



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

Impacto da imunossenescência na reconstituição funcional das células T de pacientes idosos com aids a antígenos do HIV-1 e ao toxoide tetânico

Taissa de Matos Kasahara

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2015

Taissa de Matos Kasahara

**Impacto da imunossenescência na reconstituição funcional
das células T de pacientes idosos com aids ao antígeno do
HIV-1 e ao toxoide tetânico**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2015

Ficha Catalográfica:

Kasahara, Taissa de Matos

Impacto da imunossenescência na reconstituição funcional das células T de pacientes idosos com aids ao antígeno do HIV-1 e ao toxoide tetânico / Taissa de Matos Kasahra – Rio de Janeiro, 2015

xv 66f.: il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

1. HIV-1. 2. Célula T. 3. Idoso. 4. Terapia antirretroviral

I. Título

Taissa de Matos Kasahara

Impacto da imunossenescência na reconstituição funcional das células T de pacientes idosos com aids ao antígeno do HIV-1 e ao toxoide tetânico

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora:

Dra. Cláudia Farias Benjamim (Doutora em Farmacologia) – UFRJ

Dra. Landi Veivi Guillermo Costilla (Doutora em Ciências Biológicas) – UNIRIO

Dr. Renato Santana de Aguiar (Doutor em Ciências Biológicas) – UFRJ

Dedico este trabalho à minha amada família por todo o amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amados pais, Fatima e Isac, por todo amor, carinho, apoio e oportunidades que eles me deram.

Aos meus queridos irmãos, cunhadas e sobrinho por estarem sempre ao meu lado e dispostos a me ajudarem.

A professora Cleonice, por ser uma orientadora incrível, um exemplo. Obrigada por todos os ensinamentos, o apoio, a dedicação e a paciência.

A toda equipe do LIIIT, por tornarem o laboratório um lugar único e especial.

A todos os meus amigos, principalmente Camila, Mariana, Cecília, Carolina e Rayane, pela amizade, pelos momentos de diversão e por todo apoio e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, agradeço pela disponibilidade e contribuição dada à minha formação acadêmica.

Agradeço a todos que me ajudaram a concluir essa etapa.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

Paulo Freire

Sumário

	Pág.
I- Introdução	1
1.1- Considerações gerais	1
1.2- Senescência	2
1.2.1- Senescência das células-tronco hematopoiéticas	3
1.2.2- Imunossenescência no compartimento inato	4
1.2.3- Imunossenescência da imunidade adquirida	7
1.3- Infecção pelo HIV-1	11
1.3.1- Estrutura viral e ciclo replicativo	11
1.3.2- Imunopatogênese	12
1.3.3- Terapia antirretroviral (TARV)	18
1.4- Infecção pelo HIV em indivíduos com mais de 50 anos	20
II- Objetivos	23
2.1- Geral	23
2.2- Específicos	23
III- Metodologia	24
3.1- Pacientes e imunização antitetânica	24
3.2- Quantificação plasmática de IgG anti-TT	24
3.3- Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	25
3.4- Cultura e estímulo das CMSP	25
3.5- Análise de citometria de fluxo	26
3.6- Teste de proliferação	27
3.7- Dosagem de citocinas	27
3.8- Quantificação da replicação viral <i>in vitro</i>	28
3.9- Análise estatística	28
IV- Resultados	29
4.1- Características dos indivíduos infectados pelo HIV-1	29
4.2- Impacto da idade na resposta proliferativa e no perfil de citocinas em resposta ao antígeno do HIV-1	29
4.3- Impacto da IL-10 na produção de citocinas relacionadas ao perfil Th1 e Th17 e na replicação viral <i>in vitro</i>	32

4.4- Impacto da idade na resposta proliferativa e no perfil de citocinas em resposta ao toxoide tetânico (TT)	32
4.5- Quantificação <i>in vivo</i> de IgG anti-TT e sua relação entre a produção de citocinas <i>in vitro</i> em resposta ao TT	35
4.6- Análise da frequência de diferentes subtipos de células T periféricas e a sua relação com o perfil de citocinas <i>in vitro</i> em resposta ao Env	35
4.7- Relação entre a frequência dos subtipos de células T periféricas com os níveis plasmáticos de IgG anti-TT e a produção <i>in vitro</i> de citocinas	38
V. Discussão	43
VI. Conclusão	50
VII. Referências Bibliográficas	52
VIII. Anexos	68

Lista de Figura

	Pag.
Figura 1. Efeito da idade na produção e distribuição das células da imunidade adaptativa	10
Figura 2. Evolução da infecção pelo HIV-1	15
Figura 3. Resposta proliferativa dos linfócitos e perfil de citocinas de culturas de CMSP em resposta ao antígeno Env	31
Figura 4. Efeito da neutralização da IL-10 na replicação viral e na produção de citocinas	33
Figura 5. Resposta proliferativa dos linfócitos e perfil de citocinas de culturas de CMSP em resposta ao TT	34
Figura 6. Concentração de IgG anti-TT antes e depois da vacinação com TT e sua relação entre a produção <i>in vitro</i> de citocinas.....	36
Figura 7. Estratégia de confinamento dos subtipos majoritários de células T periféricas	37
Figura 8. Relação entre a produção de citocinas <i>in vitro</i> em resposta ao Env e a frequência dos subtipos de células T periféricas	40
Figura 9. Relação entre a produção de citocinas <i>in vitro</i> em resposta ao TT e a frequência dos subtipos de células T periféricas	41
Figura 10. Relação entre os títulos de IgG anti-TT e a frequência dos subtipos de células T periféricas	42

Lista de Tabela

	Pag.
Tabela 1. Grupos de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV autorizados pelo Ministério da Saúde do Brasil	19
Tabela 2. Características dos grupos controles e dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral plasmática indetectável	39
Tabela 3. Frequência dos subtipos de células T periféricas nos grupos controles e nos pacientes infectados pelo HIV-1 tratados com terapia antirretroviral e com carga viral plasmática indetectável	39

Lista de abreviaturas

AID - citidina desaminase induzida por ativação
AIDS – síndrome da imunodeficiência humana
AZT - zidovudina
CD – grupo de diferenciação
CD40L – ligante de CD40
CDC – Centro de controle de doenças
cDNA – DNA complementar
CMSP – células mononucleares do sangue periférico
CMV – citomegalovírus
CTLA-4 – antígeno associado ao linfócito T citotóxico
CTL – célula T citotóxica
CVP – carga viral plasmática
DC – célula dendrítica
DUSP4 – proteína fosfatase de especificidade dupla
Env – envelope viral
HAART – terapia antirretroviral de alta eficiência
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HLA – antígeno leucocitário humano
ICAM-1 – molécula intercelular de adesão 1
ICOS – coestimulador induzido de célula T
Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
INNTR – inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
INTR – inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
IRF7 – fator regulatório 7 do IFN
KIR – receptor de inibição de morte
LPS - lipopolissacarídeo
mDC – célula dendrítica mielóide
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
NET – armadilha extracelular de neutrófilos
NFκB – fator de transcrição nuclear κB

NK – célula assassina natural
OMS – Organização Mundial da Saúde
PD-1 – receptor de morte programada 1
pDC – célula dendrítica plasmocitóide
PD-L1 – ligante de PD-1
rhIL-2 – interleucina-2 recombinante humana
RNA – ácido ribonucléico
SAHF – focos de heterocromatina associados a senescência
SASP – fenótipo secretório associado a senescência
SDF-1 – fator derivado do estroma 1
TARV – terapia antirretroviral
T_{CM} – célula T de memória central
TCR – receptor de célula T
T_{EM} – célula T de memória efetora
T_{EMRA} – célula T terminalmente diferenciada
T_{FH} – célula T helper folicular
Th – célula T helper ou do tipo auxiliadora
Tim-3 – domínio de mucina da imunoglobulina de célula T
TLR – receptor do tipo Toll
TNF – fator de necrose tumoral
TREC – rearranjo do receptor de célula T
Treg – célula T reguladora
TT – toxoide tetânico

Resumo

O número de pessoas infectadas pelo HIV-1 com mais de 50 anos ou mais vem aumentando em todo o mundo. Tanto a idade como a infecção pelo HIV são caracterizadas pela deficiência qualitativa e quantitativa nas células T. Dessa forma, é necessário confirmar o impacto da idade na reconstituição funcional dessas células em pacientes idosos com aids em resposta a terapia antirretroviral (TARV). Dessa forma, o nosso objetivo foi avaliar o impacto da idade nos subtipos de células T e no perfil de citocinas em resposta a um antígeno específico do HIV-1 (Env) e ao toxoide tetânico (TT) em pacientes que reconstituíram numericamente o número de células T CD4⁺. Para tanto, amostras do sangue periférico de 35 indivíduos idosos e 35 indivíduos jovens infectados pelo HIV-1 foram coletados para a obtenção do plasma e das células mononucleares do sangue periférico que foram cultivadas na presença de Env e TT na presença de rhlL-2. Em alguns experimentos, a ação da IL-10 foi neutralizada pelo anticorpo mononuclear IgG anti-IL-10. Através da incorporação de timidina radioativa avaliou-se a proliferação celular e a partir da técnica de ELISA determinou-se o perfil de citocinas do sobrenadante das culturas e os níveis plasmáticos de IgG anti-TT. Por fim, a frequência dos subtipos de células T foi determinada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que a resposta proliferativa das células T em resposta ao Env e ao TT foi significativamente inferior nos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 em uso da TARV. Em relação ao perfil de citocinas, a baixa produção de IFN- γ , IL-21 e IL-17 associada ao aumento na produção IL-10 foi observada nas culturas estimuladas com Env e TT dos pacientes idosos infectados pelo HIV-1. A neutralização de IL-10 não aumentou a produção de IFN- γ , IL-21 e IL-17 pelas células ativadas com Env nos pacientes idosos, porém foi capaz de aumentar a produção de TNF- α . Por fim, níveis reduzidos de IgG anti-TT foram observados nos pacientes idosos com aids, mesmo após o reforço com TT, e foram relacionados a baixa produção de IL-21 e IFN- γ e a reduzida frequência de células T de memória central (CD45RO⁺CD127⁺). Nossos resultados revelaram que a TARV é menos eficiente em recuperar de forma adequada a resposta imune em pacientes idosos infectados pelo HIV-1.

Abstract

The number of people infected with HIV with 50 or more years is increasing around the world. Both conditions, aids and aging, are characterized by a qualitative and quantitative deficiency of the T cell compartment, which confirms the need to determine the impact of age on the functional T cell recovery in patients treated antiretroviral therapy. Thereby, we investigate the impact of age on the T-cell subsets and the cytokine profile in response to HIV-specific stimuli (Env) and tetanus toxoid (TT) vaccination in treated aids patients successfully treated with antiretroviral therapy (ARV). For this, peripheral blood mononuclear cells from 35 young and 35 older HIV-1-infected individuals, were cultured with ENV peptides or TT in the presence of rhIL-2. In some experiments, endogenous IL-10 was blockade by using IgG anti-IL-10 monoclonal antibody. The cellular proliferation was determined through thymidin incorporation, cytokine profile and seric level of TT-specific IgG serum were quantified by ELISA technique, and the frequencies of T cell subsets were determined by flow cytometry. Our results demonstrated that proliferative response of T-cells to either HIV-1-specific Env peptides or tetanus toxoid (TT) was significantly lower in older ARV-treated patients. In relation to cytokine profile, we observed lower levels of IFN- γ , IL-17 and IL-21, and increased production of IL-10 in T cells from older patients challenged with Env or TT. The IL-10 neutralization by anti-IL-10 mAb did not elevate IFN- γ , IL-21 and IL-17 release in cell cultures from older patients, but increased TNF- α production. Finally, even after a booster dose of TT, reduced anti-TT IgG titers were quantified in older AIDS patients and it was related to both lower IL-21 and IFN- γ production and reduced frequency of central memory T-cells (CD45RO⁺CD127⁺). Our results reveal that ARV therapy was less efficient in recovering adequate immune response in older AIDS patients.

I. INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Em 2013, o número de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), era de 35 milhões (33,1 milhões – 37,2 milhões) em todo o mundo, sendo 4,2 milhões com 50 anos ou mais de idade (UNAIDS, 2013). Embora o grupo de risco da infecção pelo HIV seja de indivíduos entre 20-40 anos, 10% dos adultos que vivem com o HIV em países de baixa e média renda e 30% dos que vivem em países de alta renda tem 50 anos ou mais (UNAIDS, 2013).

O crescimento no número de pessoas infectadas com 50 anos ou mais pode ser explicado por dois motivos. O primeiro é o aumento da expectativa de vida da população em geral, permitindo que pessoas com mais idade sejam infectadas pelo vírus, e assim, elevando o número de novos casos diagnosticados nessa faixa etária (revisado por Cardoso *et al.*, 2014). O segundo motivo se deve ao sucesso da terapia antirretroviral (TARV) que promoveu uma diminuição da mortalidade de indivíduos infectados pelo HIV (Cardoso *et al.*, 2014; revisado por Costagliola, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2013, aproximadamente 12,9 milhões de pessoas ao redor do mundo estavam recebendo o tratamento antirretroviral (WHO, 2014). A introdução da TARV tem permitido que a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 consiga controlar a replicação viral e elevar o número de células T CD4⁺, resultando na melhora da qualidade e da expectativa de vida desses pacientes (Autran *et al.*, 1997).

Entretanto, alguns pacientes em tratamento não conseguem recuperar de forma satisfatória o número de células T CD4⁺, apesar de serem capazes de controlar a replicação viral e um dos fatores associados a esse fenômeno é a idade (Moore & Keruly, 2007). Todavia, alguns pacientes idosos são capazes de responder a TARV aumentando o número de células T CD4⁺, e estudos objetivando avaliar o impacto da TARV na recuperação funcional dessas células, em indivíduos com mais de 50 anos, estão faltando e podem auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nesse grupo de pacientes que continua a crescer em todo o mundo.

1.2 - Senescência

Senescência se refere às transformações progressivas que acometem todos tecidos e órgãos, tal como o sistema imune, durante o envelhecimento de um indivíduo, levando a uma disfunção orgânica progressiva. Os mecanismos que causam a senescência são multifatoriais e podem ser explicados, em parte, pela senescência celular que ocorre durante o envelhecimento (revisado por Goronzy & Weyand, 2013). Como consequência, a idade está relacionada a uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas, doenças autoimunes e neoplasias, e a uma baixa resposta a vacinas (revisado por Moro-Gracia, Alonso-Arias & López-Larrea, 2012; revisado por Montecino-Rodriguez, Berent-Maoz & Dorshkind, 2013; Goronzy *et al.*, 2013).

A senescência celular é um mecanismo de parada irreversível do ciclo celular iniciado quando uma resposta de dano ao DNA é ativada (revisado por Deursen, 2014). Essa resposta pode ser ativada pelo comprometimento dos telômeros, uma região formada por um complexo de proteínas e sequências nucleotídicas repetidas presente nas extremidades dos cromossomos, que os protegem de serem reconhecidos pela célula como moléculas de DNA danificadas com necessidade de reparo (Boccardi *et al.*, 2014).

O encurtamento dos telômeros representa um mecanismo que contribui com o comprometimento da sua função (Song *et al.*, 2010). Os telômeros encurtam, em média, de 50 a 100 pares de base em cada ciclo celular (Levy *et al.*, 1992) devido a inatividade da enzima telomerase, responsável pela formação dos telômeros. Os linfócitos, porém, são capazes de ativar a expressão da telomerase no momento em que são ativados, evitando que essas células entrem em senescência (Ahmad *et al.*, 2014). Estudos têm mostrado uma correlação positiva entre a diminuição na atividade da telomerase, principalmente nos linfócitos T, e a idade dos indivíduos (Frenk *et al.*, 1998; Koatz *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2015). Dessa forma, a idade parece contribuir com o processo de imunossenescência, uma vez que a redução na atividade da telomerase leva ao encurtamento dos telômeros e consequentemente à senescência celular de células do sistema imune.

As células senescentes adquirem características fenotípicas que permitem distingui-las. É possível observar o aparecimento de regiões de cromatina altamente condensadas, chamadas de focus de heterocromatina associados a senescência

(SAHFs), onde os cromossomos compactados são visíveis microscopicamente. Além disso, as células senescentes secretam uma variedade de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas, proteases e componentes da matriz extracelular, em um fenômeno denominado como fenótipo secretório associado a senescência (SASP) (revisado por Chandler & Peters, 2013). O SASP afeta as células vizinhas e circundantes de forma parácrina, sendo capaz de induzir senescência em células normais (Acosta *et al.*, 2013). Estudo realizado por Rodier e colaboradores (2009) mostrou que a ativação de respostas de reparo a danos no DNA podem iniciar a secreção de citocinas como IL-6. Como as células senescentes se acumulam durante o envelhecimento, o SASP pode ser a ligação entre o processo de senescência celular e a diminuição funcional de tecidos e órgãos relacionada à idade (Hayakawa *et al.*, 2015).

1.2.1 – Senescência das células-tronco hematopoiéticas

O envelhecimento das células-tronco hematopoiéticas parece ser o mecanismo inicial que influencia a imunossenescência. As principais características observadas durante o envelhecimento do sistema hematopoiético são: reduzida capacidade de renovação das células-tronco e alteração em sua composição, com maior geração de progenitores mielóides e menor geração de progenitores linfóides (revisado por Snoeck, 2013; revisado por Geiger, Denkinger & Schirmbeck, 2014). A redução do potencial de renovação das células-tronco hematopoiéticas foi observada em diversos ensaios de transplante, em que células envelhecidas transplantadas em indivíduos jovens foram 2 vezes menos eficientes em contribuir para a hematopoiese (Geiger, Denkinger & Schirmbeck, 2014). Porém, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno não estão bem esclarecidos. Estudo realizado por Yahata e colaboradores (2011) sugere que a diminuição do potencial de renovação se deve ao acúmulo de danos no DNA, durante o processo de envelhecimento, causados pelo estresse oxidativo. Além disso, foi visto que alterações na metilação global do DNA podem contribuir para a alteração do perfil proliferativo das células-tronco hematopoiéticas durante a idade (Beerman *et al.*, 2013). O perfil de metilação do DNA genômico também está envolvido com o potencial de diferenciação para um perfil mielóide do sistema hematopoiético durante o envelhecimento (Bocker *et al.*, 2011). Estudo realizado por Pang e

colaboradores (2011) mostrou que as células-tronco hematopoiéticas de indivíduos idosos, em comparação com indivíduos jovens, apresentavam uma maior expressão de genes envolvidos na diferenciação de precursores mieloides e uma menor expressão de genes envolvidos na diferenciação de precursores linfoides.

A alteração na população do sistema hematopoiético durante o envelhecimento também pode ser influenciada por mudanças nas interações entre as células-tronco hematopoiéticas e o nicho hematopoiético (Montecino-Rodriguez, Berent-Maoz & Dorshkind, 2013). O nicho hematopoiético é composto por diferentes tipos celulares que secretam fatores de crescimento e interagem de forma coordenada para promover a sobrevivência, proliferação, potencial de renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (Geiger, Haan & Florian, 2013). Dessa forma, estudo realizado por Kohler e colaboradores (2009) mostrou que células-tronco hematopoiéticas de camundongos idosos, comparadas com camundongos jovens, apresentavam uma organização diferente e uma menor adesão na medula óssea. Durante o envelhecimento, a quantidade de adipócitos presentes na medula óssea aumenta e parece influenciar negativamente o microambiente hematopoiético, diminuindo o número de células-tronco hematopoiéticas. Tuljapurkar e colaboradores (2011) mostraram que o aumento no teor de gordura presente na medula óssea de indivíduos idosos apresentava uma correlação negativa com os níveis plasmáticos de SDF-1 (*stromal-derived factor*), uma quimiocina produzida pelos osteoblastos da medula óssea que tem como função atrair as células-tronco hematopoiéticas e regular sua localização, sua capacidade de renovação e mobilização.

1.2.2 – Imunossenescência no compartimento inato

A imunidade inata é mediada por um grupo diverso de células que é responsável pela primeira resposta contra um patógeno. Os neutrófilos são os leucócitos circulantes que respondem mais rapidamente a invasões microbianas, parasitárias e fúngicas. Indivíduos idosos não perdem a capacidade de gerar uma neutrofilia em resposta a uma infecção, porém uma redução na função dessas células tem sido observada durante o envelhecimento, como redução na produção de espécies reativas do oxigênio, comprometimento na fagocitose e na quimiotaxia (revisado por Panda *et al.*, 2009; revisado por Shaw *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Wenisch e colaboradores (2000) mostrou que a redução na capacidade de fagocitose de bactérias gram-positivas e gram-negativas pelos neutrófilos de indivíduos idosos estava relacionada ao aumento no nível de cálcio intracelular e a redução no transporte de carboidratos nessas células. Porém, a diminuição na produção de espécies reativas do oxigênio por essa célula só foi observada após o estímulo com bactéria gram-positiva. O comprometimento na fagocitose pelos neutrófilos durante o envelhecimento está relacionado com uma redução na expressão de CD16 (Butcher *et al.*, 2001). Além disso, Hazeldine e colaboradores (2014) também observaram que neutrófilos de indivíduos idosos, estimulados com interleucina (IL)-8 ou LPS (*lipopolysaccharide*), apresentam a formação de NET (*neutrophil extracellular trap*) comprometida. Também foi observado que essa diminuição na formação de NET não estava relacionada com uma redução na expressão dos receptores CXCR1, CXCR2 e TLR4 (TLR – *toll like receptors*), e sim com uma menor produção de espécies reativas de oxigênio.

Em relação aos outros granulócitos, basófilos e eosinófilos, existem poucos estudos mostrando alterações nas suas funções relacionadas a idade. Já foi observado que eosinófilos de indivíduos mais velhos com asma (55-88 anos de idade) apresentam uma menor desgranulação em comparação com eosinófilos de pacientes mais jovens e que basófilos de indivíduos idosos são mais responsivos a concentrações padrões de anti-IgE (Ig – *immunoglobulin*) (Mathur *et al.*, 2009).

Os monócitos e macrófagos são importantes células efetoras e reguladoras do processo inflamatório. Estudos avaliando o número absoluto e os subtipos de monócitos no sangue periférico em indivíduos idosos são controversos, porém diversos estudos mostram uma alteração funcional dessas células (Martins, Modesti & Ginaldi, 2004; Bella *et al.*, 2007; Seidler *et al.*, 2010). Estudo realizado por Bella e colaboradores (2007) mostrou que os monócitos de indivíduos idosos, após estímulo com LPS, produzem níveis inferiores de IL-12 quando comparados com os monócitos de indivíduos jovens. Outro estudo observou uma menor produção de fator α de necrose tumoral (TNF- α) e IL-6 por monócitos de indivíduos idosos, induzidos por ligante de TLR1/2, e essa diminuição foi relacionada com a redução na expressão de TLR1 nessas células (van Duin *et al.*, 2007).

Além disso, o aumento na frequência de um subtipo de monócito denominado não clássico (CD14⁺CD16⁺) foi relacionado com a idade, porém essas células apresentavam uma redução na expressão de HLA-DR (HLA – *human leukocyte*

antigen) e CX₃CR1 (Seidler *et al.*, 2010). A diminuição na expressão de CX₃CR1 pode afetar a migração dos monócitos para locais de inflamação e pode reduzir a meia-vida dos macrófagos derivados dessas células (Seidler *et al.*, 2010). Quanto aos macrófagos, estudo realizado em modelo animal mostrou que a idade prejudica a polarização dessas células em fenótipos pró-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios (M2) (Mahbub, Deburghraeve & Kovacs, 2012).

