDON *et al.*, 2005).

Transmissões zoonóticas distintas a partir de primatas não-humanos originaram o HIV-1 e o HIV-2, ambos capazes de induzir Aids no homem. O HIV-2 apresenta maior similaridade filogenética com o SIVsm, que infecta mangabeis fuligentos africanos (*Cercobus atys*) (GAO *et al.*, 1992), ao passo que o HIV-1 apresenta maior proximidade filogenética com o SIVcpz que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) (GAO *et al.*, 1998;KEELE *et al.*, 2006). Os humanos não são os hospedeiros naturais do HIV. Acredita-se que o contato macaco-homem, através de práticas como caça e preparo de carnes destes animais para fins alimentícios, e até mesmo pela captura como mascotes, tenha sido responsável pela transmissão do vírus para humanos. Já foi mostrado que indivíduos HIV negativos que mantinham contato com fluidos de símios apresentavam infecção com diferentes variantes de SIV, evidenciando que é possível a transmissão de SIV para humanos (WOLFE *et al.*, 2004;KALISH *et al.*, 2005).

O HIV-1 possui grande variabilidade genética conferida pela alta taxa de replicação viral e ausência de atividade revisora da enzima transcriptase reversa. Esta variabilidade permite que o vírus seja classificado em 4 grupos distintos: grupo M (principal - do inglês *major*), responsável pela pandemia; O (externo – do inglês *outlier*), encontrado na África Central, principalmente na República dos Camarões, onde se encontra em baixa prevalência; N (não-M/não-O ou novo), presente em poucos

infectados na República dos Camarões; e P, caracterizado em 2009 em uma camaronesa vivendo na França (THOMSON *et al.*, 2002; PLANTIER *et al.*, 2009).

Ainda de acordo com a diversidade genética, o grupo M pode ser classificado nos subtipos A-D, F-H, J e K (ROBERTSON *et al.*, 2000). Alguns subtipos como A e F apresentam-se ainda em sub-subtipos como A1 a A5 e F1 e F2. Estas diferenças entre os tipos e subtipos do HIV podem ser observadas não só no caráter filogenético, mas também nas características biológicas de transmissão e progressão para a Aids (PEETERS & SHARP, 2000). Outra importante fonte de diversidade genética é o evento de recombinação que pode ocorrer entre os diferentes subtipos do HIV-1 (MANSKY & TEMIN, 1995).

1.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HIV

1.3.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV E SEUS PRODUTOS GÊNICOS

O genoma do HIV é formado por duas fitas de RNA de polaridade positiva, de aproximadamente 9,5 kb cada (WAIN-HOBSON *et al.*, 1985), unidas na forma de um dímero por suas extremidades 5'. Estas moléculas são transcritas e processadas pela maquinaria celular, e por isso, assim como os RNAs mensageiros eucarióticos, são capeadas (adição de 7-metil-guanosina) na porção 5' e poliadeniladas na porção 3' (BROWN *et al.*, 1991). O genoma viral apresenta diversas fases abertas de leitura (ORFs – do inglês *open reading frames*) e é flanqueado por duas repetições longas terminais (LTRs) não-codificantes.

As moléculas de RNA do HIV-1 codificam 9 genes (Fig. 1.2), que podem ser divididos em 3 grupos: genes essenciais (*gag*, *pol* e *env*), genes regulatórios (*tat* e *rev*), e genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) (WAIN-HOBSON *et al.*, 1985). As regiões LTR possuem sítios que são reconhecidos pela enzima viral integrase e desta forma são essenciais para o processo de integração no genoma da célula hospedeira. Além disso, nestas regiões são encontrados sítios de ligação para fatores transcricionais celulares (FREED, 2001).

As proteínas estruturais p17 da matriz (MA), p24 do capsídeo (CA), p7 do nucleocapsídeo (NC) e p6 são codificadas pelo gene *gag* e são traduzidas na forma de uma poliproteína precursora Gag (Pr55). Esta poliproteína é direcionada à face interna da membrana celular, onde ocorrerá a montagem e brotamento de novas partículas virais. Partículas virais em brotamento carregam a proteína Gag imatura, até que esta é clivada pela protease viral, originando partículas virais e proteínas maduras (FREED, 2001).

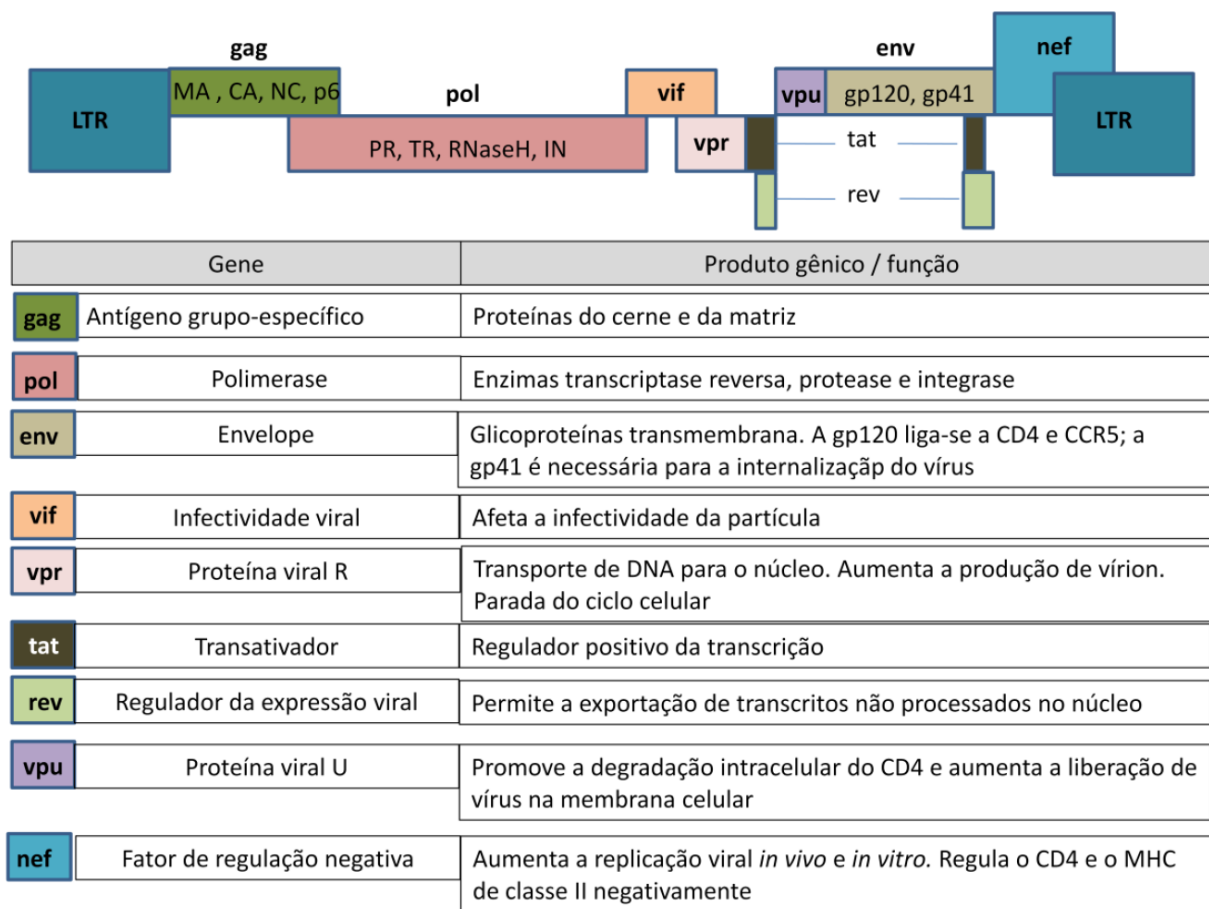


Figura 1.2 Organização genômica e função dos produtos gênicos do HIV-1. (Extraído e modificado de Janeway, 5ª ed 2002).

A proteína Pol, codificada pelo gene *pol*, é transcrita e traduzida junto com o precursor Gag, formando uma poliproteína Gag-Pol (Pr160). Após a clivagem pela protease viral, estas poliproteínas são separadas e o produto do gene *pol* originará as

proteínas p10 protease (PR), p66 transcriptase reversa (RT) e p32 integrase (IN), fundamentais ao ciclo replicativo do HIV.

O gene *env* codifica a proteína gp160 (Env), uma poliproteína que, após clivagem no retículo endoplasmático da célula hospedeira, originará as proteínas que compõe o envelope viral, gp120 e gp41. A proteína de envelope apresenta um domínio transmembrana e um externo, que a deixa exposta e permite sua interação com receptores nas células do hospedeiro, promovendo o reconhecimento e a entrada do vírus na célula.

O gene *tat* codifica a proteína transativadora (Tat), que se liga ao RNA viral e a outras proteínas da célula hospedeira, o que induz a hiperfosforilação do domínio C-terminal da RNA polimerase II celular. Esta mudança é responsável por aumentar a afinidade da RNA pol II pelo promotor viral, aumentando a taxa de transcrição do genoma viral (PUMFERY *et al.*, 2003). O gene *rev* codifica uma proteína com o mesmo nome (Rev), capaz de se ligar ao RNA mensageiro viral permitindo sua exportação para o citoplasma sem que este seja submetido ao processamento (*splicing*) por proteínas celulares, desta forma regulando a transição da replicação viral de uma fase precoce para uma tardia (MALIM *et al.*, 1989).

O HIV-1 possui ainda quatro genes que codificam proteínas chamadas acessórias, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*. Os produtos destes genes apresentam funções variadas. Vif é um fator de infectividade viral capaz de induzir degradação de fatores de restrição celular às infecções virais como as proteínas APOBEC3G e APOBEC3F, aumentando a infectividade da partícula viral e a replicação viral (ZHENG *et al.*, 2004). Incorporada na partícula viral, a proteína viral R (Vpr) atua em estágios iniciais do ciclo replicativo do HIV (SELIG *et al.*, 1999). A ausência de Vpr na partícula viral eleva a taxa de mutação viral em quatro vezes, evidenciando seu papel na fidelidade da transcrição reversa (MANSKY, 1996). Esta proteína também atua no transporte do DNA viral para o núcleo (POPOV *et al.*, 1998; LE ROUZIC *et al.*, 2002) e possui um papel citotóxico, alterando a regulação de fatores que controlam o ciclo celular e o potencial transmembrana de mitocôndrias (JACOTOT *et al.*, 2000). A proteína Vpu apresenta duas funções principais, ela atua na degradação intracelular de CD4 e auxilia o brotamento de

partículas virais na membrana da célula infectada (BOUR & STREBEL, 2003). Estas duas funções ocorrem de maneiras distintas e envolvem diferentes domínios desta proteína (GERAGHTY & PANGANIBAN, 1993). Algumas mutações em Vpu podem comprometer o brotamento do HIV, acarretando na formação de aglomerados de partículas virais no interior da célula infectada (KLIMKAIT *et al.*, 1990).

O fator de regulação Nef aumenta a replicação viral e auxilia as células infectadas na evasão do sistema imune hospedeiro, regulando negativamente proteínas da membrana celular como CD4 e MHC de classe II (SCHWARTZ *et al.*, 1996; XU *et al.*, 1999).

1.3.2. A PARTÍCULA VIRAL

A partícula viral madura do HIV (FIG. 1.3) possui aproximadamente 100-120 nm e formato icosaédrico (GOTO *et al.*, 1994). Esta partícula é formada por estruturas básicas: envelope, matriz e complexo nucleocapsídeo. A camada mais externa desta partícula é o envelope viral, presente em todos os membros da família *Retroviridae* (COFFIN *et al.*, 1997), e apresenta natureza lipoproteica proveniente da membrana plasmática celular capturada durante o brotamento da partícula viral (GOTO *et al.*, 1994). Nesta camada estão presentes proteínas da membrana celular hospedeira como moléculas de MHC (OTT, 1997) e as glicoproteínas virais gp120 (de superfície) e gp41 (transmembrana) (NAKAI & GOTO, 1996). As proteínas de envelope têm sido amplamente estudadas como potenciais alvos para novas terapias e desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV.

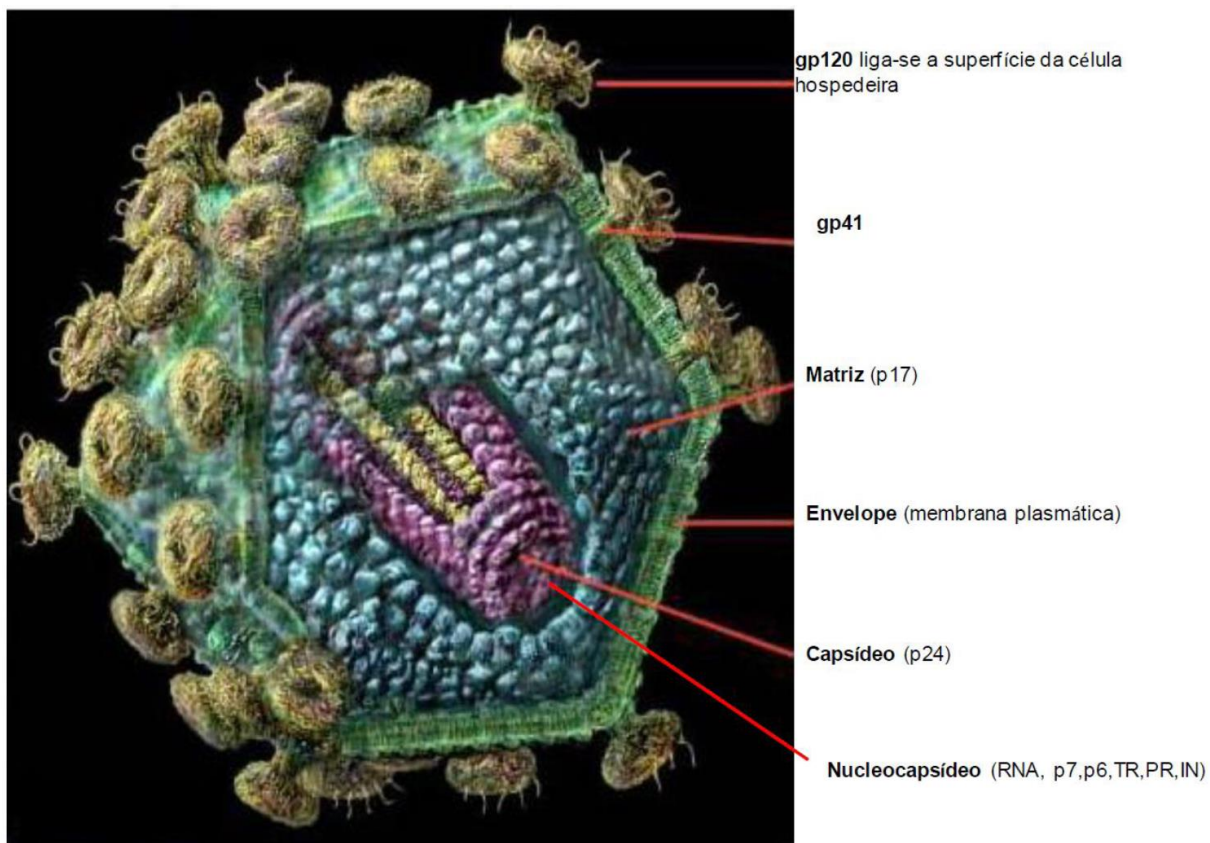


Figura 1.3 Estrutura de uma partícula de HIV-1 madura. (Extraída e modificada de Russell Kightley Media www.rkm.com.au)

Interna ao envelope encontra-se a matriz (MA). Esta proteína estrutural, codificada pelo gene *gag* e organizada em forma de trímeros, é responsável por conferir o formato icosaédrico à partícula viral madura (HILL *et al.*, 1996). Sob a matriz encontra-se uma estrutura cônica, formada pela proteína p24 (CA), o capsídeo. Dentro desta estrutura estão elementos que, juntos, compõem o nucleocapsídeo: duas fitas simples de RNA, altamente condensadas pelas proteínas p7 (NC) p6 e as proteínas codificadas pelo gene *pol*, protease, transcriptase reversa e integrase (SCARLATA & CARTER, 2003). No interior do complexo encontramos ainda algumas proteínas acessórias (Vpr, Vpu, Nef) (KNIPE, 2001) e um RNAt celular carreador de lisina (RNAt 1,2 lisil), que funcionará como iniciador da retrotranscrição em um novo ciclo infeccioso (ISEL *et al.*, 1995).

1.3.3. CICLO REPLICATIVO

O receptor celular do HIV é a molécula de CD4. Desta forma, células do sistema imune que expressam estas moléculas são o principal alvo deste vírus. Dentre elas podemos destacar as células T, dendríticas, NK e macrófagos (DALGLEISH *et al.*, 1984;KLATZMANN *et al.*, 1984). Estas moléculas são essenciais para o processo de reconhecimento de peptídeos exógenos, mediado por MHC de classe II em células apresentadoras de antígenos.

O ciclo replicativo do HIV-1 (Fig 1.4) é iniciado com o reconhecimento da célula hospedeira pelo vírus, através da interação entre a gp120 viral e o receptor CD4 presente na membrana celular. Esta interação promove uma alteração conformacional na gp120 permitindo sua interação com seus correceptores, os receptores de quimiocina CCR5 ou CXCR4. Após esta interação, ocorre uma segunda modificação conformacional que promove a exposição do peptídeo de fusão presente na gp41 (domínio transmembrana), permitindo a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (SATTENTAU *et al.*, 1993).

Uma vez ocorrido o processo de fusão ocorre o desnudamento da partícula viral e o capsídeo é liberado no citoplasma. No citoplasma, o capsídeo é dissociado, liberando um complexo pré-integrativo (PIC). As proteínas p17 (MA), integrase e Vpr, que integram o PIC, auxiliam a migração deste complexo até o núcleo celular através da rede de citoesqueleto (HEINZINGER *et al.*, 1994;GALLAY *et al.*, 1997). Chegando ao núcleo, a Vpr interage com nucleoporinas presentes na carioteca, formando um canal por onde proteínas são transportadas ativamente, inclusive o PIC (ZHAO *et al.*, 2005).

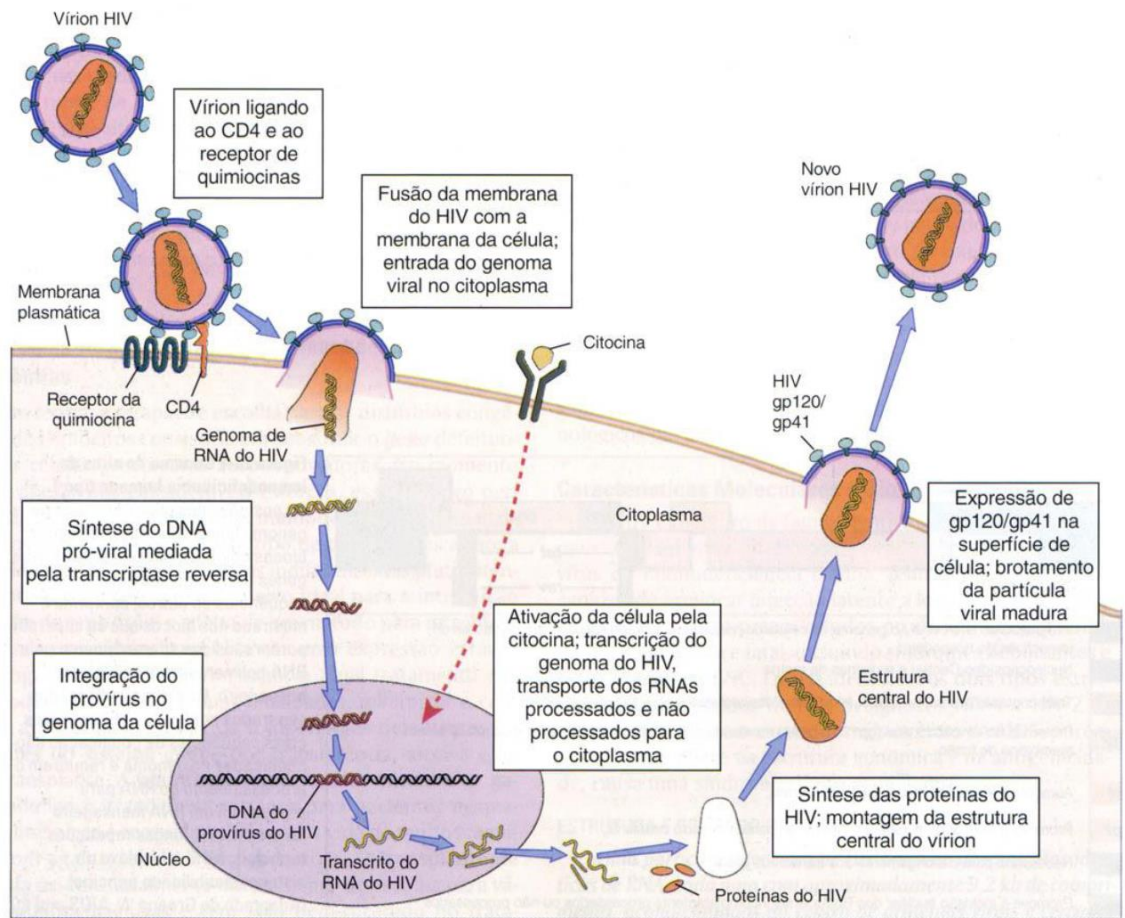


Figura 1.4 Ilustração do ciclo replicativo do HIV-1. (Extraído de ABBAS, 2003).

Simultaneamente à migração do PIC, ocorre o evento de transcrição reversa, iniciado ainda no interior da partícula viral. A transcriptase reversa viral (RT) sintetiza DNA utilizando o RNA viral como molde. Durante o processo, é formada uma molécula híbrida de RNA-DNA, com concomitante degradação da fita-molde de RNA pelo domínio da RNase H, um domínio C-terminal da RT. Em seguida, é sintetizada uma fita de DNA complementar àquela recém-sintetizada, originando uma molécula de DNA dupla-fita. Conforme citado acima, a partícula viral abriga duas moléculas de RNA, e ambas podem ser usadas como molde para a retrotranscrição. Em alguns casos, os dois moldes de RNA podem ser utilizados em um mesmo evento de retrotranscrição, originando eventos de recombinação que formam vírus mosaicos, caso as fitas-molde sejam diferentes (oriundas, por exemplo, de uma célula coinfetada por dois vírus distintos). Além disto, a RT não apresenta atividade revisora, resultando em uma taxa de incorporação de erro da ordem de uma em cada 10^4 bases por ciclo replicativo

(DOUGHERTY & TEMIN, 1988). Estes dois fatores contribuem para a alta diversidade genética do HIV.

Uma vez o PIC no núcleo, a enzima viral integrase é responsável por integrar o DNA complementar (cDNA) ao genoma da célula hospedeira (FRANKEL & YOUNG, 1998). Após a integração, este DNA é conhecido como provírus e a partir deste ponto sua transcrição e tradução serão governadas pela maquinaria celular com o auxílio de algumas proteínas virais (KNIPE, 2001).

Para que ocorra a produção de novos vírus é importante que as células contendo o provírus estejam ativadas. Os provírus integrados em células em repouso encontram-se em estado de latência, podendo permanecer assim por anos, gerando importantes reservatórios virais. Um dos grandes desafios à terapia antirretroviral é o estabelecimento destes reservatórios virais. A latência funciona como uma barreira, uma vez que todas as classes de antirretrovirais disponíveis até o momento atuam sobre pontos do ciclo replicativo do HIV, e vírus latentes não são atingidos por estas drogas (MARGOLIS, 2010).

A região LTR 5' abriga a região promotora viral, e desta forma regula a expressão gênica do provírus. Os primeiros genes transcritos são os genes regulatórios, *tat* e *rev*. A proteína Tat liga-se ao sítio TAR na porção 5' do RNAm proviral, estimulando a processividade da RNA polimerase II e a formação de transcritos virais longos. Nesta fase, também é sintetizada a proteína Nef, que aumenta a infectividade viral e promove a regulação negativa de CD4 e MHC de classe I na superfície celular, alterando o mecanismo de ativação de células T, dificultando o reconhecimento da célula infectada por linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) (GARCIA & MILLER, 1991; AIKEN & TRONO, 1995; COLLINS *et al.*, 1998).

No processo de transcrição são geradas moléculas longas de RNAm. Parte destes RNAm recém-sintetizados será direcionada aos sítios subcelulares de formação de partículas abaixo da membrana celular para que sejam incluídos nas novas partículas virais como RNA genômico. Outra parte permanece no citoplasma onde será traduzida. Após terem sido sintetizadas, as proteínas virais são direcionadas àqueles

sítios e se juntam às moléculas de RNA viral, formando um complexo nucleoproteico que brota da membrana celular, levando consigo parte desta membrana, e originando os vírions. Durante o brotamento, as proteínas Gag e Pol são clivadas pela protease viral, originando partículas virais maduras (POLLARD & MALIM, 1998;ABBAS, 2003).

1.4. HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO POR HIV

A transmissão do HIV pode ocorrer através do contato com fluidos corporais contaminados, como sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno. Desta forma, as principais vias de transmissão são a sexual, a parenteral e o aleitamento materno. O sucesso da transmissão pode ser afetado por diversos fatores relacionados tanto à biologia da cepa viral infectante quanto à biologia do hospedeiro.

Células do sistema imune expressando o receptor CD4 são o alvo do HIV. Estes vírus podem ser carregados por células dendríticas até os órgãos linfoides que abrigam grande quantidade de células-alvo para a infecção (SPIRA *et al.*, 1996). Uma vez estabelecida a infecção, observa-se uma intensa replicação viral, que pode ser detectada através da alta viremia plasmática, além da intensa depleção de linfócitos T CD4⁺. Esta fase é conhecida como fase aguda (Fig. 1.5). Nesta fase, o hospedeiro pode apresentar alguns sintomas comuns a uma gripe, como febre, cefaleia e faringite, por exemplo. Em geral este período é curto, podendo durar cerca de oito semanas, até que o sistema imune consiga montar uma resposta capaz de controlar a alta taxa de replicação viral, resposta normalmente citotóxica mediada pela ação de linfócitos T CD8⁺ (BANGHAM, 2009). Posteriormente ocorre também a produção de anticorpos neutralizantes. A ação conjunta destas duas respostas é capaz de controlar a replicação viral, reduzindo a viremia a níveis baixos, além de recuperar mesmo que não completamente os níveis de células T CD4⁺, controlando parcialmente a infecção. Após esta fase, inicia-se a fase crônica, que pode durar anos sem que o hospedeiro apresente nenhum sintoma clínico.

Caracterizada por um período de latência clínica assintomática, a fase crônica é o período no qual o sistema imune ainda está apto a responder a novas infecções por outros micro-organismos. Nesta fase é observada baixa replicação viral nos tecidos

linfóides em geral, o que é refletido na redução da carga viral plasmática, além da paulatina depleção de células T CD4⁺, caracterizando um estado de ativação crônica do sistema imune.

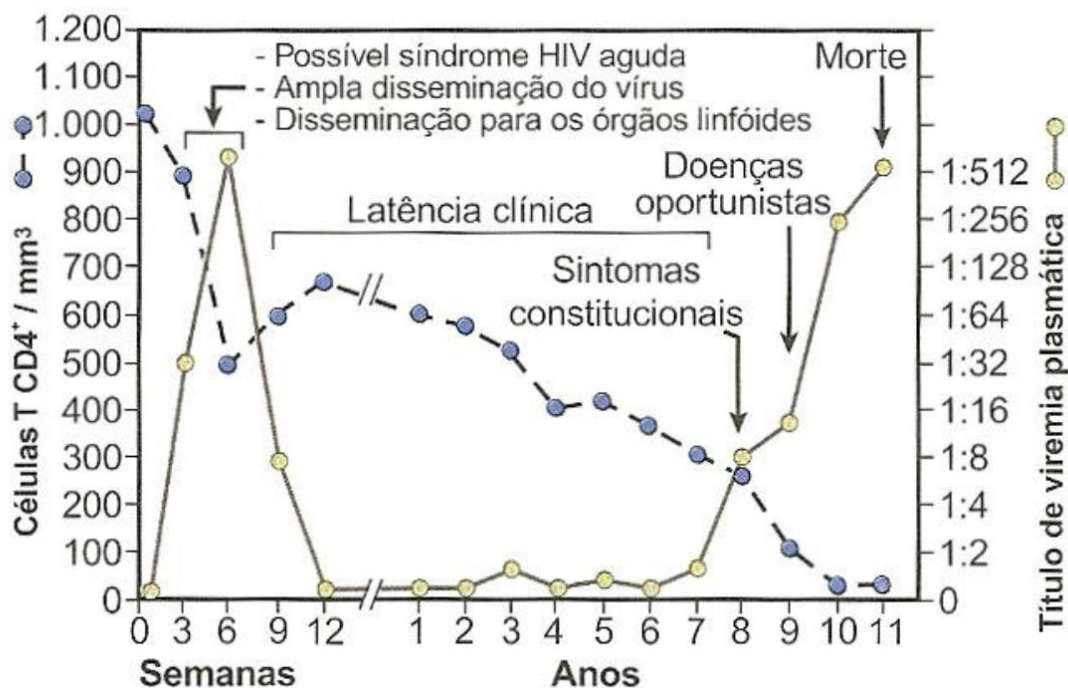


Figura 1.5 História natural da infecção por HIV. (Extraído de ABBAS, 2003).

A duração da fase crônica pode variar de indivíduo para indivíduo, e esta diferença caracteriza os diferentes perfis de progressão para a Aids. Fatores como resposta imune do hospedeiro e a cepa viral circulante podem influenciar os diferentes perfis de progressão (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010). Alguns indivíduos (2-4% dos infectados) são capazes de manter sua taxa de linfócitos T CD4⁺ acima de 500 células por mm³ de sangue ao longo de anos, e carga viral plasmática abaixo de 2.000 cópias/ml na ausência de terapia antirretroviral, sem apresentar manifestações clínicas. Estes são conhecidos como progressores de longo termo ou não-progressores (LTNP- do inglês, *long-term non progressors*) (PETRUCCI *et al.*, 1997; CASADO *et al.*, 2010). Outros indivíduos, conhecidos como controladores de elite, são capazes de controlar a

infecção por muitos anos, sem apresentar qualquer sintoma e mantendo a carga viral plasmática indetectável. Estes indivíduos têm sido estudados na tentativa de esclarecer os mecanismos responsáveis pelo controle da infecção (CASADO *et al.*, 2010; KAMYA *et al.*, 2011).

Ao final da fase crônica, observa-se o colapso do sistema imune, evidenciado por aumento da carga viral e diminuição na contagem de células T CD4⁺ para valores abaixo de 200 células por µl de sangue, caracterizando a entrada do hospedeiro na fase de Aids. A depleção de células de defesa cria um ambiente imune propício à ocorrência de infecções oportunistas, encefalopatias e neoplasias.

Algumas infecções são mais recorrentes durante o estágio da Aids, dentre elas as causadas por *Pneumocystis jiroveci*, *Candida albicans*, citomegalovirus, herpes zoster e *Mycobacterium avium*. Também são relatados casos de encefalopatias, neoplasias como linfomas, sarcoma de Kaposi, carcinoma cervical e sintomas como febre, perda de peso excessiva, sudorese noturna e alterações gastrointestinais (BROOKS *et al.*, 2009). Sem intervenção terapêutica, tal quadro pode levar ao óbito do indivíduo.

1.5. O GALT

O tecido linfóide associado ao intestino (do inglês - *Gut Associated Lymphoid Tissue* - GALT) é o maior órgão linfóide do corpo humano e o tecido mais acometido durante a fase inicial da infecção por HIV. Observa-se intensa replicação viral e depleção de linfócitos T CD4⁺ neste compartimento (LIM *et al.*, 1993; BRENCHLEY *et al.*, 2006).

O GALT apresenta condições favoráveis à infecção pelo HIV, como grandes quantidades de linfócitos T CD4⁺ expressando os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4, que atuam como correceptores virais (POLES *et al.*, 2001). Por ser um ambiente em constante contato com alimentos e antígenos bacterianos, o GALT é um ambiente rico em linfócitos T CD4⁺ ativados e de memória, principais alvos do HIV (SCHIEFERDECKER *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1997). Estima-se que ele abrigue 60% dos linfócitos totais do corpo, e é organizado em compartimentos distintos: *lamina propria*,

placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (Figura 1.6). Cada compartimento apresenta uma função e juntos formam dois importantes componentes, o sistema indutor e o sistema efetor.

O sistema indutor é responsável pelo reconhecimento de antígenos por linfócitos T. Após o reconhecimento, estes linfócitos migram para a via de maturação, o sistema imune sistêmico, e em seguida retornam para sítios efetores do GALT. Este sistema é composto pelas placas de Peyer, formadas por aglomerados celulares cercados por células M, que transportam antígenos para os sítios de indução. Além das placas de Peyer, os linfonodos mesentéricos fazem a conexão entre a imunidade sistêmica e a de mucosa. Uma vez na circulação sistêmica, os linfócitos serão maturados e diferenciados em células T de memória, que devem retornar ao sítio efetor do GALT. Esta migração é finamente regulada pela interação de proteínas celulares e componentes do sistema endotelial vascular do intestino. Neste caso, as células T expressam a integrina $\alpha 4\beta 7$ e o receptor de quimiocina CCR9, e este repertório define o grupo de células com fenótipo de endereçamento ao intestino.

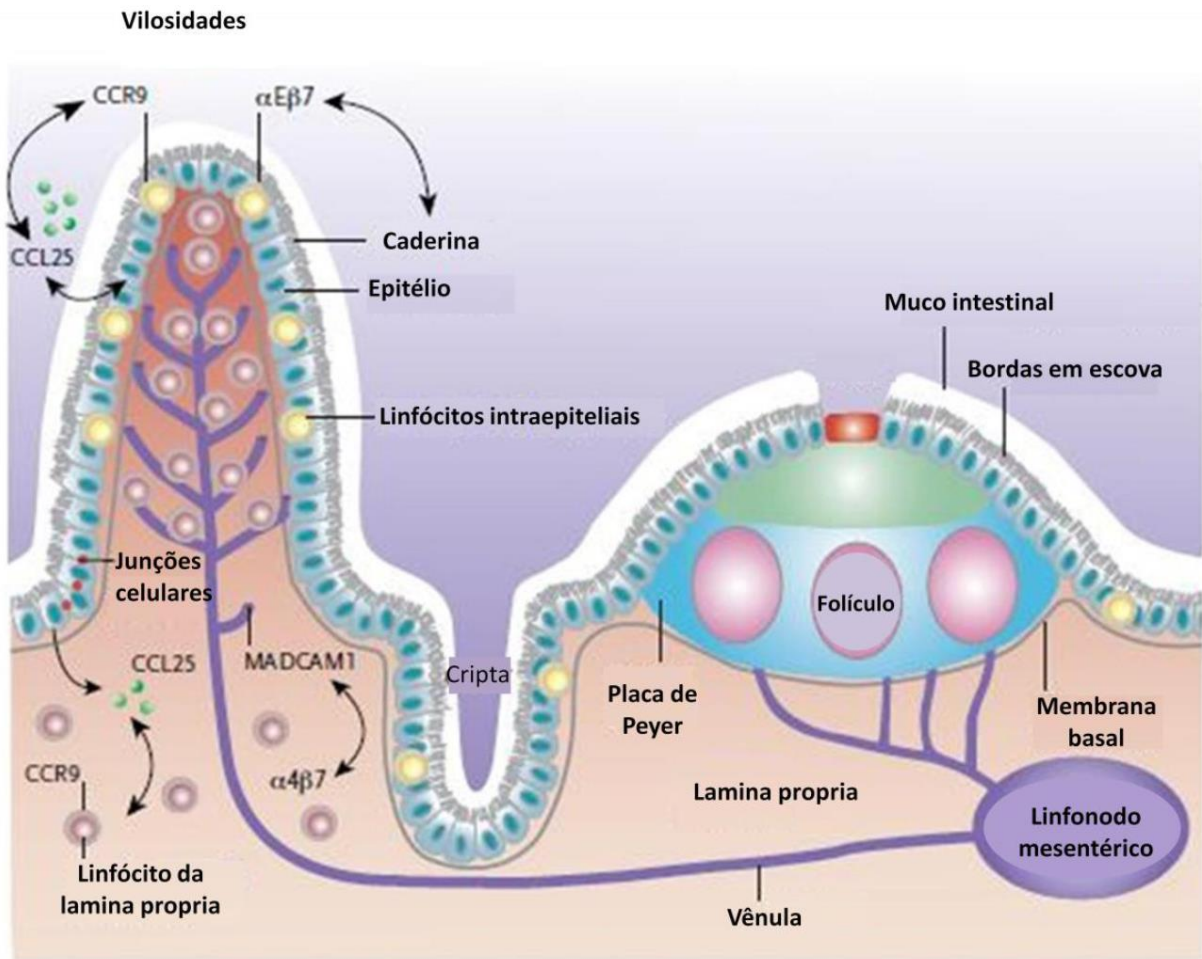


Figura 1.6 Organização do GALT, mostrando seus componentes principais e marcadores, como linfócitos ($\alpha_4\beta_7^+$) e marcadores de mucosa (MAd-CAM-1). (Extraído e modificado de MEHANDRU *et al.*, 2005).

O sistema efetor é formado pela *lamina propria*, composta por células diferenciadas com perfil de estimulação diferente das PBMCs e linfócitos intraepiteliais. Estas células são majoritariamente linfócitos T $CD8^+$ e secretam muitas citocinas, dentre elas $IFN-\gamma$, IL-4 e IL-5.

Estudos mostram que a depleção de linfócitos no GALT é acompanhada pela deposição de colágeno, e que estes dois processos podem influenciar a capacidade de restabelecimento do tecido e conseqüentemente a progressão da doença (revisado por (SHACKLETT & ANTON, 2010). Essas observações destacam a importância do GALT na infecção por HIV, onde pode ser observada uma enteropatia severa, que envolve sintomas como diarreia, aumento da inflamação do trato gastrointestinal, aumento da permeabilidade e perda de microvilosidades intestinais.

Alguns fatores podem contribuir efetivamente para o desenvolvimento de transtornos gastrointestinais, como a capacidade da gp120 do HIV de aumentar as concentrações de cálcio nos enterócitos, desencadeando um desbalanceamento iônico neste tecido. A constante depleção de células e o acometimento da barreira epitelial deste tecido permite que ocorra translocação microbiana do lúmen para o interior do GALT. Esta translocação promove um estado crônico de ativação do sistema imune, gerando assim o recrutamento de alvos adicionais para o HIV e aumentando consequentemente a sua taxa de replicação (BRENCHLEY & DOUEK, 2008).

1.6. INTEGRINAS

Integrinas são proteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade alfa (~150 kDa) e uma beta (~90 kDa) (Fig. 1.7). São conhecidos até o momento 18 genes que codificam subunidades α e oito que codificam subunidades β . Quando juntas, estas subunidades podem originar diferentes heterodímeros (TAKADA *et al.*, 2007). As subunidades α apresentam identidade em torno de 30% entre si, e as β em torno de 45%, e não há homologia entre as duas subunidades.

De uma maneira geral, as integrinas estão envolvidas em processos de migração e adesão celular, podendo se ligar a proteínas extracelulares como colágeno e fibronectina, além de proteínas de superfície celular. Uma vasta gama de células expressa integrinas, como por exemplo: células epiteliais, linfócitos, plaquetas, monócitos, células dendríticas, dentre outras.

As integrinas encontram-se inseridas na membrana plasmática e possuem domínios extracelular, transmembranar e citoplasmático. Este último interage com o citoesqueleto celular, fazendo com que estas proteínas funcionem como mediadores na transferência de sinais do meio extra para o intracelular e vice-versa. Uma vez que estas proteínas reconhecem componentes da matriz extracelular, geram sinais que são recebidos por outras proteínas no interior da célula, podendo desencadear uma intensa rede de transdução de sinais que modulam o comportamento celular em diversos aspectos, como proliferação, adesão, apoptose, morfologia, diferenciação celular e outros eventos também ligados à reorganização do citoesqueleto (HYNES, 2002).

O reconhecimento de componentes extracelulares pelas integrinas, em geral, ocorre através do reconhecimento de um domínio RGD conservado (Arg-Gly-Asp), presente em alguns dos ligantes (Fig. 1.7). Existem ainda, sítios de ligação não canônicos, como o domínio LDV (Leu-Asp-Val). A porção extracelular destes heterodímeros é composta pelas regiões N-terminais de ambas as subunidades (α e β), e a interação destas moléculas com seus ligantes depende de cátions como Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{2+} .

As integrinas possuem papel fundamental para o sistema imune, promovendo adesão de leucócitos a células endoteliais e apresentadoras de antígenos (APC) e endereçamento de linfócitos do sangue para diferentes tecidos durante processos inflamatórios. A interação de integrinas ativadas com seus ligantes em sítios de inflamação gera sinais que podem aumentar a expressão destas proteínas e potencializar a migração de células específicas para estes tecidos, auxiliando a fina regulação da resposta imunológica.

