

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Lúcia Renata Meireles de Souza

Análise de aspectos fenotípicos e funcionais de células CD8 positivas na infecção *in vitro* pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello Branco

RIO DE JANEIRO

2003

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S729

Souza, Lúcia Renata Meireles de.

Análise de aspectos fenotípicos e funcionais de células CD8 positivas na infecção *in vitro* pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 / Lúcia Renata Meireles de Souza. – Rio de Janeiro, 2003.

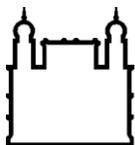
xxiii, 232 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2003.

Bibliografia: f. 167-220

1. HIV-1. 2. CD8. 3. Citocinas yc. 4. Supressão viral. I. Título.

CDD 616 5993



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LÚCIA RENATA MEIRELES DE SOUZA

**Análise de aspectos fenotípicos e funcionais de células CD8 positivas na infecção *in vitro*
pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello Branco

Aprovada em: 19/12/2003

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Vera Bongertz, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ - Presidente

Prof. Dra. Maria do Carmo Leite de Moraes, Hôpital Necker, CNRS, Paris, França

Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez, IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2003

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ e no *Department of Infectious Diseases, St. George's Hospital Medical School* em Londres, Inglaterra, sob a orientação do Dr. Luiz Roberto R. Castello Branco e co-orientação do Dr. Robin J. Shattock.

O presente trabalho recebeu os seguintes financiamentos: CAPES-PICDT-UFES e CAPES-PDEE-FIOCRUZ-RJ e *Medical Research Council (UK)* G9803142.

Dedico esta tese a todos os que já passaram pela minha vida e continuam como um tesouro no meu coração, aos que são verdadeiros e preciosos “presentes”, e a todos os que ainda espero conhecer e me encantar com...

Agradeço,

Em primeiro lugar a Deus, que não só me criou, mas se fez Amigo...e a todos que me revelam ou foram testemunho do seu Amor.

À minha família, por todo o carinho e suporte sempre... em especial, à minha avó, *in memoriam*.

Ao Luiz Roberto, por ter me aceito em seu laboratório e me introduzido à pesquisa clínica. Seu exemplo de respeito aos pacientes ficou guardado com admiração. Muito obrigada por todo apoio e orientação.

Aos pacientes do Ambulatório da Providência, e aos da CASA (Casa de Acolhida Santo Antônio), por permitirem coleta de amostras e dados; mas, sobretudo, pelo que me ensinaram como pessoas. Embora estes dados não façam parte desta tese, vocês fazem parte da minha história de vida.

Às irmãs Estela, Ester, Ana e Lourdes, responsáveis pela acolhida dos pacientes com AIDS na CASA, pelo seu exemplo de Amor incondicional.

À Dra. Maria Inês Linhares de Carvalho, por permitir o acompanhamento de pacientes no Ambulatório do Banco da Providência e na CASA. Parabéns a toda sua equipe por esse belíssimo trabalho.

À Dra Marisa Gonçalves Morgado e à Dra Vera Bongertz, por permitirem acesso ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, e ao colega Ivan Neves Júnior por ensinar a técnica de contagem de CD4/CD8 em citometria de fluxo. Obrigada a vocês pela disponibilidade.

Ao Dr. Trugo, *in memoriam*, por ter aberto seu laboratório ao aprendizado e dosagem de vitaminas em HPLC.

À Tereza Wady, pelas dicas de Nutrição Clínica.

À Leila e Silvana, pela amizade e companheirismo durante a fase de pesquisa clínica, e fora dela!

À Rosa, Renata, Luciana e Júlio por toda a ajuda e apoio no Laboratório de Imunologia Clínica.

A todos os meus colegas e amigos do Departamento de Imunologia da FOCRUZ, pelas ajudas, empréstimos de material, dicas, etc. À Sílvia, Ivone, Ricardo, pelo suporte indispensável.

To Dr. Andrew R. Freedman, my gratitude for the opportunity to develop a *PhD sandwich* program at the *University of Wales College of Medicine (Cardiff-UK)*.