As células dendríticas (DCs – *dendritic cells*) são fundamentais para a ativação de uma resposta imune específica. Assim como nos monócitos, estudos avaliando o número absoluto e a frequência dos subtipos de DCs no sangue periférico de indivíduos idosos são controversos, porém diversos estudos mostram uma alteração funcional dessas células (Bella *et al.*, 2007; Panda *et al.*, 2010; revisado por Agrawal & Gupta, 2011). Diversos estudos mostraram que a idade prejudica a migração das DCs (revisado por Agrawal & Gupta, 2011). Já em relação a expressão de marcadores relacionados a ativação, diversos trabalhos não acharam diferenças entre as DCs de indivíduos jovens e idosos (revisado por Agrawal & Gupta, 2011). Porém, Bella e colaboradores (2007) observaram que as DCs do sangue periférico de indivíduos idosos saudáveis expressavam níveis mais elevados de CD86 e CD83.

Estudo realizado por Panda e colaboradores (2010) mostrou que as DCs de indivíduos idosos não estimuladas apresentavam uma produção basal maior de citocinas pró-inflamatórias em comparação com as células de indivíduos jovens. Porém, quando as células dendríticas mielóides (mDC – *myeloid DC*) de indivíduos idosos foram estimuladas com ligantes para os receptores TLR1/2, TLR2/6, TLR3 e TLR8, foi observado uma menor produção de TNF- α , IL-6 e IL-12, e quando as células dendríticas plasmocitóides (pDC – *plasmacytoid DC*) foram estimuladas com ligantes para TLR7 e TLR9, essas produziram menos TNF- α e interferon (IFN)- γ em comparação com as células de indivíduos jovens. Esses resultados indicam que a estimulação dessas células por ligantes de TLR não é capaz de aumentar a produção de citocinas de forma eficiente em indivíduos idosos e essa deficiência foi, indiretamente, relacionada com uma baixa resposta imune humoral a imunização contra influenza por afetar a ativação das células T CD4⁺.

Sridharan e colaboradores (2011) também demonstraram o comprometimento das pDCs de indivíduos idosos em responder a ligantes de TLR. Nesse estudo, a baixa produção de IFN do tipo I e do tipo III foi explicada pela redução na

fosforilação do fator de transcrição IRF-7 (*interferon regulatory factor-7*) nessas células. Além disso, as pDCs dos indivíduos idosos não foram capazes de induzir eficientemente a produção de perforina, granzima e IFN- γ em células T CD8⁺ alogênicas de indivíduos jovens. Essas DCs de indivíduos idosos também induziram menos proliferação e produção de IFN- γ em células T CD4⁺ e T CD8⁺ de indivíduos jovens. Essa redução em induzir a proliferação e a produção de citocinas dos linfócitos T pode ser explicada, em parte, pela diminuição na expressão de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), uma molécula envolvida na interação com os linfócitos T, observada nas DCs de indivíduos idosos (Ciaramella *et al.*, 2011).

1.2.3 – Imunossenescência da imunidade adquirida

As células da imunidade adaptativa são capazes de exercer uma resposta específica, e muitas vezes duradoura, contra qualquer antígeno. O processo de envelhecimento tem sido associado a uma diminuição no número de células B naíves e um aumento no número de células B de memória. Além disso, essas células B de memória encontradas na periferia tendem a viver e a se expandirem mais, o que torna a população dessas células homogênea com receptores de antígenos menos diversificados (revisado por Dorrington & Bowdish, 2013). Estudo realizado por Buffa e colaboradores (2011) mostrou que os indivíduos idosos apresentavam um acúmulo de células B de memória exauridas caracterizadas fenotipicamente como IgG⁺IgD⁻CD27⁻, com reduzida taxa de hipermutação somática, e que as células B naíves de indivíduos idosos são capazes de produzir IL-10 e TNF- α frente a um estímulo fraco em comparação com as células dos indivíduos jovens.

Frasca e colaboradores (2008) observaram um declínio na transcrição de citidina desaminase induzida por ativação (AID) em células B do sangue periférico de indivíduos idosos. Corroborando esses resultados, Khurana e colaboradores (2012) mostraram que a redução na indução de AID, relacionada com a idade, após vacinação contra H1N1 apresentava uma correlação positiva com a geração de anticorpos de baixa afinidade. Essa deficiência das células B em produzir anticorpos pode ser consequência de um declínio na função das células T. Estudo realizado por Yu e colaboradores (2012) mostrou *in vivo* que o aumento na expressão de DUSP4 (*dual-specific phosphatase 4*) nas células T CD4⁺ de memória de indivíduos idosos estava correlacionado com a inibição da expressão de moléculas, como CD40L

(*CD40-ligand*) e ICOS (*inducible T-cell costimulator*), e de citocinas, como IL-4, IL-17 e IL-21, importantes para auxiliarem na diferenciação dos linfócitos B.

As alterações observadas nas células B durante o envelhecimento são, em parte, consequências das modificações no compartimento de células T (Figura 1). Com a idade, o número de linfócitos T naïve, devido a involução tímica, e de linfócitos T de memória central (T_{CM} – *central memory*) diminui consideravelmente enquanto o número de linfócitos T de memória efetora (T_{EM} – *effector memory*) aumenta, resultando na redução da diversidade no repertório dessas células (revisado por Geiger, Haan & Florian, 2013). As células T naïve maduras, ao saírem do timo, entram na corrente sanguínea por onde migram até os órgãos linfoides secundários e, caso não encontrem com seu antígeno, voltam para a circulação sanguínea em direção a outro órgão linfóide secundário. Essas células são atraídas para as zonas de células T dos linfonodos e tecidos associados à mucosa pelas quimiocinas CCL19 e CCL21, produzidas pelas células do estroma, que se ligam ao receptor CCR7 e entram pelo rolamento nas vênulas endoteliais altas através da L-selectina (CD62L). Dessa forma, as células T naïve encontradas no sangue são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$ e $CD28^+$ (revisado por Moro-García, Alonso-Arias & López-Larrea, 2013).

Kilpatrick e colaboradores (2008) observaram uma diminuição, dependente da idade, de células T $CD4^+$ virgens tímicas, definidas pela expressão de $CD45RA^+CD31^+$ com maiores níveis de TREC (*T cell receptor rearrangement*), associada a um incremento na frequência de células T $CD4^+$ naïves $CD31^-$, subtipo de célula T naïve derivada da proliferação homeostática das células T vígens tímicas na periferia. Além disso, também foi visto que ambos subtipos de células T $CD4^+$ naïves de indivíduos mais velhos apresentavam telômeros mais curtos, sugerindo que essas células reconheceriam novos antígenos, mas talvez não seriam capazes de gerar uma resposta proliferativa tão eficiente como as células naïve de pessoas mais novas (Kilpatrick *et al.*, 2008).

Quando as células T naïve encontram com o seu antígeno específico estas são ativadas e diferenciadas em células efetoras capazes de combater esse antígeno. Após a eliminação do antígeno, algumas células efetoras se diferenciam em células T de memória enquanto as outras sofrem apoptose. As células T de memória podem ser subdivididas em 3 grupos. As células T_{CM} migram para os linfonodos, onde sua sobrevivência é através da IL-7, produzida pelas células

reticulares fibroblásticas, que induz proliferação celular sem a necessidade de ativação. Essas células apresentam uma capacidade limitada em exercer uma função efetora, porém, a interação do antígeno com o receptor da célula T (TCR – *T cell receptor*) pode levar à proliferação e à diferenciação dessas células que são menos dependentes de co-estímulos e expressam elevados níveis de CD40L (Moro-García, Alonso-Arias & López-Larrea, 2013). Dessa forma, as células T_{CM} são caracterizadas pela não expressão de $CD45RA^-$ e a expressão de $CCR7^+$, $CD62L^+$ e $CD127^+$. As células T_{EM} são encontradas na periferia, por isso não expressam $CCR7$ e $CD62L$, e apresentam uma função efetora rápida, produzindo citocinas poucas horas após o estímulo. Essas células são caracterizadas pela não expressão de $CD45RA^-$, $CCR7^-$, $CD62L^-$ e $CD127^-$. Algumas células T de memória efetora, porém, voltam a expressar $CD45RA$, sendo consideradas como terminalmente diferenciadas ($T_{EMRA} - CD45RA^+$ *effector memory*) ou senescentes (Gupta & Gollapudi, 2008; Moro-García, Alonso-Arias & López-Larrea, 2013). Apesar de passarem a reexpressar $CD45RA^+$, essas células não voltam a expressar os receptores responsáveis pela migração das células T em direção ao linfonodo, $CCR7^-$ e $CD62L^-$, e expressam receptores que as direcionam para a periferia e locais de inflamação (revidado por Henson *et al.*, 2012).

A principal alteração que ocorre nas células T_{EM} durante o envelhecimento é a perda na expressão da molécula co-estimuladora $CD28$. Os dois tipos de células T, $CD4^+$ e $CD8^+$, se comportam de forma diferente em relação as mudanças fenotípicas e funcionais que ocorrem durante o envelhecimento, sendo os linfócitos T $CD4^+$ mais resistentes. Dessa forma, a frequência de células T que perdem a expressão de $CD28$ aumenta com a idade, porém esse aumento é mais pronunciado nos linfócitos T $CD8^+$ e menos frequente nos linfócitos T $CD4^+$ (Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008). Junto com a perda na expressão de $CD28$ é possível observar o ganho na expressão de moléculas reguladoras, como $CD85j$ e $CD158b/j$, da família KIR, e de $CD57$, um marcador de senescência das células T (Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008).

Acredita-se que a perda na expressão de $CD28$ ocorra pelos repetidos estímulos antigênicos dos linfócitos T ao longo da vida. A cada estímulo antigênico, as células são ativadas e a cada ciclo replicativo a expressão de $CD28$ diminui até se tornar nula. Os linfócitos T $CD4^+$ de memória efetora que perdem a expressão de $CD28$ são refratários a ativação da telomerase, produzem e respondem menos a IL-2, e adquirem um perfil citotóxico com produção de perforinas, granzimas e IFN- γ

(revisado por Strioga, Pasukoniene & Characiejus, 2011; Moro-García, Alonso-Arias & López-Larrea, 2013). Nesse sentido, a perforina, numa ação conjunta com as granzimas, desencadeiam uma cascata de eventos que culminam com a morte apóptica da célula-alvo (Milstein et al., 2011). Os linfócitos T $CD8^+CD28^-$ também apresentam redução na atividade da telomerase, uma capacidade proliferativa limitada, porém podem apresentar um perfil tanto citotóxico como imunossupressor (Strioga, Pasukoniene & Characiejus, 2011).

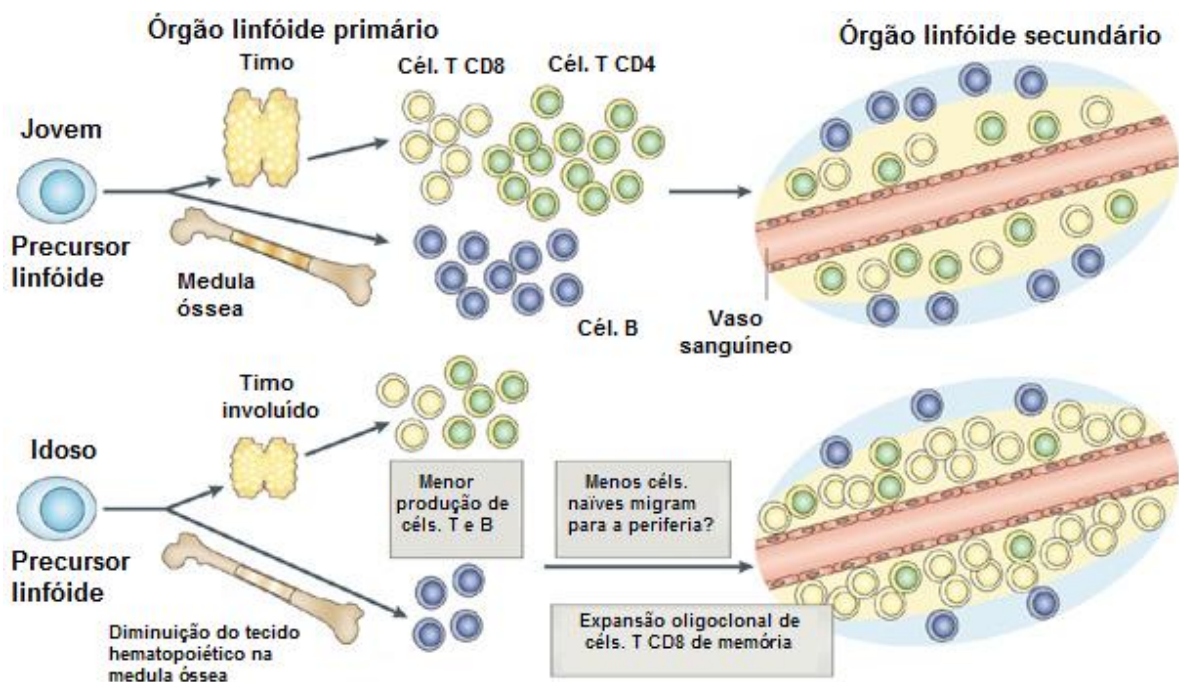


Figura 1: Efeito da idade na produção e distribuição das células da imunidade adaptativa. A diminuição na geração das células B é provocada pelas alterações nas células-tronco hematopoiéticas e na medula óssea, enquanto que a redução na geração de células T ocorre devido a involução tímica. Dessa forma, o número de linfócitos B e T naíves diminui e o número de linfócitos T, principalmente T $CD8^+$ terminalmente diferenciados, aumenta na periferia. Fonte: adaptado de Dorshkind, Montecino-Rodriguez & Singer, 2009.

O aumento no número de linfócitos T de memória efetora e terminalmente diferenciados em idosos pode ser explicado pela resistência dessas células a apoptose. As células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ naíve e de memória central de indivíduos idosos são mais sensíveis a apoptose mediada tanto pelo receptor CD95 como pelo receptor de TNF- α , enquanto que os linfócitos T de memória efetora e terminalmente

diferenciados são mais resistentes. Isso ocorre devido a uma aumento na ativação das caspases 3 e 8 nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ naíve e de memória central de indivíduos idosos (Gupta & Gollapudi, 2006; Gupta & Gollapudi, 2008).

Em relação aos fenótipos efetores dos linfócitos T CD4⁺ durante o envelhecimento, van der Geest e colaboradores (2014) observaram que indivíduos mais velhos apresentavam menor proporção de células com fenótipo Th17 (Th - *helper*), maior proporção de células T regulatórias (Treg) e nenhuma diferença em relação aos fenótipos Th1 e Th2 quando comparados com indivíduos jovens. Também foi observado que a proporção entre células Treg e T efectoras era maior em indivíduos idosos e esse aumento estava associado à baixa resposta a vacinação contra gripe (van der Geest *et al.*, 2014). Gregg e colaboradores (2005) mostraram que o número de células T CD4⁺CD25⁺ aumenta com a idade e que essas células mantem a sua função supressora. Além dos linfócitos T CD4⁺, Canaday e colaboradores (2013) relataram que os linfócitos T CD8⁺ de indivíduos idosos aumentam a expressão de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4*) após estímulo *in vitro*.

Dessa forma, os achados expostos até aqui sugerem que os eventos moleculares relacionados a imunossenescência são amplos e que afetam igualmente tanto as células da imunidade inata como da imunidade adquirida. Esses eventos fazem com que o processo de envelhecimento esteja não apenas associado a maiores riscos de infecções como também afeta a patogênese e a resposta ao tratamento dessas infecções como, por exemplo, pelo HIV-1.

1.3 – Infecção pelo HIV

1.3.1 – Estrutura viral e ciclo replicativo

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) pertence à família *Retroviridae*, sendo classificado como um lentivírus, pois a doença apresenta um curso crônico, com longo período de latência clínica e replicação viral persistente. Atualmente se conhecem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, que são intimamente relacionados, divergindo no peso molecular de suas proteínas, em alguns de seus genes acessórios e no estado de imunocomprometimento causado no indivíduo infectado, sendo a infecção pelo HIV-2 menos severa (revisado por Nyamweya *et al.*, 2013).

Cada partícula viral, ou vírion, é envolvida por um envelope de constituição fosfolipídica derivado da membrana das células do hospedeiro dentro da qual se inserem as glicoproteínas virais gp120 e gp41. A gp120 se liga ao receptor CD4, expresso na superfície de células T e macrófagos, e aos co-receptores CCR5 ou CXCR4 expressos na superfície das células. Após a ligação da gp120 ao receptor e co-receptor ocorre uma mudança conformacional fazendo com que a gp41 se dissocie parcialmente da gp120, permitindo a sua inserção na membrana celular e subsequente fusão vírus-célula (revisado por Stolp & Fackler, 2011).

Após a fusão do envelope viral à membrana celular, o capsídeo, formado pelas proteínas p17 e p24, é liberado no citoplasma onde ocorre a sua desintegração, permitindo assim a liberação do genoma viral e das proteínas acessórias, a transcriptase reversa e a integrase (Briones, Dobard & Chow, 2010; revisado por Friedrich *et al.*, 2011). No interior das células hospedeiras as enzimas virais se tornam ativas e iniciam o ciclo de replicação viral com a enzima transcriptase reversa promovendo a síntese de uma cópia de DNA fita simples complementar (cDNA) ao RNA genômico do HIV (revisado por Frankel & Young, 1998). O DNA viral é levado ao núcleo da célula hospedeira e, com o auxílio da integrase, a dupla fita de cDNA é inserida no genoma humano permanecendo na forma de provírus (revisado por Friedrich *et al.*, 2011). Uma vez integrado, o provírus comporta-se como um gene celular residente e serve como molde para a transcrição do RNA viral. A transcrição dos genes virais é estimulada por um fator de transcrição que está presente em todas as células T CD4⁺ ativadas, o fator de transcrição NFκB (*nuclear factor κB*) (Biswas *et al.*, 1998; Zhao, Papadopoulou & Tremblay, 2004; Haraguchi *et al.*, 2006). Uma vez traduzidas, as proteínas virais são então direcionadas para a membrana citoplasmática para a montagem dos capsídeos e brotamento das partículas virais.

1.3.2 – Imunopatogênese

Em geral, indivíduos são infectados pelo HIV após o contato com fluidos orgânicos, como sangue e sêmen, de uma pessoa infectada. Alguns dias após a primeira exposição ao HIV, intensa replicação viral pode ser detectada nos linfonodos levando, conseqüentemente, a uma elevada viremia associada a uma queda dos níveis de células T CD4⁺. Essa fase ocorre geralmente entre 2 a 6

semanas após a primo-infecção e é caracterizada pela soroconversão e por sintomas inespecíficos como febre, linfadenopatia e dor de garganta (revisado por Fauci *et al.*, 1996; revisado por Streeck, Bockel, van & Kelleher, 2008).

A resposta inicial à infecção pelo HIV é semelhante em muitos aspectos à resposta imune a outros vírus, e serve para eliminar a maioria das partículas virais presentes no sangue. As células dendríticas (DCs – *dendritic cells*) desempenham um papel importante para a ativação de uma resposta imune específica contra vírus. As células dendríticas plasmocitóides (pDC – *plasmacytoid DC*) expressam os receptores do tipo Toll (TLR – *toll-like receptors*) 7 e 9 que se ligam, respectivamente, ao RNA de fita simples e a motivos de CpG repetidos e não metilados no DNA. Quando estimuladas, as pDCs produzem os interferons do tipo I, principalmente o IFN- α (Azzoni *et al.*, 2005; Boasso *et al.*, 2011). Através da sua interação com os seus receptores, o IFN- α ativa a transcrição de diversos genes que conferem às células hospedeiras resistência à replicação viral; auxiliam no sequestro de linfócitos nos gânglios linfáticos, aumentando as chances de encontro com os antígenos virais; aumentam a citotoxicidade das células assassinas naturais (NK – *natural killer*) e dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs – *cytotoxic T lymphocytes*); e regulam positivamente a expressão das moléculas de histocompatibilidade principal (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe I.

A resposta imune celular mediada pelos linfócitos T CD8⁺ ativados é sabidamente fundamental no combate às doenças infecciosas virais. Nos indivíduos infectados pelo HIV, uma ativação eficiente dos linfócitos T CD8⁺ e a manutenção de uma resposta de memória dependem do auxílio de células T CD4⁺ funcionais (Streeck, Bockel, van & Kelleher, 2008). Quando ativadas, as células T CD8⁺ clássicas, chamadas CTLs, matam células infectadas pelo HIV pela via exocítica através da liberação de grânulos de perforinas, granzimas, e/ou pela via de engajamento de receptores de superfície da célula-alvo contendo domínio de morte (Schoenberger *et al.*, 1998). Nesse último caso, as células infectadas pelo HIV-1 morrem devido à ativação das caspases da via extrínseca de apoptose. As células T CD8⁺ ativadas podem também bloquear a infecção de células saudáveis por produzir e secretar β -quimiocinas (Walker *et al.*, 1986; Cocchi *et al.*, 1995).

Durante a fase inicial da infecção, apesar de se observar uma queda nos níveis de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico, o local em que ocorre a maior perda dessas células é na mucosa, onde se encontra a maior parte dos linfócitos T CD4⁺

de memória. Nesse primeiro momento, a depleção dessas células é causada principalmente pela interação vírus-célula, e posteriormente amplificada pela rede de citocinas inflamatória em resposta ao invasor (Figura 2A) (revisado por Brenchley, Price & Douek, 2006). Além da depleção numérica, também é possível observar, já nas primeiras semanas após a infecção, distúrbios funcionais nas células T CD4⁺ circulantes identificadas pela expressão de níveis elevados de marcadores relacionados à exaustão como PD-1 (*programmed cell death-1*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4*) e Fas, associadas à uma queda na expressão de CD127 (revisado por Streecka, van Bockelb & Kelleher, 2008).

Após a infecção aguda, o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro é normalmente alcançado e, muitos indivíduos infectados podem não apresentar manifestações clínicas por anos. Durante este período da infecção, chamado de período de latência clínica, o sistema imune estabelece tanto respostas imunes de mediação celular quanto humoral direcionadas aos antígenos virais. Estas respostas controlam parcialmente a infecção, permitindo assim um aumento na contagem de células T CD4⁺ associado a redução da carga viral no plasma e permite que o organismo permaneça competente para lidar com a maioria das infecções causadas por micro-organismos.

No entanto, a destruição progressiva dos linfócitos T CD4⁺ é observada na maioria dos indivíduos, condicionando-os a um estado grave de imunossupressão. A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV evolui para a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), normalmente quando a contagem de células T CD4⁺ chega a 200 células/mm³. Como a maioria dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico não abriga o vírus, a perda dessas células pode ser explicada pela ativação crônica do sistema imune que podem levar essas células a exaustão e morte por apoptose (Alimonti *et al*, 2003; revisado por Maartens, Celum & Lewin, 2014) (Figura 2B). Essa ativação crônica ocorre pelos efeitos diretos do HIV, que se liga aos TLRs nas pDCs, e indiretos como a translocação microbiana, causada pela perda dos linfócitos Th17 na mucosa gastrointestinal que são importantes para uma resposta adequada contra infecções bacterianas e fúngicas e para promover a regeneração epitelial (Brenchley *et al.*, 2006; revisado por Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013).