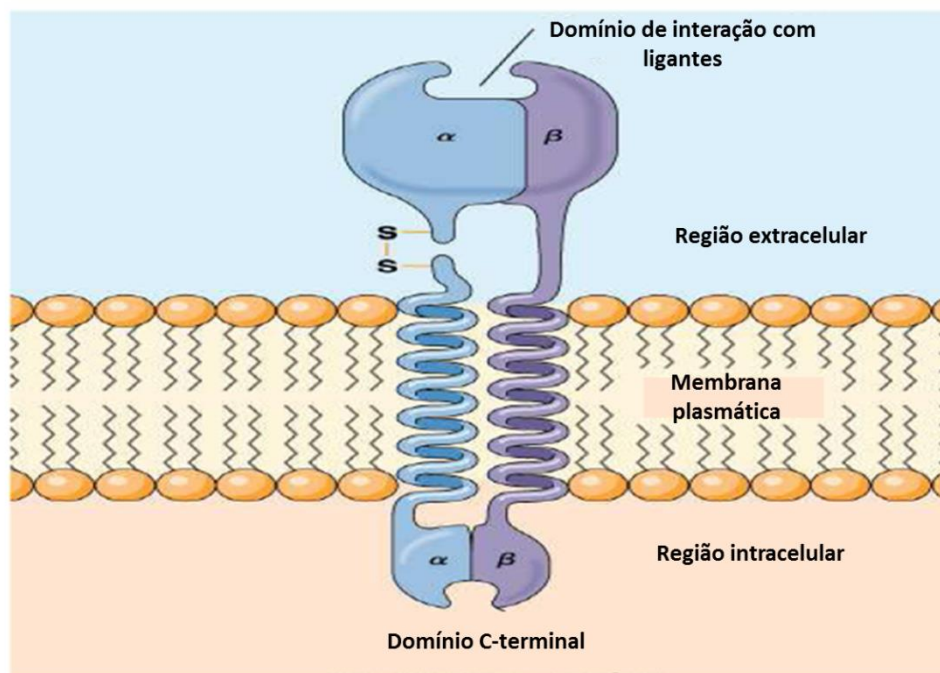


Figura 1.7 Organização das integrinas na membrana celular. (Extraído e modificado de HARDIN, 2011)

Um aspecto importante neste sistema é a especificidade entre células e as integrinas que estas expressam, principalmente para coordenar de forma adequada a migração de linfócitos para diferentes tecidos. Podemos destacar, por exemplo, a integrina LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), que interage com moléculas ICAM (do inglês *intercellular adhesion molecule*), promovendo o direcionamento de células para linfonodos periféricos e adesão à células APC. Já a integrina $\alpha_4\beta_7$ é capaz de interagir com MAdCAM-1 (do inglês *mucosal addressing cellular adhesion molecule 1*) e promover a migração celular para órgãos linfoides, enquanto a VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) interage com VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*), promovendo a migração de leucócitos para tecidos com inflamação (KINASHI, 2005).

Outro ponto importante é a avidéz das integrinas por seus ligantes. Linfócitos não estimulados não apresentam capacidade de adesão, porém logo que recebem estímulo através de quimiocinas ou antígenos, por exemplo, tornam-se aderentes dentro de um curto período através da alteração da conformação do heterodímero (KINASHI, 2005) (Fig. 1.8).

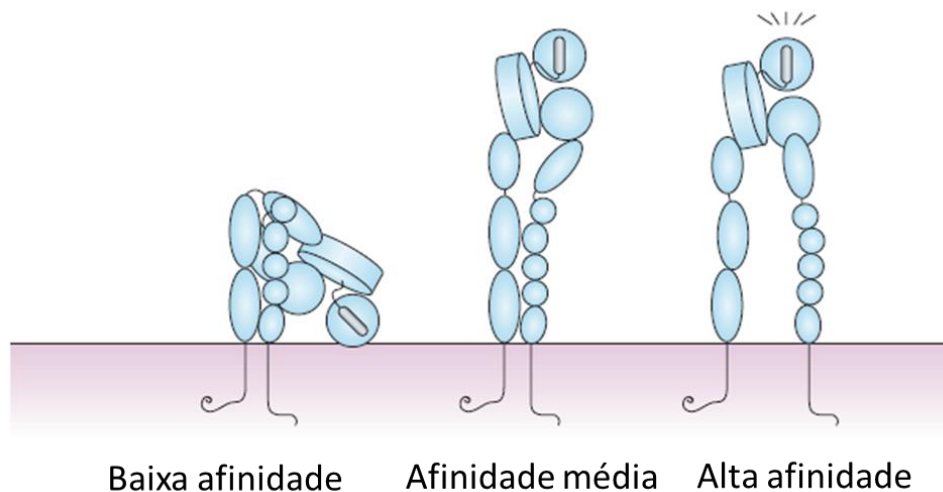


Figura 1.8 Diferentes estados de afinidade das integrinas. (Extraído e modificado de KINASHI, 2005).

1.6.1. A INTEGRINA $\alpha_4\beta_7$

A integrina $\alpha_4\beta_7$ governa a migração de linfócitos T para o GALT. Esta integrina é a única capaz de se ligar a MAdCAM, uma molécula de endereçamento e adesão celular presente na superfície de mucosas. A expressão de MAdCAM na superfície de células das vênulas endoteliais do intestino definem $\alpha_4\beta_7$ como a integrina endereçadora do intestino. Sabe-se que os linfócitos T de memória capazes de migrar para este tecido apresentam um fenótipo de alta ativação de $\alpha_4\beta_7$. Desta forma, podemos destacar o importante papel desta proteína no sistema imune de mucosa (WILLIAMS & BUTCHER, 1997; VON ANDRIAN & MACKAY, 2000).

A subunidade α_4 é codificada pelo gene *itga4*, que possui 80.856 pb e codifica 27 íntrons e 28 éxons. O gene está alocado na região 31.3 do braço longo do cromossomo 2 (2q31-q32) (ZHANG *et al.*, 1991). A subunidade apresenta sete sequências repetidas de 60-70 aminoácidos na sua porção N-terminal, dobradas em um domínio denominado *β -propeller* que podem ser observadas na Figura 1.9 (TAKADA *et al.*, 1997). Na porção superior, encontram-se potenciais domínios de ligação a cátions divalentes como Mg^{+2} e a seus ligantes, e na porção inferior, domínios de ligação a Ca^{+2} .

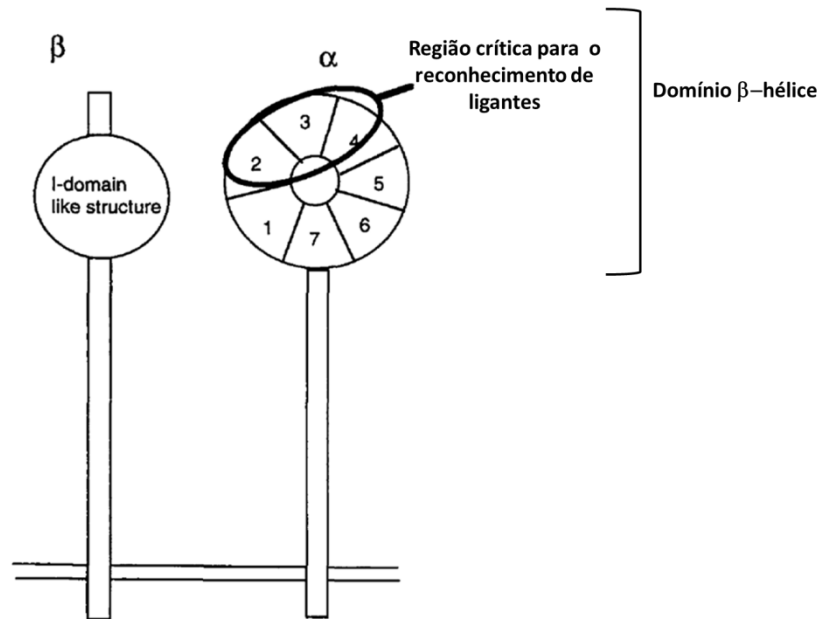


Figura 1.9 Estrutura do heterodímero. Na subunidade α_4 podem ser observadas as sete repetições de 60-70 aminoácidos na sua porção N-terminal. (Extraído e modificado de TAKADA *et al.*, 1997)

Estudos com anticorpos bloqueadores de função mostraram que a porção responsável pela interação da integrina $\alpha_4\beta_7$ com seus ligantes naturais parece ocorrer na terceira repetição da porção N-terminal de α_4 e que as alças compreendidas entre as repetições 2-4 são fundamentais para o reconhecimento de ligantes pela integrina α_4 (IRIE *et al.*, 1995).

Diversos estudos destacam a importância da subunidade α_4 das integrinas em patologias como encefalomielite, diabetes não relacionada a obesidade (NOD), alergias do trato respiratório e doenças intestinais inflamatórias (LOBB & HEMLER, 1994). O tratamento com diferentes anticorpos anti- α_4 pode atenuar os sintomas e o desenvolvimento destas patologias.

Observou-se que pacientes com esclerose múltipla apresentam maior expressão da integrina α_4 quando comparados a indivíduos saudáveis (IGLESIAS *et al.*, 2004). O tratamento destes pacientes com interferon β reduz a expressão da integrina α_4 (JENSEN *et al.*, 2005). Podemos destacar ainda o efeito terapêutico do anticorpo monoclonal anti- α_4 natalizumab no tratamento de pacientes com esclerose múltipla e

doença de Crohn, provavelmente devido à sua capacidade de bloquear a interação das integrinas $\alpha_4\beta_7$ e $\alpha_4\beta_1$ com seus ligantes naturais, o que destaca o envolvimento das mesmas, mais especificamente da subunidade α_4 , no desenvolvimento das doenças (VON ANDRIAN & ENGELHARDT, 2003).

Em 2007, O'Doherty e colaboradores publicaram o primeiro estudo avaliando sequências genóticas entre pacientes com esclerose múltipla e controles saudáveis. Este trabalho avaliou 12 SNPs em diferentes regiões do gene *itga4* de populações de origem báltica e nórdica, com o objetivo de traçar um paralelo dos polimorfismos encontrados com a susceptibilidade à esclerose múltipla. Desta forma, foi observada uma maior prevalência do genótipo CC do SNP rs1449263, localizado na região promotora do gene *itga4*, em pacientes afetados pela doença em ambas as populações (O'DOHERTY *et al.*, 2007).

Alguns estudos mostram a relação entre a integrina α_4 e diversos tipos de câncer. A perda de função desta proteína pode estar relacionada ao processo de metástase (FELDING-HABERMANN, 2003; GARMY-SUSINI *et al.*, 2010). Já foi detectada a perda de expressão de α_4 em linhagens celulares de tumor gástrico humano. Park e colaboradores mostraram que este efeito pode ser revertido na presença de inibidores de DNA metiltransferases, mostrando um efeito epigenético na regulação da expressão de α_4 em células tumorais (PARK *et al.*, 2004).

1.6.2. A INTEGRINA $\alpha_4\beta_7$ E O HIV

Em 2008, Arthos e colaboradores mostraram que a gp120 do HIV é capaz de se ligar a $\alpha_4\beta_7$ e que esta interação poderia auxiliar a transmissão de vírus entre células adjacentes através de sinapses virológicas (ARTHOS *et al.*, 2008). A ligação da gp120 a $\alpha_4\beta_7$ promove a ativação da integrina LFA-1, que uma vez ativada liga-se a ICAM-1 de células adjacentes, promovendo a aproximação das células vizinhas. Isto facilita a transmissão de vírus entre as células, como pode ser observado na Figura 1.10, e este processo é conhecido como sinapse virológica (CICALA *et al.*, 2011). Testes com anticorpos monoclonais anti- α_4 , anti- β_7 e anti- $\alpha_4\beta_7$ mostraram que os sítios de interação

da integrina com a gp120 do HIV é o mesmo ou muito próximo daquele utilizado na interação da integrina com seus ligantes naturais (ARTHOS *et al.*, 2008).

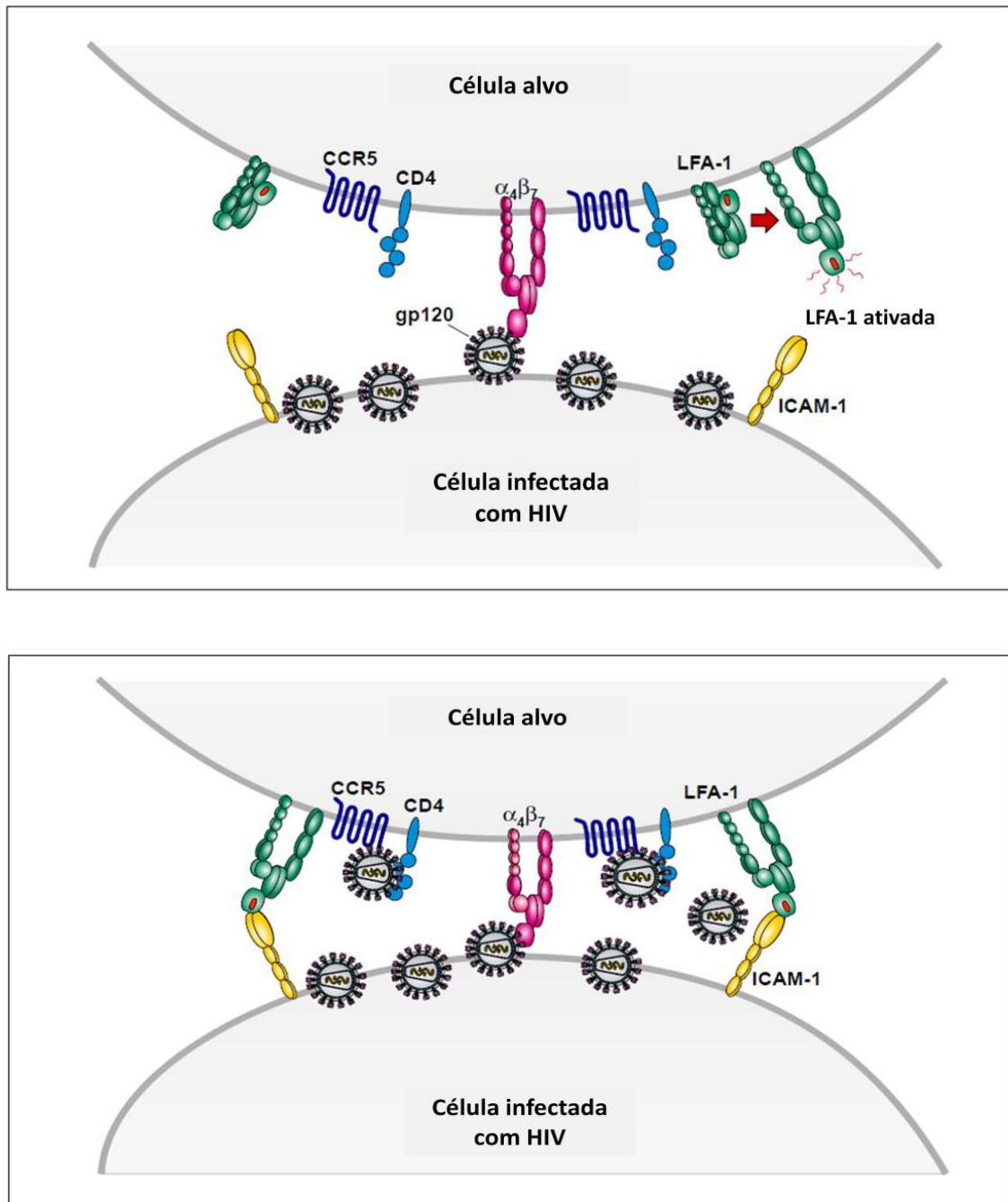


Figura 1.10 Esquema mostrando a interação da gp120 do HIV-1 com a integrina $\alpha_4\beta_7$ e a subsequente ativação de LFA-1, facilitando a transmissão de vírus célula-célula. (Extraído e modificado de CICALA *et al.*, 2011).

Estudos evidenciam a presença de linfócitos T CD4⁺ no GALT com alto nível de expressão do receptor de quimiocina CCR5 e de $\alpha_4\beta_7$ em sua conformação de alta afinidade, e ainda que estas moléculas colocalizam na membrana plasmática, definindo um repertório celular vulnerável à infecção e apto à replicação viral (CICALA *et al.*, 2009).

A gp120 do HIV é formada por trímeros, que interagem com as moléculas celulares CD4, CCR5, CXCR4 e $\alpha_4\beta_7$ (Fig. 1.11). A avidéz desta interação pode ser influenciada por fatores celulares, como o estado de ativação e conformação da $\alpha_4\beta_7$ e fatores presentes no trímero. Sabe-se que a gp120 do HIV apresenta em sua região variável 2 (V2) uma sequência Leu-Asp-Val/Ile (LDV/I) nos resíduos 179-181 (relativos ao clone HXB2 do HIV-1) que mimetiza o peptídeo de interação presente nos ligantes naturais de $\alpha_4\beta_7$. Além disso, de forma semelhante aos ligantes naturais, o ácido aspártico na posição 180 é conservado em mais de 98% dentre sequências de gp120 analisadas provenientes do banco de dados de Los Alamos (ARTHOS *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2011).

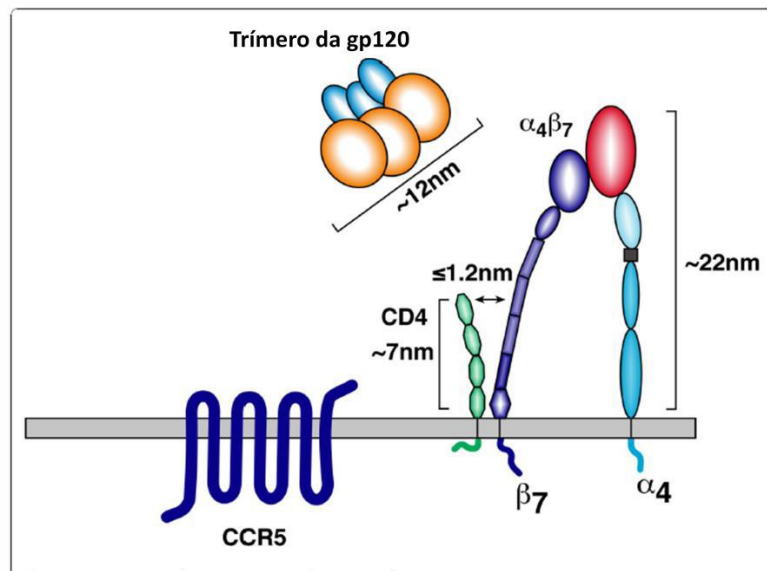


Figura 1.11 Ilustração da integrina $\alpha_4\beta_7$, comparando o tamanho das suas subunidades, do trímero formado pela gp120 e da molécula de CD4. (Extraído e modificado de CICALA *et al.*, 2011).

Em 2011, nosso grupo descreveu polimorfismos na região dos éxons 5 e 6 do gene da subunidade α_4 da integrina $\alpha_4\beta_7$ em primatas não-humanos neotropicais que alteram a interação destas proteínas com seus ligantes naturais, com anticorpos monoclonais, bem como com a gp120 do HIV-1 de diferentes subtipos (DARC *et al.*, 2011). Diversos estudos com primatas não-humanos têm ajudado a elucidar questões importantes para o melhor entendimento do mecanismo envolvido na relação entre a integrina $\alpha_4\beta_7$ e a infecção por lentívirus.

Recentemente, Martinelli e colaboradores publicaram um estudo avaliando a frequência de células T CD4⁺ de memória e com fenótipo de alta expressão de $\alpha_4\beta_7$ ($\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$) na infecção por SIV. Neste trabalho, macacos resos (*Macaca mulata*) foram desafiados com SIV (inoculação retal) e acompanhados por biópsias locais antes e após o desafio. Foi mostrado que os animais positivos para a infecção apresentavam maior contagem de células T de memória CD4⁺ $\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$ 21 dias antes e no dia 0 do desafio, quando comparados àqueles em que a infecção não se estabeleceu. Desta forma, sugeriu-se uma relação entre a frequência de células T CD4⁺ $\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$ e a susceptibilidade à infecção por SIV (MARTINELLI *et al.*, 2013).

Em 2015, Byrareddy e colaboradores publicaram um estudo que mostra uma diferença de expressão de $\alpha_4\beta_7$ em diferentes primatas não-humanos. É interessante destacar que foi observada uma menor expressão desta proteína nas espécies conhecidas como hospedeiras naturais do SIV (primatas africanos, como o mangabeí fuligento), que normalmente não desenvolvem Aids, quando comparadas com primatas asiáticos, como os resos, que sucumbem à Aids quando infectados por lentívirus. Além disso, foi observada uma população de células T CD4⁺ expressando a integrina β_7 pareada com a subunidade α_E nos mangabeis fuligentos, o que não é observado nas espécies em que a infecção é patogênica e que não são hospedeiras naturais do SIV. Estes mesmos resultados foram observados em PBMCs e células da mucosa intestinal. Isto sugere o envolvimento de α_E no mecanismo de proteção destes animais à infecção, pareando com β_7 e possivelmente impedindo sua ligação a α_4 .

Ainda no âmbito das doenças infecciosas, podemos destacar a alteração na expressão da integrina $\alpha_4\beta_7$ durante a infecção por lentívirus. Um estudo observou que

após infecção de células de macacos resos por SIVmac239 (um lentivírus similar ao HIV), há uma diminuição da expressão de $\alpha_4\beta_7$ nas células infectadas (BUDDE *et al.*, 2010). Mais ainda, o bloqueio desta proteína durante a infecção aguda de animais por SIV protege as células contra a infecção viral, o que leva a uma diminuição da carga viral plasmática e no GALT destes animais (ANSARI *et al.*, 2011). Em humanos, foi demonstrado que o bloqueio tanto da subunidade α_4 como de β_7 diminuem a susceptibilidade de células T CD4⁺ à infecção *in vitro* (TJOMSLAND *et al.*, 2013).

1.7. A TRANSMISSÃO DO HIV EM MUCOSAS

A infecção por HIV em geral ocorre em superfícies de mucosa e este evento apresenta uma taxa de sucesso muito reduzida. Estudos com casais sorodiscordantes estimam que uma infecção produtiva resulte a cada 1000 relações sexuais (WAWER *et al.*, 2005).

Uma vez depositado na superfície da mucosa, seja ela do trato reprodutor feminino ou do trato gastrointestinal, o vírus deve ser capaz de ultrapassar diversas barreiras físicas e biológicas para estabelecer uma infecção efetiva. Em ambos os casos, são observadas a presença de muco, barreira epitelial e microbiota dificultando o acesso do HIV às suas células-alvo (figura 1.12). Além disso, a escassez de células T CD4⁺ ativadas (alvo do HIV) e a presença de células do sistema de defesa inato também dificultam o estabelecimento da infecção (HAASE, 2005; HAASE, 2010). O HIV pode eventualmente transpor estas barreiras através de microtraumas oriundas do ato sexual, facilitando sua penetração na mucosa epitelial e o acesso a células-alvo presentes na submucosa (NORVELL *et al.*, 1984).

Um dos principais fatores limitantes da transmissão do HIV é a baixa frequência de células-alvo ativadas na mucosa genital. Linfócitos T CD4⁺ estão, em geral, dispersos pela endo- e ectocervix, e por vezes restritos a regiões da submucosa. Em macacos resos, a maioria destas células apresenta fenótipo de repouso, sendo este repertório em muitos casos 70 vezes mais abundante que células T CD4⁺ ativadas (HAASE, 2010). Processos inflamatórios desencadeados por doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem aumentar a eficiência de transmissão do HIV, uma vez

que promovem ativação celular e conseqüentemente o recrutamento de células-alvo deste vírus (HAALAND *et al.*, 2009;MASSON *et al.*, 2015).

Estudos usando primatas não humanos como modelos de infecção mostram que, em macacos resos, células T CD4⁺ da mucosa em estágio subótimo de ativação são os primeiros alvos da infecção por SIV, uma vez que estas células estão presentes em maiores concentrações nestes tecidos do que outros tipos celulares (ZHANG *et al.*, 1999;MILLER *et al.*, 2005). A infecção deste tipo de células pode, em muitos casos, não ser capaz de gerar uma infecção produtiva e irreversível, uma vez que estas estão presentes em baixa frequência e a quantidade de vírus que elas produzem também é reduzida (ZHANG *et al.*, 2004;HORTON *et al.*, 2010).

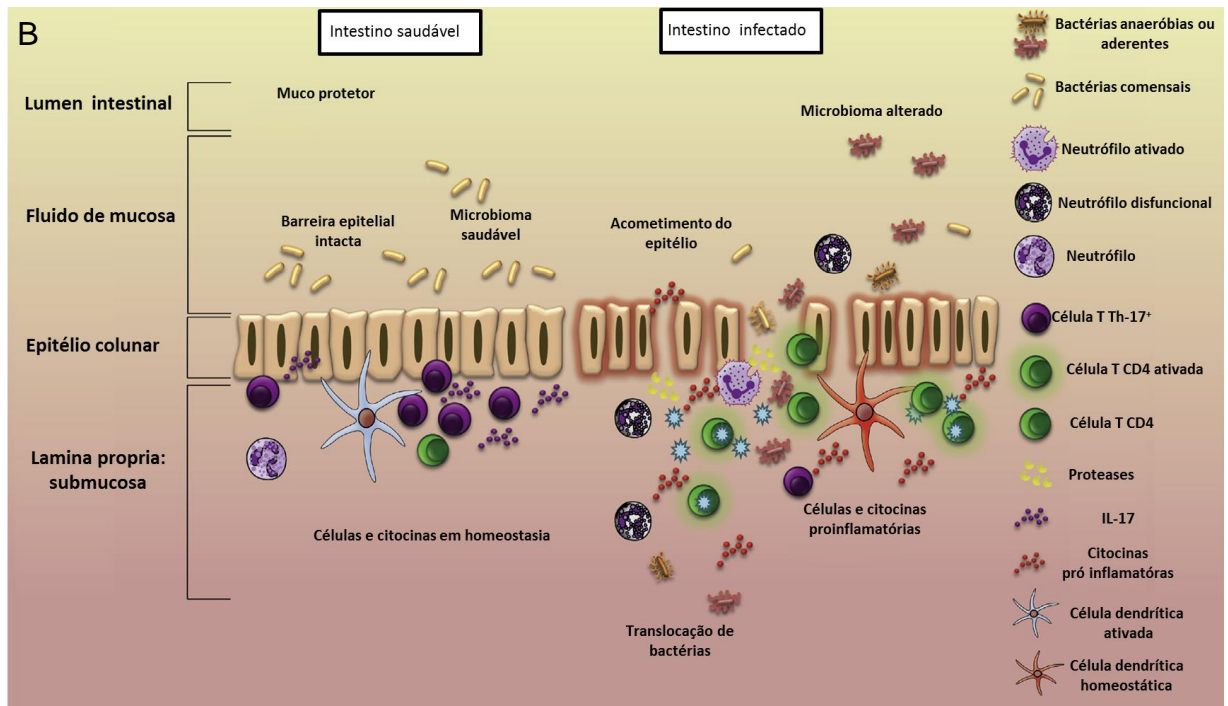
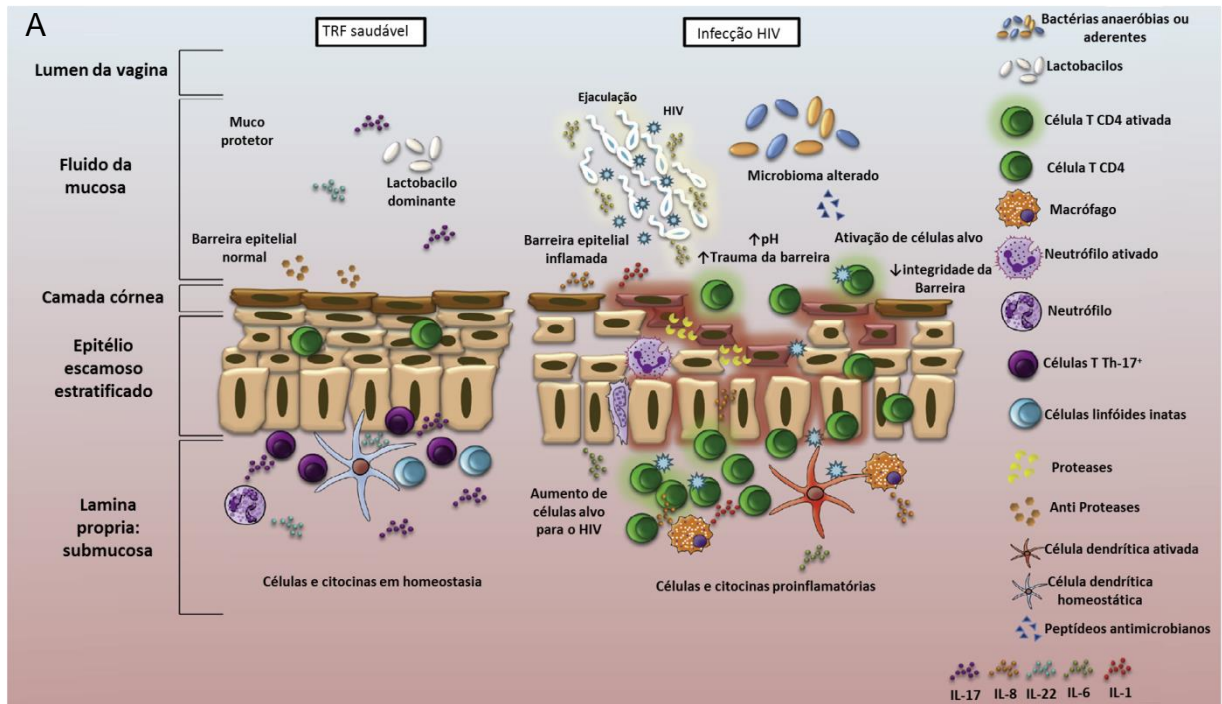


Figura 1.12 Barreiras fisiológicas do trato reprodutor feminino - TRF (A) e trato gastrointestinal (B). Na porção esquerda dos painéis, podemos observar ambas as mucosas saudáveis com barreiras íntegras, com seu muco, epitélio e microbioma preservados. A porção direita do esquema mostra o contexto de infecção pelo HIV, com acometimento de barreiras epiteliais, alteração de microbioma, extravasamento de células para o lúmen e de microorganismos para o interior do tecido (BURGENER *et al.*, 2015).

Acredita-se que a infecção irreversível envolve uma série de eventos, muitos dos quais ainda pouco elucidados. Uma vez que células em repouso são infectadas, os vírus nelas produzidos devem ser capazes de infectar células T CD4⁺ em repouso e células T CD4⁺ ativadas, estas sim, capazes de produzir grandes quantidades de vírus e migrar para linfonodos drenantes, transmitindo o vírus para células mais distantes (Figura 1.13) (ZHANG *et al.*, 1999;ZHANG *et al.*, 2004).

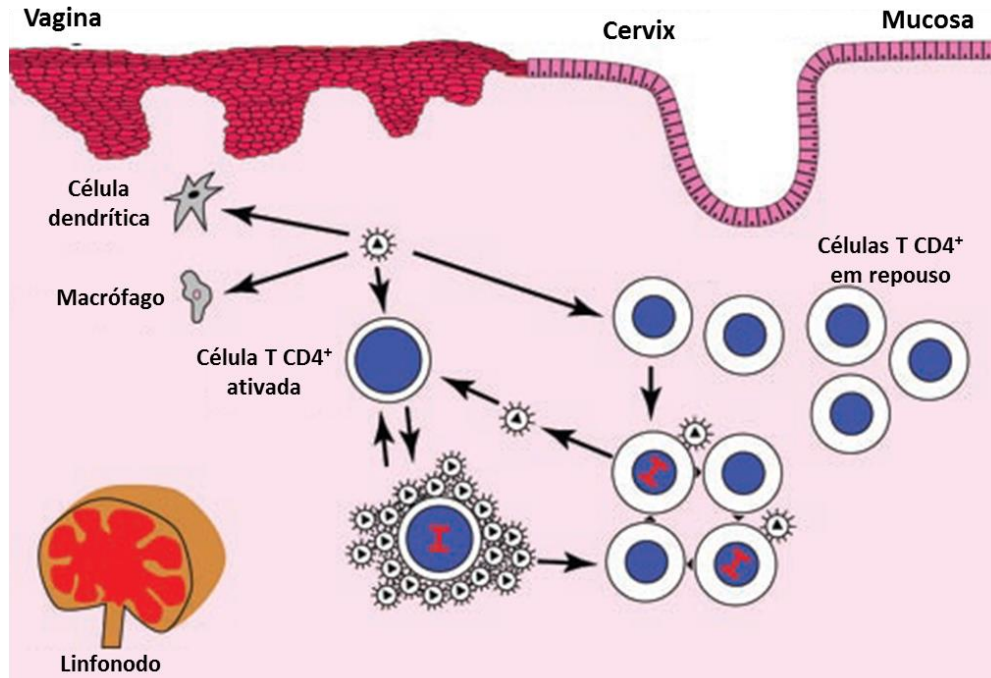


Figura 1.13 Disponibilidade de células-alvo e produção de vírus por células T CD4⁺ em repouso e ativadas durante a transmissão do vírus em estágios iniciais da fase aguda da infecção. Os vírus que cruzam a barreira da mucosa e se espalham pelo tecido linfático podem infectar células dendríticas, macrófagos e células T CD4⁺ ativadas ou em repouso (Extraído e modificado de ZHANG *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos na literatura mostram a importância de células T CD4⁺/ α4β7⁺ na transmissão do HIV e SIV em mucosas. Sabe-se que uma fração significativa de células T CD4⁺ da mucosa genital são α4β7⁺ (MCKINNON *et al.*, 2011). Estudos com macacos resos e SIV mostram que células T CD4⁺/ α4β7⁺ estão entre as primeiras a serem infectadas e depletadas após a transmissão do vírus (WANG *et al.*, 2009), o que é consistente com a depleção deste mesmo repertório celular na infecção de humanos pelo HIV (KRZYSIEK *et al.*, 2001). A frequência de células T CD4⁺/ α4β7⁺ já foi relacionada à susceptibilidade à infecção por SIV (MARTINELLI *et al.*, 2013). Em 2014,

um estudo publicado por Byrareddy e colaboradores mostrou que a administração intravenosa de um anticorpo monoclonal anti- $\alpha_4\beta_7$ foi capaz de proteger macacos resos da transmissão vaginal de uma cepa altamente patogênica de SIV (SIVMac251) (BYRAREDDY *et al.*, 2014).

Além de linfócitos T CD4⁺, outros tipos celulares também podem apresentar papel importante nos estágios iniciais da infecção por HIV. Células dendríticas e de Langerhans podem ser infectadas e aprisionar vírus no seu interior. O receptor DC-SIGN das células dendríticas pode se ligar ao HIV e mediar a interação deste com células T CD4⁺ (DE WITTE *et al.*, 2008).

Um ponto crucial para o estabelecimento da infecção é a migração de células infectadas para os sítios de indução do GALT: placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (MEHANDRU *et al.*, 2004). Células dendríticas e de Langerhans também podem auxiliar este processo, embora os mecanismos envolvidos neste tráfego ainda sejam objeto de estudo. A intensa replicação viral observada nestes sítios compõe o evento central da fase aguda da infecção, representando a fonte primária de viremia nesta fase. Estes fatores evidenciam a importância do GALT nas infecções por HIV e SIV, sendo estes considerados vírus com tropismo para o intestino. O DNA proviral também pode ser encontrado em células da lâmina própria, o maior sítio efetor do GALT, onde ocorre uma depleção massiva de linfócitos T CD4⁺ de memória, que culmina com a degradação da ultraestrutura deste compartimento (MATTAPALLIL *et al.*, 2005). É importante ressaltar que esta depleção de células T CD4⁺ é observada tanto em casos de transmissão parenteral (SMIT-MCBRIDE *et al.*, 1998) como via mucosa (VEAZEY *et al.*, 2000).

Os danos causados à lâmina própria são considerados o principal fator no desenvolvimento da Aids. O acometimento da barreira epitelial propicia a translocação microbiana do lúmen intestinal para o interior da lâmina própria, o que gera um estado de ativação crônica do sistema imune e conseqüentemente mais células ativadas são recrutadas para este local, aumentando os alvos para o HIV e facilitando a sua replicação e espalhamento (BRENCHLEY & DOUEK, 2008; ESTES *et al.*, 2010).

A migração de células T CD4⁺ desde os linfonodos drenantes na mucosa genital até as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos é um processo finamente regulado e requer o extravasamento destas células pelas vênulas endoteliais altas que chegam até o tecido intestinal (BERLIN *et al.*, 1995). Este extravasamento se dá por diversas interações entre proteínas presentes na superfície dos linfócitos e das vênulas endoteliais. Estas interações dependem de três eventos consecutivos que compõem a cascata de adesão: 1) rolamento de leucócitos pelas vênulas (mediado por L-selectinas presentes na superfície dos leucócitos), 2) sinalização por quimiocinas, resultando na ativação de integrinas e 3) adesão dos leucócitos às células endoteliais ao longo das vênulas (mediado por integrinas ativadas). Diversos pontos desta cascata são comuns ao processo de extravasamento de linfócitos em diferentes tecidos, porém a especificidade do direcionamento destas células para as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos se deve em grande parte à interação entre a integrina $\alpha_4\beta_7$ e L-selectina (CD62-L) na superfície dos linfócitos com MAdCAM e o ligante de L-selectina presentes na superfície das células endoteliais (BARGATZE *et al.*, 1995). Estas interações promovem o direcionamento de linfócitos T CD4⁺ naives para os sítios indutores do GALT através das vênulas endoteliais.

O processo de migração de linfócitos para o GALT se inicia com a interação entre a L-selectina da superfície destas células com seus ligantes presentes em células epiteliais das vênulas (figura 1.14). Esta interação promove a adesão dos linfócitos ao epitélio e é seguida pela interação de integrinas, neste caso $\alpha_4\beta_7$, com MAdCAM (WARNOCK *et al.*, 1998). Neste momento, $\alpha_4\beta_7$ encontra-se em baixo estado de ativação, e desta forma a interação com MAdCAM possui baixa afinidade, porém é suficiente para auxiliar o rolamento de leucócitos nas paredes das vênulas endoteliais. A interação com MAdCAM estimula a secreção de citocinas que induzem alterações em $\alpha_4\beta_7$, que neste momento passa a apresentar sua conformação de alta afinidade, promovendo a adesão firme dos leucócitos à parede do endotélio. Outras integrinas como $\alpha_4\beta_1$ e LFA-1 também podem ser ativadas durante este processo, estabilizando a adesão dos linfócitos até que estes extravasem para o interior do epitélio. Alterações nos níveis de expressão de L-selectina e $\alpha_4\beta_7$, bem como nos estágios de agregação e conformação de $\alpha_4\beta_7$, regulam este processo. Neste sentido, podemos destacar a

importância de MAdCAM no tráfego de células T CD4⁺ para o GALT a sua relação com o tropismo do HIV por este tecido.

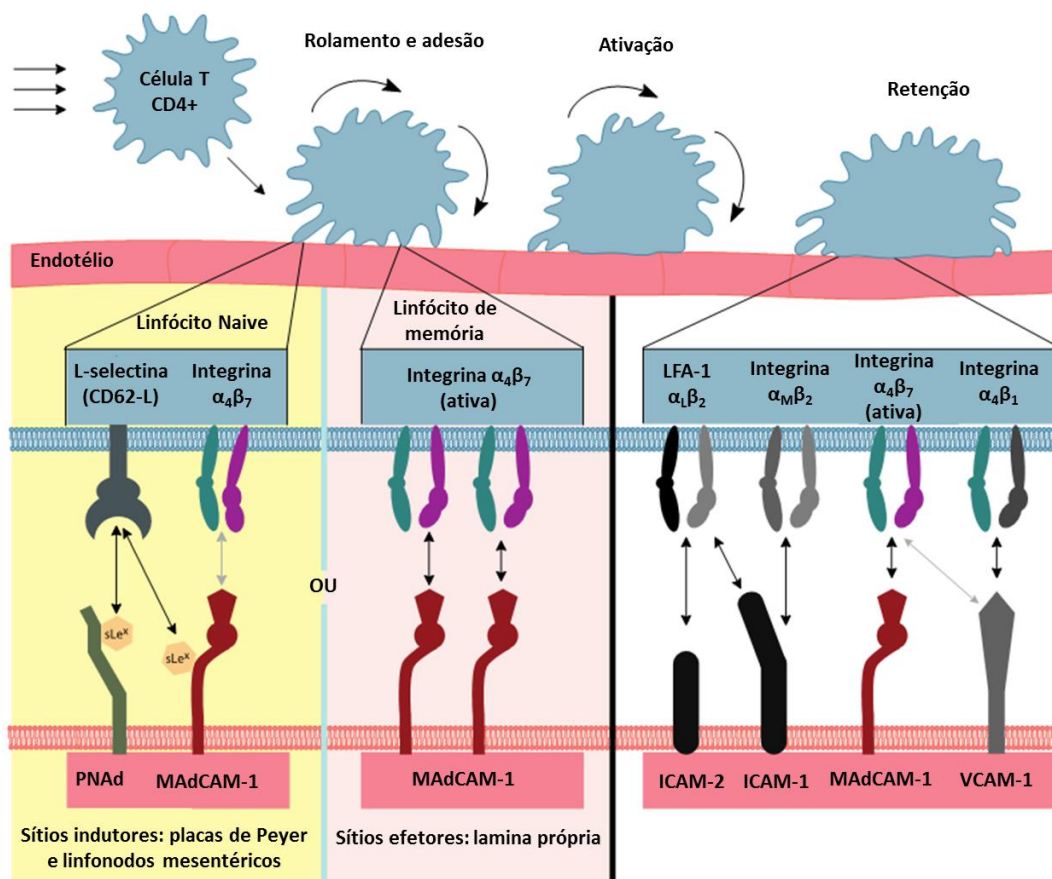


Figura 1.14 Esquema mostrando o papel fundamental de $\alpha_4\beta_7$ no rolamento e adesão de linfócitos ao longo das vênulas endoteliais. O processo tem início com a interação de selectinas (no epitélio) e seus ligantes (na superfície dos leucócitos). Apesar de ser uma interação de baixa afinidade, é suficiente para promover a adesão dos linfócitos ao endotélio. Em seguida a interação, também com baixa afinidade, de integrinas (na superfície de linfócitos) com seus ligantes MAdCAM e VCAM (em células endoteliais) auxilia o rolamento dos linfócitos. Esta interação inicia uma série de sinalizações celulares que culminam com a ativação destas integrinas, aumentando a afinidade destas por seus ligantes. Desta forma, a ativação de integrinas e sua alta afinidade por MAdCAM e VCAM são críticas para a retenção de linfócitos na parede das vênulas endoteliais, auxiliando seu extravasamento para o interior do tecido. Figura gentilmente cedida por Jocelyn Ray (não publicada).