À Cátia, brasileira, Ângela, portuguesa e, Kiran, indiana, por nossa amizade “pluri-continental”. Obrigada por todo o apoio e belos momentos que passamos em Cardiff. Obrigada também à família da Ângela pela sua acolhida no Natal que passamos em Portugal.

À Bela, Charlie e Marta, pela amizade “em português” no *St. George’s*.

À Patrícia, minha companheira de alojamento no *St. George’s*, que se tornou uma grande amiga.

To all the staff of Dept. Infectious Diseases at *St. George’s Hospital Medical School, University College of London*, my gratitude for the friendly and scientifically stimulating environment.

To my great collaborators in this work: Claire Cassar, Dave Derry, Trish (Patricia Phelps) and Quin Hu, I’m very grateful for all the help and support. Thanks a lot!

To Dr. Fran Gibson, I’m very grateful for the supervision and help developing flow cytometry protocols and analysis.

To Dr. Robin Shattock, my forever gratitude for all the supervision and friendly support I received during my stay and visits to *St George’s*. Thank you so much!

À Dra Vera Bongertz, pela criteriosa revisão desta tese. Obrigada pela sua atenção.

A todos os que também criticaram e contribuíram para a finalização deste trabalho: Lúcia Batista, Maria Helena, Leila...e, em especial, Claudinha, meu muito obrigado!

...todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus...

Carta de São Paulo aos Romanos 8, 28



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

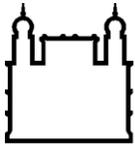
ANÁLISE DE ASPECTOS FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DE CÉLULAS CD8 POSITIVAS NA INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Lúcia Renata Meireles de Souza

Células CD8⁺ participam do controle da infecção pelo HIV-1 através de atividades citolítica e não-citolítica (supressora da replicação viral). Contudo, durante a progressão da infecção, são observadas alterações em sua diferenciação e função. Várias razões para tal são postuladas, incluindo a suscetibilidade do próprio linfócito T CD8⁺ à infecção pelo HIV-1. Neste estudo, analisamos os efeitos da infecção *in vitro* pelo HIV-1 sobre o fenótipo de células CD8⁺. Comparado às culturas não-infectadas, observamos aumento de células CD8⁺ CD57⁺ e CD45RO⁺, bem como daquelas de estágio intermediário, enquanto a expressão do fenótipo *naive* diminuiu, sem que houvesse aquisição do fenótipo efetor, padrão este mais evidente em culturas infectadas por vírus X4 que R5, e semelhante ao que é encontrado *in vivo*. A função da população expandida CD8⁺CD57⁺ foi avaliada em um segundo estudo e, ao inibir a proliferação celular, inibe, desse modo, a replicação viral. Nosso terceiro estudo objetivou analisar se a infecção produtiva de células CD8⁺ pelo HIV-1 afetaria seu papel na supressão viral. Nestes experimentos *in vitro*, utilizamos citocinas γ c que se apresentam alteradas na infecção pelo HIV-1, tais como IL-2, IL-7 e IL-15. Paradoxalmente, IL-2 e IL-15 modulam ambos os papéis exercidos por células CD8⁺ na infecção, como alvos e supressores de replicação viral. Em parte, isto se explica pela cinética mais lenta do vírus nestas células CD8⁺, tornando-as reservatórios em potencial. Ainda, como células dendríticas (DC) produzem IL-15, avaliamos em um quarto estudo se esta citocina, de forma endógena ou exógena, afetaria a suscetibilidade e atividade antiviral de células CD8⁺ frente ao HIV-1 em co-cultura com DC autólogas. De fato, IL-15 parece ser um importante estímulo para a atividade supressora de células CD8⁺ neste modelo mais fisiológico de replicação viral, embora também promova a infecção das mesmas células CD8⁺ quando em co-cultura com DC. Esta infecção após contato com DC autólogas pulsadas com HIV-1 poderia ser explicada pela co-expressão de CD4 e CXCR4, provavelmente facilitada pela interação CD28/B7, já que encontramos em células CD8⁺CD28⁺ níveis maiores de expressão destes receptores, bem como maior produtividade de HIV-1, que em células CD8⁺CD28⁻. Portanto, terapias que utilizem as citocinas γ c IL-2 ou IL-15 devem levar em consideração não só a ativação de reservatórios de células CD4⁺, mas também de células CD8⁺.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE DE ASPECTOS FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DE CÉLULAS CD8 POSITIVAS NA INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1.