Nesse contexto, apesar do perfil de citocinas produzido em resposta ao HIV-1 na fase inicial da infecção ser ainda pouco conhecido, a ativação crônica do sistema

imune do paciente soropositivo que progride para a aids é essencial para a infecção produtiva de células T CD4⁺ (Lieberman *et al.*, 2001). A infecção dos macrófagos pelo HIV altera a sua função e o perfil de produção de citocinas e quimiocinas. Estudos mostram que, em macrófagos infectados, a proteína viral Nef induz esses fagócitos a secretarem elevados níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- β , que juntos, favorecem a ativação das células T CD4⁺ no local de infecção (Mangino *et al.*, 2011). Além disso, a proteína Nef também regula negativamente a expressão de moléculas de MHC de classe I, o que aumenta a resistência dos macrófagos infectados à morte por ação das células T CD8⁺ locais ativadas (Schwartz *et al.*, 1996).

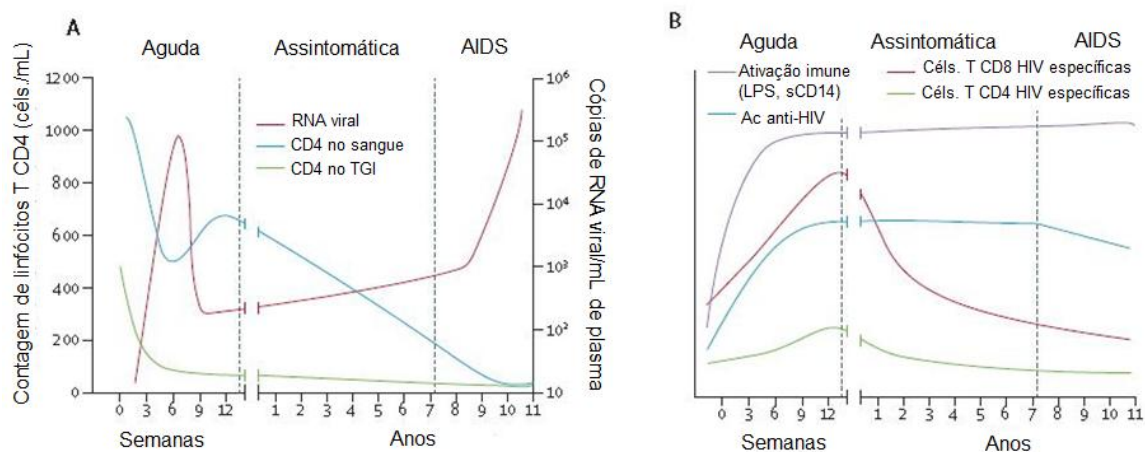


Figura 2: Evolução da infecção pelo HIV-1. (A) Na fase aguda ocorre um aumento na carga viral plasmática, uma redução progressiva de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e uma depleção nos linfócitos T CD4⁺ do trato gastrointestinal. Após esse período, as células T CD4⁺ continuam a ser depletadas, porém o indivíduo mantém um certo grau de imunocompetência. A infecção progride para aids quando há uma depleção severa no número de células T CD4⁺ no sangue periférico associada a um aumento na carga viral plasmática. (B) A resposta aguda a infecção pelo HIV-1 inclui um aumento expressivo de marcadores de ativação imune, a produção de anticorpos anti-HIV não neutralizantes e ativação de células T HIV-específicas. Fonte: adaptado de Maartens, Celum & Lewin, 2014.

Deficiências funcionais são detectadas em todos os compartimentos celulares do sistema imune, particularmente nas células T, e têm sido atreladas a elevado grau de ativação imune crônica no qual o paciente infectado pelo HIV é condicionado. As células T CD4⁺ HIV-específicas são as primeiras acometidas por

serem as mais estimuladas antígenicamente. Essas células tendem a aumentar a expressão dos marcadores de superfície como HLA-DR, PD-1, CD38 e Fas (Eggena *et al.*, 2005a). Com relação ao impacto da infecção pelo HIV na rede fenotípica das células T CD4⁺, estudos demonstraram que a progressão clínica para aids é estreitamente relacionada à perda funcional das células Th1 e Th17, que são alvos preferenciais tanto da infecção direta pelo vírus como também da exaustão clonal, por serem mais requisitados nesse contexto (Rodriguez *et al.*, 1997; Douek *et al.*, 2002; revisado por Lane, 2010; revisado por Hunt, 2010). Com a evolução da infecção, portanto, passam a predominar fenótipos menos afetados (principalmente Th2, Tr-1 e Treg), inibidores da imunidade celular; e o paciente torna-se cada vez mais susceptível às infecções e neoplasias oportunistas (Tenorio *et al.*, 2009). Diversos estudos têm mostrado que a alteração no equilíbrio entre Th17/Treg está associada a elevados níveis de ativação imune e a progressão da doença (Li *et al.*, 2011; Brandt *et al.*, 2011).

Além disso, estudos mostraram que indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma maior frequência de linfócitos T_{FH} (T_{FH} – *T follicular helper*) infectadas no linfonodo, principalmente T_{FH} HIV-específicas, quando comparados com indivíduos saudáveis, e que esse aumento está associado a uma redução das células B de memória, a hipergamaglobulinemia e ao aumento das células B do centro germinativo (Lindqvist *et al.*, 2012; Perreau *et al.*, 2013). Além disso, foi observado que os linfócitos T_{FH} são as principais células do compartimento T CD4⁺ para infecção, replicação e produção do vírus (Perreau *et al.*, 2013). Apesar do aumento dos linfócitos T_{FH} nos linfonodos, essas células não são capazes de auxiliar de forma adequada as células B. Cubas e colaboradores (2013) mostraram um aumento na frequência de células B que expressavam PD-L1 (*PD-ligand 1*) nos linfonodos de indivíduos infectados pelo HIV quando comparado com indivíduos saudáveis e que o aumento da expressão de PD-L1 inibe, *in vitro*, a função dos linfócitos T_{FH} através da ligação com PD-1.

Ao longo da progressão da doença, com a queda numérica e funcional das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ HIV-específicos adquirem um fenótipo anormal, muito característico de imunosenescência. Estudo realizado por Altman e colaboradores (1996) demonstrou que indivíduos com elevada frequência de células T CD8⁺ imunosenescentes, fenotipicamente caracterizadas como CD28⁻ CD38⁺ HLA-DR⁺ CD62L⁻ CCR7⁻, logo após a soroconversão, desenvolvem uma forma mais

agressiva da doença com uma queda persistente na contagem de células T CD4⁺ periféricas. Estes linfócitos T CD8⁺ apresentam uma capacidade limitada em reconhecer antígenos associados às moléculas do HLA (Trimble & Lieberman, 1998; Shankar *et al.*, 2000), além de não apresentarem perforina em seus grânulos citoplasmáticos (Appay *et al.*, 2000). Outros fatores também podem contribuir para a disfunção *in vivo* das células T CD8⁺, como a elevada expressão de receptores inibidores de morte (KIR - *killing inhibitory receptor*), que regula negativamente a citotoxicidade das células NK humanas, e a incapacidade destes linfócitos em expressar CCR7, que os exclui dos gânglios linfáticos, principais locais de replicação viral (Lieberman *et al.*, 2001; revisado por McMahon & Raulet, 2001).

Durante o curso da doença, elevados níveis de citocinas inflamatórias tem sido também correlacionado a um aumento progressivo no número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ HIV-1- não-específicas com deficiências funcionais. A frequência de linfócitos T que expressam marcadores de exaustão, tais como PD-1, CTLA-4 e Tim-3 (*T cell immunoglobulin mucin-3*), e de apoptose, principalmente a expressão de CD95, aumenta em paralelo com os níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias em pacientes que progridem para aids (revisado por Lawn, Butera & Folks, 2001; Alimonti, *et al.*, 2003; Eggena *et al.*, 2005a; revisado por Bangs, McMichael & Xu, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Junto com essas deficiências funcionais, também é observada uma diminuição na frequência de células T naïve e de memória central associada a um acúmulo de células T efetoras e terminalmente diferenciadas (D'Offizi *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2012).

Portanto, acredita-se que a principal causa da exaustão imune característica da aids seja uma consequência do estado de ativação crônica que acelera os processos de imunosenescência no indivíduo infectado. De fato, relatos atuais consideram que indivíduos infectados pelo HIV há mais de 8 anos com 50 anos de idade tenham um sistema imune funcional comparado a um indivíduo de 80 anos (revisado por Rickabaugh & Jamieson, 2010).

1.3.3 – Terapia antirretroviral (TARV)

A descoberta de drogas baseada no entendimento do ciclo viral, na década de 80, transformou a infecção pelo HIV, antes considerada uma infecção de

progressão rápida e letal, em uma condição crônica que pode ser controlada durante anos. Atualmente, no Brasil, existem 21 medicamentos disponíveis que são divididos em quatro grandes classes de antirretrovirais: os inibidores da transcriptase reversa, os inibidores da protease, os inibidores da integrase e os inibidores de entrada. Os inibidores da transcriptase, por sua vez, podem ser subdivididos em duas classes, os análogos sintéticos de nucleosídeos (INRTs) e os não análogos (INNTRs) (revisado por De Clercq, 2007; Ministério da Saúde, 2013) (Tabela 1).

Os primeiros estudos clínicos nos anos 80 revelaram que o tratamento dos pacientes infectados com uma única droga antirretroviral, a monoterapia com zidovudina (AZT), não era eficiente e o número de mortes por aids continuou aumentando. Felizmente, a descoberta de novas drogas permitiu a combinação de diferentes classes de antirretrovirais, aumentando a eficácia do tratamento e permitindo um melhor prognóstico ao paciente infectado (revisado por Pomerantz & Horn, 2003). Esta nova forma de tratar pacientes infectados com HIV foi nomeada de terapia antirretroviral de alta atividade, mais conhecida pela sigla em inglês HAART (*highly active antiretroviral therapy*).

No guia de tratamento dos países em desenvolvimento, criado pela Organização Mundial da Saúde, recomenda-se que a primeira linha de tratamento para adultos e adolescentes contenha dois INTRs e um INNTR. Estas duas classes de medicamentos são mais baratas, ajudando no financiamento e manutenção do tratamento, além de possuírem genéricos dessas formulações. Os inibidores de protease e os inibidores de entrada são preservados, sendo utilizados somente para a segunda linha de tratamento.

O objetivo principal da TARV é retardar a progressão da imunodeficiência e restaurar, na medida do possível, a imunidade aumentando o tempo e a qualidade de vida dos indivíduos infectados. Um tratamento eficiente está associado a uma rápida redução da carga viral plasmática (CVP) e a um aumento gradativo no número de células T CD4⁺, que ocorre em duas fases. A primeira fase reflete a redistribuição rápida de células T CD4⁺ com fenótipo ativado/memória que estavam retidas nos órgãos linfoides secundários e na medula-óssea e uma redução na morte por apoptose (Ensoli *et al.*, 2000). Já a segunda fase é mais sutil e é caracterizada pela expansão de células naíves geradas no timo (revisado por Ye, Kirschner & Kourtis, 2004; revisado por Lawn & Wilkinson, 2006). Para muitos autores, a recuperação das células T CD4⁺ na segunda fase reflete melhor o grau de

aquisição de imunocompetência do portador de HIV. A timopoiese, após o início da TARV, é acompanhada de uma recuperação de linfócitos T CD4⁺ expressando um repertório diverso de TCRV β e fenotipicamente positivas para TRECs (*T cell receptor rearrangement*), CD45RA⁺ e CD62L⁺ (Franco *et al.*, 2002; Kolte *et al.*, 2002).

Tabela 1. Grupos de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV autorizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.*

Inibidor da Transcriptase Reversa nucleosídeos ou nucleotídeos (INRT)	Inibidor da Transcriptase Reversa não nucleosídeos (INNTR)	Inibidor de Protease (IP)	Inibidor de Integrase *	Inibidor de Fusão*	Inibidor de Co-receptor*
Zidovudina (ZDV, AZT)	Nevirapina (NVP)	Saquinavir (SQV)	Raltegravir (RAL)	Efuertide(T-20)	Maraviroque (MVQ)
Didanosina (ddl)	Efavirenz (EFZ)	Ritonavir (RTV)			
Abacavir (ABC)	Etraviripina (TMC-125)	Indinavir (IDV)			
Estavudina (d4T)		Nelfinavir (NFV) #			
Lamivudina (3TC)		Amprenavir (APV)			
Tenofovir (TDF)		Lopinavir (LPV)			
		Atazanavir (ATV)			
		Darunavir (DRV)			
		Tipranavir (TPV)			
		Fosamprenavir (FPV)			

* www.aids.gov.br # excluído dos esquemas anti-retovirais

Uma melhor recuperação quantitativa e qualitativa das células T CD4⁺ periféricas pela TARV é diretamente proporcional à redução no índice de ativação imune e, portanto, a um aumento na sobrevivência das células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Leng *et al.*, 2002). Ao reduzirem a replicação viral, os antirretrovirais diminuem a estimulação antigênica pelo HIV e conseqüentemente reduzem o grau de hiperativação em que se encontra o sistema imune (Andersson *et al.*, 1998; Behbahani *et al.*, 2000). A recuperação parcial das barreiras mucosas também ajuda a controlar a hiperativação e inflamação crônica na medida em que reduz a exposição a antígenos bacterianos translocados do trato gastrointestinal (Stein & Hsue, 2012). Dessa forma, é possível observar uma queda na frequência de linfócitos T periféricos que expressam certos marcadores de ativação, tais como CD40L, CD154, CD30, CD27 e CD38 e de imunosenescência como PD-1 e CD57

(Tilling *et al.*, 2002; revisado por Weissman & Montamer, 2002; revisado por Fry & Mackall, 2002; revisado por Battegay *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Além disso, estudos mostraram que uma reconstituição numérica melhor e duradoura das células T CD4⁺ periféricas induzida pela TARV também depende da recuperação de pDCs funcionais (Fernandez *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2008). A normalização desses parâmetros imunes está diretamente associada à reconstituição funcional da resposta imune e conseqüentemente a uma maior resistência do paciente tratado às infecções. Quanto ao perfil de citocinas, a TARV geralmente promove uma recuperação parcial do fenótipo Th1, evidenciada pela capacidade de produção de IFN- γ e, conforme recentemente demonstrado, também do fenótipo Th17, os quais estão habitualmente escassos no paciente em fase avançada de doença (Spitsin *et al.*, 2012; He *et al.*, 2012).

Indivíduos que alcançam níveis até 200 células/mm³ após a TARV tem mais chances de apresentarem eventos definidores de aids, doenças malignas, eventos cardiovasculares e infecções severas do que aqueles que foram capazes de reconstituir de forma mais eficaz os níveis de células T CD4⁺ (Lapadula *et al.*, 2013; revisado por Wilson & Sereti, 2013). No entanto, alguns pacientes, apesar de controlarem a carga viral, não conseguem reconstituir adequadamente o número de células T CD4⁺ e um dos fatores associados é a idade (Wilson & Sereti, 2013). A idade avançada pode interferir significativamente nessa dinâmica, alterando quantitativa e qualitativamente a reconstituição imune pós-TARV (Viard *et al.*, 2001).

1.4 – Infecção pelo HIV em indivíduos com mais de 50 anos

Diversas alterações observadas no sistema imune durante a infecção pelo HIV-1 são similares às transformações da imunossenescência, sugerindo que a infecção acelera o processo de envelhecimento do sistema imune. Essa hipótese é reforçada por estudos mostrando que pacientes jovens que recebem a TARV tem mais chances de apresentarem doenças não relacionadas à aids, mas sim a idade como, por exemplo, doenças cardiovasculares, hepáticas, câncer e doenças ósseas (revisado por Rickabaugh & Jamieson, 2010; Wu *et al.*, 2014). A hiperativação e a inflamação crônica induzidas pelo HIV são fatores que contribuem para o desenvolvimento dessas comorbidades não infecciosas nos pacientes jovens e para

o agravamento em pacientes idosos (Mocroft *et al.*, 2010; revisado por Lane, 2010; Hasse *et al.*, 2011; revisado por Stein & Hsue, 2012).

As alterações causadas pelo HIV e pela imunosenescência podem somar-se no indivíduo portador de ambas as condições, causando um distúrbio ainda maior e comprometendo a eficácia da reconstituição imune pela TARV (Rickabaugh *et al.*, 2011). A infecção pelo HIV, em pacientes acima de 50 anos, progride mais rapidamente à aids, e quando esse grupo de pacientes inicia a TARV, observa-se uma reduzida elevação na contagem de células T CD4⁺ comparada a pacientes mais jovens (Operskalski *et al.*, 1995). Por outro lado, vários ensaios clínicos revelaram que após início da TARV, pacientes HIV-positivos com mais de 50 anos apresentaram uma excelente resposta virológica ao tratamento, melhor que nos pacientes jovens (Grabar *et al.*, 2004; Viard *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2011).

A redução no número de células T CD4⁺ naíve nos pacientes idosos pode contribuir para a rápida progressão da doença observada nesse grupo (Rickabaugh *et al.*, 2011). Além disso, estudo realizado por Kalayjian e colaboradores (2013) mostrou que pacientes idosos infectados pelo HIV apresentam uma frequência reduzida de células T CD4⁺ naíve em relação aos pacientes jovens após o início da TARV. Essa redução na recuperação das células T CD4⁺ naíve estaria associada a elevados níveis de expressão de HLA-DR e CD38 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes idosos (Kalayjian *et al.*, 2013).

Um estudo feito pelo nosso grupo (Andrade *et al.*, 2007) mostrou que indivíduos idosos HIV-positivos tratados produzem grandes quantidades de IL-10, uma das principais citocinas inibidoras da imunidade celular, e que os níveis desta citocina nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico apresenta relação clara e direta com a capacidade de controle virológico *in vitro*. Posteriormente, a caracterização fenotípica das células desses pacientes revelou que o aumento na produção de IL-10 era causado pelas células T CD4⁺FoxP3⁻CD152⁺ específicas para o Env (Andrade *et al.*, 2012). De fato, células T CD4⁺ de fenótipos protetores cuja ativação esteja inibida pela IL-10 são péssimos microambientes para a replicação do HIV, porém são menos capazes de coordenar respostas protetoras ao HIV e outros patógenos (McGowan *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2007; Darrah *et al.*, 2010). Além disso, outro estudo do nosso grupo também mostrou uma maior produção de IL-10 pelas células T de indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 em resposta ao TT (Andrade *et al.*, 2010).

Apesar dos estudos mostrarem que pacientes idosos apresentam uma recuperação numérica de células T CD4⁺ menor em resposta a TARV quando comparados aos jovens, pouco se sabe sobre a recuperação funcional dos subtipos dessas células, principalmente em um subgrupo de pacientes cuja recuperação numérica de células T CD4 é satisfatória. Dessa forma, é preciso conhecer o comportamento imunológico dessa população mediante diferentes desafios antigênicos, inclusive na resposta à vacinas, uma vez que as condutas terapêuticas e profiláticas atualmente preconizadas para pacientes com aids baseiam-se em estudos que avaliaram essencialmente populações jovens, e talvez não sejam totalmente adequadas ao manejo da infecção em pacientes idosos.

II. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Avaliar o impacto da idade no perfil funcional das células T de pacientes com aids em sucesso terapêutico em resposta aos antígenos do envelope do HIV-1 e ao toxoide tetânico.

2.2 - Específicos

1 – Avaliar a resposta proliferativa das células T de indivíduos idosos e jovens infectados pelo HIV-1 a antígenos do envelope viral (Env) e ao toxoide tetânico (TT);

2 – Quantificar diferentes citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em resposta ao Env e ao TT em ambos os grupos experimentais;

3 – Avaliar o papel da IL-10 na replicação viral e na produção de citocinas pelas CMSP em resposta ao Env;

4 – Correlacionar a frequência dos subtipos de células T periféricas com a produção de citocinas pelas CMSP em resposta ao Env e TT e a concentração de IgG anti-TT.

5 – Correlacionar a concentração de IgG anti-TT com os níveis de IL-21, IFN- γ e IL-10.

III. METODOLOGIA

3.1 - Pacientes e imunização antitetânica

Para o estudo, 35 pacientes com mais de 55 anos infectados pelo HIV-1 e 35 pacientes jovens (< 40 anos) também infectados pelo HIV-1 em tratamento antirretroviral foram recrutados entre 2010 e 2013 de dois hospitais universitários do estado do Rio de Janeiro, o Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) e o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG/UNIRIO). Como controle, indivíduos jovens (n=20) e idosos (n=20) saudáveis foram incluídos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética dos hospitais e, antes de qualquer procedimento, o consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes (Anexo 1).

Todas as características dos indivíduos infectados pelo HIV-1 foram obtidas de prontuários médicos, incluindo o esquema antirretroviral, os valores de células T CD4⁺ e a carga viral plasmática (CVP) no início e 24 meses após a terapia antirretroviral. Todos os pacientes infectados pelo HIV-1 estavam no primeiro esquema antirretroviral. Os indivíduos saudáveis e infectados pelo HIV em uso de medicamentos imunossupressores ou que apresentavam outra condição médica que afetasse o seu sistema imunológico, como doenças autoimunes, outras doenças infecciosas, diabetes e manifestações alérgicas não foram incluídos no estudo.

Para avaliar a resposta imune a antígenos de memória, todos os indivíduos que foram imunizados contra o toxoide tetânico (TT) durante a infância receberam uma dose de reforço de TT (Sanofi Pasteur, AS, Lyon, França) no momento em que foram recrutados para o estudo pelo Dr. Regis Mariano de Andrade, infectologista de nossa equipe. As características clínicas e virológicas de todos os pacientes se mantiveram estáveis após 2 meses do reforço.

3.2 - Quantificação plasmática de IgG anti-TT

Amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes e 30 dias após o reforço de TT para a obtenção do soro para posterior quantificação de IgG anti-TT através do kit SERION ELISA Classic (Immunomat TWIN System, Würzburg, Alemanha). Cem microlitros (100 µL) das amostras diluídas foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-IgG. Após 1 hora de incubação à 37°C,

os poços foram lavados 4 vezes com 300 μ L de solução de lavagem e 100 μ L do anticorpo secundário (previamente conjugado com a enzima fosfatase alcalina) foram adicionados em cada poço e adicionalmente incubados por 30 minutos a 37°C. Por fim, os poços foram lavados mais 4 vezes com 300 μ L de solução de lavagem e 100 μ L de substrato p-nitrofenilfosfato foram adicionados aos poços e a reação foi revelada após 30 minutos através da adição de uma solução de parada. Valores menores que 0,01 IU/mL foram considerados não protetores, valores entre 0,11 e 0,5 IU/mL foram considerados como indicadores de proteção suficiente e valores >0,5 IU/mL foram considerados como indicadores de proteção duradoura.