A ativação antígeno-específica de células T CD4⁺ tem início com a interação do MHC de classe II (contendo fragmentos do antígeno) na célula dendrítica com o complexo CD3/TCR na superfície de células T CD4⁺. A ligação de moléculas de superfície celular com seus receptores em células dendríticas propicia um sinal coestimulatório, independente de MHC e antígeno, mas que também é de suma importância para a ativação de células T (figura 1.15). A sinergia entre os sinais primários e coestimulatórios induzem a transcrição de importantes citocinas capazes de induzir proliferação e diferenciação celular.

Algumas integrinas, além de moléculas de endereçamento, podem funcionar como receptores coestimulatórios em células T CD4⁺. A ativação eficiente de células T requer o contato físico entre estas e células dendríticas, e neste contexto a interação de integrinas com seus ligantes são de suma importância para a estabilização da adesão célula-célula. Podemos destacar o papel de LFA-1 em combinação com CD28 promovendo a ativação de células T (BERNARD *et al.*, 2002). Assim como LFA-1, a integrina $\alpha_4\beta_7$ também é capaz de induzir sinais coestimulatórios em células T através de sua interação com MAdCAM presente nas células endoteliais do intestino. Já foi demonstrado que tanto LFA-1 (via ICAM-1) quanto $\alpha_4\beta_7$ (via MAdCAM) podem promover coestímulo juntamente com CD28, induzindo a proliferação de células T (LEHNERT *et al.*, 1998). O coestímulo por MAdCAM pode ser separado em tempo e espaço daquele induzido via CD28 e do estímulo primário via TCR. Tal fato levanta a possibilidade de que o MAdCAM expresso nas vênulas endoteliais pode participar dos processos de ativação e proliferação de células T à medida em que estas passam pelos sítios de indução (placas de Peyer e linfonodos mesentéricos) e efetor (lâmina própria) do GALT.

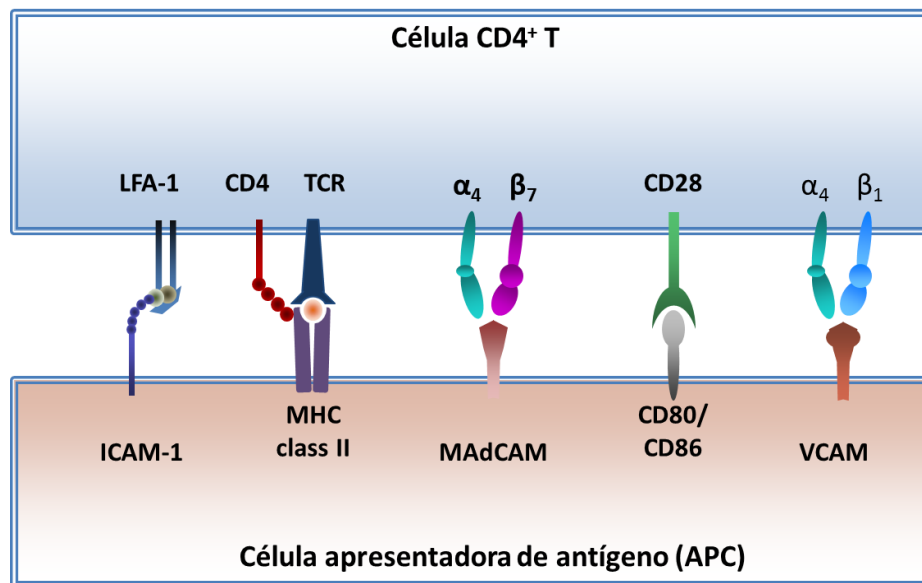


Figura 1.15 O esquema mostra exemplos de moléculas coestimulatórias. A interação do MHC de classe II na superfície da célula APC com o TCR da célula T inicia o primeiro sinal. Diversas moléculas na célula T podem gerar o segundo sinal, como a interação de CD80/CD86 com CD28 e MHC classe II com CD4. A interação das integrinas nas células T com seus ligantes (presentes nas APCs) podem promover a coestimulação destas células, funcionando como o terceiro sinal. Figura gentilmente cedida por Jocelyn Ray (não publicada).

Os achados aqui apresentados destacam a importância da integrina $\alpha_4\beta_7$ em eventos que vão além da sua função de adesão e endereçamento celular e mostram o seu papel em processos coestimulatórios durante a ativação de células T CD4⁺.

1.8. MODELOS ANIMAIS DE ESTUDO DO HIV

Apesar de mais de 30 anos de descoberta do HIV e intensa pesquisa, o estudo da infecção por este vírus em humanos ainda é um fator limitante para o melhor entendimento dos processos envolvidos no estabelecimento da infecção e produção de vacinas. No contexto de fases iniciais da infecção (infecção aguda) abordados no presente trabalho, podemos destacar uma série de fatores que limitam o desenvolvimento da pesquisa. A dificuldade de identificar pacientes em fase aguda e mais ainda, a obtenção de biópsias de tecidos intestinais em momentos próximos ao evento de transmissão viral tornam o estudo de fases iniciais da infecção em mucosa um grande desafio. Muito esforço tem sido empregado para a obtenção de modelos animais que possibilitem o estudo da infecção pelo HIV *in vivo*. Alguns dos modelos

utilizados são primatas não-humanos e animais de pequeno porte como camundongos, coelhos e ratos.

Os primatas não-humanos apresentam vantagens óbvias em relação a animais de pequeno porte, principalmente para o estudo da biologia da infecção pelo HIV. Estes animais são susceptíveis à infecção por SIV, o vírus da imunodeficiência símia, e esta infecção pode acarretar sintomas similares aos da Aids em humanos, acometendo os mesmos tipos celulares e tecidos. Além disso, as mucosas dos tratos reprodutivo e intestinal são similares em macacos e humanos, o que proporciona um bom modelo para testes de medicamentos e vacinas para a prevenção da transmissão do HIV em mucosas.

Atualmente, os primatas não-humanos utilizados como modelo de estudo de infecção patogênica pelo HIV são os macacos asiáticos pertencentes ao gênero *Macaca*, como o macaco reso (*Macaca mulatta*). Diversos outros primatas não-humanos são hospedeiros naturais do SIV. Em geral, estes hospedeiros naturais são pertencentes a espécies do Velho Mundo, dentre os quais podemos destacar os chimpanzés, macacos fuligentos e macacos verdes africanos. Mesmos apresentando alta viremia plasmática, depleção de linfócitos T CD4⁺ na mucosa intestinal durante a fase aguda e ausência de controle da replicação viral, os macacos africanos não desenvolvem imunodeficiência, tornando impossível sua utilização em modelos de infecção patogênica (REY-CUILLE *et al.*, 1998; SILVESTRI *et al.*, 2003; PANDREA *et al.*, 2006). Por outro lado, estes animais fornecem importante fonte de informação e comparação para o melhor entendimento da patogênese do HIV nos diferentes modelos de infecção (figura 1.16) (revisto por (CHAHROUDI *et al.*, 2012)).

Os macacos resos são os melhores e mais bem caracterizados modelos de infecção patogênica por lentivírus até o momento. As cepas virais mais utilizadas em estudos com estes animais são o SIVmac239 e SIVmac251, ambos isolados de macacos resos indianos. A infecção com estes é capaz de promover altos níveis de replicação viral sem apresentar grandes variações entre diferentes animais pertencentes ao gênero *Macaca*.

Pelos motivos especificados no que tange as diferenças entre modelos de estudo, e pelo fato do nosso grupo possuir um colaborador com vasta experiência no assunto, o presente trabalho fez uso do modelo que utiliza macacos resos e a cepa viral SIVmac239.

Células T CD4+ Naives ■ ■ ■ ■ ■ ► Células T CD4+ de memória central (Tcm) e efetoras (Tem)

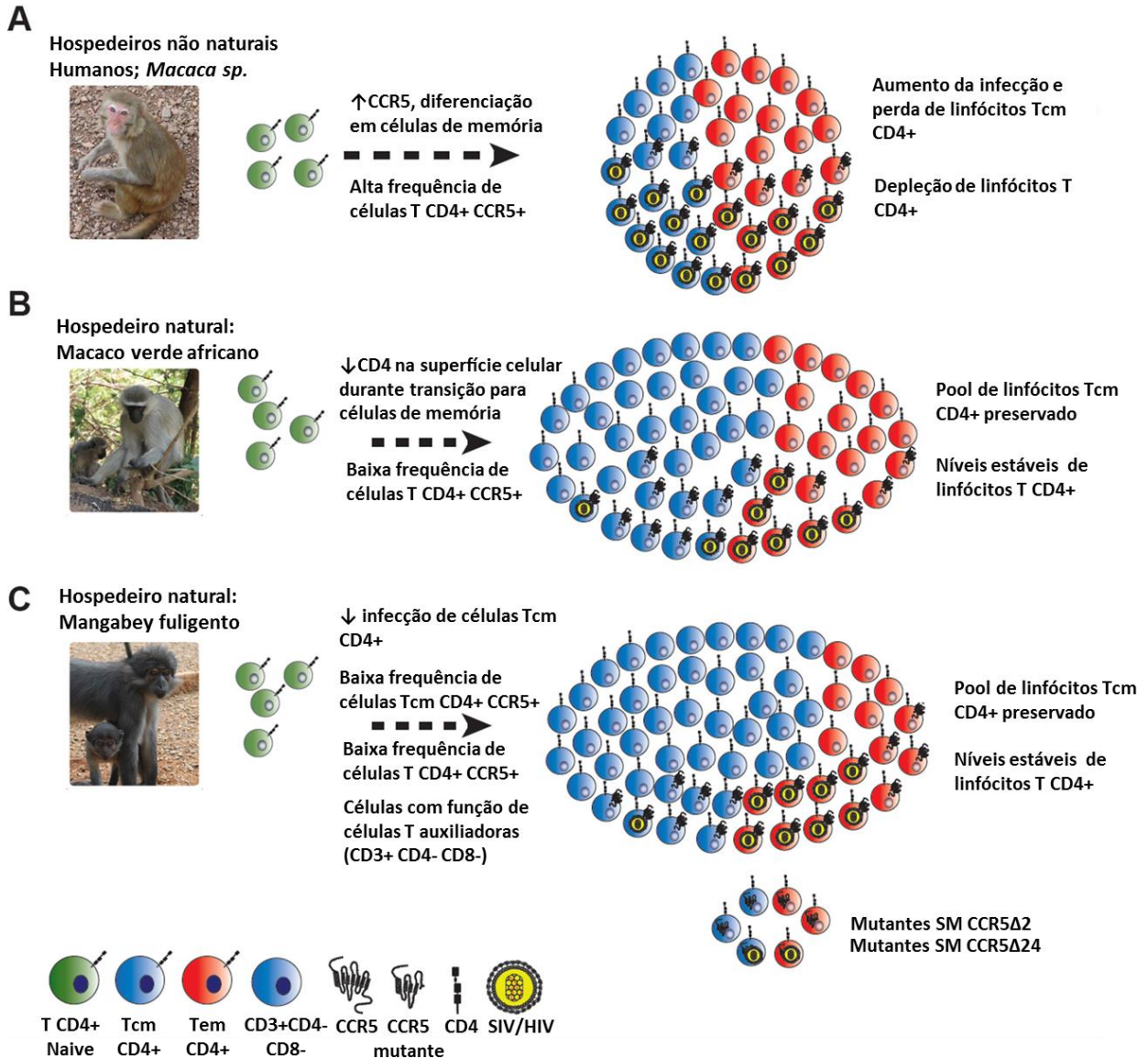


Figura 1.16 Mecanismos de restrição de células-alvo em hospedeiros naturais do SIV. (A) Em hospedeiros patogênicos como o macaco reso, a ativação de células T CD4+ induz a maior expressão de CCR5 na superfície celular, fornecendo alvos e promovendo a replicação viral. A infecção é distribuída entre células T de memória efetora (Tem) e central (Tcm). A depleção de Tcm leva à perda da homeostase de células T. (B) Em macacos verdes africanos, observa-se a expressão reduzida de CD4 na superfície celular e preservação de células T CD4+. Estes animais também apresentam menor expressão de CCR5 quando comparados a hospedeiros não-naturais. (C) Redução dos níveis de CCR5 em células Tcm CD4+ quando comparados a Tem, refletindo em maior proteção de células Tcm. Presença de mutações no gene CCR5, apesar de não conferirem resistência ao vírus. (Extraído e modificado de CHAHROUDI *et al.*, 2012)

2. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DA TESE

As informações aqui apresentadas sugerem que a integrina $\alpha_4\beta_7$ possui um papel importante na infecção pelo HIV e por outros retrovírus, além de outras doenças como a esclerose múltipla, inflamações e alergias, tendo todas em comum a interação dos domínios extracelulares da proteína com seus ligantes naturais ou, no caso do HIV, ligantes virais. Estudos mostram ainda que diferenças de expressão desta proteína podem modular algumas infecções virais, e que o bloqueio destas proteínas pode afetar o desenvolvimento das infecções e de outras doenças autoimunes aqui descritas. Desta forma, estudos de caracterização de polimorfismos genéticos, de mecanismos de ativação via $\alpha_4\beta_7$ e ainda de bloqueio da mesma durante a infecção por HIV/SIV são de extrema importância para um melhor entendimento da função e regulação destas proteínas durante a infecção pelo HIV-1. A informação gerada nestes trabalhos pode contribuir para o entendimento de fatores que possam modular a resistência à infecção viral, como observado em indivíduos expostos não-infectados e ainda para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento e prevenção da infecção por HIV.

Esta tese compreende os resultados de três diferentes projetos, divididos nos capítulos 4, 5 e 6, realizados durante o doutorado da candidata. No capítulo 4, abordaremos polimorfismos genéticos no gene *itga4* e seus fenótipos em indivíduos infectados ou não pelo HIV. No capítulo 5, apresentaremos dados de ativação celular e replicação do HIV mediante diferentes estímulos celulares, incluindo o envolvimento da integrina $\alpha_4\beta_7$. Por fim, no capítulo 6, abordaremos a padronização de técnicas para sequenciamento ultraprofundo de SIV em modelo de proteção de infecção de primatas através do bloqueio de $\alpha_4\beta_7$.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Este estudo tem como objetivo principal avaliar diferentes aspectos da interação da integrina $\alpha_4\beta_7$ com lentivírus de primatas, através de diferentes parâmetros desta dinâmica que podem estar envolvidos no mecanismo de estabelecimento da infecção viral, principalmente em mucosas.

4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA INTEGRINA α_4 E ASSOCIAÇÃO COM DADOS GENOTÍPICOS

Neste capítulo, iremos abordar os diferentes genótipos do SNP rs1449263, localizado na região promotora do gene *itga4*, e a relação destes com a expressão do gene. Já foi demonstrado por O'Doherty e colaboradores que o genótipo homozigótico CC foi encontrado em maior frequência em indivíduos com esclerose múltipla, e sabe-se que portadores da doença apresentam uma maior expressão de integrinas. Este estudo tem como objetivo avaliar a associação entre dados genotípicos e de padrão de expressão do gene *itga4* em relação à aquisição do HIV e/ou à progressão para a Aids em diferentes coortes de indivíduos HIV-positivos, negativos e expostos não-infectados.

Neste estudo foram examinadas três diferentes coortes. A primeira abrange 223 pacientes infectados pelo HIV arrolados na coorte de infecção aguda e/ou precoce por HIV da Universidade de São Paulo, coordenada pelo Prof. Éspér G. Kallás. Esta coorte está em acompanhamento desde 2002, e arrolou indivíduos que soroconverteram dentro dos seis meses prévios ao arrolamento, tendo evidência de infecção aguda ou precoce. Desta forma, o acompanhamento constante destes pacientes permitiu a coleta de diversos dados clínicos como contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺, carga viral do HIV, presença de coinfeções durante diferentes visitas, dentre outros parâmetros.

A segunda coorte do estudo é composta por 28 crianças expostas não-infectadas, acompanhadas no Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG – UFRJ) e no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE-RJ), ambos na cidade do Rio de Janeiro, pela Dra. Elizabeth S. Machado. Estas crianças são HIV-negativas e filhas de mães HIV-positivas que não foram submetidas à profilaxia para a transmissão vertical e que, portanto, foram expostas ao vírus, mas não se

infectaram. Este grupo é pareado com outro de 61 crianças HIV-positivas que contraíram a infecção após exposição às mesmas condições. A terceira coorte é composta por 67 adultos doadores voluntários, HIV-negativos e residentes na cidade do Rio de Janeiro. Todos os pacientes (ou seus guardiões, no caso das crianças) proveram consentimento informado por escrito para participação no estudo e os projetos foram aprovados nos comitês de ética dos respectivos centros.

4.1. OBJETIVOS

- Descrever a prevalência do SNP rs1449263 do gene *itga4* em diferentes coortes de indivíduos expostos ao HIV e não-infectados, indivíduos HIV-positivos e indivíduos HIV-negativos;

- Quantificar os níveis de expressão do mRNA de *itga4* na coorte de indivíduos HIV-negativos na tentativa de avaliar uma possível relação entre os diferentes genótipos/alelos do SNP rs1449263 e a expressão de *itga4*;

- Quantificar os níveis de expressão do mRNA de *itgb7* e *itgae* na coorte de indivíduos HIV-negativos para avaliar a disponibilidade de $\beta 7$ para um possível pareamento com α_4 ($\alpha_4\beta_7$) ou αE ($\alpha E\beta_7$);

- Avaliar a expressão da proteína $\alpha_4\beta_7$ na superfície celular por citometria de fluxo.

- Comparar as frequências alélicas e genótípicas do SNP rs1449263 de *itga4*, entre indivíduos-controle, expostos não-infectados e infectados pelo HIV, na tentativa de estabelecer o papel destes marcadores na aquisição da infecção pelo vírus.

- Avaliar a evolução da doença (contagens de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, sobrevida) em portadores dos diferentes alelos genótipos do SNP rs1449263 de *itga4* na coorte de acompanhamento longitudinal a fim de identificar potenciais efeitos da expressão de α_4 nos parâmetros analisados.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. EXTRAÇÃO DE PBMC

Dez mililitros de sangue total foram coletados de cada indivíduo em tubos *Vaccuntainer* (*BD Biosciences*, San Jose, EUA) contendo EDTA. Após a coleta, o material foi enviado ao nosso laboratório e então processado, onde a extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi realizada por gradiente de *Ficoll-Paque* (*GE Healthcare*, Uppsala, Suécia). Inicialmente, foram misturados 3 mL de sangue total com 3 mL de solução salina estéril a 0,8% em tubos *Falcon* de 15 mL (*Sarstedt*, Nuembrecht, Alemanha). Desta forma, foram feitas 3 extrações para cada 10 mL de sangue total. Este material foi adicionado lentamente a um novo tubo *Falcon* de 15 mL contendo 6 mL de *Ficoll-Paque* a temperatura ambiente, sempre tomando cuidado para que a mistura de sangue e soro fisiológico não se misturasse ao Ficoll. Após esta transferência, as amostras foram submetidas à centrifugação em centrífuga de rotor de angulação livre por 20 min a 1700 rpm. Após esta etapa, era possível observar o anel leucocitário formado pelo gradiente. Este anel foi então colhido e transferido para um novo tubo *Falcon* de 15 mL. A estas células foram adicionados 6 mL de solução salina a 0,8% q.s.p., seguido de centrifugação por 7 min a 1400 rpm (lavagem). Este processo de lavagem foi repetido 3 vezes. Antes da centrifugação da terceira lavagem, foram retirados 10 µl da solução para realizar a contagem de células. Ao final da última centrifugação, os tubos foram mantidos invertidos sobre papel toalha por 15 min para secar o precipitado de células.

Uma vez seco o precipitado celular, este foi ressuspendido em *RNA later* (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA), seguindo as quantidades conforme recomendações do fabricante, e o conteúdo foi transferido para criotubos de 2 mL (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, EUA). As células foram mantidas *overnight* a 4°C, e no dia seguinte foram transferidas para freezer a -80 °C em recipiente embebido em isopropanol (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Após 24h em isopropanol, os criotubos com as PBMCs foram transferidos para caixas de estoque e mantidos no freezer a -80 °C até a etapa seguinte. As PBMCs

submetidas à citometria de fluxo foram utilizadas frescas, portanto logo após a extração foram ressuspensas em solução salina a 0,9%.

4.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

As extrações de DNA e RNA foram realizadas com o sistema *AllPrep DNA/RNA mini kit* (Qiagen). Os PBMCs estocados foram descongelados em gelo e então centrifugados a 1400 rpm por 10 min a 4° C. Após este processo, o sobrenadante de *RNA later* foi retirado cuidadosamente e ao precipitado de células foi adicionado tampão de lise (RLT) contendo β -mercaptoetanol (10 μ l/ 1 mL de RLT). As amostras foram homogeneizadas com auxílio de vórtex por 1 min, ou até o lisado ficar transparente. Esta mistura foi transferida para uma coluna com afinidade a DNA (*gDNA Eliminator spin column*), que foi centrifugada por 30 seg a 10.000 rpm. Após a centrifugação, a coluna de DNA foi colocada em um novo tubo coletor, e ao filtrado contendo RNA foram adicionados 350 μ L de etanol a 70%. A partir deste ponto, as extrações de DNA e RNA foram realizadas separadamente, segundo as recomendações do fabricante do sistema.

É importante destacar que apenas as amostras da coorte de doadores voluntários HIV⁻ foram submetidas a ambas as extrações de DNA e RNA. As demais amostras foram submetidas apenas à extração de DNA, devido à escassez de material ou ao estado de armazenamento das mesmas.

4.2.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA E RNA EXTRAÍDOS

O material extraído foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, EUA). Foi utilizado 1 μ L de amostra para cada medição. Também foram avaliados os valores de pureza através dos parâmetros 260/280 nm (picos de absorbância na faixa de 280 nm em geral podem estar relacionados à presença de proteínas na amostra) e 260/230 nm (picos de absorbância na faixa de 230 nm em geral podem estar relacionados à presença de fenol na amostra). Para a razão 260/280 nm, foram aceitas as amostras com valores ao redor de 1,8 para DNA e 2,0 para RNA. Já para a razão 260/230 nm, foram aceitas as amostras com valores entre 2 e 2,2 em ambos os casos.

4.2.4. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA

Algumas amostras foram submetidas à avaliação da integridade do RNA extraído utilizando a plataforma *Bionalyzer 2100* (Agilent, Santa Clara, EUA). Para isto foi utilizado o sistema *Agilent RNA 6000 Nano Kit*, segundo recomendações do fabricante. Amostras com RIN (do inglês, *RNA integrity number*) acima de 8 foram consideradas ótimas e submetidas à etapa seguinte.

4.2.5. SÍNTESE DE CDNA

O RNA extraído foi submetido à reação de retrotranscrição para síntese de cDNA com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies). As reações foram conduzidas em tubos *Eppendorf* de 0,2 mL. Cada reação continha 2,0 µL de tampão 10X, 0,8 µL de dNTP 25x (100 mM), 2,0 µL de iniciadores randômicos 10x, 1,0 µL de enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 4,2 µL de H₂O livre de DNase e RNase (Life Technologies), e a cada uma foram adicionados até 1 µg de RNA, quando disponível. As reações foram colocadas em termociclador *GeneAmp® PCR system 9700* (Life Technologies) e submetidas à seguinte ciclagem: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, e mantidas a 8 °C até que fossem guardadas em freezer a -20 °C até a etapa de PCR em tempo real descrita no item 4.12.

4.2.6. DETECÇÃO DO SNP RS1449263 NO PROMOTOR DE *ITGA4* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O SNP rs1449263 no promotor do gene *itga4* (O'DOHERTY *et al.*, 2007) foi estudado através de uma PCR para amplificação de um fragmento de 281 pb contendo o SNP em questão, a partir do DNA genômico extraído do sangue total dos sujeitos analisados. A reação de PCR foi realizada em tubos *Eppendorf* de 0,2 µL, de acordo com o seguinte protocolo: 5 µL de tampão 10X da DNA polimerase *Taq Platinum®* (Life Technologies); 2,0 µL MgCl₂ a 50 mM; 0,5 µL de cada iniciador a 25 pmoles; 0,4 µL dNTPs a 0,25 mM; e 0,4 µL de DNA polimerase *Taq Platinum®* (Life Technologies). As

reações foram ajustadas com H₂O deionizada para um volume final de 49 µL e acrescidas de 1 µL de DNA genômico. Os iniciadores utilizados nesta etapa estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Iniciadores utilizados nas PCR e nas reações de sequenciamento, e sua *localização no gene *itga4* (número de acesso GenBank: NC_000002.11).

Iniciador	Sentido	Posição*	Sequência	Utilização
SNP F	Senso	-3251 a -3228	5'CATAGGAAATGGGTTAGATCTCC 3'	PCR/ Sequencia- mento
SNP R	Antissenso	-2993 a -2970	5' CTTGTGTAGAAAGTCCTCCCCAG 3'	PCR/ Sequencia- mento

As amplificações foram feitas em termociclador *GeneAmp® PCR system 9700* (*Life Technologies*). A ciclagem utilizada foi: 94 °C por 2 min para ativação da enzima, seguido de 35 ciclos: 94 °C por 30 seg para desnaturação do DNA, 53 °C por 30 seg para anelamento dos iniciadores e 72 °C por 1 min para extensão da cadeia. Após esta ciclagem, foi feita uma extensão final a 72 °C por 10 min para término das fitas iniciadas.

4.2.7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O sucesso da amplificação do fragmento contendo o SNP foi confirmado através de corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão NaOH 1X (solução estoque a 20x: ácido bórico a 0,9M e NaOH a 0,2M; (ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha), onde 5 µL do produto da PCR foram misturados a 2 µL de tampão de corrida *BlueGreen®* (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e aplicados nos poços do gel imerso em tampão NaOH 1X. No mesmo gel também foram aplicados 2 µL de tampão de corrida *BlueGreen®* misturados a 2 µL de padrão de peso molecular *1 kb ladder* (*Life Technologies*) para auxiliar na estimativa de tamanho dos fragmentos gerados. As amostras foram corridas a 100 volts por aproximadamente 40 minutos. Após a corrida, o gel foi fotografado sob luz UV em transiluminador, com auxílio do *software Kodak Molecular Imaging Software* (*Eastman Kodak Company*, EUA). O tamanho dos

fragmentos amplificados foi estimado comparando-os com o marcador de peso molecular.

4.2.8. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

As amostras amplificadas com sucesso na PCR foram purificadas com o sistema *HiYield Gel/PCR DNA Mini Kit* (RBC - *Real Genomics*, Taiwan) segundo recomendações do fabricante. Ao final do processo, as amostras foram recuperadas em 30 μL de tampão de eluição. Uma vez purificadas, as amostras foram quantificadas através da comparação de intensidade de bandas do material purificado e do marcador de peso e massa moleculares *Low DNA Mass Ladder* (*Life Technologies*). Para tal comparação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão NaOH 1X, onde foram aplicados 2 μL de amostra e 2 μL de tampão de corrida *BlueGreen®*; o mesmo foi feito com o padrão de peso molecular.

Após a corrida eletroforética, o gel foi fotografado sob luz UV em transiluminador. A interpretação da massa de cada banda foi feita de acordo com o protocolo do fabricante. De acordo com a intensidade da banda, foi possível inferir a quantidade de DNA em nanogramas presente em 1 μL da amostra.

4.2.9. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Uma vez quantificadas, as amostras foram submetidas ao sequenciamento automático de nucleotídeos com o objetivo de avaliar a existência de polimorfismos nas regiões genômicas analisadas.

O sequenciamento pela metodologia de Sanger foi realizado na plataforma *ABI Prism 3130XL* (*Life Technologies*). Para tal, foi utilizado o sistema *Big Dye Terminator® v.3.1* em placas *MicroAmp® Optical96-well Reaction Plate* (ambos da *Life Technologies*). Para cada reação foram utilizados 1,5 μL do tampão de sequenciamento; 1 μL do *Big Dye Terminator*; 3,2 pmoles do respectivo iniciador (SNPF ou SNPR) e 10 ng do produto purificado. As reações foram ajustadas com H_2O deionizada para um volume final de 10 μL . Ao final do processo, as amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: 96 °C por 1 min; 25 ciclos a 96 °C por 15 segundos

para desnaturação do DNA, 50 °C por 15 segundos para anelamento do iniciador e 60 °C por 4 min para extensão.

Após as reações de sequenciamento, os produtos foram precipitados através da adição de 35 µL de isopropanol a 75%, incubação por 15 min ao abrigo da luz e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, vertendo-se a placa sobre papel toalha. Foram adicionados 50 µL de etanol a 75% e novamente a placa foi submetida à centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado conforme descrito anteriormente e a placa foi colocada em bloco aquecido a 60 °C, durante 10 minutos e ao abrigo da luz.

Para serem submetidas ao sequenciamento automático de nucleotídeos, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida. As sequências obtidas foram analisadas manualmente no programa Seqman, integrante do pacote de programas *Lasergene* (DNASTAR, Madison, WI), a procura de SNPs na posição 148 do fragmento amplificado.

4.2.10. ANÁLISE DE EXPRESSÃO

O cDNA obtido foi submetido à análise por PCR em tempo real com o objetivo de avaliar os níveis de expressão relativa dos genes *itga4*, *itgae* e *itgb7* em indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos do SNP estudado na coorte de doadores voluntários HIV⁻. Para isso foram utilizados iniciadores e sondas específicas para os genes *itga4*, *itgae* e *itgb7* de acordo com os ensaios *TaqMan® Gene Expression Assay* Hs00168433_m1, Hs00559580_m1 e Hs01565750_m1 respectivamente (*Life Technologies*). Para o controle endógeno foram utilizados sondas e iniciadores para o gene *gapdh* Hu GAPDH 20x Probe dye FAM-MGB (*Life Technologies*). De posse do material, foram feitas curvas-padrão para os genes-alvo (*itga4*, *itgae*, *itgb7*) e endógeno (*gapdh*) para avaliar a eficiência de reação do experimento. Para isso, um pool com 3 µL de cDNA de 7 amostras foi submetido a cinco diluições seriadas de 10X. As reações foram feitas em triplicata e montadas em placas *MicroAmp® Optical96-well Reaction Plate* (*Life Technologies*). Para cada reação foram adicionados 7,5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* (*Life Technologies*), 0,75 µL da mistura de sonda e iniciadores, 5,75 µL de H₂O livre de nucleases (GIBCO) e 1,0 µL de cDNA. O mesmo

protocolo foi adotado quando as amostras isoladas foram submetidas a esta mesma técnica.

Para construção das curvas-padrão, as médias para as triplicatas técnicas de cada diluição para cada gene foram calculadas manualmente em planilha *Excel* (*Microsoft Corporation*, Seattle, EUA). Uma regressão linear foi conduzida para cada um dos genes, considerando as médias das diferentes diluições seriadas. A eficiência da reação foi estimada através do coeficiente da reta, calculado através da expressão $y = ax + b$, onde “a” é o coeficiente angular da função. A eficiência das reações foi calculada utilizando a expressão $E = 10^{(-1/-a)}$.

Os resultados obtidos foram avaliados no programa *Excel*. Uma vez que as curvas-padrão para ambos os genes apresentaram eficiência de 100%, não foi necessário o uso de nenhum método de correção. As amostras foram então avaliadas pelo método do Ct comparativo. Para tal, foram calculadas as médias dos valores de Ct para as triplicatas, e em seguida foi feita a normalização entre a média do Ct para o gene-alvo e a média do Ct do gene endógeno para uma mesma amostra (ΔCt). Os valores foram então convertidos para escala logarítmica utilizando-se a expressão $2^{-\Delta Ct}$.

Os valores de expressão relativa do gene *itga4* foram ainda submetidos a uma calibração, para calcular os valores de $\Delta\Delta Ct$, que foi convertido em *fold change* utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para este cálculo, foi utilizada como calibrador a mediana dos valores de ΔCt obtidos para indivíduos portadores do genótipo TT. Os valores de expressão relativa e *fold change* foram plotados em um gráfico de dispersão no programa *GraphPad Prism v.5* (*GraphPad Software*, La Jolla, EUA) e submetidos ao teste de *Mann-Whitney* para comparação entre eles.

4.2.11. MARCAÇÃO DE PBMC PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As PBMCs extraídas conforme o item 4.2 foram ressuspensas em 6 mL de solução salina a 0,9% e contadas no equipamento *Countess® Automated Cell Counter* (*Life Technologies*), segundo recomendações do fabricante. Após a contagem, as

células foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 5 min e mantidas em cultura contendo 10 mL de meio RPMI (LGC Biotecnologia) complementado com 10% de soro fetal bovino (*Life Technologies*) até o dia seguinte. As células foram então submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 5 min e o meio de cultura foi retirado, seguido de lavagem com 2 mL de PBS 1x (LGC Biotecnologia) e de centrifugação a 1500 rpm por 5 min. Após este processo, as células foram ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação Mg^{2+}/Ca^{2+} (HEPES a 10 mM; NaCl a 150 mM; $MgCl_2$ a 2 mM; $CaCl_2$ a 100 µM; BSA a 0,5%) e divididas em 4 tubos *Eppendorf* de 0,6 mL. Em cada tubo foi adicionado 1 µL do respectivo anticorpo, e as amostras foram mantidas em gelo por 30 min. Neste processo foram utilizados dois anticorpos ACT-1 (anti- $\alpha 4\beta 7$, AbD Serotec, Hercules, EUA) e controle isotípico *IgG* $\kappa 1$ de camundongo (*BD Pharmingen*, San Jose, EUA). Para as amostras marcadas com mais de um anticorpo, foi realizada a primeira marcação, seguida de centrifugação a 1500 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação, seguido por incubação com 1 µL do segundo anticorpo por 30 min em gelo. Após as marcações, as células foram fixadas em paraformaldeído a 2% e transferidas para tubos próprios para FACS (*BD Biosciences*).

4.2.12. CITOMETRIA DE FLUXO

As células previamente marcadas foram analisadas em *FACSCalibur* (*BD Biosciences*) para avaliar a intensidade de fluorescência, uma vez que estavam marcadas com anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos. Em uma primeira leitura, foram analisados os parâmetros FSC e SSC, que proporcionam a estimativa de volume e granulosidade celular, respectivamente. A partir destes dados foi possível definir a população celular que seria avaliada.

Uma vez definida a população celular de estudo, as células foram analisadas de acordo com o anticorpo com o qual estavam marcadas. Para esta leitura, foram utilizados os detectores que captam a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo que está conjugado ao anticorpo. Foram utilizados diferentes detectores, de acordo com os fluoróforos presentes nos anticorpos, FITC (isotiocianato de

fluoresceína, do inglês - *fluorescein isothiocyanate*) para ACT-1 e PE (ficoeritrina, do inglês *phycoerythrin*) para o controle isotípico de IgG κ 1 de camundongo.

A cada leitura foram adquiridos 10.000 eventos (células), que foram plotados em gráficos de dispersão (*dotplot*). De posse dos dados foram construídos histogramas para comparar a eficiência de ligação dos diferentes anticorpos às células pertencentes aos diferentes genótipos do SNP rs1449263.

4.2.13. ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E ESTATÍSTICAS

As frequências dos dois diferentes alelos e dos três genótipos relativos ao SNP estudado foram calculadas manualmente para as coortes estudadas. Para a coorte de adultos soropositivos de SP, onde tínhamos disponíveis diversos dados clínicos, foram conduzidas análises no programa SPSS (IBM, Armonk, EUA) com o intuito de avaliar a associação entre a presença do SNP ou de genótipos definidos e diversos fatores clínicos e laboratoriais na fase aguda e na progressão para a Aids. Os seguintes fatores foram analisados: contagem de células T CD4⁺, de T CD8⁺ e carga viral do HIV-1 na entrada da coorte e a sobrevida livre de tratamento ao longo de 5 anos de infecção (neste caso, o desfecho utilizado foi a data para início do tratamento). Para comparar dados clínicos entre diferentes genótipos ou alelos foi usado o teste de *Mann-Whitney*.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. ANÁLISE DO SNP RS1449263 NO PROMOTOR DO GENE *ITGA4*

A partir de dados da literatura que destacam a maior frequência do genótipo CC no SNP rs1449263 em pacientes com esclerose múltipla quando comparados a indivíduos normais, foi avaliada a presença deste SNP no promotor do gene *itga4* das coortes analisadas. A Figura 4.1 mostra um gel de agarose onde amostras de DNA genômico foram utilizadas para amplificação da região que engloba este SNP. As amostras amplificadas com sucesso apresentam o fragmento do tamanho esperado, de 281pb. Este procedimento foi aplicado a todos os pacientes da coorte de São Paulo (223 pacientes), dos quais 222 amostras foram amplificadas com sucesso. A coorte de

adultos HIV-negativos contava com 67 amostras, todas amplificadas com sucesso. E a coorte pediátrica contava com 89 amostras, todas também amplificadas com sucesso.

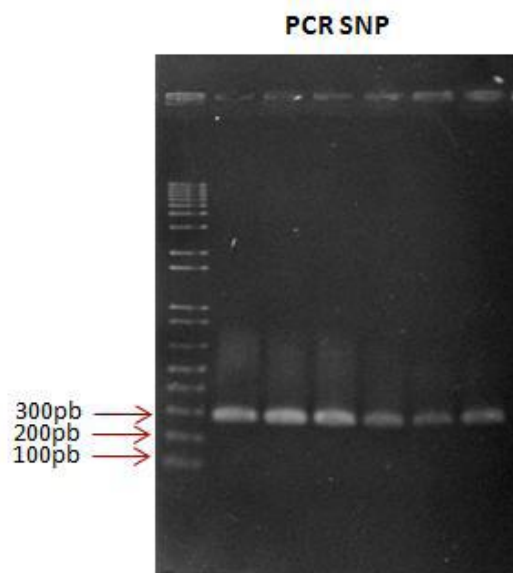


Figura 4.1 Gel de eletroforese representativo das amostras amplificadas para o SNP rs1449263. No primeiro poço observamos o marcador de peso molecular 1Kb plus Track it (Invitrogen). Nos demais poços foram aplicadas as amostras obtidas na PCR, todas amplificadas com sucesso.

A figura 4.2 mostra cromatogramas representativos dos diferentes genótipos observados para o SNP analisado: homozigoto CC, homozigoto TT e heterozigoto, respectivamente.

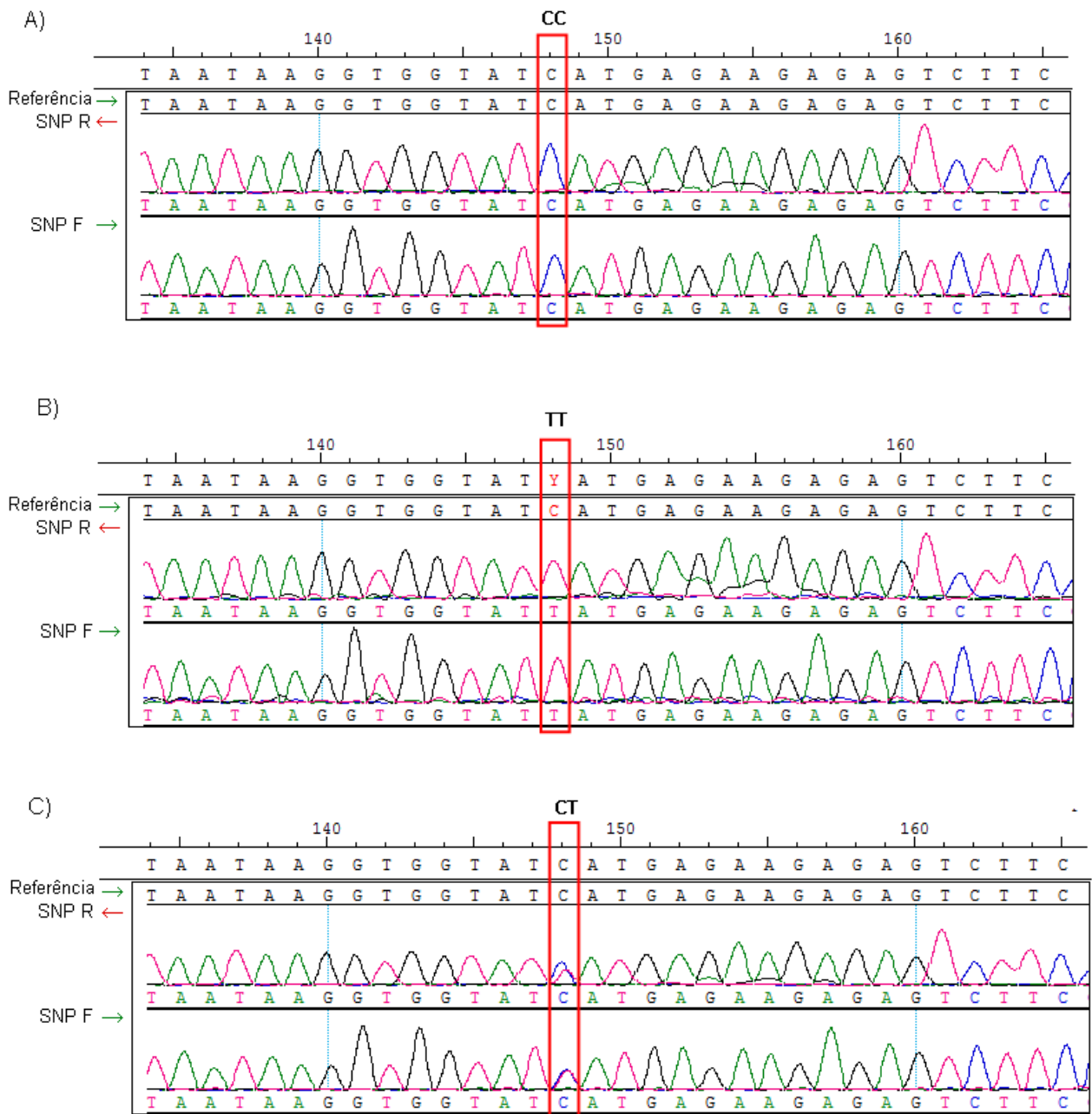


Figura 4.2 Cromatogramas representativos dos genótipos para o SNP rs1449263: (A) CC; (B) TT; (C) CT.