3.3 - Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Amostras de aproximadamente 20 mL de sangue periférico foram colhidas de todos os indivíduos participantes utilizando agulhas e tubos estéreis contendo heparina ou em seringas heparinizadas (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). A partir do sangue total, as CMSP foram obtidas por centrifugação (2.000 rpm por 20 minutos à 25°C), sobre um gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. Os plasmas foram colhidos e congelados a -20° C. As CMSP foram lavadas 3 vezes com solução de HANK's e contadas em azul de trypan utilizando uma câmara de Neubauer. As células viáveis foram ajustadas para uma concentração final de 1×10^6 células/mL.

3.4 - Cultura e estímulo das CMSP

As CMSP foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato em 0,2 mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 20 U/mL de penicilina, 20 μ g/mL de estreptomicina e 20 mM de tampão HEPES. A fim de avaliar a resposta específica ao HIV-1, as CMSP foram mantidas em cultura por 5 dias com uma combinação de peptídeos sintéticos imunodominantes do envelope (ppHIV-1_{ENV}) a uma concentração de 1 μ M de cada peptídeo, na presença de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) a 20 u/mL (BD Systems, Minneapolis, MN). O coquetel de peptídeos sintéticos do envelope é composto por peptídeos de regiões constantes [T1 (KQIINMWQEVGKAMYA, aa 428-4430), T2 (HEDIISLWDQSLK, aa 112-124) e TH4 (DRVIEVVQGAYAIR, aa 834-848)] e de regiões loop hipervariáveis [P18 MN (RIHIGPGRAFYTTKN, aa 315-329) e

P18 IIIB (RIQRGPGRAVFTIGK, aa 315-329)]. As concentrações dos peptídeos derivados do envelope foram estabelecidas em nosso laboratório como a dose que induziu a proliferação de células T CD8⁺ em pacientes em fase aguda de infecção pelo HIV. Em alguns experimentos, doses saturadas de anti IL-10 ou do anticorpo isotipo controle (22 µg/mL; BD Systems) foram adicionadas, no início e 3 dias depois, as culturas de CMSP estimuladas com Env.

Para avaliar a resposta específica ao TT, as CMSP obtidas 30 dias após o reforço com TT foram estimuladas por 7 dias com TT a 1 µg/mL (SBL Vaccin, Stockholm, Suécia) na presença de rhIL-2 a 20 U/mL (BD Systems, Minneapolis, MN). As células foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida a 5% de CO₂.

3.5 - Análise de citometria de fluxo

A frequência das populações de células T foi definida através da marcação com anticorpos monoclonais (mAbs) marcados com fluorocromos específicos. Os anticorpos CD3-PE, CD8-FITC, CD4-FITC, CD45RA-PE, CD45RO-PE, CD62L-APC, CCR7-PECy7, CD127-AlexaFluor647 (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) foram utilizados para a caracterização dos seguintes subtipos de células T (CD4⁺ ou CD8⁺): naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻), memória central (CD45RO⁺CD127⁺) e terminalmente diferenciada (CD45RA⁺CCR7⁻). Resumidamente, as CMSP recém purificadas (2 x 10⁵ células/poço) foram incubadas com várias combinações de anticorpos por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As células foram lavadas com PBS suplementado com 1% de SFB e fixadas com uma solução de PBS contendo 4% de paraformaldeído. Após uma nova lavagem, as análises foram realizadas através do FACSCalibur utilizando o software CELLQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Anticorpos de isotipo controle e amostras marcadas com um único anticorpo foram usados como controle. Após a aquisição de 20.000 ou 30.000 eventos, os linfócitos foram determinados através dos padrões de tamanho e granulosidade após a exclusão de células mortas e debrits.

3.6 - Teste de proliferação

Aproximadamente, 1×10^5 células por poço de CMSP foram estimuladas por 5 dias com ppHIV-1_{ENV}/rhIL-2 ou 7 dias com TT/rhIL-2. A proliferação celular foi medida através da incorporação de [³H] timidina ([³H] TdR), adicionada às culturas a 4 µCi/poço, 8h antes do final do tempo de incubação. As células foram recolhidas, utilizando um coletor automático, e o conteúdo celular impregnado em papel de filtro. Esses papéis foram transferidos, individualmente, para frascos contendo líquido de cintilação e levados para um contador de cintilação líquido (modelo Is 6000se da Beckman). A incorporação da timidina radioativa nas moléculas do DNA foi avaliada através desse contador de radiação β e os resultados foram mostrados como média ± desvio-padrão da contagem por minuto (cpm).

3.7 - Dosagem de citocinas

A fim de se dosar diferentes citocinas *in vitro*, os sobrenadantes das culturas estimuladas com ppHIV-1_{ENV}/rhIL-2 ou TT/rhIL-2 foram submetidos a quantificação de citocinas pela técnica de ELISA. As dosagens de IL-6, IL-10, IL-4, TNF-α, IL-17, IL-21 e IFN-γ foram realizadas usando kits BD OptEIA (BD, Pharmigen, San Diego), seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante. Cinquenta microlitros (50 µL) das amostras (diluídos 1:10) foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina. Após 2 horas de incubação, 100 µL do anticorpo secundário (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados em cada poço e adicionalmente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada após 30 minutos através da adição de uma solução de parada (ácido fosfórico a 1 M). As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Dynex Technologies, USA). As mesmas citocinas humanas recombinantes variando de 10-500 pg/mL foram usadas para construir as curvas-padrão.

3.8 - Quantificação da replicação viral *in vitro*

Em alguns experimentos, doses saturadas de anti-IL-10 (22 µg/mL; BD Systems) foram adicionadas as CMSP estimuladas com ppHIV-1_{ENV}/rhIL-2. O sobrenadante foi colhido após 5 dias de cultura e congelado a -70° C para posterior quantificação do RNA do HIV-1 pela técnica quantitativa da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa através do kit Amplicor HIV Monitor (Roche Molecular System, Branchburg, New Jersey, USA), com uma taxa de detecção de 50 cópias/mL.

3.9 - Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad software). O teste paramétrico t de Student e o teste não paramétrico de Mann-Whitney U foram utilizados para determinar se os 2 grupos eram estatisticamente diferentes para cada variável dada. A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação entre diferentes eventos imunológicos estudados. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 - Características dos indivíduos infectados pelo HIV-1.

Para o nosso estudo, amostras do sangue periférico foram obtidas de indivíduos jovens (n=35, idade média: 32,4 anos) e idosos (n=35, idade média: 59,7 anos) infectados pelo HIV-1. No momento da coleta, apesar de todos os pacientes estarem assintomáticos, em algum momento eles foram classificados com aids, segundo a classificação do CDC (*Center for Disease Control*) (Anexo 2). Ambos os grupos tinham tempo semelhante de diagnóstico da infecção e eram tratados com uma combinação de 3 antirretrovirais. A contagem de células T CD4⁺ antes (jovens: média de 159,3 células/ μ L; idosos: média de 147,7 células/ μ L) e após 2 anos (jovens: média de 577,5 células/ μ L; idosos: média de 593,9 células/ μ L) o início da terapia antirretroviral (TARV) nos pacientes jovens e idosos foi similar (Tabela 2). No momento do estudo, todos os pacientes apresentavam carga viral plasmática (CVP) indetectável, definida como <50 cópias de RNA viral/mL. A CVP foi expressa em escala logarítmica para normalizar a distribuição. Como controle, foram recrutados indivíduos jovens e idosos saudáveis, pareados pela idade e pelo sexo (Tabela 2).

4.2 - Impacto da idade na resposta proliferativa e no perfil de citocinas em resposta ao antígeno do HIV-1.

O primeiro evento imune analisado foi a proliferação das células T de indivíduos infectados pelo HIV-1 em resposta a antígenos do HIV-1. Para isso, as células foram mantidas em cultura por 5 dias com uma combinação de peptídeos do envelope do HIV-1 (ppHIV-1_{ENV}) na presença de IL-2 recombinante humana (rhIL-2). É importante ressaltar que não foi detectada nenhuma proliferação das células apenas com adição de rhIL-2 (dado não mostrado). Como mostrado na figura 3A, a proliferação das células T dos pacientes idosos, em resposta ao ppHIV-1_{ENV}, foi significativamente inferior quando comparada com as células dos pacientes jovens.

Com relação ao perfil de citocinas (Figura 3B), as culturas de células ativadas com ppHIV-1_{ENV} e rhIL-2 dos indivíduos idosos produziram níveis significativamente inferiores de citocinas relacionadas aos perfis Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17 e IL-21). A

Tabela 2. Características dos grupos controles e dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral plasmática indetectável¹

	Jovem HIV-1 neg.	Jovem HIV-1 pos.	Idoso HIV-1 neg.	Idoso HIV-1 pos.
N ^o de indivíduos	20	35	20	35
Idade em anos (dp)	31,3 (6,2)	32,4 (3,9)	60,1 (2,7)	59,7 (3,7)
Homens (%)	70	71,4	70	77,1
Tempo desde o diagnóstico em anos (dp) ²	-	6,9 (2,7)	-	7,4 (3,3)
Média da carga viral inicial [log cópias/mL (dp)]	-	4,3 (0,5)	-	4,9 (0,3)
Média da contagem de células T CD4 [célis/ μ L (média)] ²				
Inicial	-	159,3 (51-211)	-	147,7 (78-244)
Final	1.078 (937-1.271)	577,5 (377-1.007)	1.011 (789-1.407)	593,9 (367-984)
Classificação CDC (%) ³				
A3	-	42,8	-	48,6
B3	-	-	-	-
C3	-	57,1	-	51,4
Esquema HAART (%) ⁴				
AZT/3TC/EFZ	-	54,3	-	71,4
AZT/3TC/SQV _r	-	5,7	-	08
AZT/DDI/EFZ	-	5,7	-	11,4
AZT/3TC/NFV	-	11,4	-	5,71

AZT, zidovudina; 3TC, lamivudina; EFZ, efavirenz; DDI, didanosina; SQV/r, saquinavir reforçado com ritonavir; NFV, nelfinavir.

¹Limite de detecção: 50 cópias/ml

²Diagnóstico por testes laboratoriais.

³Sistema de classificação para adultos e adolescentes infectados pelo HIV-1, US Center for Disease Control (CDC).

⁴Após 24 meses do início da terapia antirretroviral.

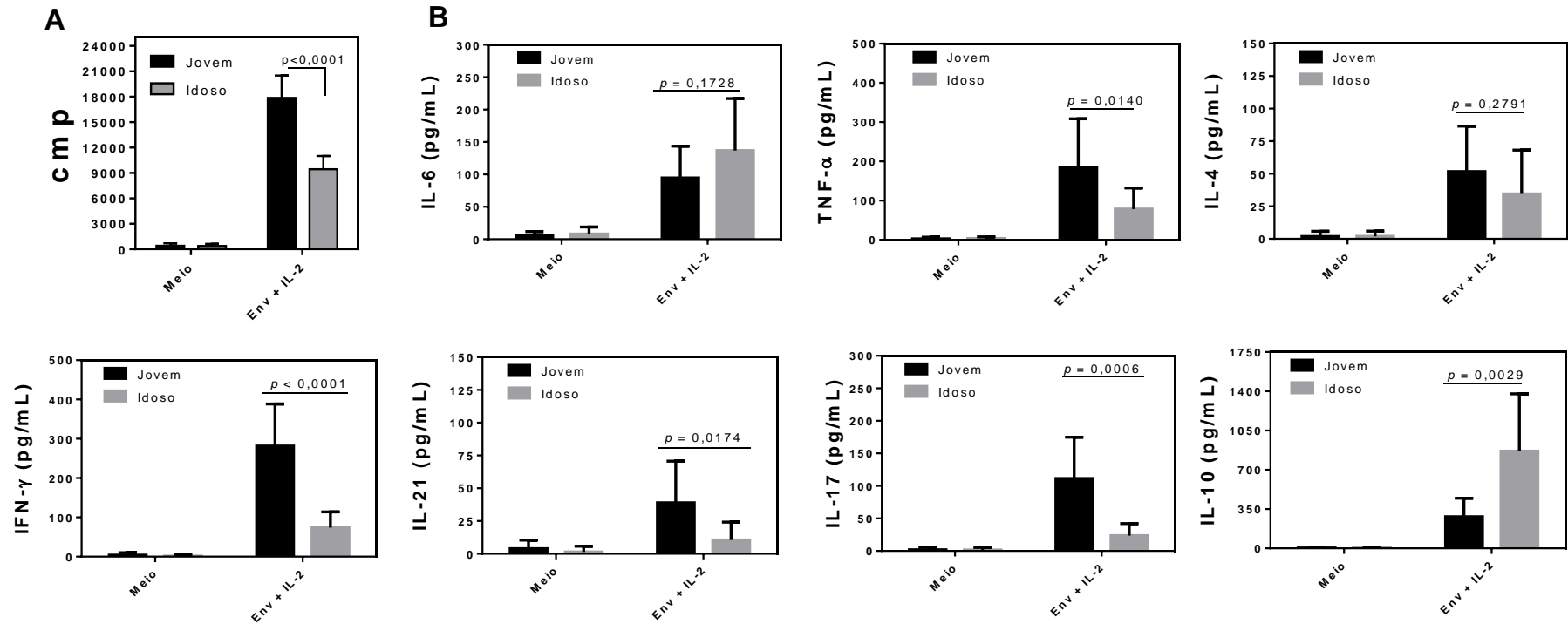


Figura 3: Resposta proliferativa dos linfócitos e perfil de citocinas de culturas de CMSP em resposta ao antígeno Env. As culturas de CMSP (1×10^6 /mL), obtidas de pacientes jovens ($n=10$) e idosos ($n=10$) infectados pelo HIV-1 foram mantidas por 5 dias na presença de Env ($1 \mu\text{M}$ de cada peptídeo) com IL-2 (20U/mL). (A) A resposta proliferativa foi avaliada através da incorporação de timidina tritiada. (B) As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA. Os resultados estão representados como média \pm desvio-padrão e os valores de p estão presentes na figura.

produção de TNF- α também foi inferior nas culturas de células dos pacientes idosos, porém não houve diferença em relação a produção de IL-6 e IL-4. Por outro lado, as culturas de células ativadas obtidas dos pacientes idosos liberaram níveis elevados de IL-10 quando comparadas com as culturas de células dos pacientes jovens. Não foi observada produção espontânea de citocinas nas culturas de células não estimuladas.

4.3 - Impacto da IL-10 na produção de citocinas relacionadas ao perfil Th1 e Th17 e na replicação viral *in vitro*

O resultado anterior mostrou que as culturas de células dos pacientes idosos produziram reduzidos níveis de citocinas relacionadas aos perfis Th1 e Th17 e altos níveis de IL-10. Como a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Denys *et al*, 2002), o próximo passo foi bloquear a IL-10 produzida pelas culturas de células dos pacientes jovens e idosos estimuladas com Env com anticorpos monoclonais IgG anti-IL-10. O bloqueio da IL-10 aumentou a produção de TNF- α nas culturas de células dos pacientes idosos, porém não foi capaz de elevar a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-21 (Figura 4A). Por outro lado, nas culturas de células de pacientes jovens, o bloqueio da IL-10 foi capaz de aumentar a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-21, mas não da IL-17. Nas culturas de células dos pacientes jovens e idosos, a neutralização da IL-10 aumentou a replicação do HIV-1 (Figura 4B).

4.4 - Impacto da idade na resposta proliferativa e no perfil de citocinas em resposta ao toxoide tetânico (TT)

Os resultados anteriores mostraram que as culturas de células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1, com adequada reconstituição numérica de células T CD4⁺ após o início da terapia antirretroviral (TARV), apresentaram uma resposta deficiente ao Env em relação aos jovens. Dessa forma, o próximo passo foi avaliar se a TARV foi capaz de recuperar uma resposta imune específica contra um antígeno de memória, o toxoide tetânico. Para isso, as células foram mantidas em cultura por 7 dias com toxoide tetânico (TT) na presença de IL-2 recombinante humana (rhIL-2). Como mostrado na figura 5A, a proliferação das células T dos

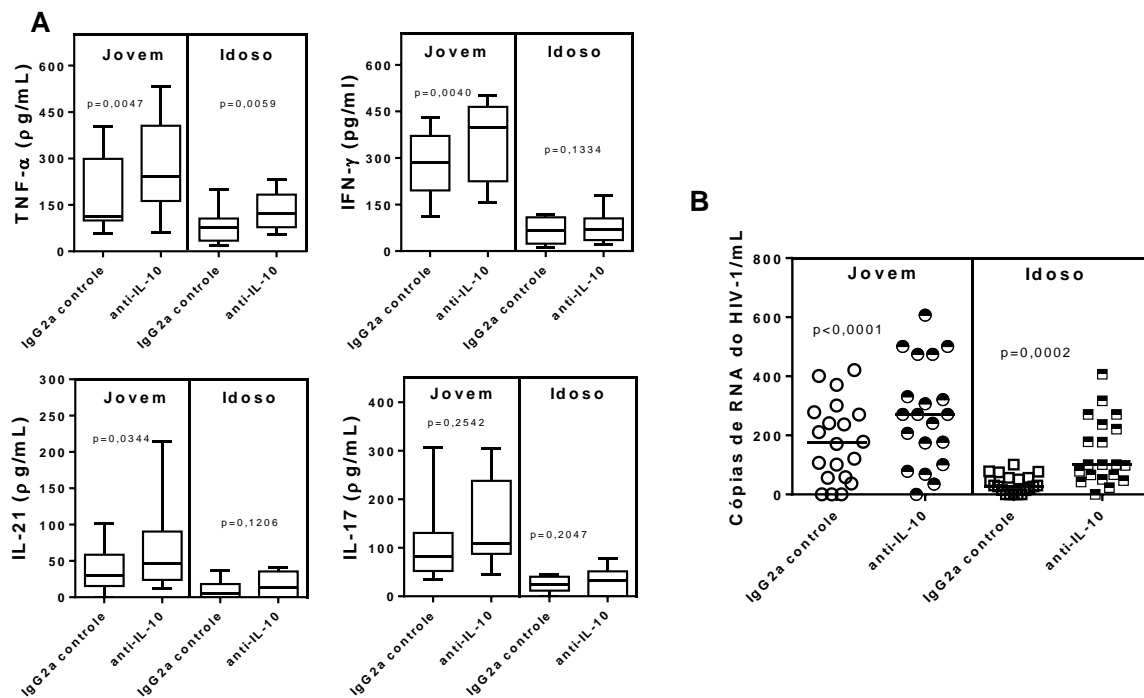


Figura 4: Efeito da neutralização da IL-10 na replicação viral e na produção de citocinas. As culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$), obtidas de pacientes jovens ($n=10$) e idosos ($n=10$) infectados pelo HIV foram mantidas por 5 dias na presença de ENV ($1 \mu\text{M}$ de casa peptídeo) com IL-2 (20U/mL) na presença ou ausência de IgG anti-IL-10 ($22 \mu\text{g/mL}$). Como controle foi adicionado o isotipo IgG2a ($22 \mu\text{g/mL}$). As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA (A) e a replicação viral foi medida através de RT-PCR (B). Os resultados estão representados como média \pm desvio-padrão e os valores de p estão presentes na figura.

indivíduos idosos infectados pelo HIV-1, em resposta ao TT, foi significativamente inferior quando comparada com as células dos outros grupos. Já em relação a proliferação das células T dos indivíduos jovens infectados pelo HIV-1, não houve diferença significativa quando comparada com as células dos indivíduos jovens saudáveis (Figura 5A).

Em relação ao perfil de citocinas (Figura 5B), as culturas de células ativadas com TT e rhIL-2 dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 produziram níveis significativamente inferiores de citocinas relacionadas aos perfis Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17 e IL-21) quando comparadas com os outros grupos. A produção de TNF- α e IL-6 também foi inferior nas culturas de células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 quando comparada com os pacientes jovens, porém a produção dessas duas citocinas entre os indivíduos idosos saudáveis e infectados pelo HIV-1 não foi

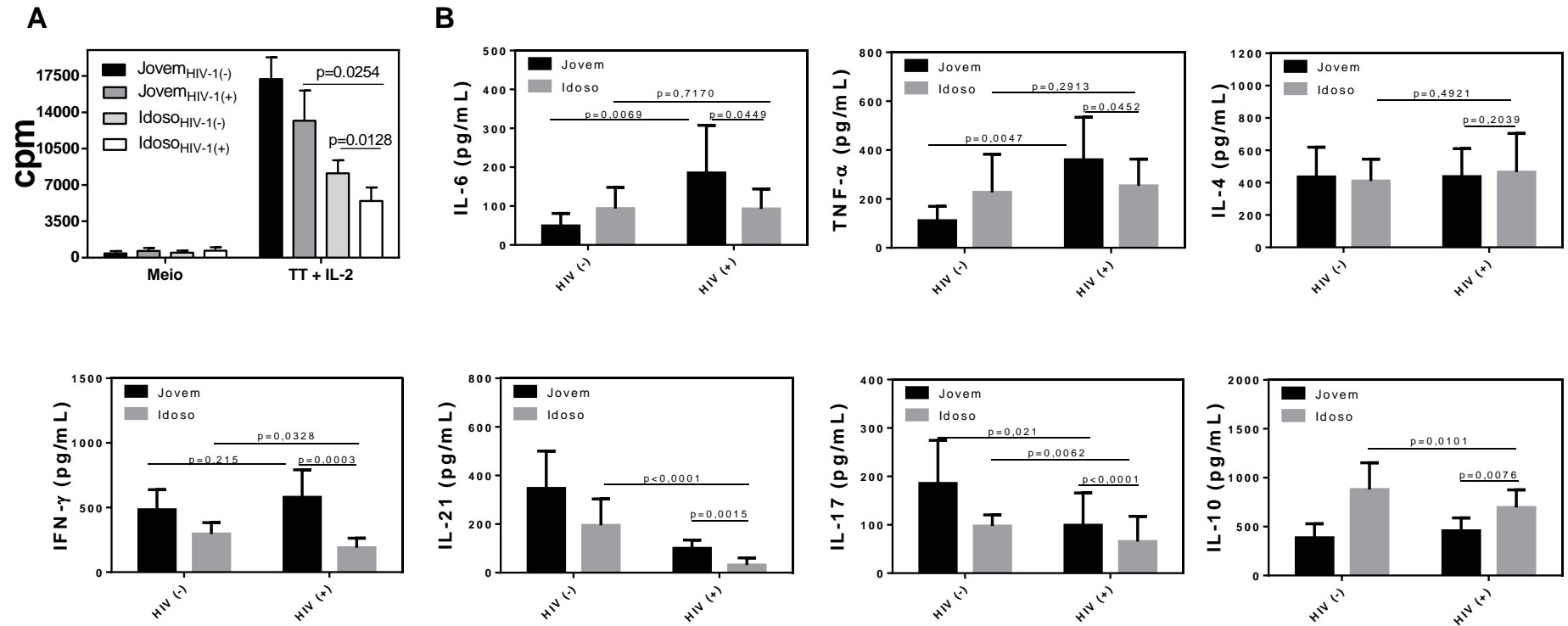


Figura 5: Resposta proliferativa dos linfócitos e perfil de citocinas de culturas de CMSP em resposta ao TT. As culturas de CMSP (1×10^6 /mL), obtidas de indivíduos infectados (10 jovens e 10 idosos) ou não (10 jovens e 10 idosos) foram mantidas por 7 dias na presença de TT ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) com IL-2 ($20\text{U}/\text{mL}$). (A) A resposta proliferativa foi avaliada através da captura de timidina radioativa. (B) As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA. Os resultados estão representados como média \pm desvio-padrão e os valores de p estão presentes na figura.

estatisticamente diferente. As culturas de células dos indivíduos jovens saudáveis produziram níveis significativamente inferiores de TNF- α e IL-6 quando comparadas com as culturas de células dos indivíduos jovens infectados pelo HIV-1 e dos indivíduos idosos saudáveis. Não foi encontrada diferença em relação a produção de IL-4. Como mostrado nas culturas de células ativadas com Env, as culturas de células ativadas com TT dos pacientes idosos infectados com HIV-1 liberaram níveis elevados de IL-10 quando comparadas com as culturas de células dos indivíduos jovens, tanto os saudáveis como os infectados pelo HIV-1. Porém, as culturas de células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 produziram níveis inferiores de IL-10 em relação as culturas de células dos indivíduos idosos saudáveis

4.5 - Quantificação *in vivo* de IgG anti-TT e sua relação entre a produção de citocinas *in vitro* em resposta ao TT

Uma resposta imune adequada ao TT requer o auxílio das células T, porém o melhor marcador imune de proteção ao TT é a produção de anticorpos neutralizantes que neutralizam a toxina tetânica, a principal molécula envolvida na patogenicidade do *Clostridium tetani*. Dessa forma, a dosagem de IgG anti-TT foi feita no plasma antes e 30 dias após o reforço com TT. Como mostrado na figura 6A, os títulos de IgG anti-TT antes do reforço de TT foi significativamente inferior nos pacientes idosos infectados pelo HIV-1 quando comparados com os indivíduos jovens e saudáveis. Após 30 dias do reforço, os títulos de IgG anti-TT nos idosos infectados pelo HIV-1 aumentaram, porém continuaram mais baixos do que os títulos dos outros grupos. Os níveis de IgG anti-TT após o reforço apresentaram uma correlação direta com a produção *in vitro* de IL-21 (Figura 6B) e IFN- γ (Figura 6C). Nenhuma relação foi encontrada entre os níveis de IgG anti-TT e a produção de IL-10 (Figura 6D).