A distribuição de genótipos encontrada em cada coorte pode ser observada na Figura 4.3. Os grupos foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi possível rejeitar a hipótese nula (H_0 = população em equilíbrio) em nenhum deles (HARDY, 1908). Conforme esperado, foi observada uma maior prevalência de heterozigotos em ambas as coortes. A coorte pediátrica foi dividida em dois grupos:

crianças expostas não-infectadas (EUC) e crianças HIV+. Foi observado que as EUC apresentaram menor prevalência do genótipo CC (11%) quando comparados com as crianças HIV+ (30%). Para o genótipo TT foi observada uma prevalência de 36% nas EUC ao passo que as crianças HIV+ apresentaram uma menor prevalência deste genótipo, 16%. Apesar destas observações, quando as distribuições genotípicas encontradas foram testadas estatisticamente, não foram encontradas diferenças significativas.

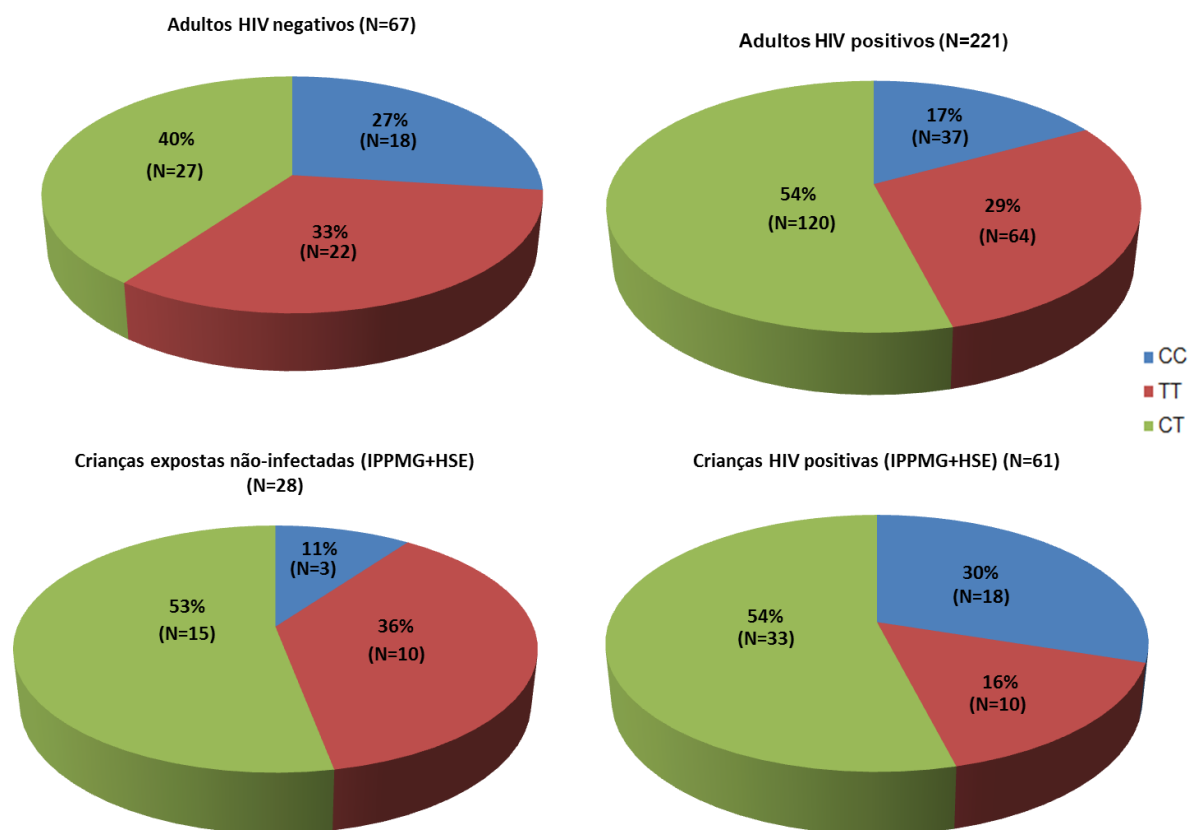


Figura 4.3 Distribuição dos genótipos para o SNP rs1449263 nos diferentes grupos estudados.

Foram calculadas ainda as frequências alélicas para ambas as coortes, conforme pode ser observado na tabela 4.2. Novamente foi observada diferença na prevalência de alelos entre os dois grupos de crianças, porém sem significância estatística.

Tabela 4.2 Frequência dos diferentes alelos para o SNP rs1449263 nas diferentes coortes estudadas.

Coorte	Alelo C	AleloT
Adultos HIV+	44%	56%
Adultos HIV-	47%	53%
Crianças HIV+	57%	43%
Crianças expostas não infectadas	38%	62%

4.3.2. EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *ITGA4* NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP RS1449263

No estudo de O'Doherty e colaboradores foi encontrada uma associação entre o alelo C do SNP rs1449263 e desenvolvimento da esclerose múltipla. Embora os autores tenham sugerido uma possível diferença de expressão de $\alpha 4$ pelos diferentes alelos, tal hipótese não foi avaliada até o momento. Desta forma, pretendíamos primeiramente testar tal hipótese, verificando a expressão de *itga4* a partir de indivíduos portando diferentes genótipos para o SNP analisado. Algumas amostras da coorte de adultos HIV-negativos foram selecionadas de acordo com a disponibilidade de material e submetidas à técnica de PCR em tempo real para análise dos níveis de mRNA de *itga4*. Foram avaliadas com sucesso 54 amostras, e os valores de expressão relativa podem ser observados na figura 4.4. Podemos observar a diferença de expressão entre as amostras pertencentes aos diferentes genótipos do SNP rs1449263, onde indivíduos com genótipo CC apresentaram maior expressão de *itga4* quando comparados aos demais genótipos.

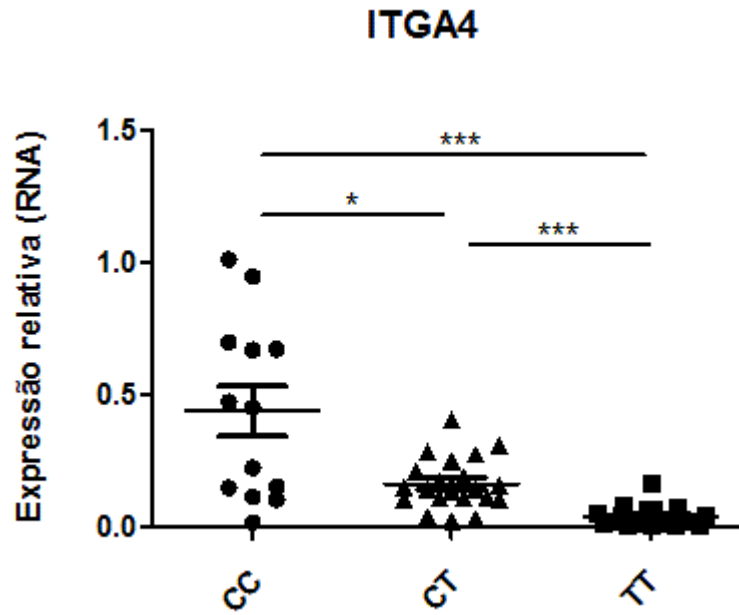


Figura 4.4 Expressão relativa do gene *itga4* em relação ao gene endógeno *gapdh* para indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos para o SNP rs1449263. Os valores de p foram significativos para todas as comparações N=54 (* p = 0,0256; *** p <0,0001).

A mesma análise foi realizada avaliando-se a expressão relativa de *itga4* para os diferentes alelos, e o resultado pode ser observado na figura 4.5. Mais uma vez, foi possível observar diferenças entre os grupos. Estes resultados sugerem que indivíduos pertencentes ao grupo de portadores do alelo C apresentam maior expressão de *itga4* quando comparados àqueles que não possuem este alelo (Fig. 4.5. A). Podemos observar também que indivíduos portadores do alelo T apresentam menor expressão de *itga4* quando comparados aos demais (Fig 4.5. B). Considerando ambas as análises, por genótipo e alelo, podemos observar uma relação crescente na expressão de *itga4* entre os diferentes genótipos, onde $TT < CT < CC$.

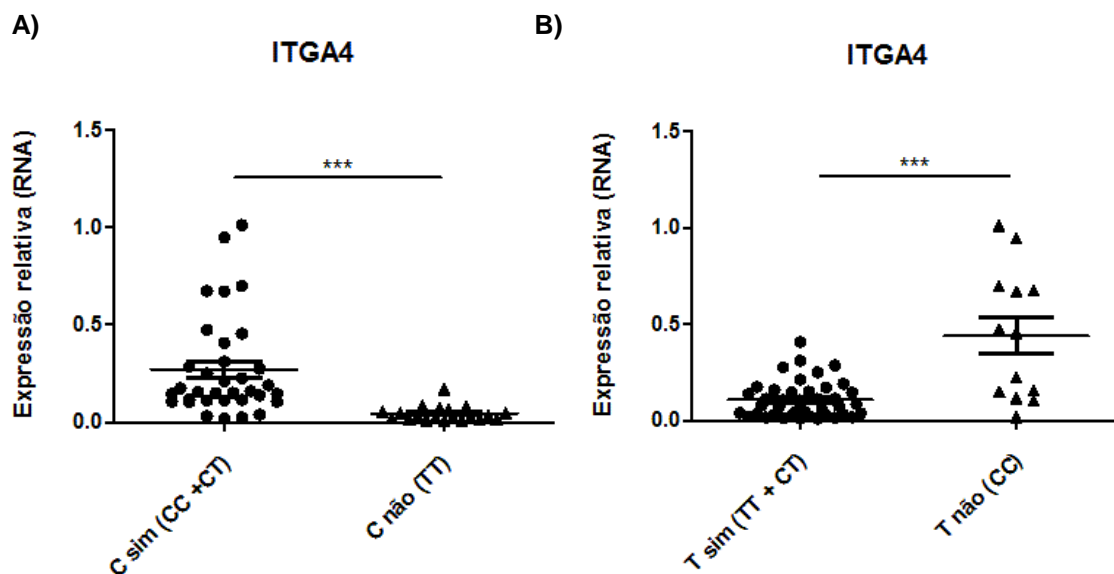


Figura 4.5 Expressão relativa do gene *itga4* em relação ao gene endógeno *gapdh* para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263. A) comparação entre portadores do alelo C (CT+CC) e não-portadores (TT). B) comparação entre portadores do alelo T (CT+TT) e não-portadores (CC). Os valores de p significativos estão demonstrados nos gráficos (***) $p < 0,0001$.

Com o intuito de avaliar a diferença entre os valores de expressão relativa obtidos para os diferentes genótipos, foi realizada a calibração das amostras através do método do $\Delta\Delta C_t$ e os resultados de *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) obtidos podem ser observados na figura 4.6. Para os indivíduos do grupo CC foi observada uma média de *fold change* 13x maior quando comparados à mediana de valores de ΔC_t obtidos para indivíduos do genótipo TT. Já para o grupo CT este aumento de expressão foi em torno de 5x, ao passo que indivíduos do grupo TT apresentaram um *fold change* em torno de 1,3x. Cabe ressaltar que todas as amostras foram avaliadas em relação ao mesmo calibrador.

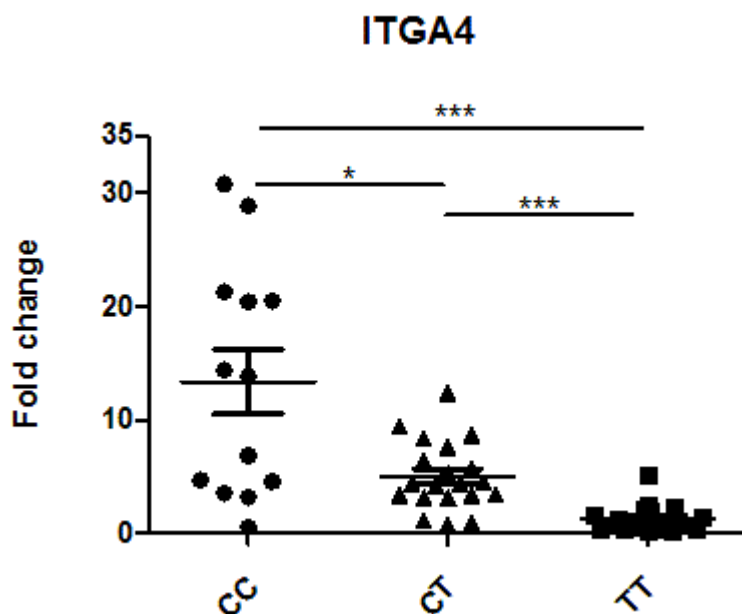


Figura 4.6 *Fold change* da expressão relativa do gene *itga4* para indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos para o SNP rs1449263. Os valores de p, significativos (< 0,05) para todas as comparações (* p = 0,0256, *** p <0,0001).

4.3.3. EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *ITGB7* E *ITGAE*

A integrina $\alpha 4$ pode parear com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 7$, sendo o heterodímero $\alpha 4\beta 7$ o mais importante no contexto do presente estudo. Um estudo publicado por Byrareddy e colaboradores em 2015 mostrou diferentes níveis de expressão de $\alpha 4\beta 7$ em diferentes primatas não-humanos usados como modelo para infecção por SIV (macaco resos, macaco fuligento e macaco rabo de porco). No mesmo trabalho, os autores mostram que o macaco fuligento (hospedeiro natural do SIV) apresentou uma frequência reduzida de células $\alpha 4\beta 7^+$. O mesmo foi observado quanto à intensidade de fluorescência para a marcação de $\alpha 4\beta 7$, mostrando uma redução destas moléculas na superfície das células destes animais. Curiosamente, os macacos fuligentos também apresentaram uma maior frequência de células expressando a integrina $\beta 7$ pareada com sua parceira alternativa αE ($\alpha E\beta 7$), ao passo que esta população celular não foi observada nos macacos resos e rabo de porco.

indivíduos portadores do alelo T (TT + CT) apresentaram uma menor expressão de *itgb7* quando comparados aos não portadores deste alelo (CC).

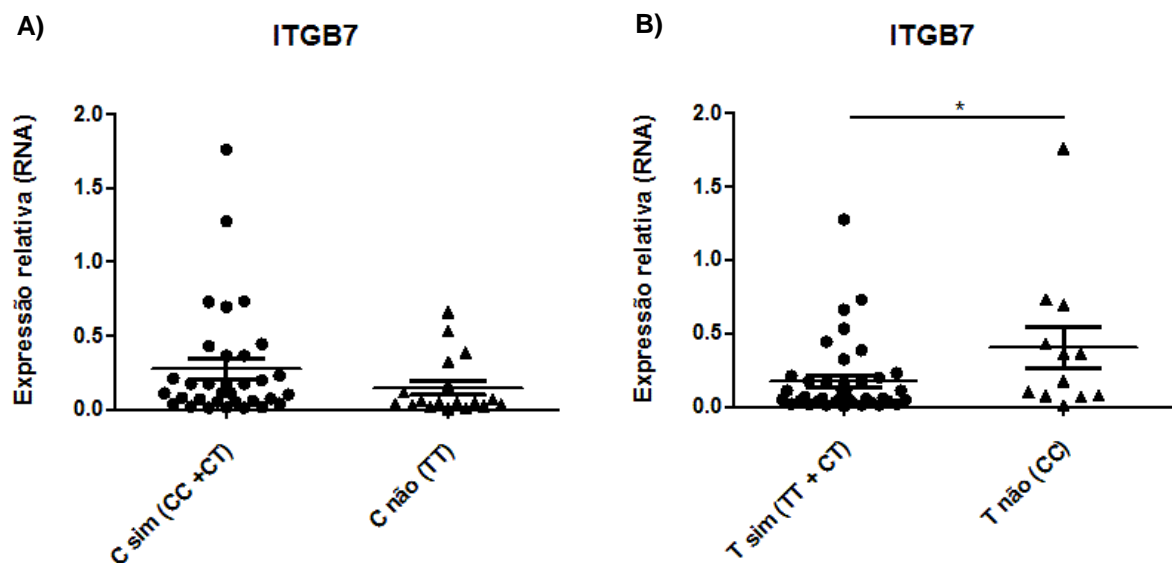


Figura 4.8 Expressão relativa do gene *itgb7* em relação ao gene endógeno *gapdh* para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263. A) Comparação entre portadores do alelo C (CT+CC) e não-portadores (TT). B) Comparação entre portadores do alelo T (CT+TT) e não-portadores (CC). O valor de p significativo está demonstrado no gráfico B (* p=0,034).

Apesar da associação entre diferenças de expressão não ter sido observada em todos os genótipos, observamos que na maioria das amostras avaliadas a expressão relativa de *itgb7* era compatível com a expressão relativa observada para *itga4*. Ou seja, em 33 das 51 avaliadas para *itgb7*, a expressão relativa deste gene era igual ou superior àquela observada para *itga4* no mesmo indivíduo. Estes resultados sugerem que, na maioria dos casos, foram observados níveis de expressão compatíveis para a produção do heterodímero $\alpha4\beta7$.

Com o intuito de verificar uma possível competição entre as subunidades $\alpha4$ e αE para a ligação com $\beta7$, avaliamos também a expressão do gene *itgae*. Ao todo foram avaliadas 28 amostras e os resultados de expressão relativa podem ser observados na figura 4.9. Não foram observadas diferenças estatisticamente

significativas na expressão relativa quando comparados os genótipos e alelos (figuras 4.9 e 4.10).

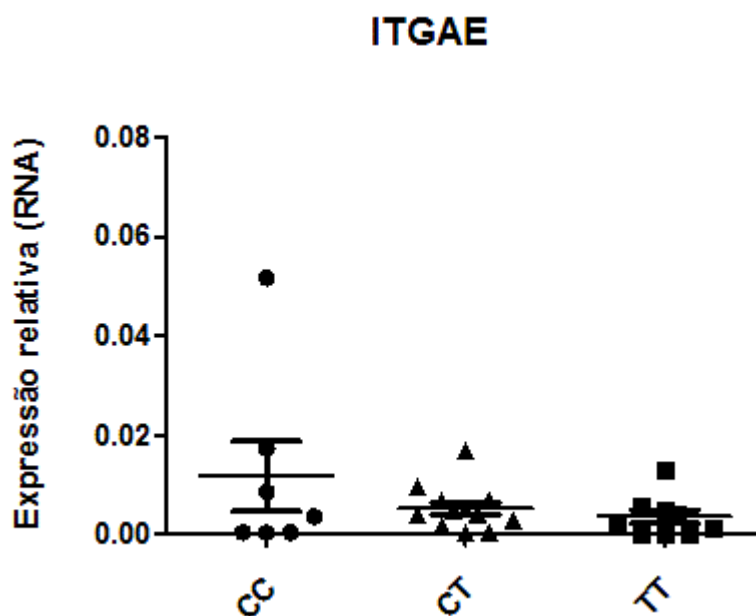


Figura 4.9 Expressão relativa do gene *itgae* em relação ao gene endógeno *gapdh* para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263.

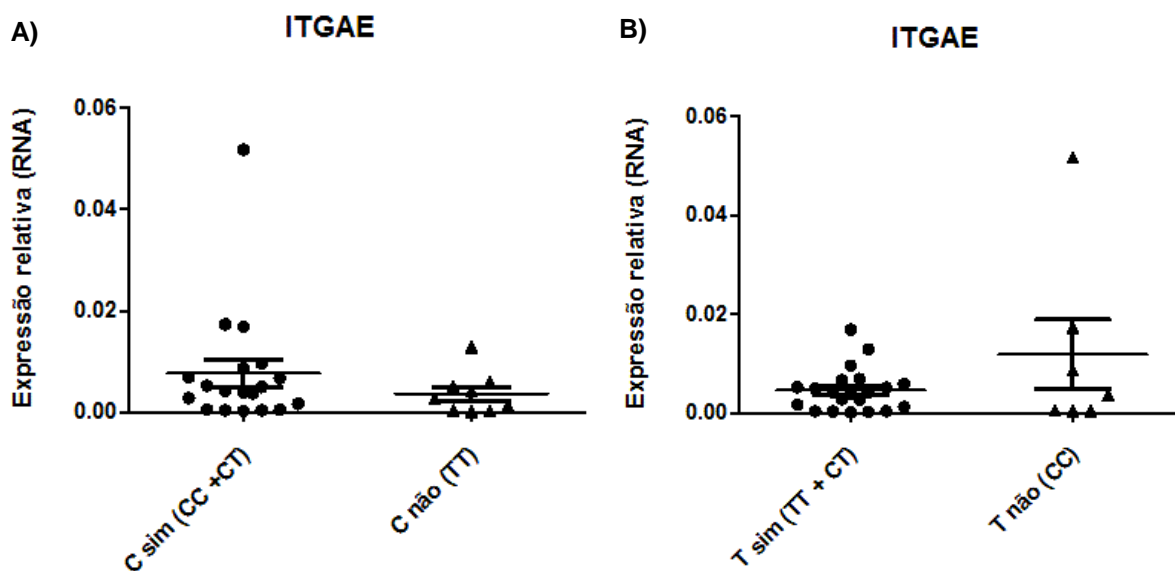


Figura 4.10 Expressão relativa do gene *itgae* em relação ao gene endógeno *gapdh* para indivíduos portadores dos diferentes alelos para o SNP rs1449263. A) Comparação entre portadores do alelo C (CT+CC) e não-portadores (TT). B) Comparação entre portadores do alelo T (CT+TT) e não-portadores (CC).

Os valores de expressão relativa para *itgae* mostraram-se inferiores aos observados para *itga4* e *itgb7*. Isto pode estar relacionado ao fato de que a integrina αE apresenta função de retenção de linfócitos no GALT e, portanto, é mais expressa em células presentes neste tecido. O presente estudo avaliou células do sangue periférico, e desta forma não foi encontrada expressão de αE em abundância neste tecido.

4.3.4. EXPRESSÃO DE $\alpha 4\beta 7$ NA SUPERFÍCIE CELULAR EM DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP RS1449263

De posse dos dados de expressão gênica, nos perguntamos se as diferenças observadas em nível de mRNA (na PCR em tempo real) poderiam se refletir também no nível de proteínas expressas. Para verificar esta hipótese, PBMCs de algumas amostras o grupo controle de indivíduos HIV- foram marcadas com o anticorpo ACT-1 (anti- $\alpha 4\beta 7$) e submetidas à citometria de fluxo para avaliar a presença da proteína $\alpha 4\beta 7$ na superfície das células. Foram avaliadas 5 amostras por esta técnica.

Na figura 4.11A, podemos observar o gráfico de dispersão para os parâmetros de tamanho e granulosidade (FSC e SSC, respectivamente) para as PBMCs. Na região G1 podemos observar a população de linfócitos selecionada para o estudo. Em 4.11B, podemos observar o gráfico de dispersão para o controle negativo com células marcadas com IgG isotípico de camundongo conjugado a PE, e conforme esperado não foi possível detectar células positivas para o parâmetro FL-2.

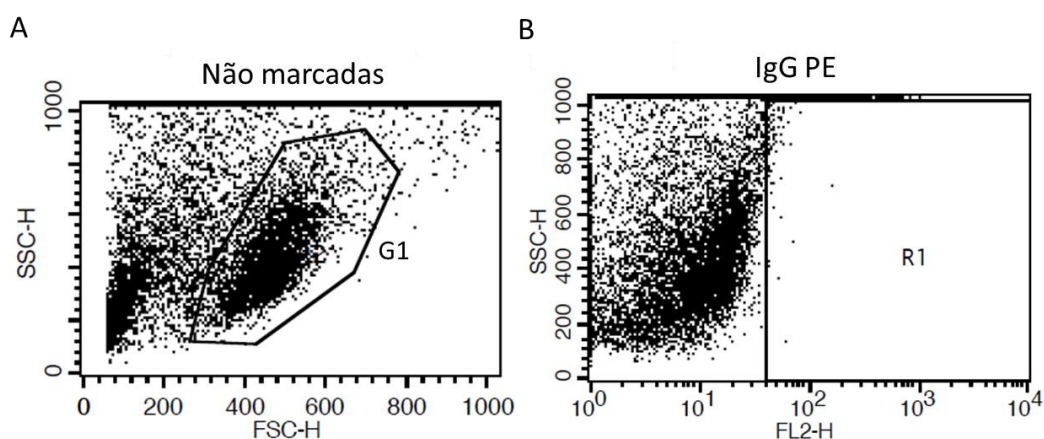


Figura 4.11 Gráfico de dispersão mostrando controles. (A) População de células estudada. (B) Controle negativo de células marcadas com IgG.

Ao analisar os gráficos de dispersão das células marcadas com o anticorpo ACT-1-FITC (anti- $\alpha_4\beta_7$), observamos células positivas para o parâmetro FL-1 nos gráficos dos diferentes genótipos, indicando positividade para a marcação com ACT-1 (Fig. 4.12). Os resultados obtidos foram colocados na forma de histogramas e podem ser observados na figura 4.3.4.3.

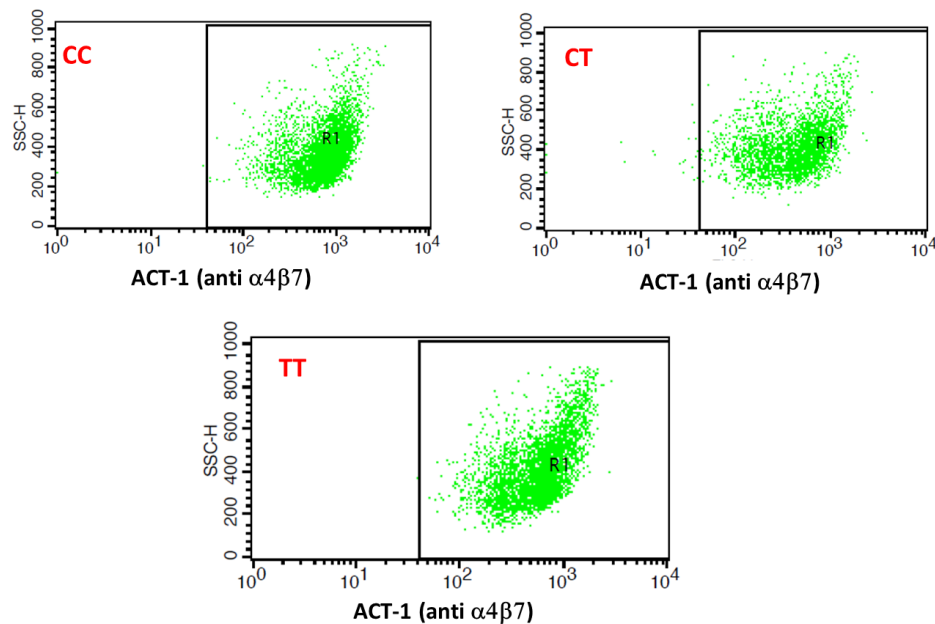


Figura 4.12 Gráfico de dispersão mostrando células de indivíduos representativos dos diferentes genótipos para o SNP rs1449263 marcadas com ACT-1.

A figura 4.13 mostra histogramas construídos para três das cinco amostras analisadas, uma pertencente a cada genótipo estudado. Podemos observar que a amostra pertencente ao genótipo CC apresenta maior positividade para a marcação com ACT-1 quando comparada aos demais genótipos. Foi encontrada para as células pertencentes ao genótipo CC uma média de fluorescência de 725, seguido de 391 para o genótipo CT e 226 para o TT, indicando a presença de mais $\alpha_4\beta_7$ na membrana das células pertencentes ao genótipo CC.

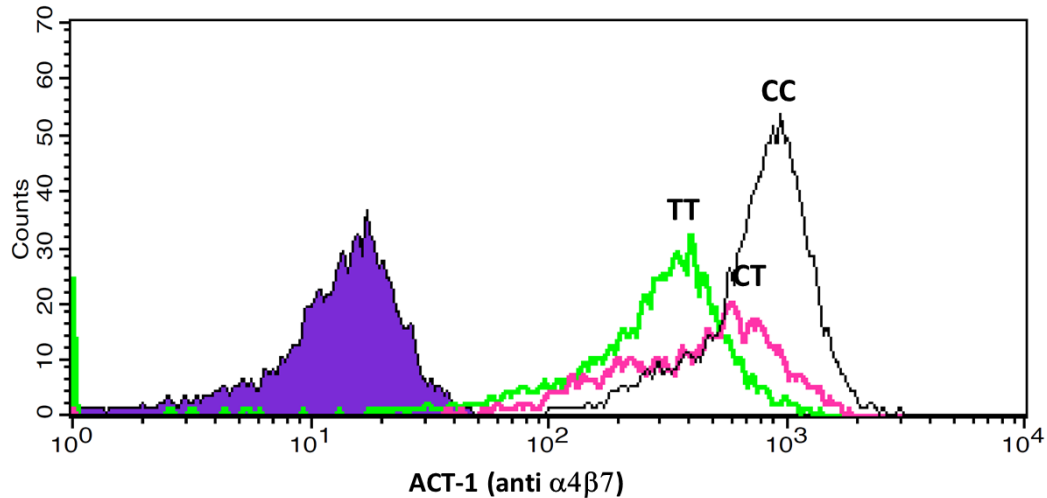


Figura 4.13 Histograma mostrando células de indivíduos dos diferentes genótipos marcadas com ACT-1. Os genótipos de cada amostra estão indicados na figura, a amostra em roxo representa o controle de células marcadas com IgG isotópico de camundongo.

4.3.5. ASSOCIAÇÃO DE DADOS GENÉTICOS COM DADOS CLÍNICOS

Para a coorte de São Paulo, os dados genótipicos foram analisados com dados clínicos na tentativa de encontrar possíveis associações entre a expressão de $\alpha 4$ e estes dados. Não foram encontradas associações entre os valores iniciais de contagens de células T $CD4^+$ e carga viral do HIV (referentes à primeira visita clínica após o arrolamento no estudo) entre os genótipos e nem entre os alelos para o SNP estudado. Os resultados podem ser observados na figura 4.14.

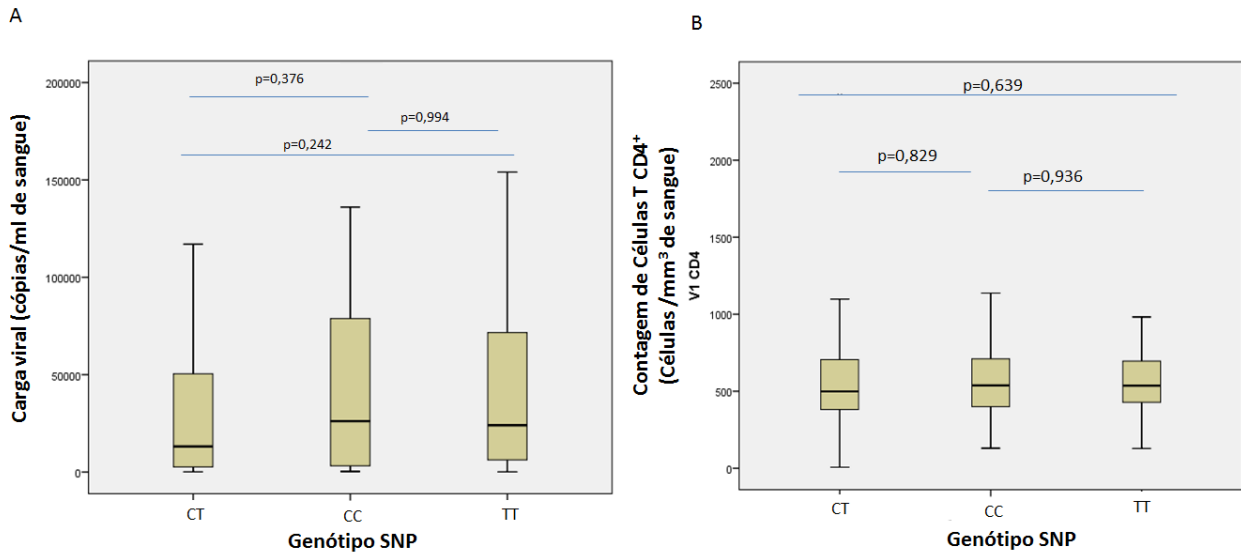


Figura 4.14 Box plots com valores de carga viral do HIV (A) e contagem de células T CD4⁺ (B) para indivíduos carregando diferentes genótipos para o SNP rs1449263. Ambos os valores referem-se à primeira medição realizada para cada indivíduo. Os valores de p podem ser observados no gráfico.

Para a primeira contagem de células T CD8⁺, foi observada uma menor contagem destas em indivíduos carregando o genótipo CT, quando comparadas às dos demais genótipos (Fig. 4.15).

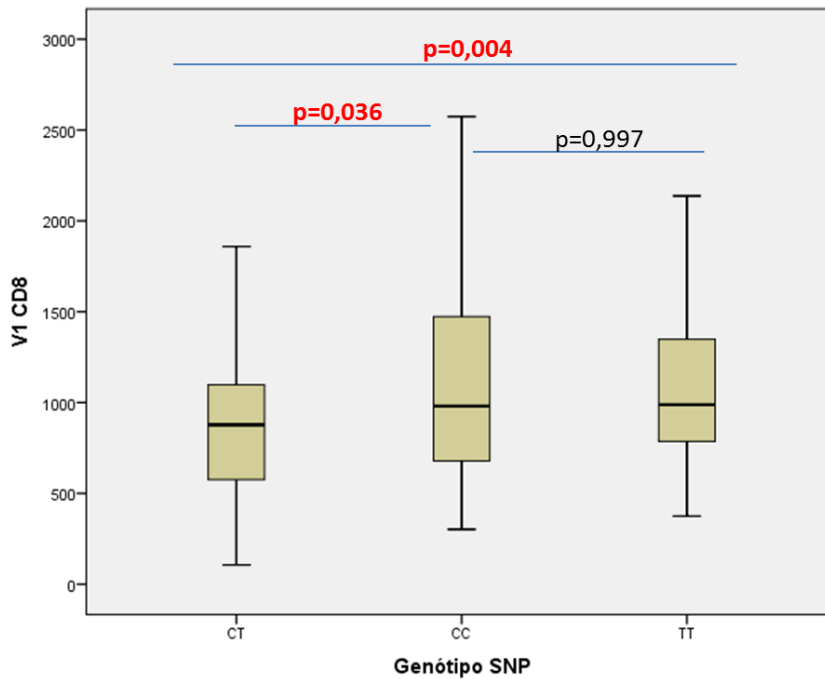


Figura 4.15 Contagem de células T CD8⁺ para indivíduos carregando diferentes genótipos para o SNP rs1449263. Os valores referem-se à primeira medição realizada para cada indivíduo. Os valores de p podem ser observados no gráfico, e aqueles significativos ($p < 0,05$) estão destacados em vermelho.

A mesma análise foi realizada considerando a presença e ausência de alelos específicos. Primeiramente, analisamos a presença do alelo C, ou seja, comparando-se os genótipos CC + CT *versus* TT (Fig 4.16). Foi observado que o grupo de indivíduos portadores do alelo C apresentou menor contagem de células T CD8⁺ quando comparado ao grupo que não possuía este alelo.

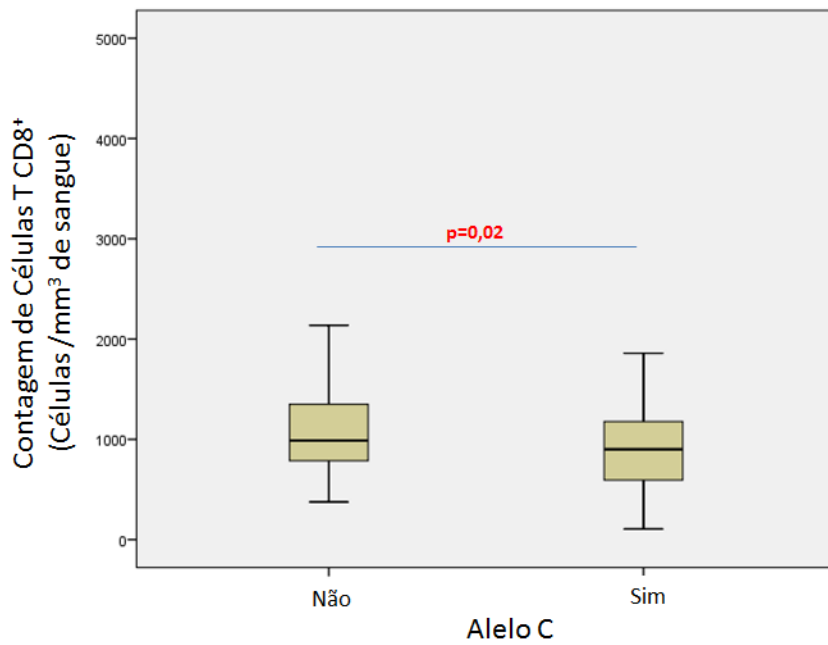


Figura 4.16 Contagem de células T CD8+ para indivíduos dos grupos de portadores (Sim) ou não (Não) do alelo C para o SNP rs1449263. Os valores referem-se à primeira medição realizada para cada indivíduo. O valor de p significativo ($p < 0,05$) está destacado em vermelho.

Também avaliamos a presença ou ausência do alelo T, ou seja, comparando os portadores dos genótipos CT + TT *versus* CC (Fig. 4.17). Neste caso, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Nossos dados sugerem que as diferenças aqui observadas podem estar relacionadas à presença do alelo C. Neste caso, a hipótese sugerida seria a de que indivíduos portadores do alelo C apresentariam menor contagem de células T CD8+ no início do acompanhamento quando comparados àqueles que não possuem este alelo.

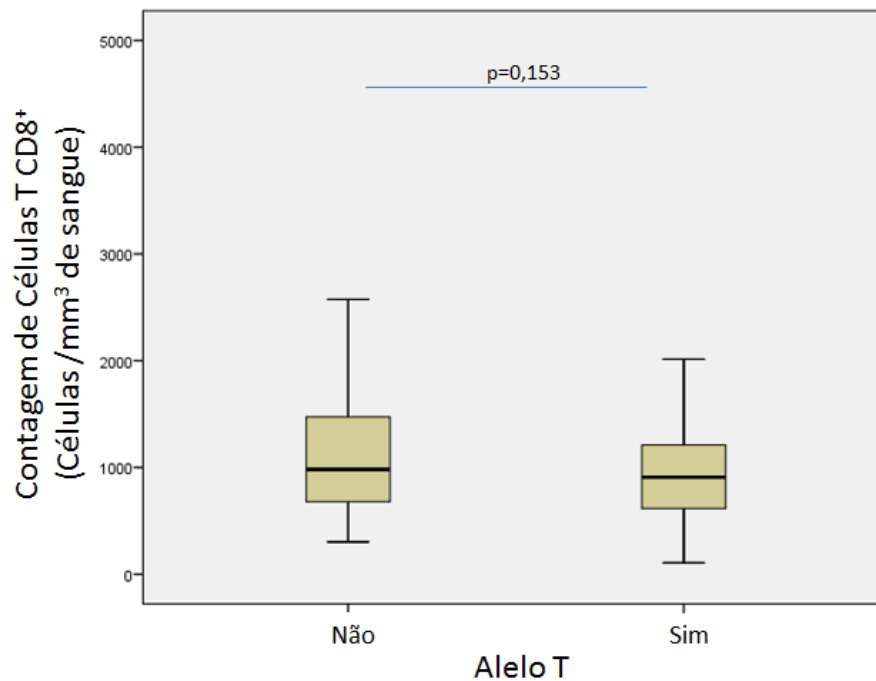


Figura 4.17 Contagem de células T CD8+ para indivíduos dos grupos de portadores (Sim) ou não (Não) do alelo T para o SNP rs1449263. Os valores referem-se à primeira medição realizada para cada indivíduo. O valor de p pode ser observado no gráfico.

Adicionalmente aos parâmetros de fase aguda ou precoce da infecção pelo HIV nos pacientes analisados, também avaliamos possíveis efeitos da expressão dos diferentes alelos de *itga4* na progressão da doença na coorte de São Paulo. Dado que, no momento da análise, a terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART) era recomendada clinicamente a partir de determinados parâmetros clínicos, imunológicos e virológicos do paciente no Brasil, nossa análise de progressão foi restrita (censurada) pelo início do tratamento. Desta forma, utilizamos a entrada em tratamento como desfecho em análises de sobrevida de nossos pacientes portando diferentes genótipos ou alelos para o SNP rs1449263. A figura 4.18 mostra uma análise de sobrevida livre de tratamento para os indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos ($p=0,368$).

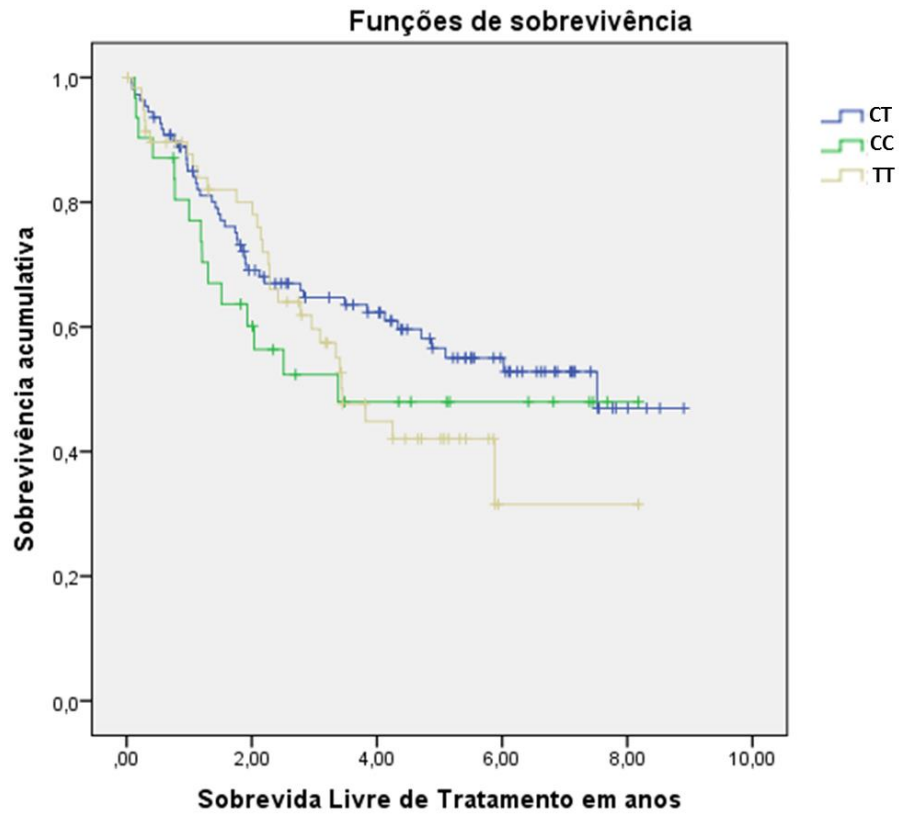


Figura 4.18 Análise de sobrevida livre de tratamento (Kaplan-Meier) para pacientes portando os diferentes genótipos do SNP rs1449263. As censuras dos pacientes de cada curva (ou seja, o momento em que são interrompidos na análise por iniciarem o tratamento antirretroviral) são mostradas por barras verticais em cada curva ao longo do tempo.

A análise de sobrevida também foi realizada para os diferentes alelos do SNP rs1449263. A figura 4.19 mostra as curvas de *Kaplan-Meier* para ambos os alelos, e não foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas.

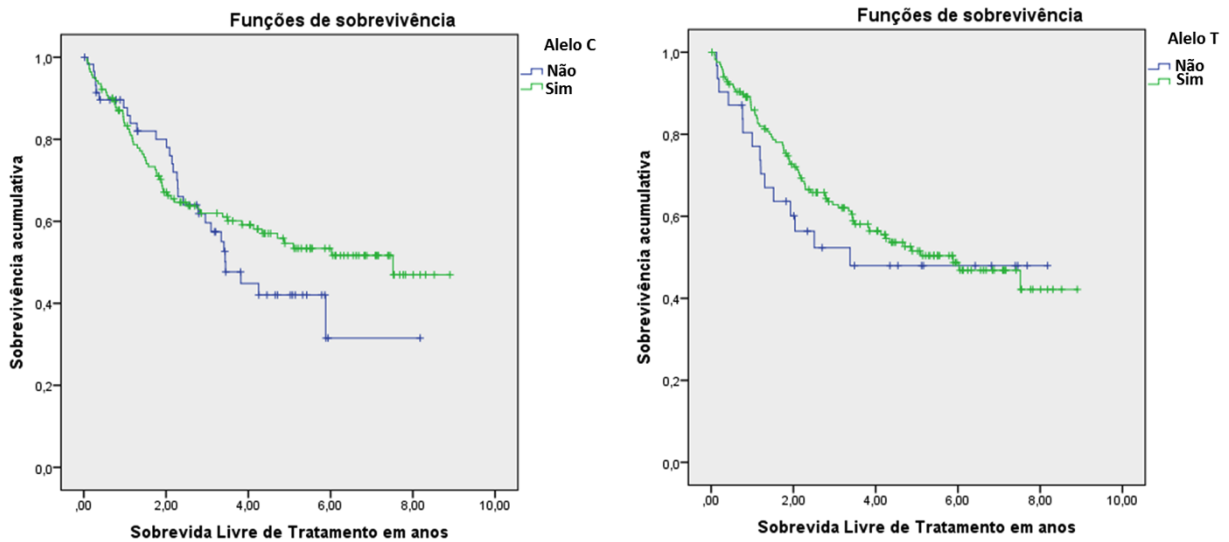


Figura 4.19 Análise de sobrevida livre de tratamento (*Kaplan-Meier*) para os portadores de diferentes alelos do SNP rs1449263. A) Comparação entre portadores do alelo C (CT+CC) e não-portadores (TT) ($p=0,583$). B) Comparação entre portadores do alelo T (CT+TT) e não-portadores (CC) ($p=0,491$). As censuras dos pacientes de cada curva (ou seja, o momento em que são interrompidos na análise por iniciarem o tratamento antirretroviral) são mostradas por barras verticais em cada curva ao longo do tempo.

5. ESTÍMULO DE CÉLULAS T CD4⁺ A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE A₄B₇ E MADCAM

Neste capítulo iremos abordar alguns aspectos da ativação de células T CD4⁺ naïves via integrina $\alpha_4\beta_7$ e a replicação do HIV nestas células. Os experimentos aqui apresentados foram desenvolvidos no Laboratório de Imunorregulação (LIR – NIAID – NIH, Bethesda, EUA), sob supervisão do Dr. James Arthos, autor do trabalho que mostrou pela primeira vez a interação da integrina $\alpha_4\beta_7$ com o HIV. Este trabalho faz parte de um projeto maior desenvolvido pelo grupo do Dr. Arthos que tem como objetivo principal avaliar o papel da integrina $\alpha_4\beta_7$ na aquisição do HIV e no estabelecimento da infecção na mucosa intestinal.

Através de técnicas como cultivo de células primárias, citometria de fluxo e *AlphaLISA*, este capítulo tem como principal objetivo avaliar o efeito do co-estímulo via $\alpha_4\beta_7$, em células T CD4⁺ naïves e seus efeitos na capacidade destas células em suportar a replicação do HIV.

5.1. OBJETIVOS

- Avaliar a capacidade do co-estímulo via $\alpha_4\beta_7$ induzir a proliferação celular em linfócitos T CD4⁺ naïves.
- Avaliar a capacidade de células T CD4⁺ naïves produzirem HIV quando co-estimuladas por MAdCAM.
- Avaliar a indução do ciclo celular em células T CD4⁺ naïves submetidas ao co-estímulo por MAdCAM

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. IMOBILIZAÇÃO DE PLACA COM LIGANTES

Para a imobilização de placas com ligantes de diferentes receptores celulares foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços de fundo chato. A cada poço foram adicionados 100 µL de tampão HBS 1x (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA), 200ng de anticorpo anti-CD3 (clone OKT3, *eBioscience*, San Diego, EUA), e a mistura foi incubada a 4°C por 2 horas. Em seguida, foram adicionados os ligantes secundários aos respectivos poços: 200 ng de MAdCAM solúvel (*R&D Biosystems*, Minneapolis, EUA) e 200ng de anticorpo anti-CD28 (*eBioscience*, San Diego, EUA). A placa foi mantida a 4°C, envolta em *parafilm*, por no mínimo 16h e no máximo 96h, até que as células fossem adicionadas. Em alguns casos foi adicionado ácido retinóico (RA) 10 nM à cultura no momento em que as células foram adicionadas. As seguintes condições foram utilizadas:

- anti-CD3
- anti-CD3 + anti-CD28
- anti-CD3 + anti-CD28 + ácido retinóico
- anti-CD3 + anti-CD28 + MAdCAM + ácido retinóico
- anti-CD3 + MAdCAM
- anti-CD3 + MAdCAM + ácido retinóico

De uma forma geral, eram preparadas três placas por experimento. Destas, uma era submetida ao ensaio de proliferação celular, outra à avaliação do ciclo celular e a terceira à infecção por HIV *in vitro* conforme descritos a seguir.

5.2.2. EXTRAÇÃO DE PBMC

Células mononucleares do sague periférico foram extraídas por gradiente de ficoll a partir de *buffy coat* ou *Leucopak* (dependendo do número de células necessárias e disponibilidade de doadores) providos pelo banco de doadores de sangue do *National Institutes of Health* (NIH – Bethesda, EUA). A quantidade disponível foi dividida em tubos Falcon de 50 mL (*Sarstedt*, Nuembrecht, Alemanha). A cada 25 mL de sangue ou

produto de aferese foram misturados 25 mL de PBS 1x (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA). Esta mistura foi adicionada lentamente a dois novos tubos *Falcon*, ambos contendo 10 mL de meio para separação de linfócitos LSM (do inglês *Lymphocyte separation medium*) (*MP Biomedicals*, Santa Ana, EUA). Após este processo, as amostras foram submetidas à centrifugação em centrífuga de rotor de angulação livre por 30 min a 1500 rpm. Ao final da centrifugação, era possível observar o anel leucocitário formado pelo gradiente. Este anel foi colhido e transferido para um novo tubo. No caso de haver mais de um tubo de gradiente de ficoll por doador, nesta etapa todos os anéis leucocitários foram adicionados a um mesmo tubo cônico de 50 mL. A este tubo foram adicionados 50 mL de PBS 1x, seguido de centrifugação por 5 min a 1200 rpm (lavagem). O processo de lavagem foi repetido duas vezes e, antes da última centrifugação, foram retirados 10 µL para contagem de células.

A contagem automática de células foi realizada no equipamento *Countess® Automated Cell counter* (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA). Inicialmente foi realizada uma diluição 1:10, em PBS 1x, do material reservado para contagem. Dez microlitros desta diluição foram adicionados a 10 µL de azul de tripan a 0.4% (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA) e 10 µL desta mistura foram aplicados em lâminas *Countess* (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA) para leitura no contador automático de células. As PBMCs extraídas foram ressuspensas em PBS contendo 10% de soro fetal bovino (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA) para uma concentração de 5×10^7 células/mL.

5.2.3. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS T CD4⁺

A extração de linfócitos T CD4⁺ foi realizada com o sistema para seleção negativa *Easystep Human CD4+ T Cell Enrichment kit* (*StemCell Technologies*, Vancouver, Canadá). Em um tubo cilíndrico de 14 mL, foram adicionados 8 mL da suspensão de PBMCs (BD, Nova Jersey, EUA) e 50 µL/mL do coquetel de anticorpos provido pelo sistema, seguido de incubação por 10 min à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 100 µL/mL de esferas magnéticas, que foram homogeneizadas com a utilização de pipeta, e a solução resultante foi incubada por 5 min a temperatura ambiente. Ao final deste tempo, o tubo cilíndrico foi inserido em uma estante magnética. Após 5 min e ainda na estante, os tubos foram invertidos para que somente seu

conteúdo líquido fosse transferido para um novo tubo cônico de 50 mL (*Sarstedt*, Nuembrecht, Alemanha).

A solução contendo os linfócitos T CD4⁺ recém isolados foi mantida em tubo cônico, ao qual foi adicionado meio RPMI (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA) com 10% de soro fetal bovino (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA) q.s.p 50 mL. Após homogeneização do conteúdo por inversões do tubo, foram reservados 10 µL desta amostra para contagem celular e o restante foi submetido à centrifugação por 5 min a 1300 rpm.

5.2.4. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAÏVE (CD45RO⁻)

O isolamento de células T CD4⁺ naíves foi realizado com o sistema de seleção positiva para células T CD4⁺ CD45RO⁺ *MACS CD45RO MicroBeads* (*Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach, Alemanha). O precipitado contendo os linfócitos T CD4⁺ foi ressuspenso em 80 µL/10⁷ células de tampão de separação (PBS 1x, BSA a 0,5%, EDTA a 2mM). Em seguida, foram adicionadas as esferas magnéticas com afinidade a CD45RO. O protocolo do fabricante recomenda 20 µL da solução de esferas para 10⁷ células, mas no presente trabalho este valor foi acrescido em 20%. Uma vez adicionadas as esferas, a amostra foi incubada por 15 min a 4°C.

Passado este período, foram adicionados 2 mL/10⁷ células de tampão de separação (lavagem), seguido de centrifugação a 300x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta sorológica. As células foram ressuspenso em 500 µL de tampão de separação. A coluna de separação instalada em estante magnética foi equilibrada com 3mL de tampão de separação, que ao passar pela coluna era coletado em tubo localizado abaixo da mesma. Este processo foi repetido mais 2 vezes e finalizado com o descarte do tubo coletor. Uma vez equilibrada a coluna, foram adicionados os 500 µL de suspensão celular. À medida que a suspensão passava através da coluna por gravidade, ela era coletada em um novo tubo. Ao final do processo a coluna foi lavada com 3 mL de tampão de separação por 3 vezes. Deste volume final (~9,5 mL), 10µl foram retirados para contagem de células (conforme descrito no item 3.3) e o restante da solução contendo as células purificadas e tampão foi centrifugado a 1500 RPM por 5 min.

As células centrifugadas foram divididas em duas alíquotas. A destinada ao processo de marcação com CFSE foi ressuspensa em PBS 1X para a concentração de 5×10^6 células/mL (item 3.6), e a outra alíquota foi ressuspensa em meio RPMI 10% FBS até a concentração de 2×10^6 células/mL para ser utilizada no experimento com placas imobilizadas com ligantes (descrito no item 3.1), onde foram adicionadas 200.000 células/poço. Com o objetivo de induzir uma maior expressão da integrina $\alpha_4\beta_7$, neste momento também foi adicionado ácido retinóico 10 nM (RA) aos poços, quando era o caso. As células foram mantidas em incubadoras a 37°C e CO₂ a 5% por 72h. Ao final desta incubação, parte das células foi submetida à análise de ciclo celular e outra a ensaios de proliferação e infecção por HIV.

5.2.5. FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS PURIFICADAS

Algumas células obtidas no item 3.4 foram utilizadas para fenotipagem, isto é, para confirmar o tipo celular resultante do processo de extração e para checar a pureza do produto obtido. Para isto, as células foram adicionadas às placas de 96 poços de fundo V (200.000 células/poço) e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado com 100 µL de PBS 1x. A cada poço foi adicionado 1µL do respectivo anticorpo (conforme tabela 5.1), seguido de incubação por 20 min à temperatura ambiente e protegidos de luz. Ao final da incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II. A partir desta análise, foi possível avaliar a pureza das células e decidir se o experimento seria continuado ou não. Neste trabalho, optou-se por utilizar somente células com pureza acima de 96%, ou seja, quando pelo menos 96% das células isoladas eram CD45RO⁻ e CD45RA⁺, apresentando um fenótipo de células T CD4⁺ naïve.

Tabela 5.1 Anticorpos utilizados na marcação de células para fenotipagem.

Anticorpo	Fluoróforo	Fabricante
Anti- α 4	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
Anti- β 7	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CCR5	Bv421	<i>BD Pharmingen</i>
CD4	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD8	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD25	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD28	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD45RO	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD45RA	Bv510	<i>BD Pharmingen</i>
CD62L	Ficoeritrina (PE)	<i>BD Pharmingen</i>
CD127	Bv421	<i>BD Pharmingen</i>
HLADR	Ficoeritrina Cy7 (PE Cy7)	<i>BD Pharmingen</i>

5.2.6. MARCAÇÃO DE CÉLULAS COM CFSE (DO INGLÊS 5-(AND 6)-CARBOXYFLUORESCEIN DIACETATE SUCCINIMIDYL ESTER) E ENSAIO DE PROFILERAÇÃO CELULAR

Uma porção das células TCD4⁺ CD45RO⁻ foi utilizada em ensaios de proliferação celular. Para tal, as mesmas foram marcadas com o corante intracelular *CellTrace CFSE proliferation kit* (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA). O precipitado celular proveniente do item 3.4. foi dividido e ressuspenso em quantidade necessária de PBS 1x para obter a concentração de 5x10⁶ células/mL. A esta mistura foi adicionado CFSE para uma

concentração final de 5 μ M, seguido de incubação por 8 min a temperatura ambiente e protegido da luz. Ao final deste processo foram adicionados 10 mL de meio RPMI com FBS a 10%, seguido de incubação por 10 min a temperatura ambiente e protegido da luz. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm por 10 min e lavadas duas vezes com RPMI com FBS a 10%. Ao final, as células foram ressuspensas a uma concentração de 2x10⁶ células/mL e foram adicionadas às placas previamente imobilizadas conforme descrito no item 3.1 (200.000 células/ poço).

As células foram mantidas em incubadoras a 37°C e CO₂ a 5% por 5 dias, e ao final deste tempo as células foram transferidas para placas de 96 poços de fundo V (200.000 células/ poço) e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado com 100 μ L de PBS 1x. A cada poço contendo células, foram adicionados 1 μ L de anticorpo anti-CD45RO e 1 μ L de anti- β_7 (item 5.2.5). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e protegidos da luz por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e analisadas em citômetro de fluxo *FACS Canto II*.

5.2.7. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Com o objetivo de avaliar em que etapas do ciclo celular as células estimuladas poderiam estar, as mesmas foram submetidas à marcação com Iodeto de propídeo (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA). Após 72 e/ou 96h de estímulo, as células foram transferidas para placas de 96 poços em fundo V e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a estas células foram adicionados 250 μ L de uma solução contendo 50 μ g/mL de iodeto de propídeo, tampão citrato a 4 mM e Triton x100 a 0,3%. Em seguida, foram adicionados 250 μ L de solução contendo 100 μ g/mL de Ribonuclease A (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) em tampão citrato a 400 mM. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min e logo em seguida foram analisadas em citômetro de fluxo *FACS Canto II*.

5.2.8. ENSAIO DE INFECÇÃO VIRAL

Após o período de incubação de 72h, parte das células estimuladas (item 3.4) foi submetida à infecção pelo HIV-1 *in vitro*. Para isto, foram adicionados a cada poço 2 µL de uma sobrenadante de cultura celular contendo a cepa viral SF162 (p24 = 16 ng/mL), e as amostras foram mantidas em incubadoras a 37°C e CO₂ a 5% por 16h. Passado o período de incubação, as células foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 5 min (dia 1 pós-infecção). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e foram adicionados 120 µL de RPMI com FBS a 10% (lavagem). O processo de lavagem foi realizado 3 vezes e ao final do último, 50 µL foram retirados, depositados em placas de 96 poços de fundo chato para serem mantidos a -80°C.

As células lavadas foram ressuspensas em 100 µL de RPMI com FBS a 10%, com nova adição de ácido retinóico a 10 nM aos respectivos poços, e as culturas foram mantidas em incubadoras a 37°C, a 5% de CO₂ por mais 3 e 6 dias (dias 4 e 7 pós-infecção, respectivamente). Passado o período de incubação, foram coletados 50 µL do sobrenadante e as células foram mantidas em placas de 96 poços de fundo chato a -80°C. Caso ainda houvesse mais tempo de incubação, mais três dias até que o sétimo dia pós-infecção fosse atingido, eram adicionados 50 µL de RPMI com FBS a 10%, além de ácido retinóico a 10 nM aos poços incubados com esta condição. O processo de recuperação e estocagem realizado nesses poços foi o mesmo realizado nos poços do quarto dia após infecção.

5.2.9. MEDIÇÃO DE P24 POR *ALPHALISA*

Para avaliar a replicação viral mediante os diferentes estímulos, as células infectadas (item 3.8) foram submetidas a um ensaio de *AlphaLisa* para detecção da proteína viral p24. Nesta etapa foi utilizado o sistema *HIV p24 (high sensitivity) AlphaLISA detection kit* (PerkinElmer, Santa Clara, EUA) e o ensaio foi realizado segundo recomendações do fabricante. Os sobrenadantes das culturas celulares provenientes dos ensaios de infecção foram descongelados por 45 min à temperatura ambiente. Diluições seriadas dos sobrenadantes foram realizadas em placas de 96 poços de fundo chato, em duplicata, nas seguintes proporções: 1/50, 1/100, 1/200 e

1/400. As diluições para a curva-padrão foram realizadas segundo recomendações do fabricante.

Uma vez prontas as diluições de curva-padrão e amostras, foram adicionados 5 μ L de uma mistura contendo esferas aceptoras e anticorpos biotinilados anti-p24 à placa de *AlphaLISA*. Em seguida, foram adicionados 5 μ L das diluições do padrão ou das amostras em seus respectivos poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1h, quando então 40 μ L de esferas magnéticas doadoras cobertas com streptavidina foram adicionadas e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por mais 30 min, protegidas da luz. A análise dos resultados foi feita no leitor de placas *Enspire* (PerkinElmer).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. RESULTADOS PRÉVIOS

Estudos prévios do grupo do Dr. Arthos (dados ainda não publicados) avaliaram o efeito do estímulo de células T CD4⁺, utilizando MAdCAM-1 como molécula co-estimulatória. A metodologia destes estudos foi a mesma empregada no presente trabalho, porém utilizando células T CD4⁺ totais (*bulk*) ao invés de apenas células T CD4⁺ naives. Através de ensaios de replicação viral foi possível observar que o co-estímulo de células T CD4⁺ com anti-CD3 + MAdCAM foi capaz de induzir a replicação viral, quando estas células foram infectadas com HIV-1, se comparadas às células estimuladas apenas com anti-CD3 (figura 5.1).

Para avaliar se a intensa replicação viral observada estava associada ao co-estímulo de $\alpha_4\beta_7$ via MAdCAM, foi adicionado às culturas celulares um anticorpo monoclonal anti- $\alpha_4\beta_7$ (mAb $\alpha_4\beta_7$). Podemos observar que a adição de anti- $\alpha_4\beta_7$ foi capaz de inibir a produção de HIV, ao passo que as células incubadas em presença do anticorpo controle (Ctrl mAb) continuaram apresentando intensa replicação viral. Desta forma podemos destacar um efeito antiviral do mAb $\alpha_4\beta_7$ neste sistema. O mesmo experimento foi realizado com sete doadores diferentes, e as diferenças entre as condições de estímulo foram observadas na maioria deles (6/7). Estas diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas por teste T de Student (figura 5.1.B).

Com o objetivo de entender melhor o efeito antiviral do mAb $\alpha_4\beta_7$, foi realizado um ensaio de proliferação celular para avaliar a capacidade de MAdCAM induzir esta proliferação em células T CD4⁺ totais. Podemos observar na figura 5.2 A que o estímulo destas células apenas com anti-CD3 não foi capaz de induzir uma proliferação expressiva das mesmas. Este cenário foi alterado quando MadCAM foi incluído no protocolo de co-estímulo. O estímulo com anti-CD3 + MadCAM foi capaz de induzir intensa proliferação celular, e este processo foi inibido quando o mAb $\alpha_4\beta_7$ foi adicionado à cultura. Estes resultados mostram que a indução de proliferação por MAdCAM ocorre via $\alpha_4\beta_7$.

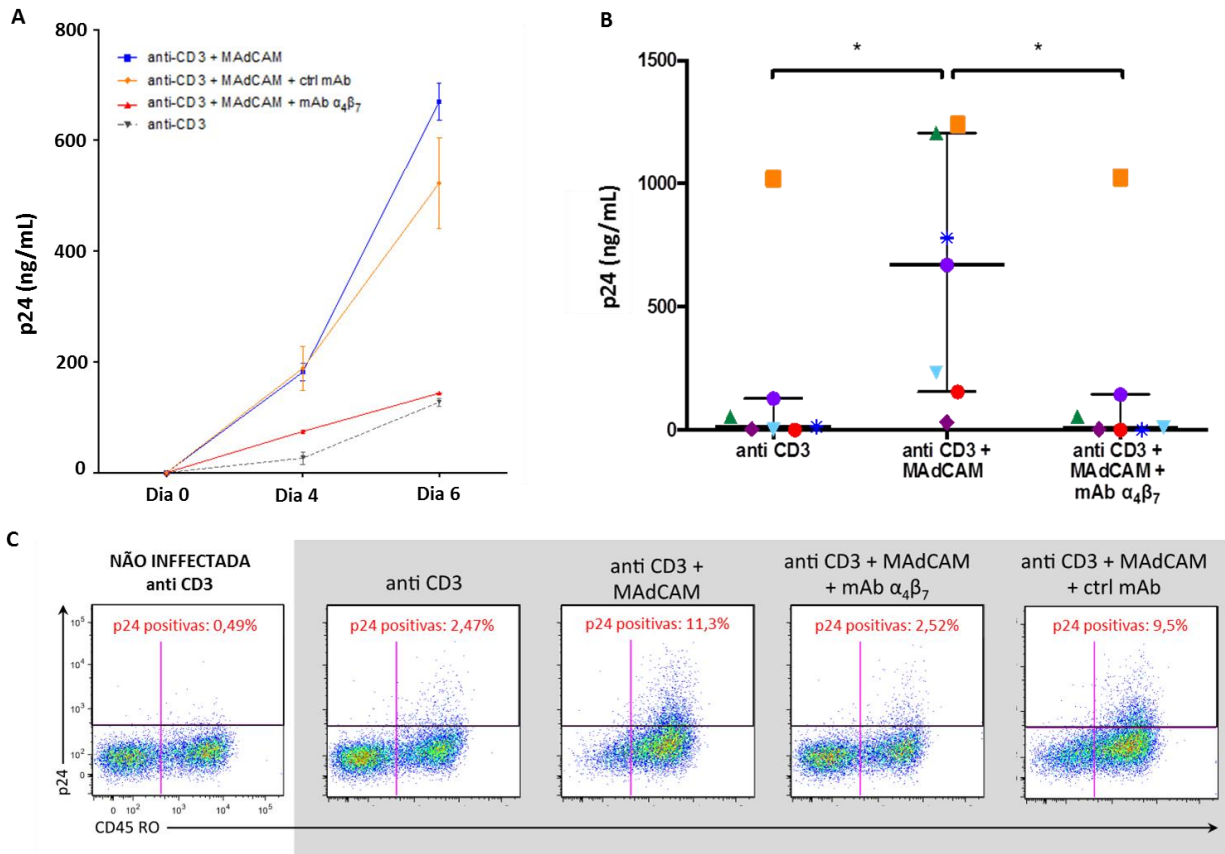


Figura 5.1 A) Replicação do HIV em linfócitos T CD4⁺ estimulados apenas com anti-CD3, com anti-CD3 em combinação com MAdCAM na presença de anticorpos monoclonais controle (ctrl mAb), e anti- $\alpha_4\beta_7$ (mAb $\alpha_4\beta_7$). A medição do vírus foi feita por AlphaLISA p24 a partir do sobrenadante colhido nos dias 0, 4 e 6 pós-infecção. B) Resultados do AlphaLISA p24 de 7 doadores diferentes avaliados sob as mesmas condições da figura A. Os valores representam a quantificação de p24 no sobrenadante da cultura celular no dia 6 pós-infecção (* $p < 0,05$). C) Dot plot representativo da marcação de p24 intracelular em linfócitos T CD4⁺ estimulados sob as mesmas condições apresentadas em A, no sexto dia pós-infecção. No eixo Y observamos a marcação de p24 intracelular e no X a marcação de CD45RO na superfície celular.

A figura 5.2 B mostra os resultados de proliferação celular (CFSE) e da marcação das células T CD4⁺ com anti-CD45RO. Podemos observar que ocorre uma diferenciação no padrão de expressão de CD45RO. À medida que as células são estimuladas, passamos a observar uma maior proporção de células com fenótipo de memória (CD45RO⁺) e redução de células naíves (CD45RO⁻) após cinco dias de estímulo. Este efeito é ainda mais pronunciado quando estas células são estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM. Neste caso, a população de células CD45RO⁻ vai de 30,9%, em células não-estimuladas, para 7,4% naquelas estimuladas na presença de MAdCAM (figura 5. 2 B).

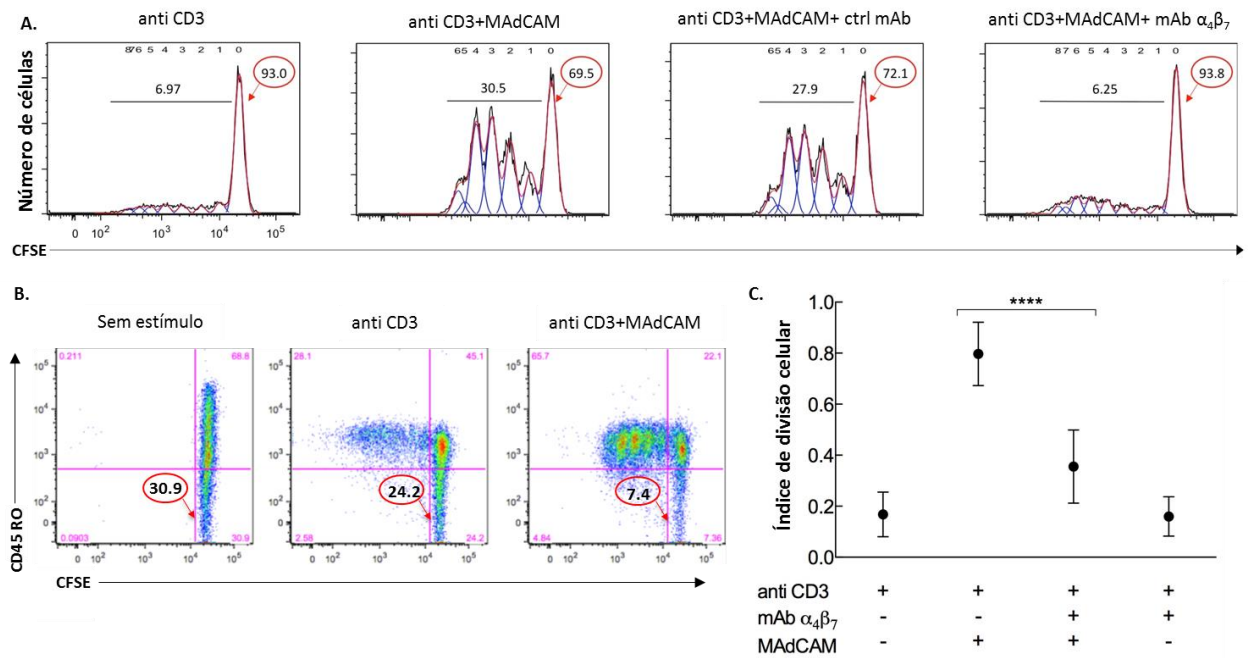


Figura 5.2 A) Resultado representativo da proliferação de linfócitos T CD4⁺ estimulados apenas com anti-CD3, com anti-CD3 em combinação com MAdCAM na presença, ou não, de anticorpos monoclonais controle (ctrl mAb), e anti- $\alpha_4\beta_7$ (mAb $\alpha_4\beta_7$). Avaliação de diluição do corante CFSE após cinco dias de estímulo. Os valores acima dos picos pretos representam a porcentagem de células com CFSE diluído (células que se dividiram) e os valores circulado em vermelho, a porcentagem de células que permaneceram marcadas com CFSE concentrado (células que não se dividiram). B) Análise representativa da expressão de CD45RO por citometria de fluxo, após 5 dias de estímulo com anti-CD3, ou em combinação com MAdCAM. No eixo Y observamos a marcação de CD45RO (superfície celular) e no X, a de CFSE (intracelular). Os valores circulado em vermelho mostram a proporção de células que permaneceram CD45RO⁻ após os cinco dias de estímulo. C) Resultado da análise de proliferação celular realizada com amostras de cinco doadores. Células estimuladas com anti-CD3, ou em combinação com MAdCAM, na presença ou ausência de mAb $\alpha_4\beta_7$. Os valores no gráfico representam o índice de divisão celular, uma medida da média de divisões celulares ocorridas por cada célula da população original. **** p<0,0001 (teste t).

A partir da análise de proliferação foram gerados índices de divisão celular, que representam a média do número de divisões celulares ocorridas nas células da população original, incluindo aquelas que não passaram pelo processo de divisão. As análises de proliferação foram realizadas com amostras de cinco doadores diferentes, e a figura 5.2.C mostra os resultados destas análises. Podemos observar que as amostras estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM apresentaram maiores índices de

divisão celular quando comparadas às demais condições. Destacamos ainda que o mAb $\alpha_4\beta_7$ foi capaz de inibir a proliferação destas células quando adicionado à cultura.

5.3.2. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAIVE VIA MADCAM NÃO É CAPAZ DE INDUZIR ALTOS NÍVEIS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os resultados obtidos previamente mostraram que células T CD4⁺ totais estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM, foram capazes de produzir vírus e proliferar. Além disso, após cinco dias de estímulo, observamos uma redução do número de células T CD4⁺ naïves (CD45RO⁻) e aumento de células de memória (CD45RO⁺), indicando que a co-estimulação destas células com MAdCAM poderia induzir uma transição das mesmas de um fenótipo naïve para o de memória. Este resultado nos instigou a investigar se o co-estímulo via MAdCAM também seria capaz de induzir a proliferação de células T CD4⁺ naïves. Uma vez que estas células estão em constante interação com MAdCAM durante o tráfego das mesmas através das vênulas endoteliais (HEV) até os sítios indutores do GALT, existia a possibilidade de ativação das mesmas via MAdCAM/ $\alpha_4\beta_7$ e consequente susceptibilidade à infecção por HIV.

Os linfócitos T CD4⁺ naïves foram extraídos por seleção negativa (>98% de pureza) e estimulados por cinco dias com anti-CD3 na presença ou ausência de MAdCAM. Os resultados podem ser observados na figura 5.3. Diferente do observado para as células T CD4⁺ totais, o estímulo com anti-CD3 + MAdCAM não se mostrou capaz de induzir uma proliferação expressiva em células T CD4⁺ naïves. Sabe-se que a expressão de $\alpha_4\beta_7$ em células T CD4⁺ naïves é, em geral, de 50 – 200 vezes menor quando comparada a células T CD4⁺ CD45RO⁺. Isto nos levou a questionar se essa redução nos níveis de $\alpha_4\beta_7$ poderia estar associada à discreta proliferação observada mediante o estímulo com anti-CD3 + MAdCAM.

Dados da literatura mostram que a expressão de $\alpha_4\beta_7$ na superfície de células T presentes nas placas de Peyer pode ser aumentada por ácido retinóico (RA) (IWATA *et al.*, 2004). Para avaliar o efeito da expressão $\alpha_4\beta_7$ no contexto de estimulação via MAdCAM, as células foram cultivadas com anti-CD3 + MAdCAM na presença de ácido

retinóico. Foi possível observar intensa proliferação nas células cultivadas sob esta condição quando comparadas àquelas cultivadas apenas com anti-CD3 ou anti-CD3 + MAdCAM (figura 5.3. A – painel superior). Além disto, após cinco dias de estímulo, foi possível observar uma maior expressão de β_7 nas células co-estimuladas em presença de RA (figura 5.3. C).

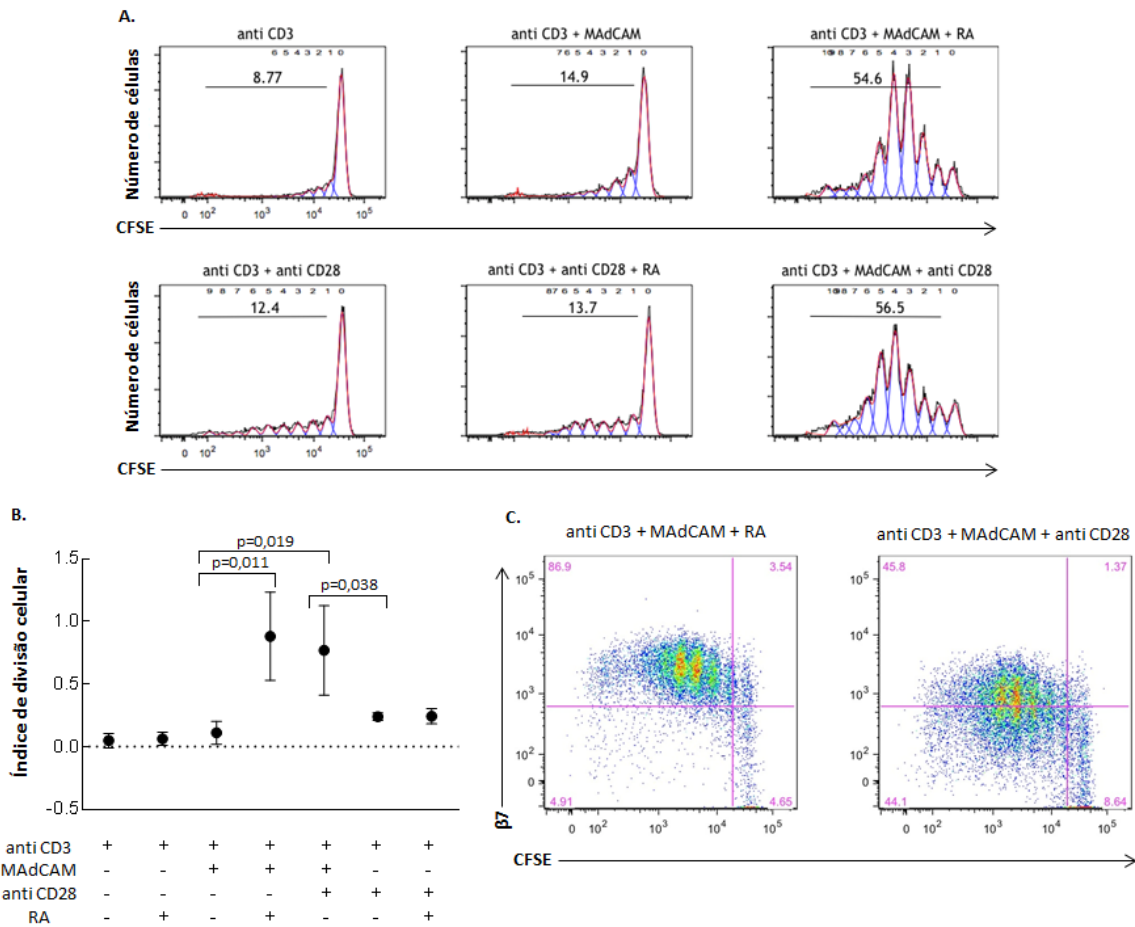


Figura 5.3 A) Resultado representativo da proliferação de linfócitos T $CD4^+ CD45RO^-$ estimulados com diferentes combinações de moléculas co-estimulatórias. Avaliação de diluição do corante CFSE após cinco dias de estímulo. Os valores acima dos picos representam a porcentagem de células com CFSE diluído (células que se dividiram). B) Resultado da análise de proliferação celular realizada com amostras de quatro doadores. Células estimuladas com anti-CD3, ou em combinação com MAdCAM, na presença ou ausência de RA e anti-CD28. Os valores no gráfico representam o índice de divisão celular, uma medida da média de divisões celulares ocorridas por cada célula da população original. C) Análise representativa da expressão de β_7 (eixo Y) por citometria de fluxo, após 5 dias de estímulo com anti CD3 + MAdCAM, na presença de RA ou anti-CD28. No eixo X observamos a marcação de CFSE.

Com o intuito de avaliar se a capacidade de RA induzir proliferação celular era observada exclusivamente em situações de co-estímulo via MAdCAM, as células T $CD4^+ CD45RO^-$ foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28. Ao compararmos os níveis de proliferação das células naïves cultivadas com anti-CD3 + anti-CD28 em presença ou ausência de RA (figura 5.3.A painel inferior), podemos observar que o último não foi capaz de induzir intensa proliferação quando utilizado em combinação

com anti-CD3 + anti-CD28. Este resultado nos mostra um efeito específico do ácido retinóico (RA) em eventos de co-estimulação via MAdCAM.

É conhecido que MAdCAM e anti-CD28 podem atuar juntos, induzindo a proliferação de células T. Por este motivo, avaliamos a proliferação de células T CD4⁺ naíves co-estimuladas com anti-CD3 + anti-CD28 + MAdCAM e observamos que esta condição é capaz de induzir proliferação celular a níveis similares ao observado quando estas células foram submetidas ao co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + RA (figura 5.3. A).

5.3.3. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NAÏVE VIA MADCAM INDUZ REPLICAÇÃO VIRAL

Os principais sítios de replicação do HIV são os sítios indutores do GALT: placas de Peyer e linfonodos mesentéricos. Sabe-se que estes tecidos são ricos em células T CD4⁺ naíves e que o tráfego destas células nestes tecidos se dá pela interação das mesmas com MAdCAM. Essa observação nos levou a questionar se estas células naíves, uma vez em contato com MAdCAM, seriam capazes de suportar a replicação viral. Para isso, células T CD4⁺ naíves de seis doadores diferentes foram submetidas ao co-estímulo com anti-CD3, anti-CD3 + MAdCAM em presença ou ausência de RA e/ou anti-CD28 por 72h. Após este tempo, as células foram infectadas com HIV-1 e o sobrenadante da cultura foi coletado nos dias 4 e 6 ou 7 pós-infecção para dosagem da proteína do capsídeo viral, p24.

A figura 5.4 mostra os resultados de *AlphaLisa* p24 para as seis amostras avaliadas. Em quatro dos seis doadores (1–4), foi observada intensa replicação viral mediante co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + RA e/ou anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28. Amostras de três doadores foram submetidas ao co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 em presença ou ausência de RA. Ambas as condições foram capazes de promover replicação viral e a adição de RA ao co-estímulo anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 não pareceu aumentar a replicação viral em dois destes três doadores.