4.6 – Análise da frequência de diferentes subtipos de células T periféricas e sua relação com o perfil de citocinas *in vitro* em resposta ao Env

Para avaliar se havia uma correlação entre os subtipos de células T periféricas com o perfil de citocinas encontrado nos pacientes infectados com HIV-1, nós analisamos a produção de citocinas em função da frequência de diferentes

subtipos desses linfócitos no sangue total. Inicialmente, nós determinamos a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naíves (CD45RA⁺CCR7⁺), memória

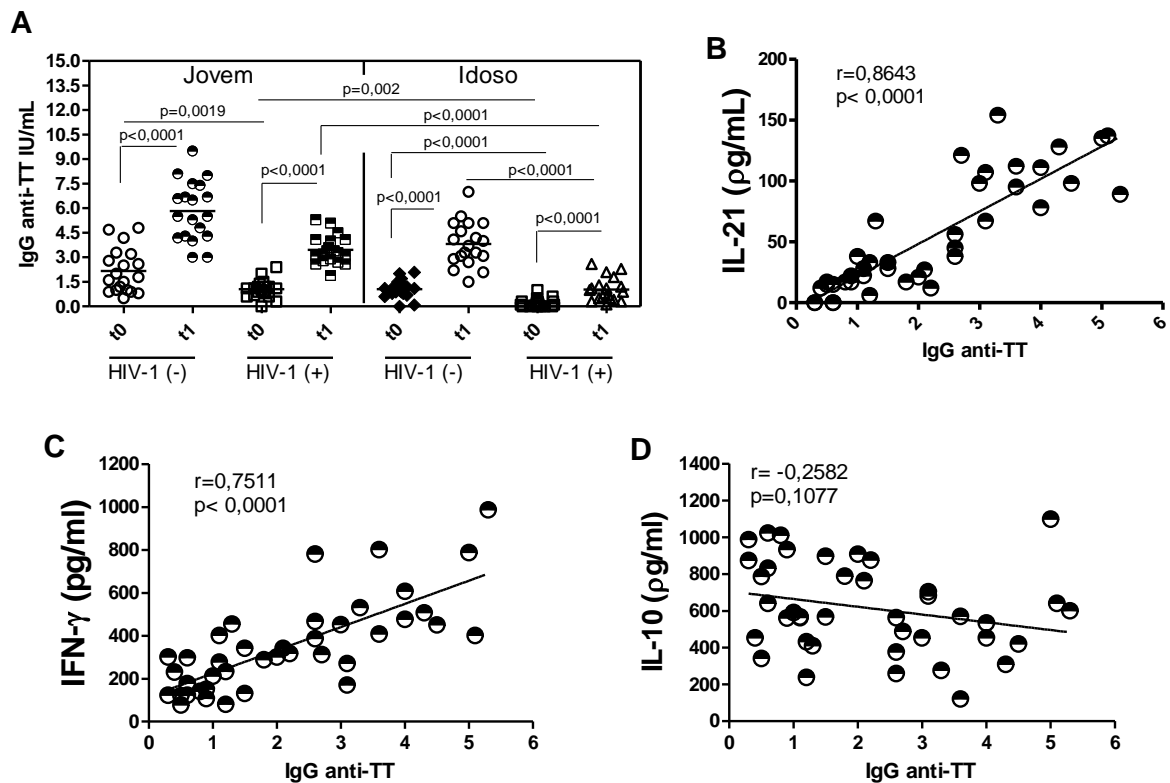


Figura 6: Concentração de IgG anti-TT antes e depois da vacinação com TT e sua relação entre a produção *in vitro* de citocinas. Antes (t0) e 30 dias depois (t1) da vacinação, o plasma foi submetido a técnica de ELISA para dosagem de IgG anti-TT (A). As culturas de PBMC (1×10^6 /mL), obtidas de indivíduos infectados (10 jovens e 10 idosos) ou não (10 jovens e 10 idosos) foram mantidas por 7 dias na presença de TT (1 μ g/mL) com IL-2 (20U/mL). As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA. As figuras mostram a correlação entre a concentração de IgG anti-TT e os níveis de IL-21 (B), IFN- γ (C) e IL-10 (D).

efetora (EM – *effector memory*) (CD45RA⁺CCR7⁻), memória central (CM – *central memory*) (CD45RO⁺CD127⁺) e células T terminalmente diferenciadas, chamadas de TEMRA (CD45RA⁺CCR7⁻) no sangue total (Figura 7). Ademais, > 95 % das células T virgens e memória central também expressavam o marcador CD62L (dado não demonstrado). Como mostrado na tabela 3, os pacientes idosos infectados pelo HIV-1 apresentaram uma frequência significativamente inferior de células T CD4⁺ e CD8⁺ naíves e de memória central em relação a todos os grupos. Por outro lado, a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora e terminalmente

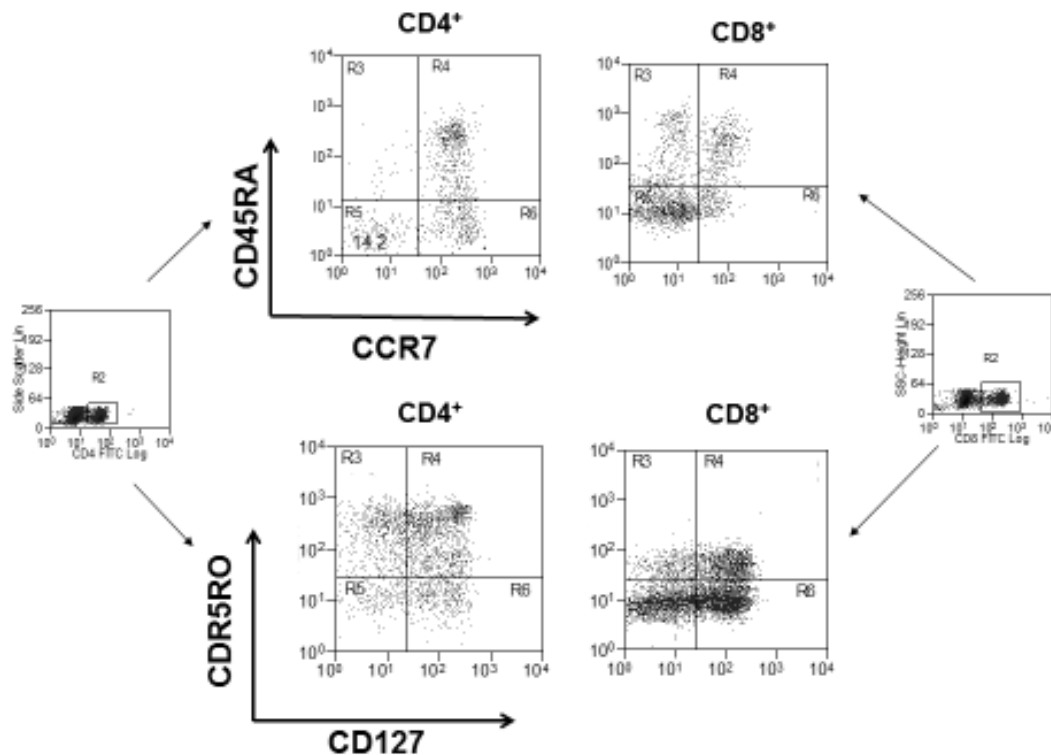


Figura 7: Estratégia de confinamento dos subtipos majoritários de células T periféricas. Dot plots representativos mostrando a identificação das células T CD4⁺ e CD8⁺ naïve, memória central, memória efetora e terminalmente diferenciadas.

diferenciada nos pacientes idosos HIV positivos foi significativamente superior quando comparada com os outros grupos. Os indivíduos idosos saudáveis apresentaram uma frequência reduzida de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naïves e um aumento na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central, efetora e terminalmente diferenciadas em comparação com os indivíduos jovens saudáveis.

Com relação ao perfil de citocinas inflamatórias produzido pelos pacientes infectados pelo HIV-1 idosos e jovens, a capacidade das células T estimuladas com Env em produzir IFN- γ , IL-17 e IL-21 foi positivamente correlacionada com a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central (Figura 8). Por outro lado, foi encontrada uma correlação inversa entre a produção dessas citocinas e a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ terminalmente diferenciadas. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a produção de citocinas e a frequência de células T naïve e de memória efetora. Quanto a IL-10, uma tendência ($p=0,061$) foi

encontrada entre a produção de IL-10 e a frequência de células T de memória central (dado não mostrado).

4.7 - Relação entre a frequência dos subtipos de células T periféricas com os níveis plasmáticos de IgG anti-TT e a produção *in vitro* de citocinas

Para avaliar se os subtipos de células T periféricas também contribuíam com o perfil de citocinas produzido após estímulo com TT, a frequência desses subtipos foi determinada a partir de amostras de sangue total. A produção de IL-21 e IFN- γ pelas células ativadas com TT apresentou uma correlação direta com a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central (Figura 9). Por outro lado, uma correlação inversa foi encontrada entre a produção dessas citocinas e a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ terminalmente diferenciadas. Além disso, como esperado, uma melhor resposta imune humoral foi encontrada em indivíduos com elevadas frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central enquanto que baixos níveis de IgG anti-TT foram encontrados em indivíduos com alta frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ terminalmente diferenciadas (Figura 10).

Tabela 3. Frequência dos subtipos de células T periféricas nos grupos controles e nos pacientes infectados pelo HIV-1 tratados com terapia antirretroviral e com carga viral plasmática indetectável¹

	Jovem HIV-1 neg.	Jovem HIV-1 pos.	Idoso HIV-1 neg.	Idoso HIV-1 pos.
	% (média)			
<i>Células T CD4⁺</i>				
<i>naïve</i>	75,3 (70,2-90,1) [#]	52,7 (42,4-56,1) ^{***, #}	30,5 (22,2-35,7) ^ψ	18 (11,1-28,3) ^{***, ψ}
<i>CM</i>	40,3 (33-51) [#]	20,1 (15,8-25,3) ^{***, #}	48,8 (40,4-55) ^ψ	7,3 (0-11,8) ^{***, ψ}
<i>EM</i>	10,6 (6,1-15,9) [#]	18,5 (10,3-20,9) ^{***, #}	11,5 (8,6-15,6) ^ψ	30,3 (22,7-35,2) ^{***, ψ}
<i>TEMRA</i>	3,1 (1,1- 7,7) [#]	8,6 (2-18,7) ^{**, #}	11,6 (8-14,5)	16,2 (8-19,3) ^{**}
<i>Células T CD8⁺</i>				
<i>naïve</i>	41,3 (33,7-43,1) [#]	30,7 (22,2-38,1) ^{***, #}	15,5 (10-22,3) ^ψ	8,4 (4,1-10) ^{***, ψ}
<i>CM</i>	10,1 (5,3-12,6) [#]	28,9 (23,6-37,7) ^{***, #}	44,6 (40,1-55,2) ^ψ	3,2 (0-8,6) ^{***, ψ}
<i>EM</i>	11,7 (3-15,4) [#]	38,8 (30-43,3) ^{**, #}	29,7 (27,1-30,8) ^ψ	55,3 (37-68) ^{**, ψ}
<i>TEMRA</i>	21,3 (5-27) [#]	33,9 (14-41,7) ^{*, #}	36,7 (27-48,2) ^ψ	47,6 (12-52) ^{*, ψ}

¹Limite de detecção: 50 cópias/ml. As análises imunes foram realizadas em pacientes infectados pelo HIV-1 após 24 meses de início da terapia antirretroviral (TARV) e após 30 dias da dose de reforço da vacina com toxoide tetânico. Foram analisadas as frequências das células T naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), de memória central (T_{CM}: CD45RO⁺CD127⁺), memória efetora (T_{EM}: CD45RA⁺CCR7⁺), e terminalmente diferenciadas (T_{TEMRA}: CD45RA⁺CCR7⁺) no sangue dos indivíduos por citometria de fluxo. Os valores médios dos diferentes subtipos de células T nos pacientes jovens e idosos infectados pelo HIV-1 foram comparados e (*) indica p<0,05, (**) p<0,001 and (***) p<0,0001. Quanto a comparação entre as médias obtidas entre jovens HIV-1 negativos e positivos, o (#) indica p<0.001. Na tabela (ψ) indica p<0.001 referente a comparação dos valores médios na frequência de diferentes fenótipos de células T entre idosos, infectados ou não pelo HIV-1.

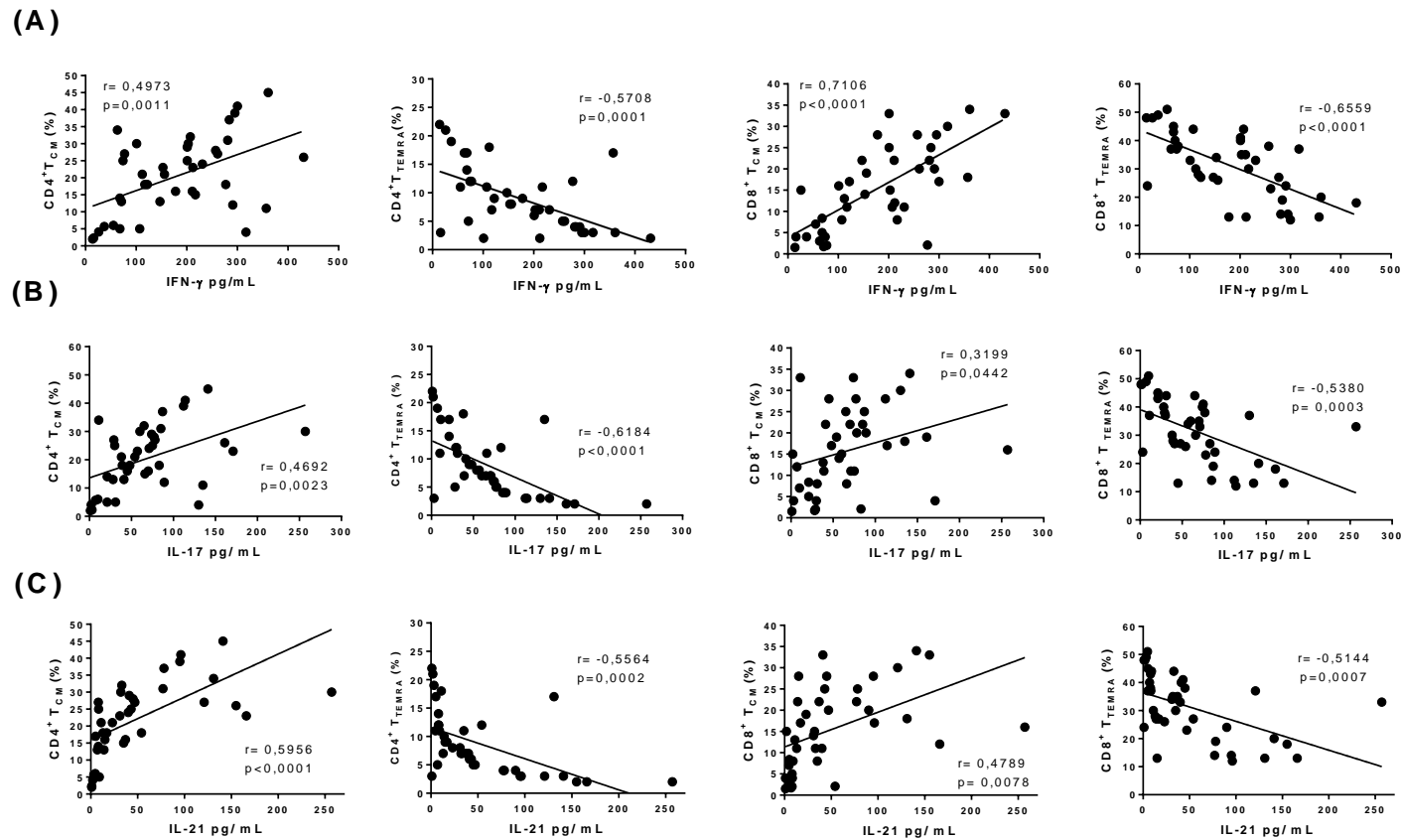


Figura 8: Relação entre a produção de citocinas *in vitro* em resposta ao Env e a frequência dos subtipos de células T periféricas. As culturas de CMSP (1×10^6 /mL), obtidas de pacientes jovens ($n=20$) e idosos ($n=20$) infectados pelo HIV-1 foram mantidas por 5 dias na presença de Env ($1 \mu\text{g}$ de cada peptídeo) com IL-2 ($20 \text{U}/\text{mL}$). As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA. As frequências dos subtipos de células T CD4^+ e T CD8^+ naïve ($\text{CD45RA}^+\text{CCR7}^+$), efectoras ($\text{CD45RA}^+\text{CCR7}^-$), memória central ($\text{CD45RO}^+\text{CD127}^+$) e terminalmente diferenciada ($\text{CD45RA}^+\text{CCR7}^-$) foram determinadas através do citômetro de fluxo. A figura mostra a correlação direta e inversa entre a produção de IFN- γ (A), IL-17 (B) e IL-21 (C) e a frequência de células T_{CM} e T_{EMRA} , respectivamente.

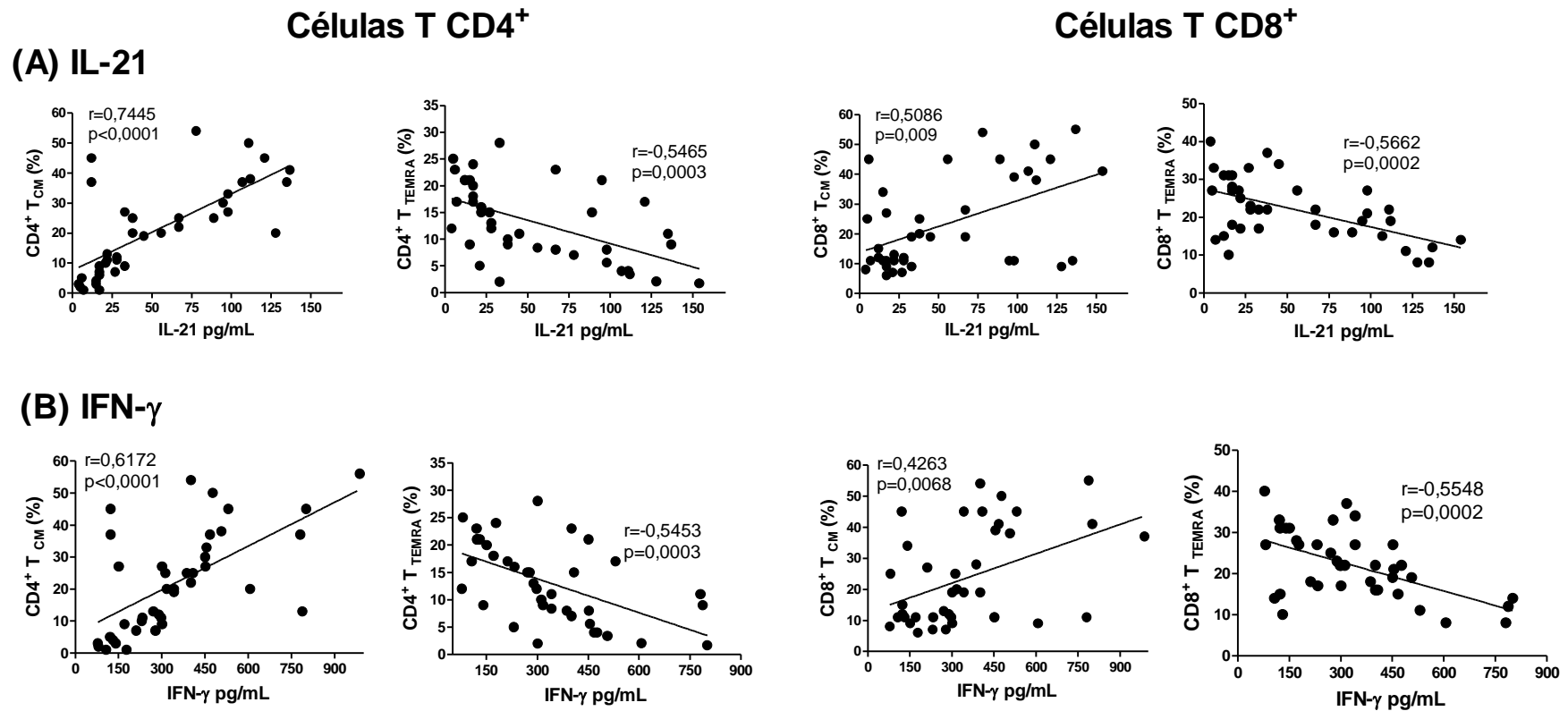


Figura 9: Relação entre a produção de citocinas *in vitro* em resposta ao TT e a frequência dos subtipos de células T periféricas. As culturas de CMSP (1×10^6 /mL), obtidas de indivíduos infectados (10 jovens e 10 idosos) ou não (10 jovens e 10 idosos) foram mantidas por 7 dias na presença de TT (1 μ g/mL) com IL-2 (20U/mL). As citocinas foram avaliadas através da técnica de ELISA. As frequências dos subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), efetoras (CD45RA⁻CCR7⁻), memória central (CD45RO⁺CD127⁺) e terminalmente diferenciada (CD45RA⁺CCR7⁻) foram determinadas através do citômetro de fluxo. A figura mostra a correlação direta e inversa entre a produção de IL-21 (A) e IFN- γ (B) e a frequência de células T_{CM} e T_{EMRA}, respectivamente.

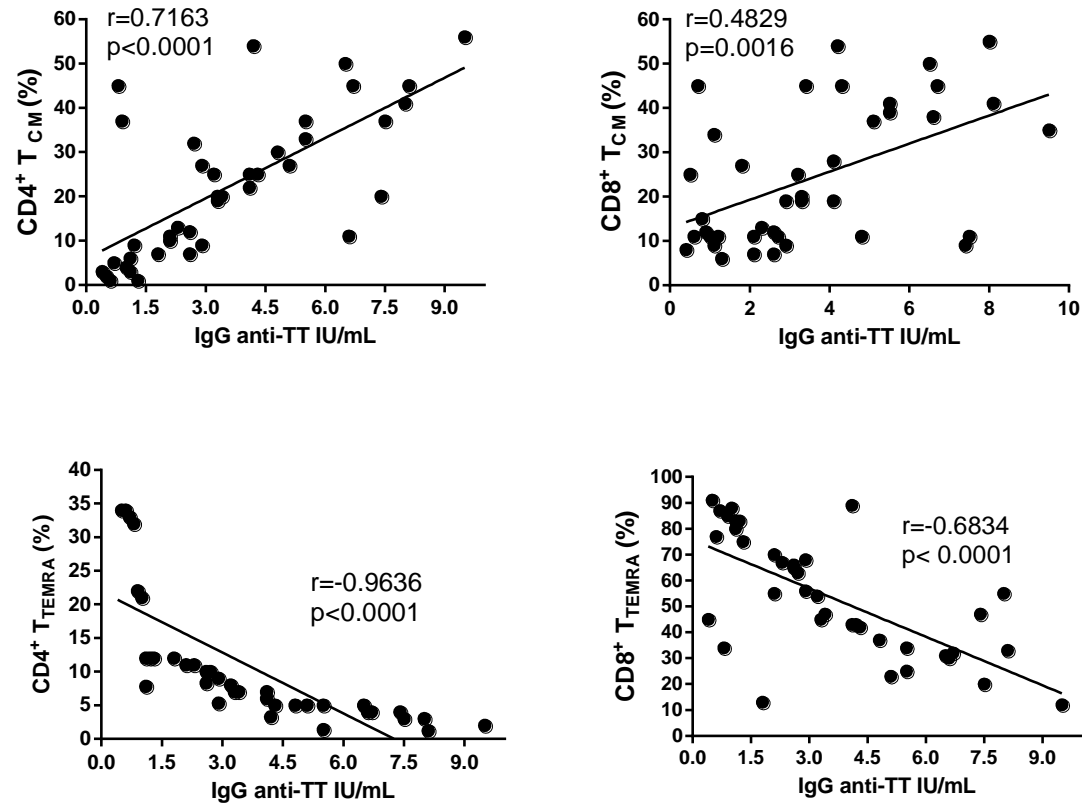


Figura 10: Relação entre os títulos de IgG anti-TT e a frequência dos subtipos de células T periféricas. Antes e depois da vacinação, o plasma foi submetido a técnica de ELISA para dosagem de IgG anti-TT. As frequências dos subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻), memória central (CD45RO⁺CD127⁺) e terminalmente diferenciada (CD45RA⁺CCR7⁻) foram determinadas através do citometro de fluxo. A figura mostra a correlação direta entre a concentração de IgG anti-TT e a frequência de células T_{CM} e a correlação inversa entre a concentração de IgG anti-TT e a frequência de células T_{EMRA}.

V. DISCUSSÃO

O número de pessoas com mais de 50 anos infectadas pelo HIV vem aumentando em todo o mundo, sendo consequência do aumento da expectativa de vida da população em geral como também do sucesso da terapia antirretroviral (TARV) que promove uma redução na taxa de mortalidade entre os indivíduos infectados. Sabe-se que os indivíduos com mais de 50 anos progridem mais rapidamente a aids, mesmo sendo tratados, e que os pacientes jovens que recebem tratamento têm mais chances de desenvolverem doenças relacionadas ao envelhecimento. O objetivo da TARV é inibir a replicação viral, promovendo a redução da CVP a níveis indetectáveis, e permitir a recuperação da competência imunológica do indivíduo (Gaardbo *et al.*, 2012). Porém, alguns indivíduos infectados pelo HIV-1 não apresentam uma reconstituição imune adequada, apesar de controlarem a replicação viral, e os idosos fazem parte desse grupo (Gaardbo *et al.*, 2012).

Todavia, alguns pacientes idosos são capazes de responder a TARV aumentando o número de células T CD4⁺ a níveis satisfatórios e são considerados em sucesso terapêutico. Na prática clínica atual, a reconstituição imune é avaliada apenas pela contagem de células T CD4⁺ periféricas, ignorando-se a multiplicidade de fenótipos que esta célula pode apresentar, bem como a modulação funcional desses fenótipos por mecanismos diversos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da idade no perfil funcional das células T de pacientes idosos infectados pelo HIV-1, em sucesso terapêutico, em resposta aos antígenos do envelope do HIV-1 (Env) e ao toxoide tetânico (TT).

Apesar da Organização Mundial da Saúde (OMS) considerar apenas indivíduos com mais de 60 anos como idosos, o CDC (*Center for Disease Control*) utiliza a idade de 50 anos para determinar como idosos as pessoas infectadas pelo HIV-1 (Nguyen & Holodniy, 2008; Cardoso *et al.*, 2013). Dessa forma, os indivíduos idosos recrutados para o nosso estudo tinham idade igual ou superior a 55 anos.

O nosso primeiro resultado (Fig. 3A) mostrou que a resposta linfoproliferativa ao Env foi significativamente inferior nos pacientes idosos infectados pelo HIV-1 e esse fenômeno também foi observado em resposta ao TT (Fig. 5A). As células T dos indivíduos idosos saudáveis proliferaram mais em resposta ao TT do que as células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1, porém proliferaram menos do que as

células dos indivíduos jovens saudáveis (Fig. 5A). Essa proliferação reduzida nos idosos já era esperada, uma vez que a diminuição na proliferação das células T é uma das mudanças relacionadas à idade observada em humanos idosos (Moro-García, Alonso-Arias & López-Larrea, 2012), e isso ocorre, em parte, pela baixa proporção de células capazes de proliferar e de gerar progênes viáveis (Bryl & Witkowski, 2004). Tanto a idade como a infecção pelo HIV-1 estão relacionadas a um declínio no número de células T naíves e de memória central, células capazes de gerar progênes viáveis, associado a um aumento no número de células T terminalmente diferenciadas, designadas como TEMRA (Andrade *et al.*, 2012; Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008). O acúmulo dessas células TEMRA com a idade deve estar relacionado à estimulação antigênica crônica ao longa da vida dos indivíduos. Essas células, que são CD28 negativas, têm menor capacidade proliferativa (Czesnikiewicz-Guzik *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). Esse fato se deve ao fato das células CD28⁻ produzirem e responderem menos a IL-2, se tornam refratárias a indução da telomerase e sofrem, portanto, senescência replicativa (Moro-Garcia, Alonso-Arias & López-Larrea, 2012). No nosso estudo, mesmo com a presença exógena de IL-2, a proliferação das células T dos indivíduos idosos foi mais baixa, principalmente naqueles infectados pelo HIV-1, indicando que a sinalização da IL-2 pode estar comprometida. De fato, tanto a infecção pelo HIV-1 quanto a idade estão relacionadas a uma deficiência na sinalização do CD25 e do TCR, observada principalmente nas células T estimuladas cronicamente (Kryworuchko, Pasquier & Thèze, 2003; Larbi *et al.*, 2011; Moro-Garcia, Alonso-Arias & López-Larrea, 2012). O aumento progressivo das células T exauridas está associado a elevados níveis de marcadores inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, porém com uma produção comprometida de IFN- γ e IL-2 (Pathai *et al.*, 2014), o que explica a baixa capacidade dos indivíduos idosos em responder a novos antígenos (Wherry, 2011). Portanto, uma recuperação imune adequada seguindo o tratamento com TARV nos pacientes com aids depende da capacidade dessas drogas em reduzir os níveis sistêmicos de marcadores inflamatórios, como TNF- α e IL-6 (Cooney, 2002; Malzahn *et al.*, 2012).

Nesse contexto, em relação à produção de citocinas, as culturas de células estimuladas com TT dos indivíduos idosos saudáveis produziram níveis elevados de IL-6 e TNF- α associado com baixos níveis de citocinas relacionadas aos perfis Th1 e Th17, quando comparadas com as culturas de células dos jovens (Fig. 5B). Estudo

realizado por Deng e colaboradores (2004) demonstrou um declínio na resposta Th1 ao vírus Influenza associado à idade, e van der Geest e colaboradores (2014) observou uma redução na proporção do fenótipo Th17 no sangue periférico de indivíduos idosos. Juntos, esses resultados demonstram que, apesar do processo de imunosenescência ser caracterizado por um status inflamatório basal, importantes componentes da resposta imune protetora contra antígenos são comprometimentos. Quanto aos pacientes idosos HIV-positivos, as culturas de CMSP desse grupo produziram níveis reduzidos de TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-21 em relação as culturas de CMSP dos pacientes jovens com aids após a estimulação com Env ou TT (Figs. 3B e 5B). Dentre os idosos, a infecção pelo HIV-1 comprometeu a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-21 em resposta ao TT. Dessa forma, podemos observar que tanto a infecção pelo HIV-1 como a idade afetam a produção de citocinas protetoras pelas células T em resposta a um antígeno.

Por outro lado, as culturas de células ativadas com Env (Fig. 3B) ou TT (Fig. 5B) dos pacientes idosos infectados com HIV-1 produziram níveis elevados de IL-10 quando comparadas com as culturas de células dos pacientes jovens. Porém, as culturas de células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 produziram níveis inferiores de IL-10 em relação as culturas de células dos indivíduos idosos saudáveis (Fig. 5B). De fato, tanto a infecção pelo HIV como a idade estão associadas a um aumento na frequência e atividade das células Treg (Gregg *et al.*, 2005). Ainda nesse cenário, estudo anterior realizado pelo nosso grupo demonstrou que a TARV elevou em idosos com aids a frequência de células T periféricas produtoras de IL-10 que não expressavam o marcador FoXP3 em resposta ao Env, sendo este fenótipo compatível com as células Tr1 (Andrade *et al.*, 2012).

Acredita-se que as células Treg são induzidas em um ambiente de inflamação crônica. Porém, a relação entre a frequência dessas células e o curso da infecção em adultos tem gerado resultados conflitantes. Enquanto alguns defendem que a elevação na frequência dessas células pode prejudicar a resposta imune celular protetora contra o HIV-1 (Andersson *et al.*, 2005), outros estudos têm demonstrado que baixos níveis de Tregs no sangue periférico estão relacionados a efeitos deletérios devido a produção exacerbada de citocinas inflamatórias, envolvidas em acelerar os processos de imunosenescência característicos da aids (Shin *et al.*, 2000; Eggena *et al.*, 2005b).

Para melhor entender o papel da IL-10, nós conduzimos os experimentos na presença de doses saturantes de IgG anti-IL-10 humana (Fig. 4). Em nosso sistema, a neutralização da IL-10 não foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-21 em resposta ao Env nas culturas de células dos pacientes idosos HIV positivos, indicando danos nos fenótipos Th1 e Th17 nesse grupo. No contexto da aids, depleção numérica e funcional dessas células deve estar associada a elevados níveis de ativação imune no qual os pacientes são condicionados (Li *et al.*, 2011; Brandt *et al.*, 2011). Por outro lado, nosso estudo demonstrou que a neutralização da IL-10 aumentou a replicação viral *in vitro* (Fig. 4B), e isso deve ser facilitado pelo aumento na produção de TNF- α nessas culturas. O TNF- α é uma importante citocina implicada em favorecer o ciclo replicativo do vírus na célula hospedeira por induzir o NF- κ B (Biswas *et al.*, 1998; Zhao, Papadopoulou & Tremblay, 2004; Haraguchi *et al.*, 2006). Sabe-se que a estimulação das células T CD4⁺ efetoras induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B pela via clássica, e este se liga tanto aos promotores de genes do DNA celular quanto nas repetições terminais longas do pró-vírus, iniciando, assim, a transcrição do RNA viral pela RNA polimerase II celular (Barbeau, 1997; Osorio *et al.*, 2012). O TNF- α ativa uma via de sinalização intracelular que culmina na ativação desse fator nuclear de transcrição (Adli *et al.*, 2010). Já a IL-10 inibe a produção de TNF- α (Denys *et al.*, 2002) e atenua a ativação do NF- κ B pelo TNF- α (Loscher *et al.*, 2005; Dhingra *et al.*, 2009). Esse resultado ajuda a entender porque pacientes idosos apresentam um controle da carga viral em resposta a TARV.

O aumento da proporção de células T de memória efetora em relação a células T naïve e de memória central são alterações observadas tanto do envelhecimento como na infecção pelo HIV. No nosso estudo, a infecção pelo HIV-1 e a idade comprometeram a frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ naïves e de memória central e favoreceram o aumento na frequência de T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória efetora e terminalmente diferenciadas (TEMRA) (Tabela 3). Em nosso estudo, em 50% dos pacientes, nós observamos uma relação direta entre a frequência de células T CD4⁺ de memória central e produção de IFN- γ em culturas estimuladas com ENV (Fig. 8A). O mesmo percentual de pacientes foi observado uma relação direta entre a frequência das células T CD8⁺ de memória central e a produção de IL-21 em resposta ao ENV (Fig. 8C). Por outro lado, forte correlação foi observada entre a produção de IL-21 e a frequência de células T CD4⁺ de memória

central (Fig. 8C). Em contraste, a capacidade das células T dos pacientes infectados pelo HIV-1 em produzir IFN- γ , IL-17 e IL-21 foi inversamente correlacionada com a frequência de células T_{EMRA} (Fig. 8). Resultado semelhante foi observado em relação a produção de IFN- γ e IL-21 pelas culturas de células em resposta ao TT (Fig. 9). As células T adquirem um fenótipo de terminalmente diferenciadas em ambientes com elevada carga viral e vão perdendo sua função com o tempo, começando pela perda na produção de IL-2 e redução na capacidade proliferativa seguido pela redução na liberação de IFN- γ (Akbar & Henson, 2011; Wherry, 2011). Acredita-se que a exposição a infecções virais crônicas, como o citomegalovírus (CMV), contribua para a imunosenescência em indivíduos saudáveis (Alonso *et al.*, 2013). Em pacientes com HIV, a co-infecção com CMV é bastante comum (Lang *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2014) e pode acelerar os mecanismos envolvidos na alteração da homeostase das células T.

Em relação à frequência das células T naíves e de memória efetora, não foi encontrada nenhuma associação com a produção de citocinas. A capacidade da TARV em reconstituir a função das células T naíves depende da idade (Rickabaugh *et al.*, 2011). Além disso, as células T naíves de idosos saudáveis e de infectados pelo HIV exibem defeitos funcionais que incluem redução no comprimento dos telômeros, repertório restrito do TCR, produção reduzida de citocinas e expansão prejudicada após estímulo antigênico (Grabar, Weiss & Costagliola, 2006). Assim, uma melhor recuperação imune após a TARV ocorre quando as células T naíves são capazes de se tornarem células T_{CM} funcionais. No caso das células T_{EM}, a ausência de uma correlação com o perfil de citocinas pode ser explicado pelo fato dessas células se apresentarem como uma população heterogênea e de vida curta que migram da periferia para o tecido onde se tornam células T de memória residentes (Mueller *et al.*, 2013).

Apesar dos indivíduos idosos HIV-positivos que participaram do estudo apresentarem elevadas frequências de células T_{EM} e T_{EMRA}, subtipos com baixa capacidade replicativa, a contagem total de linfócitos T CD4⁺ após o início da TARV foi similar daquela observada nos pacientes jovens. Esse fenômeno pode ser explicado, em parte, pela resistência dessas células a apoptose, devido a redução na atividade das caspases 3 e 8 (Gupta & Gollapudi, 2006; Gupta & Gollapudi, 2008).

Alguns estudos demonstraram que a resposta dos linfócitos a antígenos de memória, como o TT, melhorou após o início da TARV (Pontesilli *et al.*, 1999; Burton *et al.*, 2008). Dessa forma, após o reforço contra o TT, o impacto da idade na resposta humoral de indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 foi avaliado. No nosso estudo, apesar da TARV ter aumentado os títulos de IgG anti-TT após a dose de reforço, esse aumento foi inferior nos pacientes idosos (Fig. 6A). Esse resultado está de acordo com outros trabalhos que demonstraram um efeito negativo na resposta celular e humoral em resposta ao TT (Schatz *et al.*, 1998; Hainz *et al.*, 2005). Essa fraca resposta humoral ao TT é consequência, pelo menos em parte, da baixa produção de IFN- γ e IL-21, uma vez que foi encontrada uma correlação positiva entre os títulos de IgG anti-TT e os níveis *in vitro* dessas citocinas produzidas pelas células estimuladas com TT após o reforço (Figs. 6B e 6C). Além disso, as respostas celular e humoral ao TT apresentaram uma associação direta com a frequência das células T_{CM} e inversa com as células T_{EMRA} (Figs. 9 e 10).

A resposta imune humoral contra o TT é classicamente dependente de células T CD4⁺ TT-específicas. Porém, estudo realizado por Mohr e colaboradores (2010) mostrou que células T CD8⁺ também respondem as proteínas associadas ao adjuvante presente na preparação vacinal, alumínio, proliferando e produzindo IFN- γ que amplifica a troca de classe em linfócitos B TT-específicos. Recentemente, um novo subtipo de linfócito T, denominado T_{FH}, foi descrito em auxiliar na formação dos centros germinativos, nos processos de hipermutação somática, maturação de afinidade e troca de classe dos linfócitos B através da ligação de moléculas coestimuladoras e da produção de IL-21 (Crotty, 2011; Tangye *et al.*, 2013; Shulman *et al.*, 2013). A IL-21 induz a expressão de Bcl6 nos linfócitos B, permitindo a maturação dessas células e a sua diferenciação em células plasmáticas secretoras de anticorpos e em células de memória (Crotty, 2011; Pallikkuth, Parmigiani & Pahwa, 2012).

Estudo realizado por Zhou e colaboradores (2014) mostrou que indivíduos idosos apresentam uma frequência elevada de células T_{FH} de memória central no sangue e, segundo Agrawal e colaboradores (2012), as células T CD4⁺ naïve de indivíduos idosos respondem de forma alterada a IL-12, resultando no aumento da diferenciação dessas células num fenótipo T_{FH}. No entanto, nesses dois trabalhos nenhum ensaio funcional foi realizado. Nesse sentido, Yu e colaboradores (2012) mostraram que as células T CD4⁺ de memória de indivíduos idosos apresentavam

função prejudicada em auxiliar a diferenciação das células B. Além disso, foi observado que essas células T de indivíduos idosos expressavam níveis inferiores de CD40L e ICOS, importantes moléculas na interação entre as células T e B, e produziam quantidades inferiores de IL-4, IL-17 e IL-21 *in vitro*, sendo essas alterações associadas ao aumento na expressão de DUSP4 (Yu *et al*, 2012). Dessa forma, apesar de indivíduos idosos apresentarem frequências elevadas de células T_{FH} de memória, essas parecem não ser funcionais.

No contexto da infecção pelo HIV, como as células T_{FH} são as principais células do compartimento T CD4⁺ para infecção, replicação e produção do vírus (Perreau *et al*, 2013), alterações quantitativas e funcionais nesse subtipo de célula T são amplificadas nos pacientes idosos infectados pelo HIV-1. Estudo realizado por George e colaboradores (2015) mostrou que as baixas concentrações de anticorpos contra o vírus Influenza em mulheres idosas infectadas pelo HIV-1 estavam associadas com a menor frequência de células T_{FH} periféricas secretoras de IL-21. A principal fonte de IL-21 no sangue periférico parece ser a célula T_{CM} (Kastir *et al*, 2014), e uma correlação positiva foi encontrada em nosso estudo entre a frequência dessa célula e a produção *in vitro* de IL-21 pelas células T em resposta ao TT (Fig. 9A). Por outro lado, uma correlação inversa foi observada entre a frequência da célula T_{EMRA} e a produção *in vitro* de IL-21. Em nosso estudo, apesar de não termos realizado uma avaliação fenotípica quanto aos marcadores de células T_{FH}, nossos dados sugerem que o aumento na frequência de células T_{EMRA} e redução na frequência de células T_{CM} podem explicar os baixos níveis de IL-21 produzidos pelas células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 e conseqüentemente os baixos títulos de IgG anti-TT.

Além do papel desempenhado na resposta imune humoral, a IL-21 influencia diretamente a geração e manutenção de células T CD8⁺ multifuncionais (Yi, Du & Zajac, 2009; Fröhlich *et al.*, 2009; Epple *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2010) e sustenta a atividade das células T CD8⁺ efetoras durante a infecção viral crônica (Elsaesser, Sauer & Brooks, 2013). Portanto, manejos terapêuticos adicionais, além da TARV, objetivando melhorar a produção e a sinalização da IL-21 podem trazer benefícios aos pacientes idosos infectados pelo HIV-1, aumentando assim a resposta imune celular e humoral contra diversos patógenos, inclusive o HIV-1.

VI. CONCLUSÃO

- Quando comparado aos pacientes jovens, a resposta proliferativa aos antígenos Env e TT foi comprometida em idosos com aids em sucesso terapêutico;
- A menor resposta proliferativa ao Env e ao TT em cultura de células obtidas de pacientes idosos com aids em tratamento foi associada a reduzida produção de TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-21 e maior produção de IL-10;
- Não houve diferença na produção de IL-4 e IL-6 nas culturas de células ativadas com Env. Já nas culturas de células ativadas com TT a produção de IL-6 foi significativamente inferior nas células dos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1;
- A neutralização da IL-10 em culturas CMSP estimuladas com Env foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ e IL-21, apenas no grupo de pacientes jovens em sucesso terapêutico e foi capaz de aumentar a replicação viral em culturas de CMSP estimuladas com Env, e esse fenômeno foi relacionado ao aumento na produção de TNF- α , tanto nas culturas de células dos idosos e dos jovens;
- As frequências de células T naïve e T_{CM} periféricas foram significativamente menores e as frequências de células T_{EM} e T_{EMRA} foram significativamente maiores nos indivíduos idosos infectados pelo HIV-1 quando comparadas com os outros grupos;
- Foi encontrada uma correlação positiva entre a frequência de células T_{CM} e a produção *in vitro* de IFN- γ , IL-17 e IL-21 e uma correlação inversa entre a frequência de células T_{EMRA} e a produção *in vitro* de dessas citocinas em resposta ao Env. Essa mesma relação tendo sido observada nos estudos sobre a frequência de diferentes subtipos de T com a produção de citocinas em culturas estimuladas com TT;
- A capacidade de todos os indivíduos estudados aqui, infectados ou não pelo HIV-1, em produzir IgG anti-TT foi diretamente correlacionada aos níveis *in vitro* de IL-21 e IFN- γ .