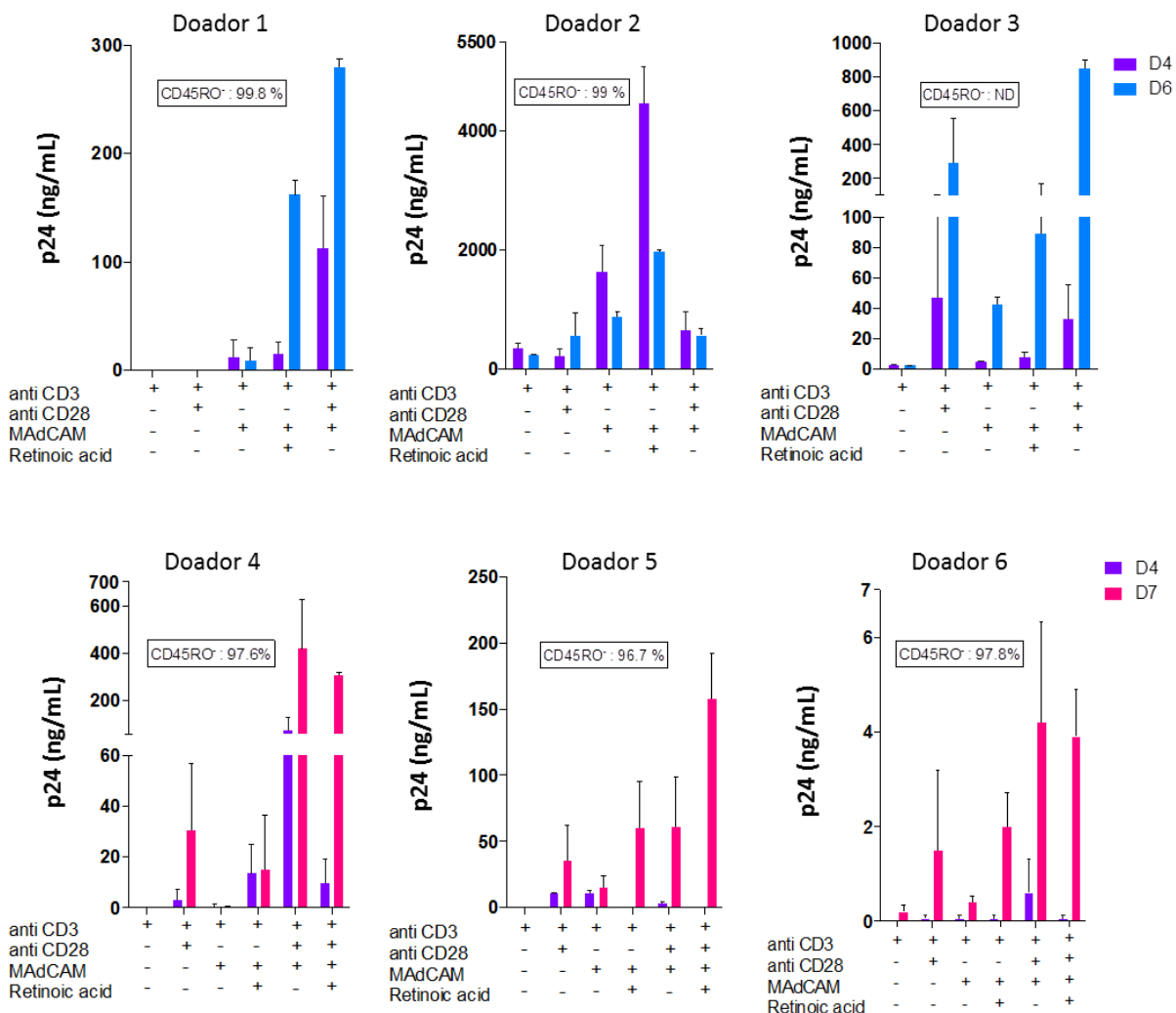


Figura 5.4 Resultado da análise de replicação viral para os seis doadores avaliados. Todos os doadores foram submetidos aos estímulos com anti-CD3, anti-CD3 + MAdCAM, anti-CD3 + MAdCAM + RA, anti-CD3 + anti-CD8, e anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD8. Para os doadores 4 e 5 também foi incluído o estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD8 + RA. Os sobrenadantes das culturas das dos doadores 1–3 foram coletados nos dias 4 e 6 pós-infecção; já para os doadores 4–6 a coleta foi realizada nos dias 4 e 7 pós-infecção. O valor destacado nas caixas corresponde à pureza das células extraídas (porcentagem de células CD45RO⁺) avaliadas por citometria de fluxo no dia 0. ND, não determinado.

Apesar do co-estímulo anti-CD3 + MAdCAM não ser capaz de induzir intensa proliferação celular, os resultados do ensaio de replicação viral mostram que em quatro dos seis doadores (1, 2, 3 e 5) submetidos a este co-estímulo, foi possível observar uma produção de vírus superior àquela observada em condições de estímulo apenas com anti-CD3.

5.3.4. ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+ NAÏVE VIA MADCAM INDUZ CICLO CELULAR

Os resultados apresentados até o momento mostram que o co-estímulo de células T CD4+ naïves com anti-CD3 + MAdCAM não foi capaz de induzir intensa proliferação celular, mas que apesar disso, células submetidas a esta condição de estímulo são capazes de produzir vírus quando infectadas pelo HIV. Esta observação sugere que o co-estímulo via MAdCAM, mesmo na ausência de RA, poderia estar promovendo um certo grau de ativação destas células, e este ser suficiente para suportar a replicação viral, mesmo apresentando níveis mínimos de proliferação.

Diante destes achados resolvemos verificar se o co-estímulo de células T CD4+ naïves com anti-CD3 + MAdCAM era suficiente para induzir o ciclo celular nas mesmas. Para isso, estimulamos linfócitos T CD4+ naïves em diferentes condições por 72h. Após este tempo, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. A figura 5.5 mostra um histograma representativo de uma amostra estimulada com anti-CD3 e anti-CD3 + MAdCAM em presença e ausência de RA.

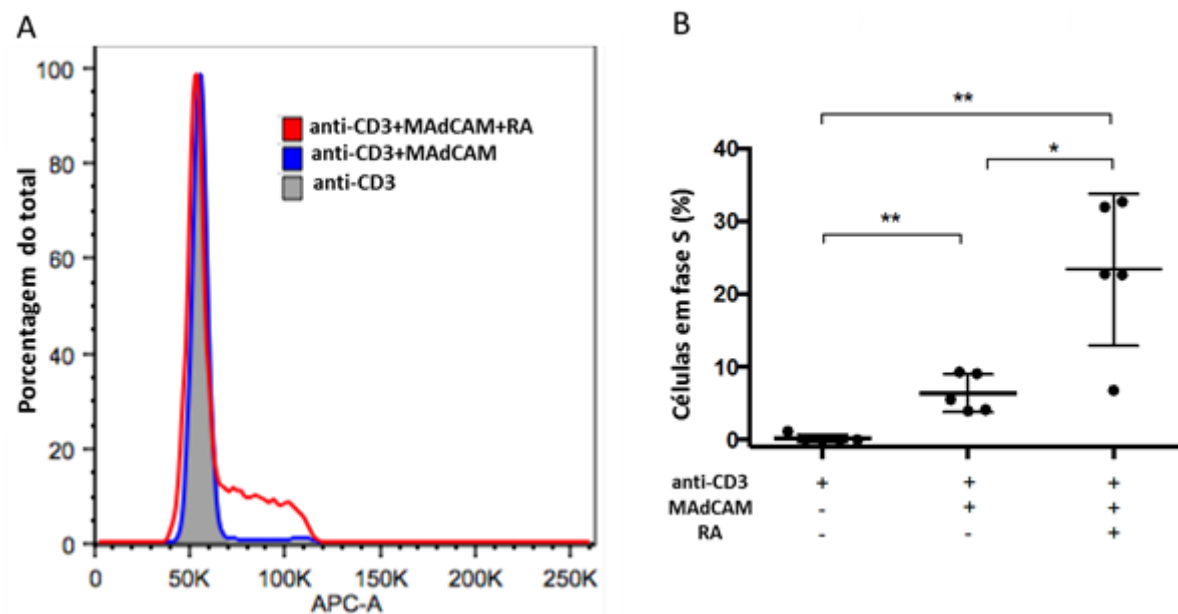


Figura 5.5 A) Histograma representativo com sobreposição da análise de ciclo celular para as diferentes condições avaliadas. B) Porcentagem de células na fase S do ciclo celular para cada condição avaliada. Resultado referente a amostras de cinco doadores diferentes. Células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM apresentaram uma proporção de células na fase S quando comparadas àquelas estimuladas apenas com anti-CD3 ($p=0,009$). Este resultado também foi observado quando as culturas foram estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM em presença de RA, em comparação ao estímulo com anti-CD3 sozinho ($p=0,007$) e anti-CD3 + MAdCAM ($p=0,03$) (teste t).

Ao observar a figura 5.5, vemos que o co-estímulo das células naíves com anti-CD3 + MAdCAM foi capaz de induzir o ciclo celular, mesmo que em níveis reduzidos, quando comparado a amostras estimuladas apenas com anti-CD3. A mesma análise foi realizada para amostras co-estimuladas com anti-CD28 na presença ou ausência de MAdCAM e/ou ácido retinóico. Os resultados desta análise estão representados na figura 5.6, onde podemos ver que a adição de anti-CD28 ao co-estímulo anti-CD3 + MAdCAM potencializa o efeito do mesmo e induz uma maior proporção de células na fase de síntese do ciclo celular (fase S), quando comparado à células estimuladas apenas com anti-CD3 ($p=0,0006$). O mesmo é observado quando comparamos células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 com células cultivadas apenas com anti-CD3 + MAdCAM ($p=0,0012$). Desta forma, destacamos o papel de anti-CD28 auxiliando o co-estímulo de células T $CD4^+CD45RO^-$ via MAdCAM.

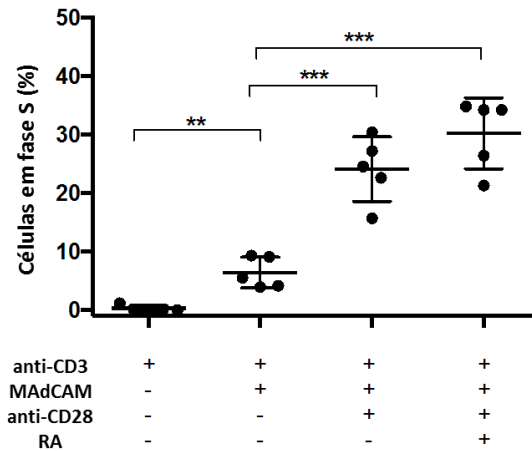
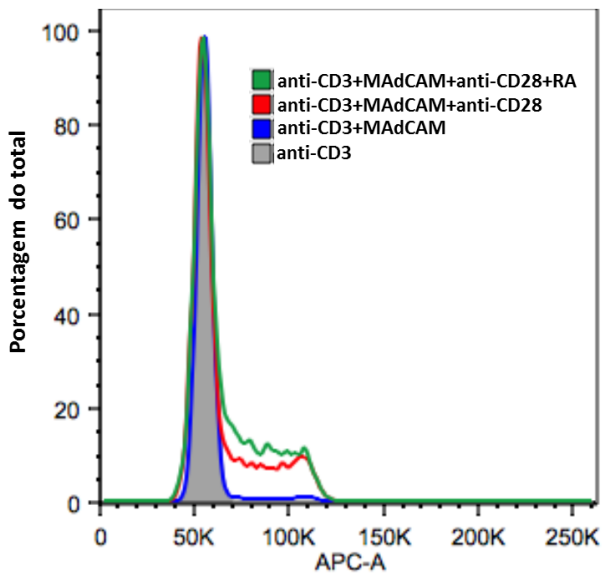


Figura 5.6 A) Histograma representativo com sobreposição da análise de ciclo celular para as diferentes condições avaliadas. B) Porcentagem de células na fase S do ciclo celular para cada condição avaliada. Resultado referente a amostras de cinco doadores diferentes. Células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 apresentaram uma proporção de células na fase S quando comparadas àquelas estimuladas apenas com anti-CD3 ($p=0,0006$). O mesmo foi observado quando comparados anti-CD3 + MAdCAM com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 ($p=0,0012$) e anti-CD3 + MAdCAM com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 + RA ($p=0,0018$) (teste t).

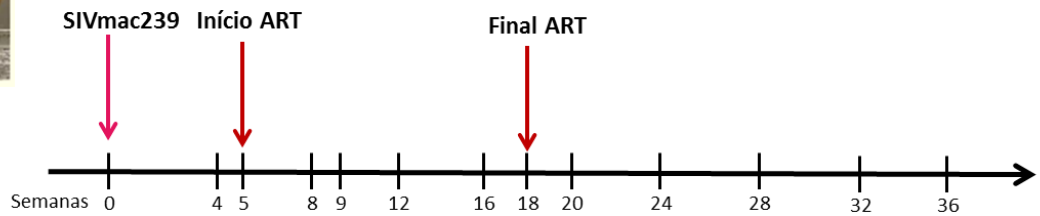
6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO TDS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-A4B7 EM MACACOS RESOS INFECTADOS POR SIV

Neste capítulo iremos abordar a padronização da técnica de sequenciamento ultraprofundo do vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês *Simian Immunodeficiency Virus*) de macacos resos infectados para determinar o efeito do tratamento destes animais com anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ no vírus circulante. Este trabalho faz parte de um estudo multicêntrico coordenado pelos pesquisadores Dr. Aftab Ansari (Emory University, Atlanta, EUA) e Dr. James Arthos (NIAID – NIH, Bethesda, EUA). Em linhas gerais, o desenho do estudo consiste no seguinte protocolo: dez macacos resos foram infectados via intravenosa com um clone de SIVmac239 (semana 0). Cinco semanas após a infecção, foi iniciada a administração diária de antirretroviral (ART, do inglês *antiretroviral therapy*). Os espécimes foram divididos em dois grupos de cinco animais e no primeiro grupo foi administrada ART (semana 5 a 18) e anticorpo monoclonal anti- $\alpha_4\beta_7$ (a partir da semana 9 pós infecção até a semana 32), enquanto no segundo grupo, considerado o grupo-controle, foram administrados ART (semana 5 a 18) e anticorpo monoclonal anti-IgG durante o mesmo período. O esquema do tratamento pode ser observado na figura 6.1.

**Grupo tratado
com anti- $\alpha 4\beta 7$**



(N=5)



(N=5)

**Grupo tratado
com anti- IgG**

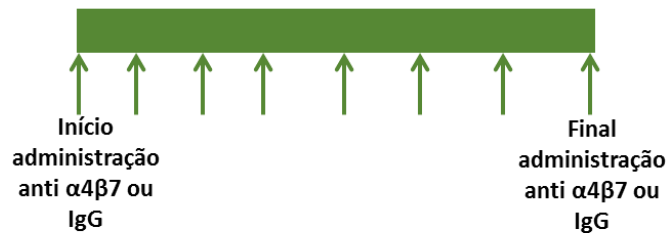


Figura 6.1 Esquema mostrando o desenho do estudo e tratamento administrado nos animais avaliados. O tratamento antirretroviral (ART) foi iniciado em todos os animais na semana 5 pós-infecção e mantido até a semana 18. Já o tratamento com anticorpos teve início na semana 9 e foi descontinuado na 32. Figura gentilmente cedida por Dr. Aftab Ansari.

Uma vez realizado o desafio com SIVmac239, todos os 10 animais foram positivos para a infecção e apresentaram o pico de viremia plasmática, característico da infecção por SIV, ao redor das semanas 2-3 pós-infecção (Figura 6.2). Da mesma forma, em todos os animais foi observada o controle da replicação viral uma vez que a ART foi iniciada (na semana 5 pós-infecção). Todos os animais permaneceram com carga viral plasmática indetectável durante o tratamento com ART (semanas 5 a 18) e apresentaram um rebote da mesma quando a ART foi descontinuada na semana 18. Nas semanas seguintes ao rebote, a maioria dos animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$ foi capaz de controlar a viremia. Nas figuras 6.2 A e B, observamos que um animal foi capaz de controlar a viremia (em azul), três controlam a viremia mas apresentam alguns picos de carga viral, os chamados *blips* (em verde), e um animal não foi capaz de controlar a replicação viral (em vermelho). Por outro lado, nenhum dos animais-controle foi capaz de controlar a replicação do SIV após a interrupção da ART (figura 6.2 C). É importante ressaltar que, nos animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$ e que controlaram a

viremia, este efeito foi observado mesmo após a interrupção do tratamento com o anticorpo.

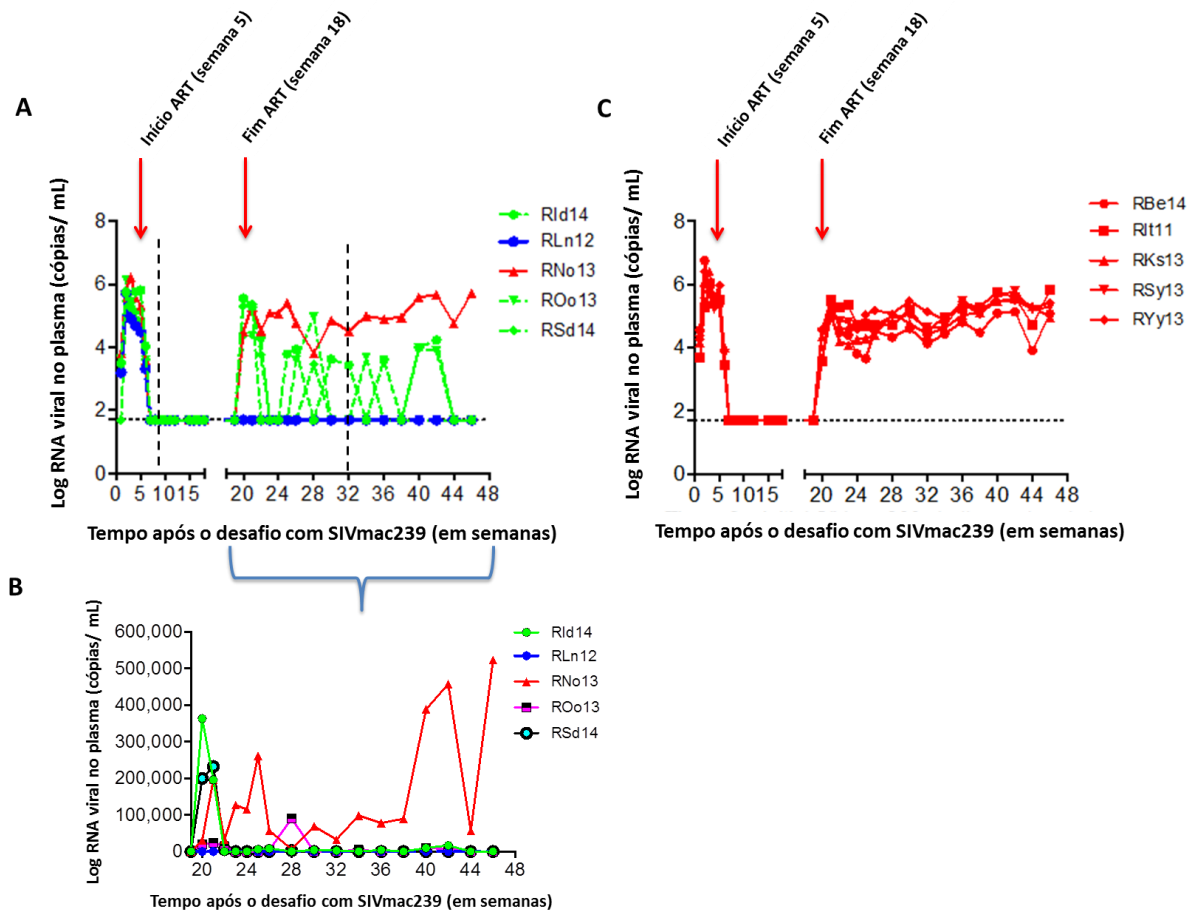


Figura 6.2 Carga viral plasmática do SIV mensurada nos diferentes animais ao longo do tempo. A) Valores de carga viral em escala logarítmica para animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$. As setas em vermelho representam o início e final do período da ART. As linhas pontilhadas representam o início e final do período do tratamento com anti- $\alpha 4\beta 7$. A linha em azul representa o animal que controlou a viremia; em verde, observamos os animais que apresentam os *blips* virais; em vermelho, o animal que não foi capaz de controlar a viremia. B) Valores de carga viral em escala linear para animais tratados com anti- $\alpha 4\beta 7$ da semana 18 a 48. Cada cor de linha representa um animal diferente. C) Valores de carga viral em escala logarítmica para animais-controle. As setas em vermelho representam o início e o final do período da ART. Cada linha em vermelho representa um animal, nenhum deles capaz de controlar a viremia.

Neste estudo os animais foram acompanhados diariamente por veterinários da Universidade de Emory (Atlanta, GA, EUA) e a coleta de sangue foi realizada semanalmente. Atualmente o estudo já ultrapassou a semana 83 e todo o material

coletado encontra-se armazenado para análise. Este capítulo tem como objetivo a padronização da técnica de sequenciamento ultraprofundo do SIVmac239 inoculado nos animais do estudo para, futuramente, sequenciar os vírus provenientes dos diferentes pontos de coleta de sangue com vistas a avaliar a dinâmica de populações virais durante a infecção e mediante os diferentes tratamentos empregados.

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados nas dependências do Laboratório de Retrovirologia do *Military HIV Research Program* (MHRP, Silverspring, EUA), sob supervisão do Dr. Gustavo Kijak. O sequenciamento das bibliotecas produzidas no MHRP é realizado pelo grupo do Dr. Steve Porcella na Divisão de Genômica do Laboratório das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain Laboratories* (RML), NIAID-NIH, Hamilton, EUA).

O grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Gustavo Kijak possui vasta experiência em sequenciamento de nova geração, mais especificamente com sequenciamento de HIV. Desta forma, os protocolos de amplificação e confecção de bibliotecas para sequenciamento ultraprofundo de regiões-alvo (TDS, do inglês *targeted deep sequencing*) seguidos nesta etapa do projeto foram desenvolvidos e são rotineiramente aplicados no Laboratório de Retrovirologia do MHRP (Kijak, 2014). Algumas etapas foram adaptadas para obedecer a algumas exigências presentes no protocolo do RML.

6.1. OBJETIVOS

- Desenhar iniciadores para a amplificação das regiões V1, V2, V3, V4 e V5 do genoma de SIVmac239.
- Validar os iniciadores desenhados para escolher as combinações a serem utilizadas em ensaios futuros.
- Testar o protocolo de TDS desenvolvido para HIV em amostras de SIV.
- Construir bibliotecas para o sequenciamento de regiões do envelope de SIVmac239 em plataforma de nova geração.

6.2. METODOLOGIA

6.2.1. DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES

Com o objetivo de analisar regiões variáveis do envelope viral, foram desenhados iniciadores com base na sequência-consenso do SIVmac239 depositada no GenBank (número de acesso: M33262). A estratégia utilizada neste estudo foi o TDS. Para isto, foram realizadas duas PCRs para cada região de interesse. A segunda reação utilizava um par de iniciadores que anelava em uma posição mais interna quando comparada ao ponto de anelamento do primeiro par de iniciadores (PCR aninhada). Aos iniciadores internos foram adicionados *overhangs*, sequências específicas e importantes durante o processo de construção de bibliotecas para o sequenciamento de nova geração – item 6.2.13. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Eurofins Scientific (Luxemburgo).

Os iniciadores foram testados em reações de PCR utilizando como molde o plasmídeo SIVmac239 SpX (*NIH AIDS Reagent Program, Bethesda, EUA*), contendo o genoma completo do SIVmac239. A concentração inicial do plasmídeo estoque era 1,5 µg/µL, e optou-se por utilizar diluições seriadas do mesmo nas reações de PCR. Foram realizadas diluições 1/10², 1/10⁴ e 1/10⁶, e as duas últimas foram utilizadas nas reações.

As reações foram montadas em placas de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate (Thermo Scientific, Waltham, EUA)*, onde foram adicionados 1µL de diluição plasmidial correspondente e 49µL do mix contendo os reagentes necessários para a amplificação. O mix foi feito de acordo com o seguinte protocolo: 5µL de tampão 10x da DNA polimerase *Titanium® Taq (Clontech, Mountain View, EUA)*, 0,5µL de cada iniciador a 20µM, 1µL de dNTPs a 10mM (*Thermo Scientific*), 1µL de DNA polimerase *Titanium® Taq 50x (Clontech, Mountain View, EUA)*, H₂O deionizada (*Thermo Scientific*) q.s.p 49 µL.

O material foi cuidadosamente aplicado nos poços, tendo sido deixado ao menos um poço vazio entre cada poço contendo a reação de PCR, com o objetivo de evitar qualquer tipo de contaminação (figura 6.3). A reação foi submetida à amplificação em

termocicladores C100 (*Bio-Rad Laboratories*, Berkeley, EUA) e a seguinte ciclagem foi utilizada: 95°C por 1 min, seguido de 27 ciclos: 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 1 min. Após esta ciclagem, foi realizada uma extensão final a 68°C por 1 min, e as amostras foram mantidas a 10°C até a próxima etapa.

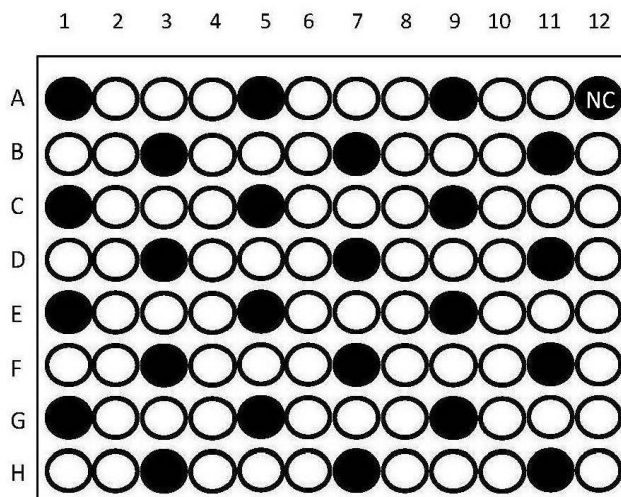


Figura 6.3 Disposição das reações de PCR em placas de 96 poços. Os poços em preto continham amostras e os vazios podem ser observados em branco. NC, Controle negativo

6.2.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O sucesso da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x (*Thermo Scientific*). A cada poço do gel, foram aplicados 5µL de reação misturados com 2µL de tampão de corrida 6x (*Thermo Scientific*). No mesmo gel foram aplicados 2µL de padrão de peso molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (*Thermo Scientific*). O gel foi corrido a 100 volts por uma hora, após o que foi fotografado sob luz UV em transiluminador, com auxílio do software *Kodak Molecular Imaging* (*Eastman Kodak Company*, Rochester, EUA).

6.2.3. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

Uma vez validados os iniciadores desenvolvidos, deu-se início à extração do RNA viral. Este procedimento foi realizado a partir de 140 µL de sobrenadante de cultura celular contendo vírus estoque SIVmac239. Foi utilizado o sistema QIAamp®

Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. Ao final do processo, o RNA foi eluído em 80 µL, que foram divididos em oito microtubos (10 µL em cada) e estocados a -80°C.

6.2.4. SÍNTESE DE CDNA

O RNA obtido foi convertido em cDNA com auxílio do sistema *Super Script III first-strand Synthesis System* (Thermo Scientific). Para garantir a retrotranscrição de todas as regiões de interesse em uma mesma reação, foram utilizados nesta etapa três iniciadores diferentes no mesmo poço, cada um deles específico para cada região. As reações foram montadas em placas de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Primeiramente, foi confeccionado o Mix 1: 2 µL dNTPs a 10mM, 1 µL do iniciador V1V2_09R a 50 µM, 1 µL do iniciador V3_09R a 50 µM, 1 µL do iniciador V4V5_09R a 50 µM, 1 µL de RNA e H₂O deionizada q.s.p 10 µL. Esta mistura foi mantida a 65°C por 5 min e em seguida mantida em gelo por 4 min. Ao final desta incubação, foram adicionados 10 µL do Mix 2 contendo: 2 µL de tampão 10x da enzima Super Script III, 2 µL de DTT a 0,1 M, 4 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1 µL de RNase OUT e 1 µL da enzima Super Script III. As reações foram conduzidas em termociclador C100 (*Bio-Rad Laboratories*) sob as seguintes condições: 50°C por 3h, 85°C por 5 min. Ao final do processo, foi adicionado 1µL de RNase H à cada amostra e estas foram mantidas a 37°C por 20 minutos. Uma vez retiradas da máquina, os cDNAs foram estocados a -20°C. O controle negativo desta etapa foi apenas uma mistura de mix 1 e 2, sem RNA.

6.2.5. AMPLIFICAÇÃO DE CDNA POR PCR MULTIPLEX (1° ROUND)

O cDNA obtido foi submetido a uma PCR em multiplex para avaliar sua integridade e o sucesso da retrotranscrição. Uma vez que foi utilizada a estratégia de multiplex para confecção dos cDNAs, optou-se por manter esta estratégia no primeiro *round* de amplificação. Desta forma, as regiões V1/V2, V3 e V4/V5 foram amplificadas juntas em uma mesma reação.

As reações foram montadas em placas de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate (Thermo Scientific)* de acordo com o seguinte protocolo: 1 µL de dNTPs a 10mM, 5 µL de tampão 10x da enzima DNA polimerase *Titanium® Taq (Clontech)*, 0,5 µL do iniciador V1V2_06F, 0,5 µL do iniciador V1V2_09R, 0,5 µL do iniciador V3_02F, 0,5 µL do iniciador V3_08R, 0,5 µL do iniciador V4V5_01F, 0,5 µL do iniciador V4V5_08R, 1 µL da enzima *DNA polimerase Titanium® Taq (Clontech, Mountain View, EUA)*, H₂O deionizada q.s.p 48 µL e 2 µL do cDNA diluído ou concentrado. Esta reação foi submetida à seguinte ciclagem: 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos: 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 1 min. Após a ciclagem, foi realizada uma extensão final a 68°C por 1 min e as amostras foram mantidas a 10°C até a etapa seguinte. Nesta etapa foram utilizados dois controles negativos: 1) controle negativo provindo da síntese de cDNA e 2) apenas o mix do 1° *round*.

6.2.6. SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO DE CDNA POR PCR (2° ROUND)

Nesta etapa, o material proveniente do item 6.1.5. foi submetido a uma segunda amplificação. Desta vez, cada reação era específica por região (V1/V2, V3 e V7/V5) e utilizando apenas um par de iniciadores (tabela 6.1.6.1). As reações foram conduzidas em placas de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate*, onde foram adicionados 5 µL de tampão 10x da DNA polimerase *Titanium® Taq (Clontech)*, 0,5 µL de cada iniciador a 20µM, 1 µL de dNTPs a 10 mM (*Thermo Scientific*), 1 µL de DNA polimerase 50x *Titanium® Taq (Clontech)*, H₂O deionizada q.s.p 49 µL e 1 µL do produto proveniente do 1° *round* (item 6.1.5). A reação foi submetida à seguinte ciclagem: 95°C por 1 min, seguido de 27 ciclos: 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 1 min. Após a ciclagem, foi realizada uma extensão final a 68°C por 1 min e as amostras foram mantidas a 10°C até a etapa seguinte. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (conforme descrito no item 6.1.2) para confirmar o sucesso da amplificação. Nesta etapa foram utilizados três controles negativos: 1) 1° *round* do controle negativo proveniente da síntese de cDNA, 2) controle negativo proveniente do mix do 1° *round* e 3) apenas o mix do 2° *round*.

6.2.7. TITULAÇÃO DO CDNA

Com o objetivo de avaliar a concentração do RNA extraído, e assim estipular o volume ideal de material a ser utilizado para a construção de bibliotecas, o cDNA recém-sintetizado foi titulado. Foram realizadas 10 diluições seriadas a partir do cDNA proveniente do RNA viral diluído (1/100): 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/729, 1/2.187, 1/6.567, 1/19.683 e 1/59.049. Uma vez prontas as diluições, foi realizada uma PCR multiplex, conforme descrito no item 6.1.5 (1° *round*). Em seguida, foi realizada uma segunda etapa de amplificação conforme descrito no item 6.1.6 (2° *round*). Todas as reações foram feitas em quadruplicatas para cada uma das diluições. O sucesso da amplificação do 2° *round* foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 6.1.2.

De posse dos resultados da eletroforese, foi possível identificar a diluição limitante onde ainda era possível encontrar ao menos uma cópia de cDNA. A diluição limitante foi considerada como a última diluição em que houve amplificação. Neste trabalho, a estimativa do número de cópias considerou a diluição em que todas as quadruplicatas foram positivas para a amplificação e a diluição limitante. Desta forma, foi calculada uma média entre as duas e esta foi considerada como a diluição que teria ao menos uma cópia de cDNA.

6.2.8. SÍNTESE DE CDNA PARA A PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS

De posse dos resultados de todos os testes apresentados previamente, foi possível iniciar a síntese de cDNA para a construção das bibliotecas a serem sequenciadas. O protocolo estabelecido pelo MHRP avalia que a quantidade ideal de RNA para iniciar a confecção de bibliotecas para TDS é de 2.000 moléculas. Este valor permite uma amplificação satisfatória do material, sem que haja saturação do sistema. A partir da titulação foi calculado o volume de RNA viral que conteria 2.000 moléculas do mesmo. Este volume foi diluído de forma que uma solução final com 10 µL contivesse 2.000 moléculas de RNA. Ainda com o objetivo de evitar a saturação da reação com muito material molde e manter a melhor eficiência possível, foram

realizadas 4 reações de retrotranscrição para a mesma amostra, onde os 10 µL da diluição de RNA foram divididos igualmente (2,5 µL em cada).

As reações foram montadas em placas de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate*, de acordo com o seguinte protocolo: Mix 1: 2 µL dNTPs a 10mM, 1 µL do iniciador V1V2_09R a 50 µM, 1 µL do iniciador V3_09R a 50 µM, 1 µL do iniciador V4V5_09R a 50 µM, 1 µL de RNA e 2.5 µL de H₂O deionizada. Esta mistura foi mantida a 65°C por 5 min e em seguida mantida em gelo por 4 min. Ao final desta incubação, foram adicionados 10 µL do Mix 2 contendo: 2 µL de tampão 10x da enzima Super Script III, 2 µL de DTT a 0,1 M, 4 µL de MgCl₂ a 25mM, 1 µL de RNase OUT e 1 µL da enzima Super Script III. As reações foram conduzidas em termociclador C100 (Bio-Rad Laboratories) sob as seguintes condições: 50°C por 3h, 85°C por 5 min. Ao final do processo foi adicionado 1µL de RNase H a cada amostra, e estas foram mantidas a 37°C por 20 minutos.

6.2.9. PRIMEIRA ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO PARA BIBLIOTECAS (1° ROUND MULTIPLEX)

O material proveniente do item 6.2.8 foi misturado em um mesmo microtubo, totalizando 80 µL de cDNA. Foi então conduzida uma PCR multiplex de 1° round conforme descrito no item 6.2.5, porém desta vez foram feitas 10 reações multiplex e foram adicionados 8 µL de cDNA por reação. Desta forma, o volume de H₂O foi ajustado para 32 µL.

6.2.10. SEGUNDA ETAPA DE AMPLIFICAÇÃO PARA BIBLIOTECAS (2° ROUND)

Nesta etapa foi realizada uma segunda amplificação do material proveniente do item 6.1.9, utilizando-se pares de iniciadores para amplificar separadamente as regiões V1/V2, V3 e V4/V5. É importante ressaltar que neste processo foram utilizados iniciadores purificados por HPLC. As reações foram montadas conforme descrito no item 6.1.6. e foram feitas 10 reações por região. Ao final do processo, foi realizada eletroforese em gel de agarose (item 6.1.2) para confirmar o sucesso da amplificação.

O procedimento só era continuado se todos os controles negativos (1, 2 e 3) para todas as regiões estivessem realmente negativos, quando avaliados por eletroforese em gel de agarose.

6.2.11. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE COM CRISTAL VIOLETA

Com o objetivo de obter um produto de PCR puro e livre de bandas com ampliações inespecíficas, o material proveniente da segunda reação de amplificação (item 6.1.10) foi corrido em gel de agarose com cristal violeta (CV) e as bandas com o tamanho desejado foram purificadas. Cabe ressaltar que esta etapa é proveniente do protocolo do MHRP e não está presente no protocolo do RML. Desta forma, foi utilizada nesta técnica apenas uma porção do material amplificado.

Foram confeccionados três géis de agarose a 2% em TAE 1x com CV e um gel foi corrido por região. As 10 reações/ região provenientes da segunda amplificação foram combinadas em um mesmo microtubo de 1,5 mL totalizando 500 µL cada. Em cada gel foram aplicados 350 µL da reação mais 10 µL de CV para cada 50 µL de reação, totalizando 420 µL. que foram divididos em 6 poços do gel, com 70 µL cada. Os 150 µL restantes da reação foram reservados para serem utilizados posteriormente (item 6.1.12).

As amostras foram corridas no gel em tampão TAE 1x a 70 volts por 1 hora. Ao final do processo, os géis foram transferidos para um transiluminador e as bandas de interesse foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi e colocadas em microtubos de 1,5 µL. Cada tubo contendo uma banda de gel foi pesado e a partir daí foi iniciado o processo de purificação do produto de PCR com o sistema *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey Nagel, Düren, Alemanha).

Inicialmente, foram adicionados 200 µL de tampão NTI para cada 100 mg de gel no microtubo, verificando sempre se a banda de gel estava completamente imersa em tampão. Este material foi vortexado e incubado em banho-maria a 50°C. A cada 3 minutos o material era vortexado até que o gel estivesse completamente dissolvido em tampão. Cada mistura (gel e tampão) foi adicionada a uma coluna de purificação que foi

centrifugada por 1 minuto a 11.000 rpm. O material filtrado foi novamente adicionado à coluna, centrifugado por 1 minuto a 11.000 rpm e o líquido foi descartado. Foram adicionados à coluna 700 µL do tampão de lavagem seguido de centrifugação por 1 minuto a 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e 250 µL de tampão de lavagem foram adicionados à coluna, que foi novamente centrifugada por 1 minuto a 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna foi submetida à centrifugação por 2 minutos a 11.000 rpm. A coluna foi colocada em um novo microtubo de 1,5 µL e a ela foram adicionados 50 µL de tampão de eluição. O material foi incubado por 2 minutos a temperatura ambiente e então centrifugado por 2 minutos a 11.000 rpm para eluição do material amplificado. O sucesso da purificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 6.1.2. O material purificado foi mantido a 4°C até a etapa seguinte.

6.2.12. NORMALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para a construção das bibliotecas, é necessário que os produtos de PCR sejam normalizados. Com o intuito de comparar e avaliar possíveis diferenças entre os produtos de PCR purificados do gel e os não-purificados, ambos foram normalizados nesta etapa. A normalização foi realizada com auxílio do sistema *SequalPrep Normalization Plate* (Thermo Scientific). Além de normalizar, este sistema também purifica os produtos de PCR, deixando-os livres de qualquer reagente da reação. Neste processo, 20 µL do produto de PCR foram adicionados a cada poço da placa de normalização. Em seguida, foram adicionados 20 µL do tampão de ligação, a placa foi vortexada, centrifugada rapidamente (*spin down*) e incubada por 1 hora a temperatura ambiente para que o DNA amplificado ficasse aderido à parede dos poços. Ao final da incubação, o líquido presente nos poços foi aspirado cuidadosamente e descartado. Foram adicionados 50 µL de tampão de lavagem a cada poço, a placa foi vortexada, centrifugada rapidamente e o líquido dos poços aspirado cuidadosamente e descartado. Foram adicionados 20 µL de tampão de eluição a cada poço, a placa foi vortexada, centrifugada rapidamente e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Ao final do processo, os 20 µL de tampão de eluição contendo o DNA amplificado foram

transferidos para novos microtubos e mantidos a -20°C. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

6.2.13. ADIÇÃO DE ÍNDICES PARA SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ILLUMINA

Uma vez amplificadas e purificadas, as amostras foram submetidas à adição de índices para serem sequenciadas na plataforma *Illumina MiSeq* (*Illumina*, San Diego, EUA). Este processo foi realizado com o sistema *Nextera XT index V2 set D* (*Illumina*) e a enzima *2x Kapa HiFi hot start mix* (*Kapa Biosystems*, Wilmington, EUA). As reações foram montadas em placas de 96 poços de acordo com o seguinte protocolo: 15 µL do mix *2x Kapa HiFi hot start*, 5 µL de cada iniciador (1 e 2) *Nextera xt N7xx* e 5 µL do produto de PCR normalizado. As amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: 95°C por 3 min, 8 ciclos: 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg. Ao final da ciclagem, foi realizada uma extensão a 72°C por 5 min, e as amostras foram mantidas a 4°C até que fossem retiradas do termociclador.

6.2.14. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS EM BIOANALYZER

Com o objetivo de avaliar a qualidade das bibliotecas sintetizadas, as amostras foram submetidas a uma corrida na plataforma 2100 *Bionalyzer* (*Agilent*, Santa Clara, EUA). Para isto, foi utilizado o sistema *Agilent DNA 1000*, segundo recomendações do fabricante. Uma vez avaliadas como satisfatórias, as amostras foram enviadas para o RML.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES

Com o objetivo de avaliar as regiões variáveis do envelope do SIVmac239, foram desenhados manualmente 30 iniciadores (15 senso e 15 antissenso). Além disso, a alguns dos iniciadores foram adicionadas sequências adaptadoras (*overhangs*), importantes durante o processo de construção de bibliotecas para sequenciamento na plataforma *Illumina*. A tabela 6.1 mostra todos os iniciadores desenvolvidos, bem como aqueles onde foram adicionados os *overhangs*.

Tabela 6.1 . Iniciadores desenvolvidos para amplificação das regiões virais V1/V2, V3 e V4/V5. Os *overhangs* adicionados aos iniciadores utilizados para a construção de bibliotecas podem ser observados em vermelho.