- Finalmente, nós observamos uma estreita correlação positiva e negativa entre a concentração sérica de IgG anti-TT e a frequência periférica das células T_{CM} e T_{EMRA} , respectivamente.

Em conclusão, nossos resultados revelam que mesmo atingindo níveis satisfatórios de células T $CD4^+$ e de controlar a carga viral, a TARV é menos eficiente em induzir uma reconstituição imune funcional em pacientes idosos com aids. Essas anormalidades podem estar ligadas, ao menos em parte, ao maior acúmulo de células T terminalmente diferenciadas associado a uma menor frequência de células T de memória central. Apesar desses resultados revelarem uma disfunção complexa no compartimento das células T em pacientes idosos, o melhor entendimento desses eventos pode prover valiosas informações para o futuro desenho de novas ferramentas imunoterapêuticas para essa população considerada imunologicamente diferenciada.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J. C.; Banito, A.; Wuestefeld, T.; Georgilis, A.; Janich, P.; Morton, J. P.; Athineos, D.; Kang, T.W.; Lasitschka, F.; Andrulis, M.; Pascual, G.; Morris, K. J.; Khan, S.; Jin, H.; Dharmalingam, G.; Snijders, A. P.; Carroll, T.; Capper, D.; Pritchard, C.; Inman, G. J.; Longerich, T.; Sanson, O. J.; Benitah, A.; Zender, L.; Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.*, 15(8): 978-990.
- Adli, M.; Merkhofer, E.; Cogswell, P.; Baldwin, A. S. (2010). IKKalpha and IKKbeta each function to regulate NF-kappaB activation in the TNF-induced/canonical pathway. *PLoS One*, 5(2):e9428.
- Agrawal, A.; Gupta, S. (2011). Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Res. Rev.*, 10(3): 336-345.
- Ahmad, H. T.; Mansoorah, J.; Fereshteh, M.; Mojtaba, H. (2014). Changes in lymphocytes' telomerase activity by 4-1BB costimulation. *J. Cancer Res. Ther.*, 10(4):998-1003.
- Akbar, A. N.; Henson, S. M. (2011). Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, 11(4): 289-295.
- Alimonti, J. B.; Ball, T. B.; Fowke, K. R. (2003). Mechanisms of CD4⁺ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.*, 84:1649-1661.
- Alonso-Arias, R.; Moro-Gracia, M. A.; Echeverría, A.; Solano-Jaurrieta, J. J.; Suárez-García, F. M.; López-Larrea, C. (2013). Intensity of the humoral response to cytomegalovirus is associated with the phenotypic and functional status of the immune system. *J. Virol.*, 87(8): 4486-4495.
- Altman, J. D.; Moss, P. A.; Goulder, P. J.; Barouch, D. H.; McHeyzer-Williams, M. G.; Bell, J. I.; McMichael, A. J.; Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274(5284): 94-96.
- Andersson, J.; Boasso, A.; Nilsson, J.; Zhang, R.; Shire, N. J.; Lindback, S.; Shearer, G. M.; Chougnet, C. A. (2005). The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J. Immunol.*, 174(6): 3143-3147.
- Andersson, J., Fehniger, T. E., Patterson, B. K., Pottage, J., Agnoli, M.; Pottage, J. (1998). Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy. *AIDS*, 12:123-129.
- Andrade, R. M.; Andrade, A. F.; Lazaro, M. A.; Vieira, M. M.; Barros, P. O.; Borner, A. R.; Silva-Filho, R. G.; Santos, J. O.; Brindeiro, R. M.; Tanuri, A.; Bento, C. A. (2010). Failure of highly active antiretroviral therapy in reconstituting immune response to *Clostridium tetani* vaccine in aged AIDS patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 54(1): 10-17,

Andrade, R. M.; Hygino, J.; Kasahara, T. M.; Vieira, M. M.; Xavier, L. F.; Blanco, B.; Damasco, P. V.; Silva, R. M.; Lima, D. B.; Oliveira, A. L.; Lemos, A. S.; Andrade, A. F.; Bento, C. A. (2012). High IL-10 production by aged AIDS patients is related to high frequency of Tr-1 phenotype and low in vitro viral replication. *Clin. Immunol.*, 145(1): 31-43.

Andrade, R. M.; Lima, P. G.; Filho, R. G. S.; Hygino, J.; Milczanowski, S. F.; Andrade, A. F. B.; Lauria, C.; Brindeiro, R.; Amilcar, A.; Bento, C. A. M. (2007). Interleukin-10-secreting CD4 cells from aged patients with AIDS decrease in-vitro HIV replication and tumour necrosis factor a production. *AIDS*, 21: 1763-1770.

Appay, V. Nixon, D. F.; Donahoe, S. M.; Gillespie, G. M.; Dong, T.; King, A.; Ogg, G. S.; Spiegel, H. M.; Conlon, C.; Spina, C. A.; Havlir, D. V.; Richman, D. D.; Waters, A.; Easterbrook, P.; McMichael, A. J.; Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.*, 192(1): 63-75.

Autran, B.; Carcelain, G.; Li, T. S.; Blan, C.; Mathez, D.; Tubiana, R.; Katlama, C.; Debré, P.; Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 277(5322): 112-116.

Azzoni, L.; Rutstein, R. M.; Chehimi, J.; Farabaugh, M. A.; Nowmos, A.; Montaner, L. J. (2005). Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4⁺ cell counts in treated HIV-1-infected children. *J. Infect. Dis.*, 191(9): 1451-1459.

Bangs, S. C.; McMichael, A. J.; Xu, X. N. (2006). Bystander T cell activation-implication for HIV infection and other disease. *Trend Immunol.*, 27(11): 518-524.

Barbeau, B.; Bernier, R.; Dumais, N.; Briand, G.; Olivier, M.; Faure, R.; Posner, B. I.; Tremblay, M. (1997). Activation of HIV-1 long terminal repeat transcription and virus replication via NF-κB-dependent and -independent pathways by potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors, the Peroxovanadium compounds. *J. Biol. Chem.*, 272: 12968-12977.

Barker, B. R.; Gladstone, M. N.; Gillard, G. O.; Panas, M. W.; Letvin, N. L. (2010). Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8⁺ T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, 40(11): 3085-3096.

Battegay, M.; Fehr, J.; Flückiger, U.; Elzi, L. (2008). Antiretroviral therapy of late presenters with advanced HIV disease. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(1): 41-44.

Beerman, I.; Bock, C.; Garrison, B. S.; Smith, Z. D.; Gu, H.; Meissner, A.; Rossi, D. J. (2013). Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell.*, 12(4): 413-425.

Behbahani, H., Landay, A., Patterson, B. K., Jones, P., Pottage, J., Agnoli, M., Anderson, J.; Spetz, A. L. (2000). Normalization of immune activation in lymphoid tissue following highly active anti-retroviral therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 25:150-156.

Bella, S. D.; Bierti, L.; Presicce, P.; Arienti, R.; Valenti, M.; Saresella, M.; Vergani, C.; Villa, M. L. (2007). Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin. Immunol.*, 122(2): 220-228.

Biswas, D. K.; Mhashilkar, A. M.; Ewaniuk, D. S.; Pezza, J. A.; Oh, L. M.; Kannangara, G. S.; Tius, M. A.; Pardee, A. B. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by combination of a novel inhibitor of TNF- α with AZT. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 18(5): 426-434.

Boasso, A.; Royle, C. M.; Doumazos, S.; Aquino, V. N.; Biasin, M.; Piacentini, L.; Tavano, B.; Fuchs, D.; Mazzotta, F.; Lo Caputo, S.; Shearer, G. M.; Clerici, M.; Graham, D. R. (2011). Overactivation of plasmacytoid dendritic cells inhibits antiviral T-cell responses: a model for HIV immunopathogenesis. *Blood*, 118(19): 5152-5162.

Boccardi, V.; Razdan, N.; Kaplunov, J.; Mundra, J. J.; Kimura, M.; Aviv, A.; Herbig, U. (2014). Stn1 is critical for telomere maintenance and long-term viability of somatic human cells. *Aging Cell*, pp1-10.

Bocker, M. T.; Hellwig, i.; Breiling, A.; Eckstein, V.; Ho, A. D.; Lyko, F. (2011). Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood*, 117(19): e182-e189.

Brandt, L.; Benfield, T.; Mens, H.; Clausen, L. N.; Katzenstein, T. L.; Fomsgaard, A.; Karlsson, I. (2011). Low level of regulatory T cells and maintenance of balance between regulatory T cells and Th17 cells in HIV-1-infected elite controllers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 57(2): 101-108.

Brenchley, J. M.; Price, D. A.; Douek, D. C. (2006). HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.*, 7(3): 235-239.

Briones, M. S.; Dobard, C. W.; Chow, S. A. (2010). Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. *J. Virol*, 84(10): 5181-5190.

Bryl, E.; Witkowski, J. M. (2004). Decreased proliferative capability of CD4⁺ cells of elderly people is associated with faster loss of activation-related antigens and accumulation of regulatory T cells. *Exp. Gerontol.*, 39(4): 587-595.

Buffa, S.; Bulati, M.; Pellicanò, M.; Dunn-Walters, D. K.; Wu, Y. C.; Candore, G.; Vitello, S.; Caruso, C.; Colonna-Romano, G. (2011). B cell immunosenescence: different features of naïve and memory B cells in elderly. *Biogerontology*, 12(5): 473-483.

Burton, C. T.; Goodall, R. L.; Samri, A.; Autran, B.; Kelleher, A. D.; Poli, G.; Pantaleo, G.; Gotch, F. M.; Imami, N.; INITIO trial international co-ordinating committee. (2008). Restoration of anti-tetanus toxoid responses in patients initiating highly active antiretroviral therapy with or without a boost immunization: an INITIO substudy. *Cli. Exp. Immunol.*, 152(2): 252-257.

Butcher, S. K.; Chahal, H.; Nayak, L.; Sinclair, A.; Henriquez, N.V.; Sapey, E.; O'Mahony, D.; Lord, J. M. (2001). Senescence in innate immune responses: reduced

neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J. Leukoc. Biol.*, 70(6): 881-886.

Canaday, D. H.; Parker, K. E.; Aung, H.; Chen, H. E.; Nunez-Medina, D.; Burant, C. J. (2013). Age-dependent changes in the expression of regulatory cell surface ligands in activated human T-cells. *BMC Immunol.*, 14: 45.

Cardoso, S. W.; Torres, T. S.; Santini-Oliveira, M.; Maris, L. M. S.; Veloso, V. G.; Grinsztejn, B. (2013). Aging with HIV: a practical review. *Braz. J. Infect. Dis.*, 17(4): 464-479.

Chandler, H.; Peters, G. (2013). Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 25(6): 765-771.

Ciaramella, A.; Spalletta, G.; Bizzoni, F.; Salani, F.; Caltagirone, C.; Bossù, P. (2011). Effect of age on surface molecules and cytokine expression in human dendritic cells. *Cell. Immunol.*, 169(2): 82-89.

Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S. K.; Gallo, R. C.; Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*, 270(5243): 1811-1815.

Cooney, E. L. (2002). Clinical indicators of immune restoration following highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 224-233.

Costagliola, D. (2014). Demographics of HIV and aging. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 9: 294-301.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.*, 29: 621-663.

Cubas, R. A.; Mudds, J. C.; Savoye, A. L.; Perreau, M.; van Grevenynghe, J.; Metcalf, T.; Connick, E.; Meditz, A.; Freeman, G. J.; Abesada-Terk, G. Jr.; Jacobson, J. M.; Brooks, A. D.; Crotty, S.; Estes, J. D.; Pantaleo, G.; Lederman, M. M.; Haddad, E. K. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.*, 19(4): 494-499.

Czesnikiewicz-Guzik, M.; Lee, W.W.; Cui, D.; Hiruma, Y.; Lamar, D. L.; Yang, Z.Z.; Ouslander, J. G.; Weyand, C. M.; Goronzy, J. J. (2008). T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin. Immunol.*, 127(1):107-118.

D'Offizi G.; Montesano, C.; Agrati, C.; Gioia, C.; Amicosante, M.; Topino, S.; Narciso, P.; Pucillo, L. P.; Ippolito, G.; Poccia, F. (2002). Expansion of pre-terminally differentiated CD8 T cells in chronic HIV-positive patients presenting a rapid viral rebound during structured treatment interruption. *AIDS*, 16(18):2431-2438.

Darrah, P. A.; Hegde, S. T.; Patel, D. T.; Lindsay, R. W. B.; Chen, L.; Roederer, M.; Seder, R. A. (2010). IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J. Exp. Med.*, 207(7): 1421-1433.

De Clercq, E. (2007). The design of drugs for HIV and HCV. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6(12): 1001-1018.

Deng, Y.; Jing, Y.; Campbell, A. E.; Gravenstein, S. (2004). Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly, *J. Immunol.*, 172: 3437-3446.

Denys, A.; Udalova, I. A.; Smith, C.; Williams, L. M.; Ciesielski, C. J.; Campbell, J.; Andrews, C.; Kwiatkowski, D.; Foxwell, B. M. (2002). Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF- α production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF- κ B in primary human macrophages. *J. Immunol.*, 168(10): 4837-4845.

Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501): 439-446.

Dhingra, S.; Sharma, A. K.; Arora, R. C.; Slezak, J.; Singal, P. K. (2009). IL-10 attenuates TNF- α -induced NF- κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, 82(1):59-66.

Dorrington, M. G.; Bowdish, D. M. (2013). Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly. *Front. Immunol.*, 4: 171.

Dorshkind, K.; Montecino-Rodriguez, E.; Signer, R. A. (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become Young again? *Nat. Rev. Immunol.*, 9(1):57-62.

Douek, D. C.; Brenchley, J. M.; Betts, M. R.; Ambrozak, D. R.; Hill, B. J.; Okamoto, Y.; Casazza, J. P.; Kuruppu, J.; Kunstman, K.; Wolinsky, S.; Grossman, Z.; Dybul, M.; Oxenius, A.; Price, D. A.; Connors, M.; Koup, R. A. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature*, 417(6884): 95-98.

Eggena, M. P.; Barugahare, B.; Okello, M.; Mutyala, S.; Jones, N.; Ma, Y.; Kityo, C.; Mugenyi, P.; Cao, H. (2005a). T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4⁺ T cell depletion, and coinfection. *J. Infect. Dis.*, 191(5): 694-701.

Eggena, M. P.; Barugahare, B.; Jones, N.; Okello, M.; Mutalya, S.; Kityo, C.; Mugenyi, P.; Cao, H. (2005b). Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.*, 174(7): 4407-4414.

Elsaesser, H.; Sauer, K.; Brooks, D. G. (2009). IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science*, 324(5934): 1569-1672.

Ensoli, F.; Fiorelli, V.; Alario, C.; De Cristofaro, M.; Santini Muratori, D.; Novi, A.; Cunsolo, M. G.; Mazzeta, F.; Giovannetti, A.; Mollicone, B.; Pinter, E.; Aiuti, F. (2000). Decreased T cell apoptosis and T cell recovery during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin. Immunol.*, 97(1): 9-20.

Epple, H. J.; Loddenkemper, C.; Kunkel, D.; Tröger, H.; Maul, J.; Moos, V.; Berg, E.; Ullrich, R.; Schulzke, J. D.; Stein, H.; Duchmann, R.; Zeitz, M.; Schneider, T. (2006). Mucosal but not peripheral FOXP3⁺ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood*, 108(9): 3072-3078.

Fauci, A. S.; Pantaleo, G.; Stanley, S.; Weissman, D. (1996). Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann. Intern. Med.*, 124(7):654-663.

Fernandez, S.; Stone, S. F.; Price, P.; French, M. A. (2008). The number and function of circulating dendritic cells may limit effector memory CD4⁺ T-cell responses in HIV patients responding to antiretroviral therapy. *Clin. Immunol.*, 128(2): 228-237.

Franco, J. M.; Rubio, A.; Martínez-Moya, M.; Leal, M.; Merchante, E.; Sánchez-Quijano, A.; Lissen, E. (2002). T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood*, 99(10): 3702-3706.

Frankel, A. D.; Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:1-25.

Frasca, D.; Landin, A. M.; Lechner, S. C.; Ryan, J. G.; Schwartz, R.; Riley, R. L.; Blomberg, B. B. (2008). Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J. Immunol.*, 180: 5283-5290.

Frenck, R. W. Jr.; Blackburn, E. H.; Shannon, K. M. (1998). The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(10): 5607-5610.

Friedrich, B. M.; Dziuba, N.; Li, G.; Endsley, M. A.; Murray, J. L.; Ferguson, M. R. (2011). Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus Res.*, 161(2): 101-114.

Fröhlich, A.; Kisielow, J.; Schmitz, I.; Freigang, S.; Shamshiev, A. T.; Weber, J.; Marsland, B. J.; Oxenius, A.; Kopf, M. (2009). IL-21E on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science*, 324(5934): 1576-1580.

Fry, T. J.; Mackall, C. L. (2002). Interleukin-7 and immunorestitution in HIV: beyond the thymus. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 11(5): 803-807.

Gaardbo, J. C.; Hartling, H. J.; Gerstoft, J.; Nielsen, S. D. (2012). Incomplete immune recovery in HIVinfection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin. Dev. Immunol.*, 670957.

Geiger, H.; Denking, M.; Schirmbeck, R. (2014). Hematopoietic stem cell aging. *Curr. Opin. Immunol.*, 29: 86-92.

Geiger, H.; Haan, G.; Florian, M. C. (2013). The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat. Rev. Immunol.*, 13(5): 376-389.

George, V. K.; Pallikkuth, S.; Parmigiani, A.; Alcaide, M.; Fischl, M.; Arheart, K. L.; Pahwa, S. (2015). HIV infection worsens age-associated defects in antibody responses to Influenza vaccine. *J. Infect. Dis.*

Goronzy, J. J.; Li, G.; Yang, Z.; Weyand, C. M. (2013). The Janus head of T cell aging – autoimmunity and immunodeficiency. *Front. Immunol.*, 4:131

Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. (2013). Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.*, 14(5): 428-436.

Grabar, S.; Kousignianb, I.; Sobelc, A.; Le Brasd, P.; Gasnaultd, J.; Enele, P. (2004). Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS*, 18: 2029-2038.

Grabar, S.; Weiss, L.; Costagliola, D. (2006). HIV infection in older patients in the HAART era. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57(1):4-7.

Gregg, R.; Smith, C. M.; Clark, F. J.; Dunnion, D.; Khan, N.; Chakraverty, R.; Nayak, L.; Moss, P. A. (2005). The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin. Exp. Immunol.*, 140(3): 540-546.

Gupta, S.; Gollapudi, S. (2006). TNF- α -induced apoptosis in human naïve and memory CD8⁺ T cells in aged humans. *Exp. Gerontol.*, 41: 68-77.

Gupta, S.; Gollapudi, S. (2008). CD95-mediated apoptosis in naïve, central and effector memory subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in aged humans. *Exp. Gerontol.*, 43(4): 266-274.

Hainz, U.; Jenewein, B.; Asch, E.; Pfeiffer, K. P.; Berger, P.; Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Insufficient protection for healthy elderly adults by tetanus and TBE vaccines. *Vaccine*, 23(25): 3232-3235.

Haraguchi, S.; Day, N. K.; Kamchaisatian, W.; Beigier-Pompadre, M.; Stenger, S.; Tangsinmankong, N.; Sleasman, J. W.; Pizzo, S. V.; Cianciolo, G. J. (2006). LMP-420, a small-molecule inhibitor of TNF- α , reduces replication of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis in human cells. *AIDS Res. Ther.*, 3: 8.

Hasse, B.; Ledergerber, B.; Furrer, H.; Battegay, M.; Hirschel, B.; Cavassini, M.; Bertisch, B.; Bernasconi, E.; Weber, R.; the Swiss HIV Cohort Study. (2011). Morbidity and Aging in HIV-Infected Persons: The Swiss HIV Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.*, 53(11): 1140-1142.

Hayakawa, T.; Iwai, M.; Aoki, S.; Takimoto, K.; Maruyama, M.; Maruyama, W.; Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PlosOne*, 10(1): e0116480.

Hazeldine, J.; Harris, P.; Chapple, I. L.; Grant, M.; Greenwood, H.; Livesey, A.; Sapey, E.; Lord, J. M. (2014). Impaired neutrophil extracellular trap formation: a

novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*, 13(4): 690-698.

He, Y.; Li, J.; Zheng, Y.; Luo, Y.; Zhou, H.; Yao, Y.; Chen, X.; Chen, Z.; He, M. (2012). A randomized case-control study of dynamic changes in peripheral blood Th17/Treg cell balance and interleukin-17 levels in highly active antiretroviral-treated HIV type 1/AIDS patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 28(4): 339-345.

Hunt, P. W. (2010). Th17, gut, and HIV: therapeutic implications. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 5(2): 189-193.

Kalayjian, R. C.; Spritzler, J.; Matining, R. M.; Fiscus, S. A.; Gross, B. H.; Francis, I. R.; Pollard, R. B.; Lederman, M. M.; Landay, A. (2013). Older HIV-infected patients on antiretroviral therapy have B-cell expansion and attenuated CD4 cell increases with immune activation reduction. *AIDS*, 27(10): 1563-1571.

Kastirr, I.; Maglie, S.; Paroni, M.; Alfen, J.S.; Nizzoli, G.; Sugliano, E.; Crosti, M. C.; Moro, M.; Steckel, B.; Steinfeld, S.; Stölzel, K.; Romagnani, C.; Botti, F.; Caprioli, F.; Pagani, M.; Abrignani, S.; Geginat, J. (2014). IL-21 is a central memory T cell-associated cytokine that inhibits the generation of pathogenic Th17/17 effector cells. *J. Immunol.*, 193(7): 3322-3331.

Khurana, S.; Frasca, D.; Blomberg, B.; Golding, H. (2012). AID activity in B cells strongly correlates with polyclonal antibody affinity maturation *in-vivo* following pandemic 2009-H1N1 vaccination in humans. *PLoS Pathog.*, 8(9): e1002920.

Kilpatrick, R. D.; Rickabaugh, T.; Hultin, L. E.; Hultin, P.; Hausner, M. A.; Detels, R.; Phair, J.; Jamieson, B. D. (2008). Homeostasis of the naïve CD4⁺ T cell compartment during aging. *J. Immunol.*, 180: 1499-1507.

Koetz, K.; Bryl, E.; Spickschen, K.; O'Fallon, W. M.; Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. (2000). T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(16):9203-9208.

Kohler, A.; Schmithorst, V.; Filippi, MD.; Ryan, M. A.; Daria, D.; Gunzer, M.; Geiger, H. (2009). Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood*, 114: 290-298.

Kolte, L., Dreves, A. M., Ersboll, A. K., Strandberg, C., Jeppesen, D. L., Nielsen, J. O., Ryder, L. P.; Nielsen, S. D. (2002). Association between larger thymic size and higher thymic output in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.*, 185(11): 1578-1585.

Kryworuchko, M.; Pasquier, V.; Thèze, J. (2003). Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit interleukin-2-induced Jak/STAT signaling in human CD4 T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 131(3): 422-427.