Nome	Sequência (5' – 3')	Sentido
V1V2_01F	CCTCAATAAAGCCTTGTGTAAAATTATCC	Senso
V1V2_02F	ATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTC	Senso
V1V2_03F	AATAAAGCCTTGTGTAAAATTATCCCC	Senso
V1V2_04F	GAGGATGTATGGCAACTCTTTGAG	Senso
V1V2_05F	GAACAGGCAATAGAGGATGTATGG	Senso
V1V2_06F	CAGTCACAGAACAGGCAATAGAGG	Antissenso
V1V2_07R	AATAGCATCCCAATAATGTTTGTCAC	Antissenso
V1V2_08R	GCACAATACCTAAATCTAATAGCATCCC	Antissenso
V1V2_09R	CTAAGCAAAGCATAAACCCTGGAGG	Antissenso
V1V2_10R	CCACCACCTTAGAACATTTAGGC	Antissenso
V1V2_11R	CATGAAGAGACCACCACCTTAGAAC	Antissenso
V1V2_12R	TGCATGAAGAGACCACCACC	Antissenso
V3_01F	CTCCAGGTTATGCTTTGCTTAG	Senso
V3_0	AAATGTTCTAAGGTGGTGGTCTCT	Senso
V3_03F	CACAAGGATGATGGAGACACAG	Senso
V3_04F	CTTTAATGGAAGTAGAGCAGAAAAT	Senso
V3_05F	ACTGGCATGGTAGGGATAATAGGA	Senso
V3_06R	TCACCTCTTTTATTGCATCCTTC	Antissenso
V3_07R	GCAATTTGTCCACATGAAGGTAA	Antissenso
V3V4_01R	CATTTTTGCCTACTTTATGCC	Antissenso
V3_08R	TATACCTGGGATGTTTGACAATGG	Antissenso
V4V5_01F	CAATTTGACGGCTCCTGG	Senso

V4V5_02F	GCAATAAAAGAGGTGAAGCAGAC	Senso
V4V5_03F	GTGGACAAATTGCAGAGGAGAG	Senso
V4V5_04F	TTGGAGGAAAATGGAAGGAT	Senso
V4V5_05F	GAAGGATGCAATAAAAGAGGTGA	Senso
V4V5_06R	ACCCAAGAACCCTAGCACAAAG	Antissenso
V4V5_07R	ACCTGCCGTTGCGAGAAA	Antissenso
V4V5_08R	GAGCGGTCAGCGTCAAC	Antissenso
V4V5_09R	ATCCCAGCCAATAAAGTTTCG	Antissenso
V4V5_10R	GCTGCGCCTGGTCCTT	Antissenso
V1V2_01FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CCCTCAATAAAGCCTTGTGTAAAATTATCC	Senso
V1V2_03FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG AATAAAGCCTTGTGTAAAATTATCCCC	Senso
V1V2_07ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG AATAGCATCCCAATAATGTTTGTAC	Antissenso
V1V2_08ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GCACAATACCTAAATCTAATAGCATCCC	Antissenso
V3_04FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CTTTAATGGAAGTAGAGCAGAAAAT	Senso
V3_05FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG ACTGGCATGGTAGGGATAATAGGA	Senso
V3_06ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG TCACCTCTTTTATTGCATCCTTC	Antissenso
V3_07ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GCAATTTGTCCACATGAAGGTAA	Antissenso
V4V5_01FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CAATTTGACGGCTCCTGG	Senso
V4V5_03FOH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GTGGACAAATTGCAGAGGAGAG	Senso
V4V5_06ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG ACCCAAGAACCCTAGCACAAAG	Antissenso
V4V5_07ROH	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG ACCTGCCGTTGCGAGAAA	Antissenso

As regiões-alvo deste estudo compreendem sequências entre 90 e 170 pb. O tamanho do fragmento a ser sequenciado no RML na plataforma Illumina MiSeq era de até 550 pb, e por este motivo algumas regiões foram amplificadas juntas. Desta forma, os iniciadores foram desenhados para amplificar as regiões da seguinte forma: V1/V2, V3 e V4/V5.

Apesar das amostras-alvo deste estudo serem provenientes de RNA viral, em um primeiro momento, os iniciadores foram validados em reações de PCR utilizando diferentes diluições do plasmídeo SIVmac239 SpX como molde. Esta opção de utilizar DNA como fita-molde foi feita para minimizar a possibilidade de que qualquer problema que pudesse ocorrer em etapas anteriores à PCR, como extração de RNA viral ou síntese de cDNA, pudesse nos levar a crer erroneamente que resultados negativos no PCR se deviam ao não-funcionamento dos iniciadores. As combinações de iniciadores testadas podem ser observadas na tabela 6.2.

Tabela 6.2 Combinações de iniciadores utilizadas para validação dos mesmos utilizando como molde o plasmídeo SIVmac239 SpX

Iniciadores	Região alvo	Tamanho do produto
V1V2_04F + V1V2_09R	V1/V2	484 pb
V1V2_04F + V1V2_11R	V1/V2	548 pb
V1V2_06F + V1V2_9R	V1/V2	504 pb
V1V2_06F + V1V2_11R	V1/V2	568 pb
V1V2_01FOH+V1V2_07ROH	V1/V2	418 pb
V1V2_01FOH+V1V2_08ROH	V1/V2	435 pb
V1V2_03FOH+V1V2_07ROH	V1/V2	415 pb
V1V2_03FOH+V1V2_08ROH	V1/V2	432 pb
V3_01F + V3_08R	V3	497 pb
V3_02F + V3_08R	V3	442 pb
V3_04FOH + V3_06ROH	V3	320 pb
V3_05FOH + V3_06ROH	V3	283 pb
V4V5_01F + V4V5_08R	V4/V5	547 pb
V4V5_01F + V4V5_09R	V4/V5	572 pb
V4V5_03FOH+V4V5_06ROH	V4/V5	520 pb
V4V5_03FOH+V4V5_07ROH	V4/V5	540 pb

A figura 6.4 mostra o resultado de um gel de agarose com amostras de DNA amplificadas por PCR para a região V3. As combinações de iniciadores e diluições plasmidiais utilizadas estão indicadas na figura. Todas as 16 combinações de iniciadores apresentadas na tabela 6.2 amplificaram com sucesso o plasmídeo nas duas diluições testadas ($1/10^3$ e $1/10^6$), e desta forma todas elas poderiam ser utilizadas para a amplificação do material.

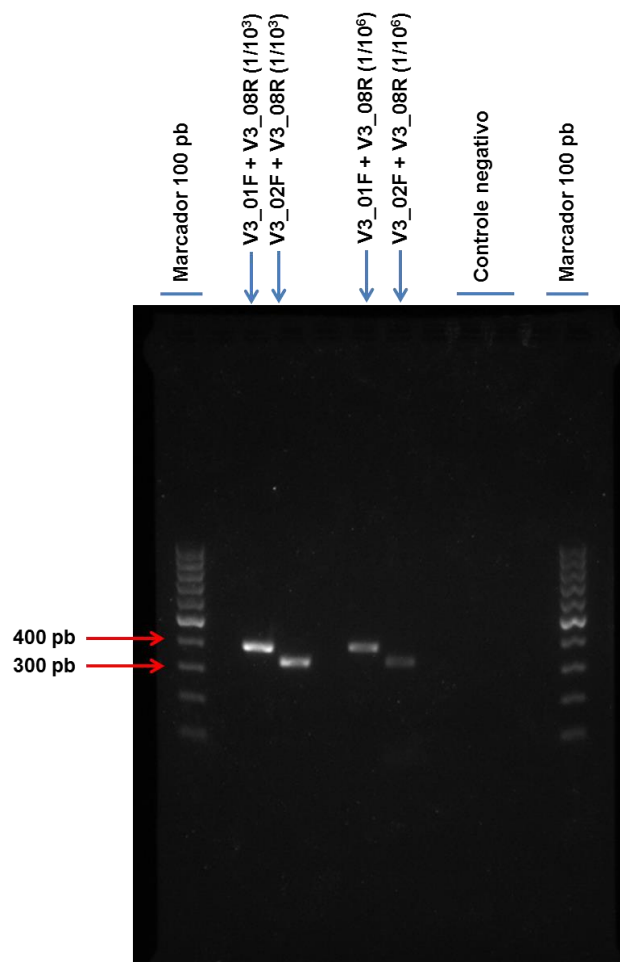


Figura 6.4 Gel de eletroforese representativo da PCR de validação de iniciadores. Este gel mostra produtos de amplificação da região V3. As amostras aplicadas nos poços estão indicadas na figura, e nos demais poços não foi aplicado nenhum material. As reações se mostraram positivas em todos os casos, para ambas as diluições de plasmídeo utilizadas ($1/10^3$ e $1/10^6$).

De posse dos resultados dos testes com o plasmídeo, o próximo passo foi testar os iniciadores desenvolvidos em amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNA viral, uma vez que as amostras do estudo são desta natureza. Para isto, o RNA viral proveniente do estoque viral inoculado nos animais foi convertido em cDNA e este utilizado como molde para amplificação. Assim como aplicado no teste com o DNA plasmidial, a amostra de RNA viral foi utilizada concentrada e diluída ($1/10^2$). Uma vez que o cDNA foi sintetizado com os iniciadores V1V2_09R, V3_08R e V4V5_09R, foram escolhidos para a etapa de amplificação-teste dos iniciadores os pares V1V2_06F/V1V2_09R, V3_02F/V3_08R e V4V5_01F/V4V5_08R. Para o fragmento V4/V5 foi

utilizado um iniciador antissenso diferente do utilizado na síntese do cDNA, interno ao primeiro, amplificando assim um fragmento menor do que o que seria gerado pelo iniciador utilizado na síntese do cDNA. A figura 6.5 mostra um esquema ilustrando a estratégia de amplificação utilizada, os iniciadores escolhidos e a localização dos mesmos.

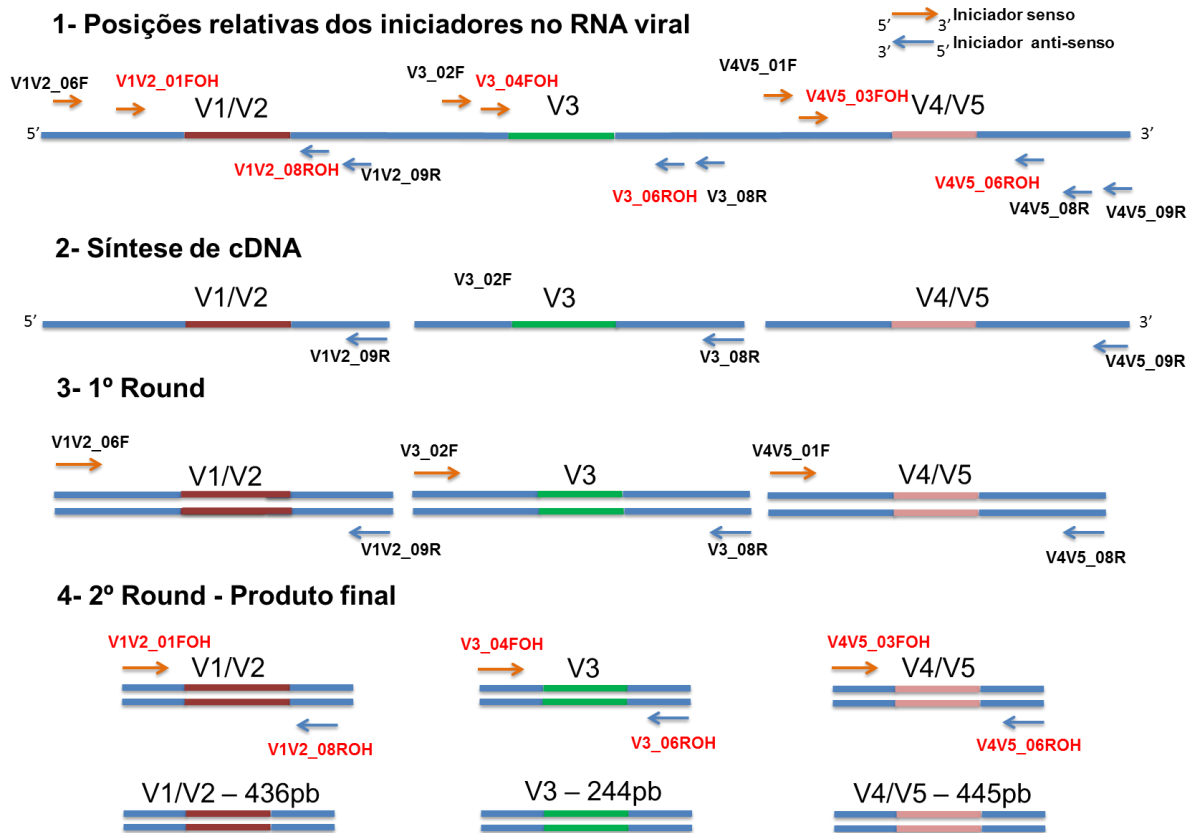


Figura 6.5 Esquema da estratégia de amplificação utilizada. O comprimento dos fragmentos entre pares de iniciadores na figura não está em escala, assim como o tamanho do RNA viral e as regiões em destaque. Em 1, estão representadas as posições de anelamento de todos os iniciadores utilizados em referência ao RNA viral. Em 2, estão os iniciadores utilizados na síntese do cDNA. Em 3, estão representados os iniciadores utilizados na primeira PCR, 1º round. Em 4, os iniciadores mais internos utilizados na segunda PCR, 2º round, e os produtos finais obtidos.

A figura 6.6 mostra um gel de agarose proveniente do PCR teste (2º round) para as regiões V1/V2, V3 e V4/V5 amplificadas a partir do DNA-molde sintetizado no 1º round. Podemos observar que todas as amostras foram amplificadas com sucesso para todas as regiões testadas e para as diferentes concentrações de RNA inicial utilizadas (concentrado e diluído 1/10²).

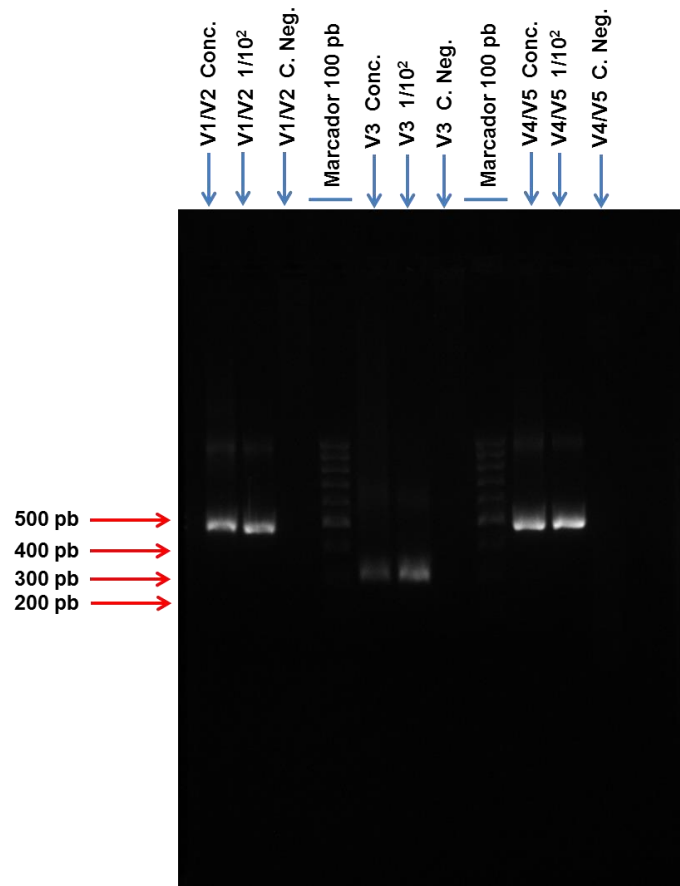


Figura 6.6 Gel de eletroforese representativo da PCR (2º round) de validação de iniciadores a partir de cDNA. As regiões amplificadas, diluições utilizadas (RNA concentrado e diluído $1/10^2$) e controles negativos (C. Neg) estão indicados na figura. Todas as regiões testadas foram amplificadas com sucesso.

6.3.2. TITULAÇÃO DO CDNA

Uma vez testados e validados os iniciadores, foi iniciada a preparação da amostra para a construção de bibliotecas. Com base no protocolo desenvolvido no Laboratório de Retrovirologia do MHRP foi realizada a titulação do cDNA sintetizado, e para tal foram seguidos os protocolos de amplificação por PCR (1º e 2º rounds) do fragmento V1/V2. É importante ressaltar que o cDNA utilizado nas diluições seriadas foi oriundo de 1 μ L de um RNA viral diluído $1/10^2$. A figura 6.7 mostra um gel de eletroforese com o resultado da titulação.

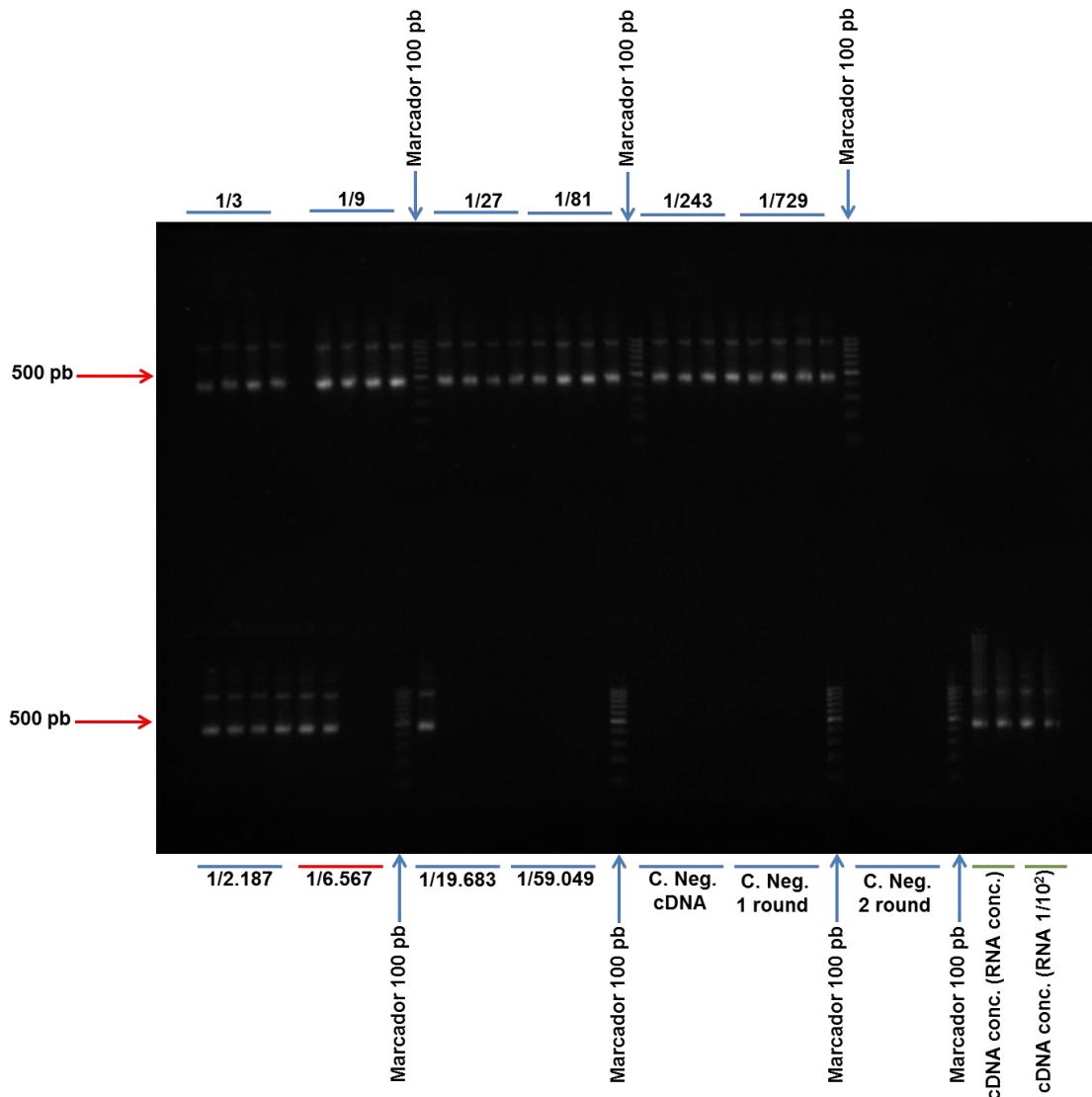


Figura 6.7 Gel de eletroforese da titulação do cDNA (2^o round). Neste exemplo, foi realizada a amplificação do fragmento V1/V2. As diluições utilizadas e controles negativos (C. Neg) estão indicados na figura. A diluição limitante foi 1/6.567 (assinalada em vermelho). Além das diluições também foram incluídas no teste, como controle positivo, amostras de cDNA sintetizadas à partir do RNA concentrado e diluído ($1/10^2$), assinaladas em verde.

Podemos observar que as últimas diluições que apresentaram amplificações são 1/2.187, 1/6.567 e 1/19.683. A diluição 1/2.187 foi a última a apresentar os quatro resultados positivos, o que fez a próxima ser considerada a diluição limitante (1/6.567).

Foi realizada uma média entre a última diluição com quadruplicata positiva e a diluição limitante, de acordo com o seguinte cálculo: $(2.187 + 6.567)/2 = 4.377$. A partir

deste valor resultante inferimos, para este exemplo, que uma cópia de cDNA deve estar contida em 1 μL de uma diluição em torno de 1/4.000.

Conforme mencionado no item 6.2.8 e de acordo com o protocolo do MHRP, a biblioteca deveria ser iniciada com um cDNA sintetizado a partir de 2.000 moléculas de RNA viral. De posse dos dados da titulação foi possível inferir o número de cópias de RNA contido em 1 μL do nosso estoque viral e calcular o volume inicial necessário para a confecção das bibliotecas. O racional seguido para este cálculo e um esquema geral das etapas pode ser observado na figura 6.8. Ao final do processo chegou-se a conclusão de que 2.000 cópias estariam contidas em 1 μL de uma solução 1/40 do RNA viral já diluído $1/10^2$. Como este volume é muito reduzido, optou-se por fazer 10 μL de uma solução 1/400 do RNA viral ($1/10^2$) e dividi-los em 4 reações de síntese de cDNA (2,5 μL de RNA em cada). Ao final das reações, todo o cDNA recém sintetizado foi combinado em um único tubo (80 μL no total). Este material foi utilizado para a construção de bibliotecas.

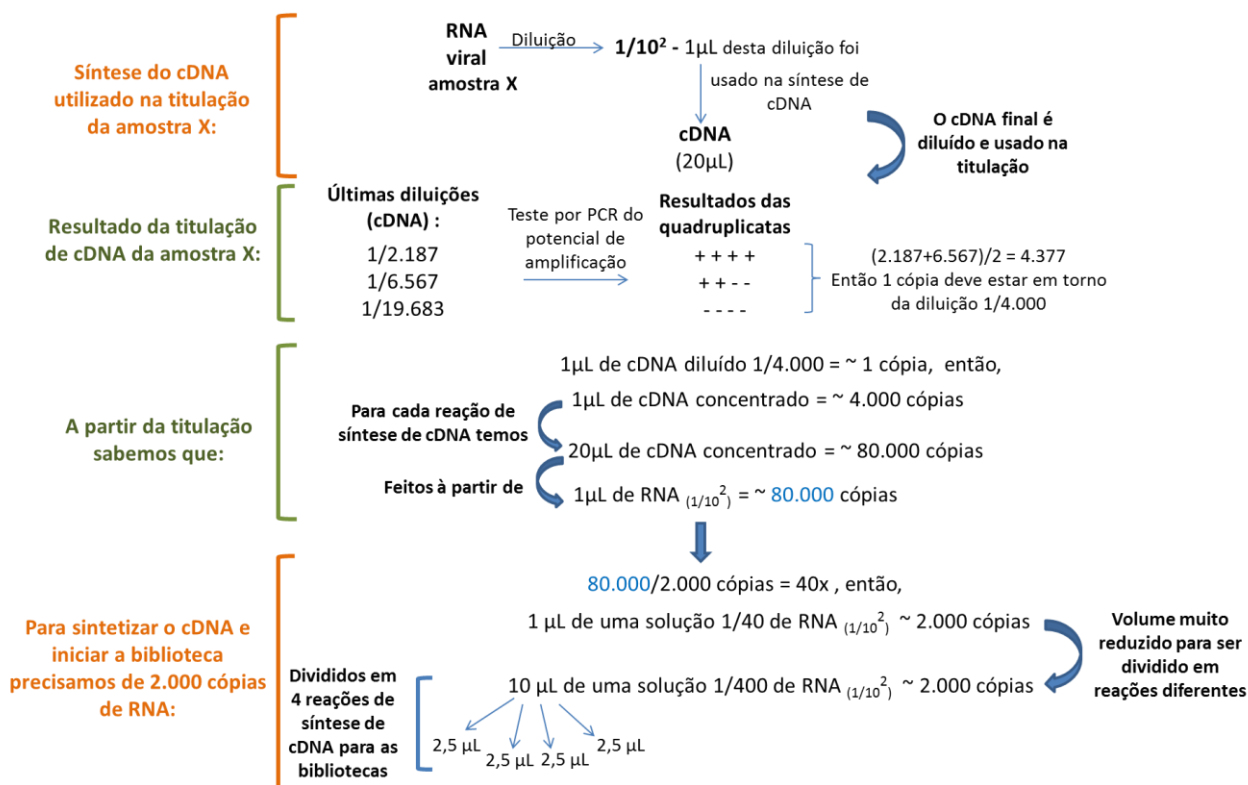


Figura 6.8 Esquema ilustrando os cálculos e procedimentos realizados a partir dos resultados obtidos na titulação do cDNA. Os passos referentes à titulação do cDNA estão destacados em verde e aqueles referentes à síntese de cDNA estão em laranja.

6.3.3. AMPLIFICAÇÃO DE CDNA PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS

A partir do cDNA recém-sintetizado, foi realizada a amplificação das regiões V1/V2, V3 e V4/V5 para a construção de bibliotecas. A figura 6.9 mostra um gel de agarose com o resultado da amplificação das referidas amostras (2^o round). Podemos observar que todas as regiões foram amplificadas com sucesso nas 10 reações que foram feitas para cada uma delas.

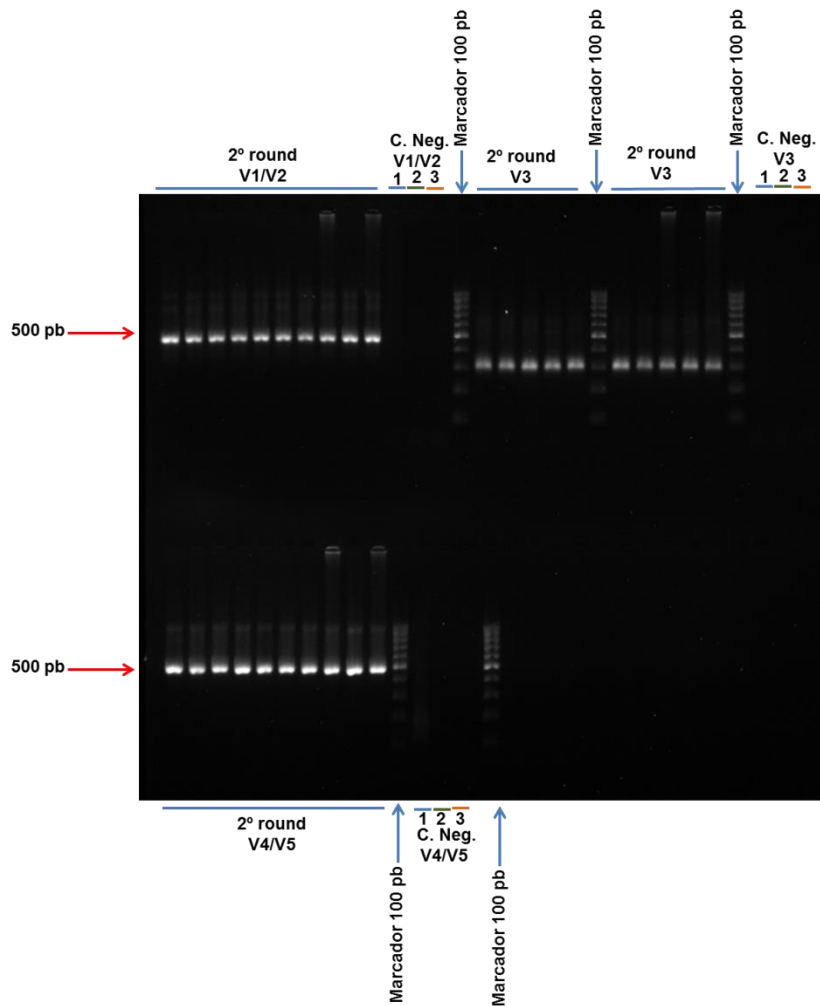


Figura 6.9 Gel de eletroforese da amplificação do cDNA (*2º round*). Nesta etapa, foi realizada a amplificação dos fragmentos V1/V2, V3 e V4/V5. As amostras testadas e controles negativos (C. Neg) estão indicados na figura. C.Neg 1, proveniente da reação de síntese de cDNA; C.Neg 2, proveniente da PCR de *1º round*; C.Neg 3, mix da PCR de *2º round*.

6.3.4. PURIFICAÇÃO DA PCR

Algumas das amostras amplificadas, quando avaliadas por eletroforese, apresentaram bandas de tamanhos diferentes dos esperados, podendo representar ampliações inespecíficas. Diante disto, optou-se por realizar a purificação em gel de agarose de todas as amostras. Esta etapa está presente no protocolo do MHRP, mas não é realizada pelo RML. Desta forma, optou-se por seguir os dois protocolos. Esta abordagem possibilitará a comparação de amostras que foram purificadas do gel de

agarose e aquelas que não foram, ou seja, seguiram direto da amplificação para a normalização.

Nesta etapa, as amostras provenientes das 10 reações de amplificação foram combinadas em um único tubo (específico para cada região genômica analisada) e 350 μL (dos 500 μL totais) foram corridos no gel de agarose e purificados. O resultado da purificação pode ser observado na figura 6.10. Após o processo de purificação, todas as amostras apresentam uma única banda com tamanho correspondente ao esperado.

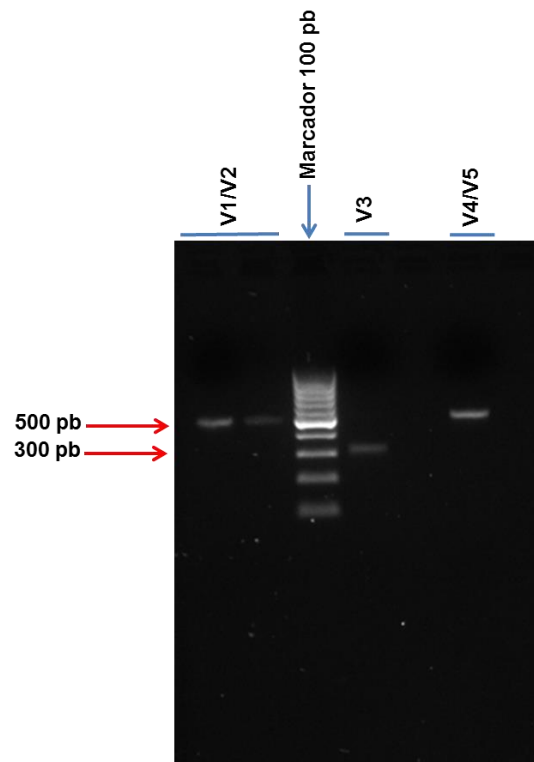


Figura 6.10 Gel de eletroforese do material purificado. Amostras V1/V2, V3 e V4/V5 estão indicadas na figura.

6.3.5. NORMALIZAÇÃO, ADIÇÃO DE ÍNDICES E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS

Uma vez amplificadas e purificadas (ou não), as amostras foram submetidas a uma etapa de normalização, para garantir que todas as amostras teriam aproximadamente 25 ng de produto amplificado. A estas amostras foram adicionados os índices (adaptadores) específicos e foi então realizada uma avaliação da qualidade das mesmas.

As bibliotecas foram construídas em duplicata para cada uma das 3 regiões (total de 6 amostras). Além disso, estas amostras foram divididas em dois grupos, purificados do gel e não-purificados. Foram então processadas 12 amostras no total. Estas 12 amostras foram avaliadas em *Bionalyzer*, e o resultado pode ser observado nas figuras 6.11 e 6.12.

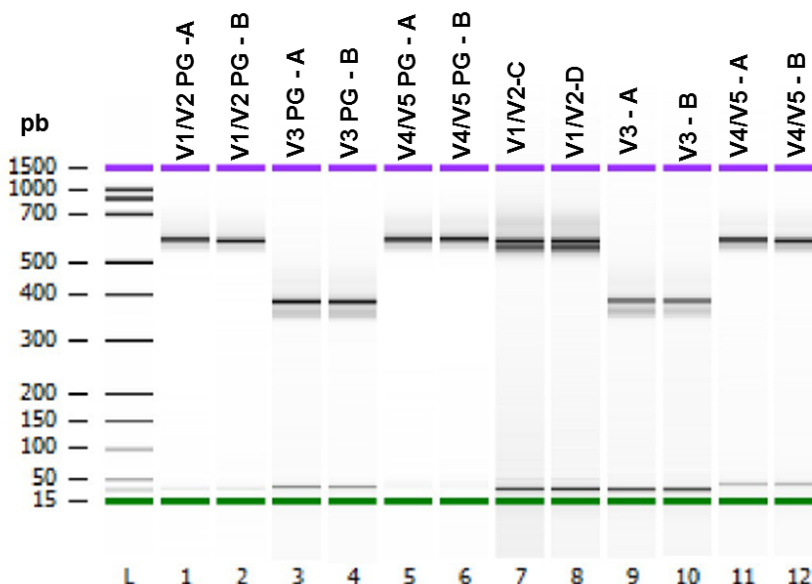


Figura 6.11 Gel de eletroforese resultante da corrida do Bionalyzer. Amostras estão indicadas na figura. PG, purificado do gel.

A figura 6.12 mostra os eletroferogramas resultantes da corrida das amostras no Bioanalyzer. Em todas as amostras, podemos observar os picos referentes ao marcador de peso molecular. O primeiro pico representa o menor marcador (15 pb) e o último

representa o maior (1.500 pb). Além disso, podemos observar alguns picos menores que não correspondem ao tamanho esperado para as respectivas amostras. No caso de picos em torno de 20-50 pb, estes podem representar os índices, utilizados durante adição de adaptadores, e que não foram ligados às amostras amplificadas. Já os picos observados na faixa de 350–550 pb podem ser fragmentos amplificados que não foram ligados aos adaptadores.

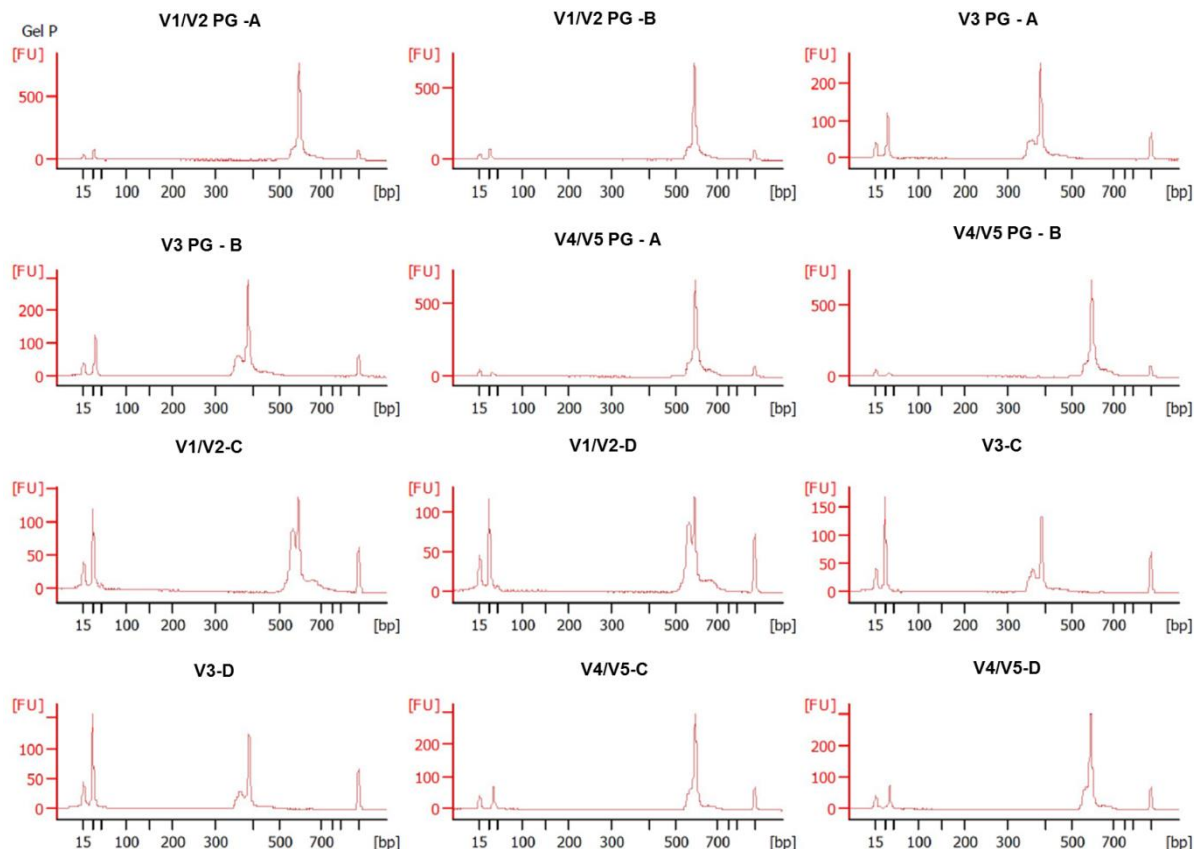


Figura 6.12 Eletroferogramas resultantes da corrida do Bionalyzer. No eixo x podemos observar o tamanho dos fragmentos presentes na amostra e no eixo y as unidades de fluorescência. Amostras estão indicadas na figura. PG, purificado do gel.

Os resultados aqui apresentados mostram que as bibliotecas apresentam o tamanho esperado e foram avaliadas como satisfatórias para o sequenciamento. Assim, as amostras foram enviadas para o RML e encontram-se em processo de sequenciamento.

7. DISCUSSÃO

O GALT é o maior tecido linfóide e abriga cerca de 60% do repertório de linfócitos do corpo humano. Dividido em *lamina propria*, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, o GALT é o principal tecido acometido durante a fase inicial de infecção pelo HIV, onde é observada uma intensa replicação viral e depleção de linfócitos T CD4⁺, levando ao acometimento deste tecido.

Os mecanismos envolvidos no processo de depleção celular no GALT durante as fases iniciais da infecção ainda são discutidos. Alguns trabalhos mostram que a gp120 do HIV pode levar ao aumento das concentrações de cálcio nos enterócitos, afetando a capacidade destas células de manterem um balanceamento iônico adequado (MARESCA *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que o acometimento da barreira epitelial intestinal pode permitir a translocação microbiana do lúmen para dentro do epitélio intestinal, promovendo a ativação imune sistêmica (BRENCHLEY *et al.*, 2006). Este processo pode desencadear a ativação de células T CD4⁺, levando a um aumento no repertório de células-alvo do HIV (BRENCHLEY & DOUEK, 2008).

As integrinas são glicoproteínas transmembranares presentes na maioria das células de vertebrados. Apresentam funções como adesão (célula-célula e célula-matriz extracelular) e migração celular. Estas proteínas podem ainda reconhecer ligantes no meio extracelular e transmitir sinais para o meio intracelular, desencadeando uma série de eventos no interior da célula. A integrina $\alpha_4\beta_7$ auxilia a migração de linfócitos T para o GALT através da sua interação com MAdCAM, uma molécula marcadora de mucosas (SAMPAIO *et al.*, 1995). Neste contexto, linfócitos expressando $\alpha_4\beta_7$ na sua conformação ativa apresentam um fenótipo de migração para o GALT. Tais observações evidenciam a importância destas proteínas durante a fase inicial da infecção pelo HIV.

Em 2007, O'Doherty e colaboradores avaliaram SNPs em diferentes regiões (codificantes e não-codificantes) do gene *itga4*, e encontraram uma maior prevalência do genótipo C-C no SNP rs1449263, localizado no promotor do gene, em pacientes com esclerose múltipla. Diante da evidência de maior expressão da integrina α_4 nestes pacientes, e do genótipo encontrado em maior frequência nos casos de esclerose

múltipla, o presente estudo avaliou três diferentes coortes para analisar a distribuição dos diferentes genótipos do SNP rs1449263 em relação à presença da infecção pelo HIV.

As distribuições genóticas obtidas para as coortes de adultos foram similares, onde adultos HIV⁺ apresentaram 17% CC, 54% CT e 29% TT, e os HIV⁻, 27% CC, 40% CT e 33% TT. Para as crianças observamos que aquelas expostas não-infectadas (EUC) apresentaram 11% CC, 53% CT e 36% TT, ao passo que as HIV⁺ eram 30% CC, 54% CT e 16% TT. Porém, quando as distribuições foram comparadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. O mesmo foi observado com relação aos alelos avaliados.

As frequências alélicas e genóticas reportadas neste estudo para as coortes de adultos estão de acordo com aquelas descritas para populações de países como EUA, Peru, Quênia, Itália e Nigéria (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2013), onde o alelo T foi observado como o mais frequente. Para a coorte pediátrica também observamos a prevalência do alelo T nas EUC, e a menor frequência do alelo C dentre todas as populações estudadas. Para as crianças HIV⁺, observamos uma prevalência de 54% do alelo C, a maior observada dentre as populações estudadas. Tais dados poderiam sugerir que a maior frequência do alelo C poderia estar associada a uma maior susceptibilidade à infecção pelo HIV, enquanto uma baixa frequência daquele alelo seria um fator protetor contra a aquisição do vírus. Entretanto, a comparação estatística entre as frequências alélicas dos grupos estudados não mostrou significância, e desta forma tais associações permanecem ainda em aberto.

Os resultados de expressão do gene *itga4* mostram uma maior expressão nos indivíduos portando o genótipo CC do SNP rs1449263 quando comparado aos demais genótipos. Pudemos observar ainda que existe uma relação dose-dependente entre a expressão deste gene em indivíduos portando diferentes genótipos encontrados para o SNP, onde TT < CT < CC. Esta mesma análise também foi realizada com o objetivo de comparar os alelos C e T, onde foi possível observar uma maior expressão do gene *itga4* em indivíduos portadores do alelo C. Os indivíduos portadores do genótipo CC apresentaram um aumento na expressão de *itga4*, em média 13x maior que o observado em indivíduos portadores do genótipo TT. Este achado se torna

interessante em um contexto de estabelecimento da fase aguda da infecção pelo HIV, uma vez que células $\alpha_4\beta_7^+$ são, em geral, $CD4^+$ e $CCR5^+$, constituindo potenciais alvos para o vírus. Diante destes resultados, optamos por medir a expressão da integrina β_7 , com o objetivo de avaliar a possibilidade de formação do heterodímero.

A análise da expressão da integrina β_7 mostrou que esta apresentou níveis de expressão compatíveis com os de α_4 , o que possibilitaria a formação do heterodímero $\alpha_4\beta_7$ de maneira estequiométrica. Observamos também que a expressão de β_7 foi maior no grupo dos indivíduos portadores do genótipo CC, quando comparados ao grupo portador do TT. O mesmo foi observado em relação ao alelo T, onde indivíduos não-portadores deste alelo apresentaram maior expressão de β_7 . Em alguns casos, a expressão relativa de β_7 foi maior que a de α_4 , o que nos levou a questionar se haveria um pareamento da mesma com a sua outra parceira, α_E .

Em 2015, Byrareddy e colaboradores publicaram um estudo que mostrou a diferença de expressão de $\alpha_4\beta_7$ em diferentes primatas não-humanos. É interessante destacar que foi observada uma menor expressão desta proteína nas espécies conhecidas como hospedeiras naturais do SIV (primatas africanos, como o mangabei fuligento), que normalmente não desenvolvem Aids, quando comparadas com primatas asiáticos, como os resos, que sucumbem à Aids quando infectados por lentivírus. Além disso, nos mangabeis fuligentos, foi observada uma população de células T $CD4^+$ expressando a integrina β_7 pareada com a subunidade α_E , o que não é observado nas espécies em que a infecção é patogênica e que não são hospedeiras naturais do SIV. Isto sugere o envolvimento de α_E no mecanismo de proteção destes animais à infecção, pareando com β_7 e possivelmente impedindo sua ligação a α_4 e consequente desenvolvimento de uma fenótipo patogênico mediante infecção por lentivírus de primatas.

Diferente do relatado por Byrareddy e colaboradores, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de α_E obtidos no presente trabalho. Além disso, os níveis de α_E encontrados foram reduzidos se comparados aos de α_4 e β_7 . A integrina $\alpha_E\beta_7$ está mais associada à retenção de linfócitos no GALT do que à migração de células para este tecido. Em humanos, a expressão desta proteína é observada de maneira mais frequente em linfócitos intraepiteliais e em quantidades

muito reduzidas em algumas populações de linfócitos periféricos. Esta pode ter sido a razão pela qual não foram observados maiores níveis de α_E nas amostras avaliadas, uma vez que trabalhamos com células do sangue periférico. É possível também que diferenças na expressão de α_E só sejam discrimináveis em comparações entre diferentes espécies de primatas, e portanto somente relacionadas ao fenótipo patogênico X não-patogênico, mas não de forma a modular diferenças intraespecíficas de susceptibilidade à infecção viral ou progressão para a Aids.

Embora tenha sido testada em poucas amostras, a detecção de $\alpha_4\beta_7$ por citometria de fluxo mostrou que os níveis do heterodímero na superfície celular correspondem aos observados para níveis de mRNA no PCR em tempo real, onde indivíduos pertencentes ao genótipo CC apresentam maior expressão de α_4 quando comparados àqueles portadores dos demais genótipos. Nossos dados indicam que a maior expressão gênica em indivíduos CC poderia representar uma maior quantidade de proteína α_4 na superfície celular.

A frequência de células T CD4⁺ com alta expressão de $\alpha_4\beta_7$ ($\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$) já foi relacionada à susceptibilidade a infecção por SIV em modelos animais. Martinelli e colaboradores (MARTINELLI *et al.*, 2013) mostraram que macacos resos submetidos à inoculação de SIV (intrarretal), e positivos para a infecção, apresentaram maior contagem de células T CD4⁺ $\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$ de memória antes (21 dias) e no dia do desafio, quando comparados àqueles em que a infecção não se estabeleceu. Além disso, já foi demonstrado que a administração de anticorpos anti- $\alpha_4\beta_7$ é capaz de inibir a infecção por SIV em primatas não-humanos (BYRAREDDY *et al.*, 2014). Estes trabalhos destacam o papel de $\alpha_4\beta_7$ nos processos iniciais de transmissão e no estabelecimento da infecção pelo HIV.

Na coorte de adultos HIV⁺, dispúnhamos de dados clínicos e laboratoriais que foram avaliados em relação aos diferentes alelos e genótipos encontrados para o SNP rs1449263. Não foi observada significância estatística quando parâmetros precoces da infecção pelo HIV foram comparados entre os diferentes genótipos, exceto pela primeira contagem de linfócitos T CD8⁺. Sabe-se que estas células são importantes para o controle da replicação viral e progressão para Aids, porém o mecanismo envolvido neste processo ainda não está bem elucidado. Estudos mostram que a

ausência de células T CD8⁺ durante a infecção de primatas não-humanos por SIV torna o sistema imune destes animais incapaz de conter a replicação viral (SCHMITZ *et al.*, 1999). Outra evidência da importância destas células durante a infecção pelo HIV é o fato de alguns alelos de HLA de classe I, responsáveis pela apresentação de epítomos para as células T CD8⁺, estarem relacionados à progressão mais lenta para a aids (CARRINGTON & O'BRIEN, 2003). No presente estudo, foi observada uma menor contagem de células T CD8⁺ em indivíduos portadores do alelo C, e este mesmo alelo foi relacionado à maior expressão de integrina α_4 . Uma explicação plausível para esta observação poderia ser de que a maior expressão desta proteína influencie de forma negativa no sistema imune, comprometendo o compartimento e/ou a reposição de células T CD8⁺, justificando a menor contagem destas células naqueles indivíduos. Alternativamente, deve-se ressaltar que as medições de células T CD8⁺ foram feitas no sangue periférico, e não temos ideia de como tais valores se correlacionam com as contagens de CD8⁺ no GALT. Elas poderiam ser correlacionadas de forma direta, mas igualmente de forma inversa (isto é, maiores contagens de células T CD8⁺ no tecido do que na periferia, através do sequestro destas células no tecido), o que torna nosso achado inconclusivo. Por fim, vale salientar que, em alguns casos, o período em que os indivíduos HIV⁺ foram submetidos à primeira coleta de material e avaliação dos parâmetros aqui apresentados pode não corresponder de fato à fase aguda ou precoce da infecção propriamente dita, visto que para alguns indivíduos este procedimento ocorreu com 6 a 8 meses pós-infecção, já caracterizando uma fase crônica e não aguda da história natural da infecção. Apesar dos fatos aqui descritos, ainda não está claro o porquê e as consequências geradas pela menor contagem de células T CD8⁺ nos indivíduos portadores do alelo C avaliado neste estudo.

A análise de sobrevida livre de tratamento não mostrou significância estatística quando os diferentes genótipos foram comparados. Devemos destacar que nesta análise só foi levada em consideração a data para início do tratamento, porém alguns indivíduos tiveram o tratamento iniciado antes mesmo de atingir valores de CD4 elegíveis para o tratamento segundo os critérios definidos então pelo Ministério da Saúde do Brasil. Diante da diferença de expressão de α_4 observada em relação aos genótipos descritos para o SNP rs1449263, esperávamos encontrar também diferenças entre os dados clínicos e de progressão, o que não foi observado. Uma questão

importante é que talvez os níveis de expressão da integrina α_4 não tenham de fato um papel relevante na fase crônica da infecção e na progressão para Aids, mas sim em etapas muito precoces da infecção, ou mesmo na aquisição do HIV. Isto poderia explicar o fato de não termos encontrado diferenças nas progressões de indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos ou portando os diferentes alelos, uma avaliação feita já nas fases tardias da história natural do HIV.

Células T CD4⁺ expressando $\alpha_4\beta_7$ são alvos atrativos para a replicação do HIV, e evidenciam a importância desta integrina nos estágios iniciais da infecção, facilitando o estabelecimento da mesma. O papel de $\alpha_4\beta_7$ na infecção aguda tem se destacado na literatura. Sabe-se que além do seu papel de adesão celular, as integrinas possuem a capacidade de transduzir sinais do meio extra para o intracelular. No caso de $\alpha_4\beta_7$, isto pode ocorrer através da interação com seu ligante natural MAdCAM. Diante disto, optamos por avaliar o papel de MAdCAM como molécula co-estimulatória em células T CD4⁺ totais e naïves.

Os experimentos de estímulo de células T CD4⁺ totais (CD45RO⁺ e CD45RO⁻) mostram que MAdCAM é capaz de atuar como molécula co-estimulatória induzindo a proliferação e replicação do HIV nestas células. Podemos destacar também o efeito inibitório do anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ na replicação do HIV em células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM. Ao avaliarmos células T CD4⁺ totais marcadas com anticorpo anti-CD45RO, notamos que à medida que as células eram estimuladas e proliferavam, também era observada uma redução da população de células naïves (CD45RO⁻), concomitante com um aumento da população de memória (CD45RO⁺). Esta observação poderia estar relacionada à aquisição de células no citômetro, já que as células de memória estão em maior frequência nas PBMCs. Uma vez ativadas, estas células proliferariam, aumentando ainda mais sua proporção em relação às células naïves, dificultando a detecção destas últimas durante a citometria. Ou ainda, o que seria mais interessante, MAdCAM seria capaz de atuar em células naïves, induzindo a transição destas para um fenótipo de memória. Este achado é particularmente interessante quando o avaliamos no contexto de infecção pelo HIV, onde as células T naïves chegam aos sítios indutores do GALT através da interação com MAdCAM, expresso na superfície das vênulas endoteliais.

Sabe-se que, uma vez estabelecida a infecção por HIV na fase aguda, observam-se altos níveis de replicação viral nos sítios indutores do GALT (placas de Peyer e linfonodos mesentéricos), sítios estes ricos em células T CD4⁺ naíves. Em geral, estas células não estão ativadas e portanto não seriam capazes de suportar uma infecção viral produtiva. A possibilidade de que MAdCAM induza um estágio de ativação nestas células, mesmo que basal, levanta a questão de que talvez células T naíves sejam capazes de suportar a replicação viral nestas condições.

Os ensaios de co-estímulo mostraram que células TCD4⁺ naíves, quando estimuladas via $\alpha_4\beta_7$ por MAdCAM, apesar de não apresentarem proliferação celular expressiva, são capazes de suportar a replicação viral em níveis superiores aos observados em estímulos clássicos, via CD3 ou CD3 em combinação com CD28. Este efeito é ainda mais pronunciado quando o co-estímulo com MAdCAM é feito em presença de ácido retinóico (RA). O RA é secretado por células dendríticas, podendo ser encontrado em tecidos como placas de Peyer (PP) e vênulas endoteliais. O RA é conhecido por induzir uma maior expressão de $\alpha_4\beta_7$ na superfície de células T naíves presentes nas PP (IWATA *et al.*, 2004). Porém, neste caso não acreditamos que o efeito do ácido retinóico esteja associado ao aumento da expressão da integrina $\alpha_4\beta_7$, uma vez que experimentos realizados pelo grupo do Dr. Arthos mostraram que a proliferação de linfócitos T CD4 naíves começa a ser observada após 48h de co-estímulo (anti-CD3 + MAdCAM + RA) (dados não publicados), mesmo antes que o aumento da expressão de $\alpha_4\beta_7$ via RA seja observado, o que em geral pode levar cerca de quatro dias.

O efeito de RA parece ser exclusivo do co-estímulo com MAdCAM, uma vez que em células estimuladas com anti-CD3 + anti-CD28 a adição de RA não foi capaz de induzir maior proliferação. De acordo com trabalhos prévios, nossos experimentos mostraram que o co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 é capaz de induzir proliferação celular. O co-estímulo de células T CD4⁺ naíves com anti-CD3 + MAdCAM + RA induziu maior expressão de β_7 , ao passo que este efeito não foi observado em células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28. O efeito de anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28 na indução da proliferação celular foi similar ao obtido com anti-CD3 + MAdCAM + RA. Este dado sugere que a indução de proliferação intensa por

MAdCAM pode não ser dependente do aumento da expressão de $\alpha_4\beta_7$, uma vez que, até o momento, não há relatos de modulação da expressão desta integrina por CD28.

O aumento da expressão de $\alpha_4\beta_7$ pode não ser um pré-requisito para o co-estímulo de células T $CD4^+ CD45RO^-$ com MAdCAM, porém alguns fatores adicionais são necessários para indução de proliferação celular, podendo ser um receptor co-estimulatório clássico, como CD28, ou fatores solúveis, como o RA. É importante destacar que o co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM em presença de anti-CD28 ou RA poderia culminar na geração de diferentes fenótipos de ativação. Um exemplo disso pode ser observado em relação à expressão de β_7 . Nos experimentos descritos no presente trabalho, células naíves estimuladas em presença de RA proliferam e são quase que em sua totalidade β_7^+ . Já aquelas estimuladas com anti-CD28, apesar de proliferarem de forma similar às estimuladas com RA, são aproximadamente 50% β_7^+ e 50% β_7^- , mostrando que as mesmas células quando submetidas a diferentes estímulos podem apresentar diferentes marcadores em sua superfície. Seria interessante avaliar diferentes marcadores de ativação e tipos celulares para tentar determinar os perfis celulares que estão sendo gerados mediante os diferentes estímulos adotados.

A partir dos resultados de proliferação celular e replicação viral em células naíves, começamos a questionar os possíveis efeitos de MAdCAM nestas células. Uma vez que células quando estimuladas tendem a iniciar o ciclo celular, que culmina com a divisão das mesmas, resolvemos avaliar a capacidade de MAdCAM induzir a entrada de células no ciclo celular. Para avaliar o efeito de MAdCAM na ativação de células naíves e indução do ciclo celular, as células estimuladas foram marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo.

O estímulo de linfócitos T naíves com anti-CD3 + MAdCAM foi capaz de induzir o ciclo celular nestas células, mesmo que em níveis reduzidos se comparados àqueles observados mediante o estímulo com anti-CD3 + MAdCAM em presença de anti-CD28 ou RA. Estes achados corroboram os dados supracitados que evidenciam o papel co-estimulatório de MAdCAM em linfócitos T $CD4^+ CD45RO^-$, induzindo um estágio de ativação basal. O próximo passo deste projeto visa avaliar a integração do HIV no genoma de células naíves estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM. Isto pode ser importante do ponto de vista do estabelecimento de reservatórios virais ainda na fase

aguda da infecção. O estímulo de linfócitos T naíves com anti-CD3 + MAdCAM, apesar de não induzir proliferação celular, pode ser suficiente para gerar um estado basal de ativação que possibilite a integração do HIV no genoma destas células e consequentemente o estabelecimento de reservatórios virais.

O estudo da dinâmica do estabelecimento da infecção do HIV em humanos é delicado. Alguns fatores limitantes contribuem para este fato, como a dificuldade na detecção de fases iniciais da infecção e a escassez de material para estudo. Uma vez que os principais eventos que governam o estabelecimento da infecção ocorrem em mucosas, torna-se necessário o uso de biópsias destes tecidos para a realização de estudos que visam elucidar os mecanismos envolvidos neste processo. Dada a óbvia limitação para amostragem de tecidos em humanos, diversos trabalhos têm utilizado primatas não-humanos como modelo de estudo. A utilização destes modelos é interessante, uma vez que estes animais apresentam grande similaridade com humanos e são susceptíveis a infecção por SIV, podendo apresentar sintomas similares aos da Aids em humanos.

No capítulo 6 deste trabalho, descrevemos um exemplo de estudo com primatas não-humanos no qual tivemos a oportunidade de participar. Neste trabalho, 10 macacos resos foram infectados com um clone de SIVmac239. Cinco semanas após a infecção foi iniciada a administração diária de antirretroviral (ART). Metade dos animais foi submetida à administração de ART (das semanas 5 a 18) e anticorpo monoclonal anti- $\alpha_4\beta_7$ (das semana 9 a 32). E na outra metade, o grupo controle, foram administrados ART (semanas 5 a 18) e anticorpo monoclonal anti-IgG (semanas 9 a 32). Quatro dos cinco animais tratados com anti- $\alpha_4\beta_7$ controlaram a replicação viral após o fim da administração da ART, e este efeito foi observado mesmo após a suspensão da administração do anticorpo. Três destes quatro animais apresentaram pequenos picos de replicação viral (*blips*), que foram rapidamente controlados. Os animais-controle, submetidos à terapia com anti-IgG, não foram capazes de conter a replicação viral.

Os animais deste estudo ainda estão em acompanhamento, agora por mais de 80 semanas pós-infecção, e todo o material coletado durante este período encontra-se armazenado e disponível para análise. Na execução deste projeto, pretendemos utilizar as amostras coletadas durante o acompanhamento para, através do sequenciamento

de nova geração, avaliar a dinâmica de populações virais durante os diferentes pontos da infecção para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos empregados. Esta análise será de suma importância para detectar possíveis diferenças entre os vírus emergentes e que possam ter sido selecionadas pelo tipo de tratamento administrado nestes animais. Além disso, as informações geradas podem ser relevantes para o melhor entendimento do papel da integrina $\alpha_4\beta_7$ durante a infecção por SIV/HIV, bem como o uso de anticorpos monoclonais contra esta proteína como terapia. A análise deste material será feita pela técnica de sequenciamento de nova geração. Para isto, nesta Tese, mostramos a validação do método TDS, desenvolvido nos laboratórios do MHRP e RML, no sequenciamento de SIV.

Os protocolos disponibilizados pelo MHRP e RML foram desenvolvidos com base em sequências de HIV. Uma vez que nosso estudo será realizado em amostras de SIV, fez-se necessária a avaliação e adaptação destes métodos para amostras desta natureza. Nossos testes mostraram que estes protocolos também podem ser aplicados em amostras de SIV, salvo algumas adaptações descritas no presente trabalho. Nem todos os iniciadores desenvolvidos para SIV neste trabalho (Tabela 6.1) foram testados. Porém, todos os iniciadores testados (Tabela 6.2) amplificaram com sucesso ambos os moldes utilizados, plasmídeo ou cDNA (provindo do RNA do estoque viral inoculado nos macacos), e desta forma poderão ser utilizados nos experimentos que darão continuidade ao projeto.

Os dois protocolos utilizados diferiam quanto ao método de purificação. No protocolo do MHRP era realizada a corrida das amostras em gel de agarose com cristal violeta, a partir do qual eram selecionadas as bandas contendo o fragmento de interesse, que eram excisadas do gel e purificadas. Este processo evita que bandas de tamanhos não desejados estejam presentes na etapa de produção das bibliotecas. Já no protocolo do RML, as amostras eram purificadas e normalizadas direto do 2^o round, mesmo que fossem observadas bandas inespecíficas no gel de confirmação da amplificação. O sequenciamento de NGS é um método muito sensível. Além disso, as amostras utilizadas tanto nos estudos com HIV como SIV costumam apresentar sequências similares. Em nosso caso, esta observação se torna ainda mais pertinente, uma vez que utilizaremos amostras de animais diferentes, porém todos infectados com

mesmo estoque viral. Desta forma deve-se ter um cuidado extremo para evitar contaminações e até mesmo troca de amostras. A adição de um passo extra de purificação pode ser um risco, uma vez que para cada região avaliada deve ser corrido um gel (por amostra) com seis poços, gerando um total de seis bandas a serem purificadas/região. Por isso, neste teste de validação dos protocolos optamos por testar ambos os métodos e, ao menos ao final da preparação das bibliotecas, todas as amostras mostraram-se satisfatórias para o sequenciamento.

De forma coletiva, as informações aqui apresentadas evidenciam a importância da integrina $\alpha_4\beta_7$ na infecção pelo HIV. Os resultados gerados por este trabalho abordam em diferentes aspectos o papel da integrina $\alpha_4\beta_7$ na infecção pelo HIV. Estes achados são de grande relevância para o melhor entendimento da regulação destas proteínas durante os eventos que culminam com a transmissão do vírus e estabelecimento da infecção. Destacamos ainda que as informações aqui apresentadas contribuem para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento contra o HIV/SIV utilizando esta integrina como alvo.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Não foram encontradas diferenças significativas de distribuição dos diferentes genótipos e alelos do SNP rs1449263 entre as coortes HIV⁺ e HIV⁻ avaliadas no estudo.
- ✓ Foi detectada uma maior expressão do gene *itga4* em indivíduos apresentando o genótipo CC quando comparados aos demais. Esta expressão diferencial parece ser dose-dependente, onde CC > CT > TT.
- ✓ A diferença de expressão do gene codificante de α_4 também foi detectada em relação aos alelos avaliados. Indivíduos portadores do alelo C apresentam maior expressão desta proteína do que os não portadores deste alelo.
- ✓ A expressão do gene codificante da integrina β_7 foi compatível com os níveis de α_4 observados, evidenciando a possibilidade de formação do heterodímero $\alpha_4\beta_7$ em quantidades estequiométricas.
- ✓ Em alguns casos, a expressão gênica de β_7 foi maior do que a de α_4 , o que permitiria a formação do heterodímero $\alpha_E\beta_7$. Porém, não foi possível detectar a expressão de α_E em células do sangue periférico.
- ✓ A expressão diferencial de $\alpha_4\beta_7$ foi detectada por citometria de fluxo, confirmando a hipótese de que indivíduos pertencentes aos diferentes genótipos do SNP avaliado apresentariam diferenças na expressão de α_4 , onde CC > CT > TT.
- ✓ Foi encontrada uma menor contagem de células T CD8⁺ nadir em indivíduos HIV⁺ portadores do alelo C, exigindo investigações futuras.
- ✓ Não foi encontrada relação entre a detecção do SNP analisado e a progressão para a Aids em indivíduos HIV⁺.
- ✓ MAdCAM, na presença de anti-CD3, foi capaz de induzir a proliferação e replicação do HIV em linfócitos T CD4⁺ totais.
- ✓ Em linfócitos T CD4⁺ naïves, o co-estímulo com MAdCAM + anti-CD3 não foi capaz de induzir a proliferação celular, necessitando de outros fatores co-estimulatórios como anti-CD28 ou ácido retinóico (RA).
- ✓ O co-estímulo com MAdCAM em presença de anti-CD28 ou RA induziu proliferação intensa de células T CD4⁺ naïves e em níveis similares.

- ✓ A adição de RA ao co-estímulo anti-CD3 + MAdCAM induz maior expressão de β_7 , o que não é observado em células estimuladas com anti-CD3 + MAdCAM + anti-CD28.
- ✓ O RA parece ter efeito apenas no co-estímulo com anti-CD3 + MAdCAM.
- ✓ O co-estímulo de células T CD4⁺ naïves com MAdCAM foi capaz de suportar a replicação do HIV mesmo na ausência de proliferação celular.
- ✓ O co-estímulo de linfócitos T CD4⁺ naïves com anti-CD3 + MAdCAM induz a progressão do ciclo celular.
- ✓ Os iniciadores desenvolvidos e testados para amplificação do SIVmac239 produzem fragmentos com o tamanho esperado e podem ser utilizados na técnica de TDS.
- ✓ A purificação dos produtos amplificados em gel de agarose com cristal violeta parece não influenciar na qualidade das bibliotecas geradas.
- ✓ Os protocolos de TDS do MHRP e RML podem ser combinados e adaptados para a utilização com amostras de SIV.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. L., A.H; POBER, J.S. (2003). Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro, Revinter.

AIKEN, C. and D. TRONO. **Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis**. J Virol. 1995. 69(8): 5048-5056.

ANSARI, A. A., *et al.* **Blocking of alpha4beta7 gut-homing integrin during acute infection leads to decreased plasma and gastrointestinal tissue viral loads in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques**. J Immunol. 2011. 186(2): 1044-1059.

ARTHOS, J., *et al.* **HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells**. Nat Immunol. 2008. 9(3): 301-309.

BANGHAM, C. R. **CTL quality and the control of human retroviral infections**. Eur J Immunol. 2009. 39(7): 1700-1712.

BARGATZE, R. F., *et al.* **Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined**. Immunity. 1995. 3(1): 99-108.

BARRE-SINOUSI, F., *et al.* **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)**. Science. 1983. 220(4599): 868-871.

BERLIN, C., *et al.* **alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow**. Cell. 1995. 80(3): 413-422.

BERNARD, A., *et al.* **The two-signal model of T-cell activation after 30 years.** *Transplantation*. 2002. 73(1 Suppl): S31-35.

BOUR, S. and K. STREBEL. **The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release.** *Microbes Infect.* 2003. 5(11): 1029-1039.

BRENCHLEY, J. M. and D. C. DOUEK. **HIV infection and the gastrointestinal immune system.** *Mucosal Immunol.* 2008. 1(1): 23-30.

BRENCHLEY, J. M., *et al.* **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nat Med.* 2006. 12(12): 1365-1371.

BROOKS, J. T., *et al.* **HIV-associated opportunistic infections--going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines.** *Clin Infect Dis.* 2009. 48(5): 609-611.

BROWN, P. H., *et al.* **Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences.** *J Virol.* 1991. 65(6): 3340-3343.

BUDDE, M. L., *et al.* **Integrin alpha4beta7 is downregulated on the surfaces of simian immunodeficiency virus SIVmac239-infected cells.** *J Virol.* 2010. 84(13): 6344-6351.

BURGENER, A., *et al.* **HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis.** *Curr Opin Immunol.* 2015. 36: 22-30.

BYRAREDDY, S. N., *et al.* **Targeting alpha4beta7 integrin reduces mucosal transmission of simian immunodeficiency virus and protects gut-associated lymphoid tissue from infection.** *Nat Med.* 2014. 20(12): 1397-1400.

CARRINGTON, M. and S. J. O'BRIEN. **The influence of HLA genotype on AIDS.** Annu Rev Med. 2003. 54: 535-551.

CASADO, C., *et al.* **Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression.** PLoS One. 2010. 5(6): e11079.

CAVALLO, G. and R. CAVALLO. **[Retroviruses: current classification system].** G Bacteriol Virol Immunol. 1986. 79(7-12): 288-294.

CHAHROUDI, A., *et al.* **Natural SIV hosts: showing AIDS the door.** Science. 2012. 335(6073): 1188-1193.

CICALA, C., *et al.* **HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV.** J Transl Med. 2011. 9 Suppl 1: S2.

CICALA, C., *et al.* **The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(49): 20877-20882.

COFFIN, J. M., *et al.* **The Interactions of Retroviruses and their Hosts.** Retroviruses. J. M. Coffin, S. H. Hughes and H. E. Varmus. Cold Spring Harbor (NY). (1997)

COLLINS, K. L., *et al.* **HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.** Nature. 1998. 391(6665): 397-401.

CONSORTIUM, T. I. H. (2013). The International HapMap Project. Nature. **426**: 789-796.

DALGLEISH, A. G., *et al.* **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** Nature. 1984. 312(5996): 763-767.

DARC, M., *et al.* **Polymorphisms in the alpha4 integrin of neotropical primates: insights for binding of natural ligands and HIV-1 gp120 to the human alpha4beta7.** PLoS One. 2011. 6(9): e24461.

DE WITTE, L., *et al.* **Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission.** Trends Mol Med. 2008. 14(1): 12-19.

DOUGHERTY, J. P. and H. M. TEMIN. **Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication.** J Virol. 1988. 62(8): 2817-2822.

ESTES, J. D., *et al.* **Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections.** PLoS Pathog. 2010. 6(8): e1001052.

FANALES-BELASIO, E., *et al.* **HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview.** Ann Ist Super Sanita. 2010. 46(1): 5-14.

FELDING-HABERMANN, B. **Integrin adhesion receptors in tumor metastasis.** Clin Exp Metastasis. 2003. 20(3): 203-213.

FRANKEL, A. D. and J. A. YOUNG. **HIV-1: fifteen proteins and an RNA.** Annu Rev Biochem. 1998. 67: 1-25.

FREED, E. O. **HIV-1 replication.** Somat Cell Mol Genet. 2001. 26(1-6): 13-33.

GALLAY, P., *et al.* **HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1997. 94(18): 9825-9830.

GALLO, R. C., *et al.* **Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** Science. 1983. 220(4599): 865-867.

GAO, F., *et al.* **An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I).** J Virol. 1998. 72(12): 10234-10241.

GAO, F., *et al.* **Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa.** Nature. 1992. 358(6386): 495-499.

GARCIA, J. V. and A. D. MILLER. **Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef.** Nature. 1991. 350(6318): 508-511.

GARMY-SUSINI, B., *et al.* **Integrin alpha4beta1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis.** Cancer Res. 2010. 70(8): 3042-3051.

GERAGHTY, R. J. and A. T. PANGANIBAN. **Human immunodeficiency virus type 1 Vpu has a CD4- and an envelope glycoprotein-independent function.** J Virol. 1993. 67(7): 4190-4194.

GORDON, C. M., *et al.* **Prevention interventions with persons living with HIV/AIDS: state of the science and future directions.** AIDS Educ Prev. 2005. 17(1 Suppl A): 6-20.

GOTO, T., *et al.* **Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy.** J Electron Microsc (Tokyo). 1994. 43(1): 16-19.

GOTTLIEB, M. S., *et al.* **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.** N Engl J Med. 1981. 305(24): 1425-1431.

HAALAND, R. E., *et al.* **Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1.** PLoS Pathog. 2009. 5(1): e1000274.

HAASE, A. T. **Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts.** Nat Rev Immunol. 2005. 5(10): 783-792.

HAASE, A. T. **Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission.** Nature. 2010. 464(7286): 217-223.

HARDIN, J. B. G. K., L. J. (2011). Becker's World of the Cell, Benjamin Cummings.

HARDY, G. H. **Mendelian Proportions in a Mixed Population.** Science. 1908. 28(706): 49-50.

HE, X., *et al.* **Conservancy of the alpha4beta7 integrin mimotope in the V2 domain of HIV type 1 CRF07_BC compared to subtype B' strains in China.** AIDS Res Hum Retroviruses. 2011. 27(10): 1127-1133.

HEINZINGER, N. K., *et al.* **The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994. 91(15): 7311-7315.

HILL, C. P., *et al.* **Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 93(7): 3099-3104.

HORTON, R. E., *et al.* **Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations.** J Infect Dis. 2010. 202 Suppl 3: S377-381.

HYNES, R. O. **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** Cell. 2002. 110(6): 673-687.

IGLESIAS, A. H., *et al.* **Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells.** J Neuroimmunol. 2004. 150(1-2): 163-177.

IRIE, A., *et al.* **Critical amino acid residues for ligand binding are clustered in a predicted beta-turn of the third N-terminal repeat in the integrin alpha 4 and alpha 5 subunits.** EMBO J. 1995. 14(22): 5550-5556.

ISEL, C., *et al.* **Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer).** J Mol Biol. 1995. 247(2): 236-250.

IWATA, M., *et al.* **Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.** Immunity. 2004. 21(4): 527-538.

JACOTOT, E., *et al.* **The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore.** J Exp Med. 2000. 191(1): 33-46.

JENSEN, J., *et al.* **Cytokines and adhesion molecules in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b.** Cytokine. 2005. 29(1): 24-30.

JETT, J. R., *et al.* **Acquired immunodeficiency syndrome associated with blood-product transfusions.** Ann Intern Med. 1983. 99(5): 621-624.

KALISH, M. L., *et al.* **Central African hunters exposed to simian immunodeficiency virus.** Emerg Infect Dis. 2005. 11(12): 1928-1930.

KAMYA, P., *et al.* **T cell Activation does not drive CD4 decline in longitudinally followed HIV-infected Elite Controllers.** AIDS Res Ther. 2011. 8(1): 20.

KEELE, B. F., *et al.* **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.** Science. 2006. 313(5786): 523-526.

KIM, S. K., *et al.* **Activation and migration of CD8 T cells in the intestinal mucosa.** J Immunol. 1997. 159(9): 4295-4306.

KINASHI, T. **Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes.** Nat Rev Immunol. 2005. 5(7): 546-559.

KLATZMANN, D., *et al.* **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** Nature. 1984. 312(5996): 767-768.

KLIMKAIT, T., *et al.* **The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release.** J Virol. 1990. 64(2): 621-629.

KNIPE, D. M. H., P.M.; GRIFFIN, D.E. **Retroviridae: The virus and their replication.** Fundamental Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, c2001. 4: 763-843 (2001).

KRZYSIEK, R., *et al.* **Preferential and persistent depletion of CCR5+ T-helper lymphocytes with nonlymphoid homing potential despite early treatment of primary HIV infection.** Blood. 2001. 98(10): 3169-3171.

LE ROUZIC, E., *et al.* **Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1.** J Biol Chem. 2002. 277(47): 45091-45098.

LEHNERT, K., *et al.* **MAdCAM-1 costimulates T cell proliferation exclusively through integrin alpha4beta7, whereas VCAM-1 and CS-1 peptide use alpha4beta1: evidence for "remote" costimulation and induction of hyperresponsiveness to B7 molecules.** Eur J Immunol. 1998. 28(11): 3605-3615.

LEVY, J. A., *et al.* **Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.** Science. 1984. 225(4664): 840-842.

LIM, S. G., *et al.* **Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection.** Clin Exp Immunol. 1993. 92(3): 448-454.

LOBB, R. R. and M. E. HEMLER. **The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo.** J Clin Invest. 1994. 94(5): 1722-1728.

MALIM, M. H., *et al.* **The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA.** Nature. 1989. 338(6212): 254-257.

MANSKY, L. M. **The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene.** Virology. 1996. 222(2): 391-400.

MANSKY, L. M. and H. M. TEMIN. **Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.** J Virol. 1995. 69(8): 5087-5094.

MARESCA, M., *et al.* **The virotoxin model of HIV-1 enteropathy: involvement of GPR15/Bob and galactosylceramide in the cytopathic effects induced by HIV-1 gp120 in the HT-29-D4 intestinal cell line.** J Biomed Sci. 2003. 10(1): 156-166.

MARGOLIS, D. M. **Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity.** Curr HIV/AIDS Rep. 2010. 7(1): 37-43.

MARTINELLI, E., *et al.* **The frequency of alpha(4)beta(7)(high) memory CD4(+) T cells correlates with susceptibility to rectal simian immunodeficiency virus infection.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2013. 64(4): 325-331.

MASSON, L., *et al.* **Inflammatory cytokine biomarkers to identify women with asymptomatic sexually transmitted infections and bacterial vaginosis who are at high risk of HIV infection.** Sex Transm Infect. 2015.

MASUR, H., *et al.* **An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction.** N Engl J Med. 1981. 305(24): 1431-1438.

MATTAPALLIL, J. J., *et al.* **Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.** Nature. 2005. 434(7037): 1093-1097.

MCKINNON, L. R., *et al.* **Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility.** J Immunol. 2011. 187(11): 6032-6042.

MEHANDRU, S., *et al.* **Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.** J Exp Med. 2004. 200(6): 761-770.

MEHANDRU, S., *et al.* **The gastrointestinal tract is critical to the pathogenesis of acute HIV-1 infection.** J Allergy Clin Immunol. 2005. 116(2): 419-422.

MILLER, C. J., *et al.* **Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus.** J Virol. 2005. 79(14): 9217-9227.

NAKAI, M. and T. GOTO. **Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency virus.** J Electron Microsc (Tokyo). 1996. 45(4): 247-257.

NORVELL, M. K., *et al.* **Investigation of microtrauma after sexual intercourse.** J Reprod Med. 1984. 29(4): 269-271.

O'DOHERTY, C., *et al.* **ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis.** J Neuroimmunol. 2007. 189(1-2): 151-157.

OTT, D. E. **Cellular proteins in HIV virions.** Rev Med Virol. 1997. 7(3): 167-180.

PANDREA, I., *et al.* **Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences.** J Med Primatol. 2006. 35(4-5): 194-201.

PARK, J., *et al.* **Aberrant methylation of integrin alpha4 gene in human gastric cancer cells.** Oncogene. 2004. 23(19): 3474-3480.

PEETERS, M. and P. M. SHARP. **Genetic diversity of HIV-1: the moving target.** AIDS. 2000. 14 Suppl 3: S129-140.

PETRUCCI, A., *et al.* **How many HIV-infected individuals may be defined as long-term nonprogressors? A report from the Italian Seroconversion Study. Italian Seroconversion Study Group (ISS).** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997. 14(3): 243-248.

PLANTIER, J. C., *et al.* **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** Nat Med. 2009. 15(8): 871-872.

POLES, M. A., *et al.* **A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection.** J Virol. 2001. 75(18): 8390-8399.

POLLARD, V. W. and M. H. MALIM. **The HIV-1 Rev protein.** Annu Rev Microbiol. 1998. 52: 491-532.

POPOV, S., *et al.* **Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex.** J Biol Chem. 1998. 273(21): 13347-13352.

POPOVIC, M., *et al.* **T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III.** Lancet. 1984. 2(8417-8418): 1472-1473.

PUMFERY, A., *et al.* **Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription.** Curr HIV Res. 2003. 1(3): 343-362.

REY-CUILLE, M. A., *et al.* **Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease.** J Virol. 1998. 72(5): 3872-3886.

ROBERTSON, D. L., *et al.* **HIV-1 nomenclature proposal.** Science. 2000. 288(5463): 55-56.

SAMPAIO, S. O., *et al.* **Organization, regulatory sequences, and alternatively spliced transcripts of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) gene.** J Immunol. 1995. 155(5): 2477-2486.

SATTENTAU, Q. J., *et al.* **Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding.** J Virol. 1993. 67(12): 7383-7393.

SAÚDE, M. D. **Boletim Epidemiológico - Departamento DST/Aids.** 2015.

SCARLATA, S. and C. CARTER. **Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly.** Biochim Biophys Acta. 2003. 1614(1): 62-72.

SCHIEFERDECKER, H. L., *et al.* **T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria.** J Immunol. 1992. 149(8): 2816-2822.

SCHMITZ, J. E., *et al.* **Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes.** Science. 1999. 283(5403): 857-860.

SCHWARTZ, O., *et al.* **Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.** Nat Med. 1996. 2(3): 338-342.

SELIG, L., *et al.* **Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses.** J Virol. 1999. 73(1): 592-600.

SHACKLETT, B. L. and P. A. ANTON. **HIV Infection and Gut Mucosal Immune Function: Updates on Pathogenesis with Implications for Management and Intervention.** Curr Infect Dis Rep. 2010. 12(1): 19-27.

SILVESTRI, G., *et al.* **Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia.** Immunity. 2003. 18(3): 441-452.

SMIT-MCBRIDE, Z., *et al.* **Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes.** J Virol. 1998. 72(8): 6646-6656.

SPIRA, A. I., *et al.* **Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques.** J Exp Med. 1996. 183(1): 215-225.

TAKADA, Y., *et al.* **Structural basis of integrin-mediated signal transduction.** Matrix Biol. 1997. 16(4): 143-151.

TAKADA, Y., *et al.* **The integrins.** Genome Biol. 2007. 8(5): 215.

TAKEMURA, T., *et al.* **A novel simian immunodeficiency virus from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in the Democratic Republic of Congo.** J Gen Virol. 2005. 86(Pt 7): 1967-1971.

THOMSON, M. M., *et al.* **Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy.** Lancet Infect Dis. 2002. 2(8): 461-471.

TJOMSLAND, V., *et al.* **Blocking of integrins inhibits HIV-1 infection of human cervical mucosa immune cells with free and complement-opsonized virions.** Eur J Immunol. 2013. 43(9): 2361-2372.

UNAIDS. **The Gap Report.** 2015.

VEAZEY, R. S., *et al.* **Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo.** J Virol. 2000. 74(1): 57-64.

VON ANDRIAN, U. H. and B. ENGELHARDT. **Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease.** N Engl J Med. 2003. 348(1): 68-72.

VON ANDRIAN, U. H. and C. R. MACKAY. **T-cell function and migration. Two sides of the same coin.** N Engl J Med. 2000. 343(14): 1020-1034.

WAIN-HOBSON, S., *et al.* **Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.** Cell. 1985. 40(1): 9-17.

WANG, X., *et al.* **Monitoring alpha4beta7 integrin expression on circulating CD4+ T cells as a surrogate marker for tracking intestinal CD4+ T-cell loss in SIV infection.** Mucosal Immunol. 2009. 2(6): 518-526.

WARNOCK, R. A., *et al.* **Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes.** J Exp Med. 1998. 187(2): 205-216.

WAWER, M. J., *et al.* **Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda.** J Infect Dis. 2005. 191(9): 1403-1409.

WILLIAMS, M. B. and E. C. BUTCHER. **Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen.** J Immunol. 1997. 159(4): 1746-1752.

WOLFE, N. D., *et al.* **Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters.** Lancet. 2004. 363(9413): 932-937.

XU, X. N., *et al.* **Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain.** J Exp Med. 1999. 189(9): 1489-1496.

ZHANG, Z., *et al.* **Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells.** Science. 1999. 286(5443): 1353-1357.

ZHANG, Z. H., *et al.* **The gene for the alpha 4 subunit of the VLA-4 integrin maps to chromosome 2Q31-32.** Blood. 1991. 78(9): 2396-2399.

ZHANG, Z. Q., *et al.* **Roles of substrate availability and infection of resting and activated CD4+ T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004. 101(15): 5640-5645.

ZHAO, R. Y., *et al.* **HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses.** Indian J Med Res. 2005. 121(4): 270-286.

ZHENG, Y. H., *et al.* **Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication.** J Virol. 2004. 78(11): 6073-6076.