Lane, H. C. Pathogenesis of HIV infection: total CD4⁺ T-cell pool, immune activation, and inflammation. *Top. HIV Med.*, 18(1): 2-6.

Lang, D. J.; Kovacs, A. A.; Zaia, J. A.; Doelkin, G.; Niland, J. C.; Aledort, L.; Azen, S. P.; Fletcher, M. A.; Gauderman, J.; Gjerset, G. J.; Lusher, J.; Operskalski, E. A.; Parker, J. W.; Pegelow, C.; Vyas, G. N.; Mosley, J. W. (1989). Seroepidemiologic studies of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus onfections in relation to human immunodeficiency virus type 1 infection in selected recipient populations. Transfusion Safety Study Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2(6): 540-549.

Lapadula, G.; Cozzi-Lepri, A.; Marchetti, G.; Antinori, A.; Chiodera, A.; Nicastri, E.; Parruti, G.; Galli, M.; Gori, A.; Monforte, A. d.; ICONA Foundation Study. (2013). Risk of clinical progression among patients with immunological nonresponse despite virological suppression after combination antiretroviral treatment. *AIDS*, 27(5): 769-779.

Larbi, A.; Pawelec, G.; Wong, S. C.; Goldeck, D.; Tai, J. J.; Fulop, T. (2011). Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? *Ageing Res. Rev.*, 10(3): 370-378.

Lawn, S. D.; Butera, S. T.; Folks, T. M. (2001). Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(4): 753-777.

Lawn, S. D.; Wilkison, R. J. (2006). Immune reconstitution disease associated with parasitic infections following antiretroviral treatment. *Parasite Immunol.*, 28(11): 625-633.

Lee, S. A.; Sinclair, E.; Hatano, H.; Hsue, P. Y.; Epling, L.; Hecht, F. M.; Bangsberg, D. R.; Martin, J. N.; McCune, J. M.; Deeks, S. G.; Hunt, P. W. (2014). Impact of HIV on CD8⁺ T cell CD57 expression is distinct from thar of CMV and aging. *PLoS One*, 9(2):e89444.

Leng, Q.; Bentwich, Z.; Magen, E.; Kalinkovich, A.; Borkow, G. (2002). CTLA-4 upregulation during HIV infection: association with anergy and possible target for therapeutic intervention. *AIDS*, 16(4): 519-529.

Levy, M. Z.; Allsopp, R. C.; Futcher, A. B.; Greider, C. W.; Harley, C. B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.*, 225(4): 951-960.

Li, D.; Chen, J.; Jia, M.; Hong, K.; Ruan, Y.; Liang, H.; Liu, S.; Zhang, X.; Zhao, H.; Peng, H.; Ma, P.; Shao, Y. (2011). Loss of balance between T helper type 17 and regulatory T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 165(3): 363-371.

Li, X.; Margolick, J. B.; Jamieson, B. D.; Rinaldo, C. R.; Phair, J. P.; Jacobson, L. P. (2011). CD4⁺ T-cell counts and plasma HIV-1 RNA levels beyond 5 years of highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 57: 421-428.

- Lieberman, J.; Shankar, P.; Manjunath, N.; Andersson, J. (2001). Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood*, 98(6): 1667-1677.
- Lin, Y.; Damjanovic, A.; Metter, E. J.; Nguyen, H.; Truong, T.; Najarro, K.; Morris, C.; Longo, D. L.; Zhan, M.; Ferrucci, L.; Hodes, R. J.; Weng, N. P. (2015). Age-associated telomere attrition of lymphocytes in vivo is co-ordinated with changes in telomerase activity. *Clin. Sci (Lond)*., 128(6): 367-377.
- Lindqvist, M.; van Lunzen, J.; Soghoian, D. Z.; Kuhl, B. D.; Ranasinghe, S.; Kranias, G.; Flanders, M. D.; Cutler, S.; Yudanin, N.; Muller, M. I.; Davis, I.; Farber, D.; Hartjen, P.; Haag, F.; Alter, G.; Schulze zur Wiesch, J.; Streeck, H. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J. Clin. Invest.*, 122(9): 3271-3280.
- Loscher, C. E.; Draper, E.; Leavy, O.; Kelleher, D.; Mills, K. H.; Roche, H. M. (2005). Conjugated linoleic acid suppresses NF- κ B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J. Immunol.*, 175(8): 4990-4998.
- Maartens, G.; Celum, C.; Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*, 384(9939): 258-271.
- Mahbub, S.; Deburghgraeve, C. R.; Kovacs, E. J. (2012). Advanced age impairs macrophage polarization. *J. Interferon Cytokine Res.*, 32(1): 18-26.
- Malzahn, J.; Shen, C.; Caruso, L.; Ghosh, P.; Sankapal, S. R.; Barratt-Boyes, S.; Gupta, P.; Chen, Y. (2012). Effect of early anti-retroviral therapy on the pathogenic changes in mucosal tissues of SIV infected rhesus macaques. *Viol. J.*, 9: 269.
- Mangino, G.; Percario, Z. A.; Fiorucci, G.; Vaccari, G.; Acconcia, F.; Chiarabelli, C.; Leone, S.; Noto, A.; Horenkamp, F. A.; Manrique, S.; Romeo, G.; Polticelli, F.; Geyer, M.; Affabris, E. (2011). HIV-1 Nef induces proinflammatory state in macrophages through its acidic cluster domain: involvement of TNF- α receptor associated factor 2. *PLoS One.*, 6(8):e22982.
- Marchetti, G.; Tincati, C.; Silvestri, G. (2013). Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(1): 2-18.
- Martins, M.; Modesti, M.; Ginaldi, L. (2004). Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. *Immunol. Cell Biol.*, 82(4): 415-420.
- Mathur S. K.; Schwantes, E. A.; Jarjour, N. N.; Busse, W. W. (2008). Age-related changes in eosinophil function in human subjects. *Chest*, 133(2): 412-419.
- McGowan, I.; Elliott, J.; Fuerst, M.; Taing, P.; Boscardin, J.; Poles, M.; Anton, P. (2004). Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 37: 1228-1236.

McMahon, C. W.; Raulet, D. H. (2001). Expression and function of NK cell receptors in CD8⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 13(4): 465-470.

Milstein, O., Hagin, D., Lask, A., Reich-Zeliger, S., Shezan E., Ophir E., Eidelstein Y., Afik R., Antebi YE., Dustin ML. and Reisner Y. (2011) CTLs respond with activation and granule secretion when serving target for T cell recognition. *Blood* 117,1042-1052

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapeuticas para Adultos Vivendo com HIV / AIDS. Brasília, 2013. p.75.

Mocroft, A.; Reiss, P.; Gasiowski, J.; Ledergerber, B.; Kowalska, J.; Chiesi, A.; Gatell, J.; Rakhmanova, A.; Johnson, M.; Kirk, O.; Lundgren, J.; The EuroSIDA Study Group. (2010). Serious fatal and nonfatal non-AIDS-defining illnesses in Europe. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 55: 262-270.

Mohr, E.; Cunningham, A. F.; Toellner, K. M.; Bobat, S.; Coughlan, R. E.; Bird, R. A.; MacLennan, I. C.; Serre, K. (2010). IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(40): 17292-17297.

Montecino-Rodriguez, E.; Berent-Maoz, B.; Dorshkind, K. (2013). Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J. Clin. Invest.*, 123(3): 958-965.

Moore, R. D.; Keruly, J. C. (2007). CD4⁺ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression. *Cli. Infect. Dis.*, 44(3): 441-446.

Moro-García, M. A.; Alonso-Arias, R.; López-Larrea, C. (2012). Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. *Curr. Genomics*, 13: 589-602.

Moro-García, M. A.; Alonso-Arias, R.; López-Larrea, C. (2013). When aging reaches CD4⁺ T-cells: phenotypic and functional changes. *Front. Immunol.*, 4: 107.

Mueller, S. N.; Gebhardt, T.; Carbone, F. R.; Heath, W. R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.*, 31:137-161.

Nguyen, N.; Holodniy, M. (2008). HIV infection in the elderly. *Clin. Interv. Aging*, 3(3): 453-472.

Nyamweya, S.; Hegedus, A.; Jaye, A.; Rowland-Jones, S.; Flanagan, K. L.; Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.*, 23(4): 221-240.

Operskalski, E. A.; Stram, D. O.; Lee, H.; Zhou, Y.; Donegan, E.; Busch, M. P.; Stevens, C. E.; Schiff, E. R.; Dietrich, S. L.; Mosley, J. W. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 infection: Relationship of risk group and age to rate of progression to AIDS. *J. Infect. Dis.*, 172(3): 648-655.

- Osorio, A. A.; Muñóz, A.; Torres-Romero, D.; Bedoya, L. M.; Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Alcamí, J.; Bazzocchi, I. L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependent transcription. *Eur. J. Med. Chem.*, 52: 295-303.
- Pallikkuth, S.; Parmigiani, A.; Pahwa, S. (2012). Role of IL-21 and IL-21 receptor on B cells in HIV infection. *Crit. Rev. Immunol.*, 32(2): 173-195.
- Panda, A.; Arjona, A.; Sapey, E.; Bai, F.; Fikrig, E.; Montgomery, R. R.; Lord, J. M.; Shaw, A. C. (2009). Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.*, 30(7): 325-333.
- Panda, A.; Qian, F.; Mohanty, S.; Duin, D.; Newman, F. K.; Zhang, L.; Chen, S.; Towle, V.; Belshe, R. B.; Fikrig, E.; Allore, H. G.; Montgomery, R. R.; Shaw, A. C. (2010). Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts Influenza vaccine response. *J. Immunol.*, 184: 2518-2527.
- Pang, W. W.; Price, E. A.; Sahoo, D.; Beerman, I.; Maloney, W. J.; Rossi, D. J.; Schrier, S. L.; Weissman, I. L. (2011). Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(50): 20012-20017.
- Pathai, S.; Bajillan, H.; Landay, A. L.; High, K. P. (2014). Is HIV a model of accelerated or accentuated aging? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 69(7): 833-842.
- Perreau, M.; Savoye, A. L.; DeCrignis, E.; Corpataux, J. M.; Cubas, R.; Haddad, E. K.; De Leval, L.; Graziosi, C.; Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J. Exp. Med.*, 210(1): 143-156.
- Pomerantz, R. J.; Horn, D. L. (2003). Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.*, 9(7): 867-873.
- Pontesilli, O.; Kerkhof-Garde, S.; Notermans, D. W.; Foudraine, N. A.; Roos, M. T.; Klein, M. R.; Danner, S. A.; Lange, J. M.; Miedema, F. (1999). Functional T cell reconstitution and human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity during highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.*, 180(1): 76-86.
- Rickabaugh, T. M.; Jamieson, B. D. (2010). A challenge for the future: aging and HIV infection. *Immunol. Res.*, 48(1-3): 59-71.
- Rickabaugh, T. M.; Kilpatrick, R. D.; Hultin, L. E.; Hultin, P. M.; Hausner, M. A.; Sugar, C. A.; Althoff, K. N.; Margolick, J. B.; Rinaldo, C. R.; Detels, R.; Phair, J.; Effros, R. B.; Jamieson, B. D. (2011). The dual impact of HIV-1 infection and aging on naïve CD4 T-cells: additive and distinct patterns of impairment. *PLoS One*, 6(1):e16459.
- Rodier, F.; Coppé, JP.; Patil, C. K.; Hoeijmakers, W. A. M.; Munoz, D. P.; Raza, S. R.; Freund, A.; Campeau, E.; Davalos, A. R.; Campisi. (2009). Persistent DNA

damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.*, 11(8): 973-979.

Rodriguez, N.; Yano, N.; Eylar, E.; Yamamura, Y. (1997). Mechanisms associated with defective Th1 cytokine production in HIV infection. *Cell Mol. Biol.*, 43(7): 951-958.

Sachdeva, N.; Asthana, V.; Brewer, T. H.; Garcia, D.; Asthana, D. (2008). Impaired restoration of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected patients with poor CD4 T cell reconstitution is associated with decreased in capacity to produce IFN- α but not proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 181(4): 2887-2897.

Schatz, D.; Ellis, T.; Ottendorfer, E.; Jodoin, E.; Barrett, D.; Atkinson, M. (1998). Aging and the immune response to tetanus toxoid: diminished frequency and level of cellular immune reactivity to antigenic stimulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5(6): 894-896.

Schoenberger, S. P.; Toes, R. E.; van der Voort, E. L.; Offringa, R.; Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393(6684): 480-483.

Schwartz, O.; Maréchal, V.; Le Gall, S.; Lemonnier, F.; Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.*, 2(3): 338-342.

Seidler, S.; Zimmermann, H. W.; Bartneck, M.; Trautwein, C.; Tacke, F. (2010). Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol.*, 11: 30.

Shankar, P.; Russo, M.; Harnisch, B.; Patterson, M.; Skolnik, P.; Lieberman, J. (2000). Impaired function of circulating HIV-specific CD8⁺ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*, 96(9): 3094-3101.

Shaw, A. C.; Joshi, S.; Greenwood, H.; Panda, A.; Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 22(4): 507-513.

Shin, H. D.; Winkler, C.; Stephens, J. C.; Bream, J.; Young, H.; Goedert, J. J.; O'Brien, T. R.; Vlahov, D.; Buchbinder, S.; Giorgi, J.; Rinaldo, C.; Donfield, S.; Willoughby, A.; O'Brien, S. J.; Smith, M. W. (2000). Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL-10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(26): 14467-14472.

Shulman, Z.; Gitlin, A. D.; Targ, S.; Jankovic, M.; PasquaL, G.; Nussenzweig, M. C.; Victora, G. D. (2013). T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science*, 341(6146): 673-677.

Snoeck, H. W. (2013). Aging of the hematopoietic system. *Curr. Opin. Hematol.*, 20: 355-361.

Song, Z.; Figura, G.; Liu, Y.; Kraus, J. M.; Torrice, C.; Dillon, P.; Rudolph-Watabe, M.; Ju, Z.; Kestler, H. A.; Sanoff, H.; Rudolph, K. L. (2010). Lifestyle impacts on the aging associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood. *Aging cell*, 9(4): 607-615.

Spitsin, S.; Tustin, N. B.; Riedel, E.; Tustin, R. III; Murray, J. B.; Peck, L. M.; Khan, M.; Quinn, J.; Douglas, S. D. (2012). Programmed death 1 receptor changes ex vivo in HIV-infected adults following initiation of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 19(5): 752-756.

Sputova, K.; Garbe, J. C.; Pelissier, F. A.; Chang, E.; Stampfer, M. R.; LaBarge, M. A. (2013). Aging phenotypes in cultured normal human mammary epithelial cells are correlated with decreased telomerase activity independent of telomere length. *Genome Integr.*, 4(1): 4.

Sridharan, A.; Esposito, M.; Kaushal, K.; Tay, J.; Osann, K.; Agrawal, S.; Gupta, S.; Agrawal, A. (2011). Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. *Age*, 33(3): 363-376.

Stein, J. H.; Hsue, P. Y. (2012). Inflammation, immune activation, and CVD risk in individuals with HIV infection. *JAMA*, 308(4): 405-406.

Stolp, B.; Fackler, O. T. (2011). How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. *Viruses*, 3(4): 293-311.

Streeck, H.; van Bockel, D.; Kelleher, A. (2008). T-cell responses in primary HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 3(1):52-59.

Strioga, M.; Pasukoniene, V.; Characiejus, D. (2011). CD8⁺CD28⁻ and CD8⁺CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology*, 134(1): 17-31.

Tangye, S. G.; Ma, C. S.; Brink, R.; Deenick, E. K. (2013). The good, the bad and the ugly – TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 13(6): 412-426.

Tenorio, A. R., Spritzler, J., Martinson, J., Gichinga, C. N., Pollard, R. B., Michael, M., Lederman, M. M., Kalayjian, R. C.; Landay, A. L. (2009). The effect of aging on T-regulatory cell frequency in HIV infection. *Clin. Immunol.*, 130(3): 298-303.

Tilling, R.; Kinloch, S.; Goh, L. E.; Cooper, D.; Perrin, L.; Lampe, F.; Zaunders, J.; Hoen, B.; Tsoukas, C.; Andersson, J.; Janossy, G.; Quest Study Group. (2002). Parallel decline of CD8⁺CD38⁺⁺ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS*, 16(4): 589-596.

Trimble, L. A.; Lieberman, J. (1998). Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood*, 91(2): 585-594.

Tuljapurkar, S. R.; McGuire, T. R.; Brusnahan, S. K.; Jackson, J. D.; Garvin, K. L.; Kessinger, M. A.; Lane, J. T.; O'Kane, B., J.; Sharp, J. G. (2011). Changes in human

bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J. Anat.*, 219: 574-581.

UNAIDS. Global Report. 2012. 212 p.

van der Geest, K. S.; Abdulahad, W. H.; Tete, S. M.; Lorencetti, P. G.; Horst, G.; Bos, N. A.; Kroesen, B. J.; Brouwer, E.; Boots, A. M. (2014). Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4⁺ T cells. *Exp. Gerontol.*, 60: 190-196.

Duin, D.; Mohanty, S.; Thomas, V.; Ginter, S.; Montgomery, R. R.; Fikrig, E.; Allore, H. G.; Medzhitov, R.; Shaw, A. C. (2007). Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J. Immunol.*, 178: 970-975.

Viard, J. P., Mocroft, A., Chiesi, A., Kirk, O., Roge, B., Panos, G., Vetter, N., Bruun, J. N., Johnson, M.; Lundgreen, J. D. (2001). Group EuroSIDA Study Group. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J. Infect. Dis.*, 183: 1290-1294.

Walker, C. M.; Moody, D. J.; Stites, D. P.; Levy, J. A. (1986). CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science*, 234(4783): 1563-1566.

Wang, X.; Zhang, Z.; Zhang, S.; Fu, J.; Yao, J.; Jiao, Y.; Wu, H.; Wang, F. S. (2008). B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur. J. Immunol.*, 38(11): 3226-3236.

Weissman, D.; Montaner, L. J. (2002). Immune reconstitution. *Clin. Lab. Med.*, 22(3): 719-740.

Wenisch, C.; Patruta, S.; Daxböck, F.; Krause, R.; Hörl, W. (2000). Effect of age on human neutrophil function. *J. Leukoc. Biol.*, 67(1): 40-45.

Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.*, 12(6): 492-499.

Wilson, E. M. P.; Sereti, I. (2013). Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunol. Rev.*, 254(1): 343-354.

Wu, P. Y.; Chen, M. Y.; Hsieh, S. M.; Sun, H. Y.; Tsai, M. S.; Lee, K. Y.; Liu, W. C.; Yang, S. P.; Luo, Y. Z.; Zhang, J. Y.; Sheng, W. H.; Hung, C. C. (2014). Comorbidities among the HIV-infected patients aged 40 years or older in Taiwan. *PLoS One*, 9(8):e104945.

Yahata, T.; Takanashi, T.; Mugeruma, Y.; Ibrahim, A. A.; Matsuzawa, H.; Uno, T.; Sheng, Y.; Onizuka, M.; Ito, M.; Kato, S.; Ando, K. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 118(11): 2941-2950.

Ye, P.; Kirschner, D. E.; Kourtis, A. P. (2004). The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Curr. HIV Res.*, 2(2): 177-183.

Yi, J. S.; Du, M.; Zajac, A. J. (2009). A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*, 324(5934): 1572-1576.

Yu, M.; Li, G.; Lee, WW.; Yuan, M.; Cui, D; Weyand, C. M.; Goronzy, J. J. (2012). Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(15): E879-888.

Zhang, J. Y.; Zhang, Z.; Wang, X.; Fu, J. L.; Yao, J.; Jiao, Y.; Chen, L.; Zhang, H.; Wei, J.; Jin, L.; Shi, M.; Gao, G. F.; Wu, H.; Wang, F. S. (2007). PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, 109(11): 4671-4678.

Zhao, C.; Papadopoulou, B.; Tremblay, M. J. (2004). *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 α . *J. Immunol.*, 172(5): 3086-3093.

VIII. ANEXOS



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 10 de junho de 2003

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Dr^a. Cleonice Alves de M. Bento

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (755-CEP/HUPE) "RELAÇÃO ENTRE A CINÉTICA DA REPLICAÇÃO VIRAL E RECONSTITUIÇÃO EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1: IMPACTO DE DIFERENTES ESQUEMAS ANTI-RETROVIRAIS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2

Classificação do CDC

Categorias Laboratoriais (T CD4 ⁺)	Categorias Clínicas		
	A Assintomático ou Infecção aguda pelo HIV ou Linfadenopatia generalizada persistente	B Condições sintomáticas (*) não A ou não B	C Condições indicativas de aids (**)
(1) ≥ 500	A1	B1	C1
(2) 200 a 499	A2	B2	C2
(3) < 200	A3	B3	C3

(*)

Categorias B: definidas como condições sintomáticas ocorrendo em adulto ou adolescente infectado pelo HIV que apresente pelo menos um dos seguintes critérios:

a) sejam atribuídas à infecção pelo HIV ou indiquem um defeito na imunidade celular;

b) tenham o curso clínico complicado pela infecção pelo HIV.

Alguns exemplos (entre outros):

- Angiomatose bacilar
- Candidíase orofaríngea
- Candidíase vulvovaginal persistente ou resistente
- Doença inflamatória pélvica
- Displasia cervical (moderada ou severa) / carcinoma cervical in situ
- Leucoplasia pilosa oral
- Púrpura trombocitopênica idiopática
- Sintomas constitucionais, tais como febre (> 38,5° C) ou diarreia com duração maior que 1 mês

- Neuropatia periférica

- Herpes zoster, envolvendo 2 ou mais episódios ou 1 ou mais dermatômos

(**)

Categorias C: Condições indicativas de AIDS :

- Pneumonia bacteriana recorrente (2 ou mais episódios em 12 meses)
- Candidíase de brônquios, traquéia ou pulmões
- Candidíase esofageana
- Carcinoma cervical invasivo, confirmado por biópsia
- Coccidioidomicose disseminada ou extrapulmonar
- Criptococose extrapulmonar
- Criptosporidiose crônica intestinal (duração > 1 mês)
- Doença por citomegalovírus (outra além de fígado, baço ou gânglios)
- Encefalopatia relacionada ao HIV
- Herpes simples: úlceras crônicas (duração > 1 mês), ou bronquite, pneumonite ou

esofagite

- Histoplamose disseminada ou extrapulmonar
- Isosporíase intestinal crônica (duração > 1 mês)
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoma de Burkitt, imunoblástico ou primário do SNC
- Micobacteriose (M.avium ou M.Kansasii) disseminada ou extrapulmonar
- Tuberculose pulmonar ou extrapulmonar
- Outras espécies de Micobactérias ou espécies não identificadas, disseminadas ou

extrapulmonares

- Pneumonia por Pneumocystis jiroveci (P.carinii)
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva
- Septicemia recorrente por Salmonella (não-tifóide)
- Toxoplasmose cerebral
- Síndrome consumitiva devida ao HIV (perda de peso involuntária > 10%), associada

com diarreia crônica

(2 ou mais evacuações por dia, por 1 mês ou mais) ou fraqueza crônica e febre documentada por 1 mês ou mais.

Fonte: http://www.previdencia.gov.br/arquivos/office/4_110831-181722-268.pdf