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Lúcia Renata Meireles de Souza

CD8⁺ T cells contribute to control HIV-1 infection via cytotoxic and non-lytic suppressor activities. However, during progression of disease, it is observed that CD8⁺ T cells present impairment of differentiation and function. Many reasons for this disturbance in the physiology of CD8⁺ cells are discussed, including their own susceptibility to HIV-1 infection. In this study, we analysed the effects of *in vitro* HIV-1 infection on phenotype of CD8⁺ cells. Compared to non-infected cultures, there was an increase of CD57⁺ and CD45RO⁺ CD8⁺ T cells, with diminished expression of the *naïve* phenotype. On the other hand, the activated/memory as well as the intermediary subset were augmented, without acquisition of the effector phenotype, a pattern similar to that observed *in vivo*, and more clearly seen in cultures infected by X4 than R5 virus. We then evaluated in a second study the function of the expanded CD8⁺CD57⁺ subset. We found that these cells were able to inhibit cell proliferation and, thus, viral replication. Our third work was aimed to investigate if productive infection of CD8⁺ T cells may affect the outcome of suppressor assays *in vitro*. We analysed the effects of γ c-cytokines altered during HIV-1 infection, like IL-2, IL-7 and IL-15. Paradoxically, IL-2 and IL-15 modulated both roles of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication. This may in part be explained by the slower kinetics of viral production by CD8⁺ T cells compared to CD4⁺ T cells, what may make them potential virus reservoirs. Since virus-stimulated dendritic cells are able to produce IL-15, which we demonstrated to promote productive HIV-1 infection of CD8⁺ T cells as well as their non-cytolytic antiviral function, we also evaluated in a fourth study, the role of endogenous and exogenous IL-15 on X4 HIV-1 production in co-cultures with autologous DC. Indeed, IL-15 seems to be an important stimulus for CD8⁺ antiviral activity, albeit it promotes productive HIV-1 infection in DC/CD8⁺ co-cultures. Infection of CD8⁺ cells in contact to autologous DC could be explained by their co-expression of CD4 and CXCR4, probably supported by CD28/B7 interaction, since in our studies we found that CD8⁺CD28⁺ cells presented higher levels of expression of co-receptors and HIV-1 productivity than CD8⁺CD28⁻ cells. Thus, therapies using either γ c-cytokines IL-2 or IL-15 in HIV-1 infection might consider the activation not only of CD4⁺ T cells reservoirs, but also of CD8⁺ T cells.

ABREVIATURAS

AICD	<i>Activation Induced Cell Death</i> ou morte celular induzida por ativação
AIDS	<i>Acquired ImmuneDeficiency Syndrome</i> ou síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i> ou célula apresentadora de antígeno
CAF	<i>CD8+ T cell Antiviral Factor</i> ou fator antiviral de célula T CD8+
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ou grupamento de diferenciação
CBMC	<i>Cord Blood Mononuclear Cells</i> ou células mononucleares de cordão umbilical
CMV	Citomegalovírus
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> ou linfócitos T citotóxicos
DC	<i>Dendritic Cell</i> ou célula dendrítica
DC-SIGN	<i>DC Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin (CD209)</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> ou terapia anti-retroviral altamente ativa
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> ou Vírus de Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ou antígeno leucocitário humano
IL	<i>Interleukin</i> ou interleucina
iNKR	receptores inibidores de NK
LDA	<i>Limiting Dilution Assays</i> ou ensaios de diluição limite
LTNP	<i>Long-Term Non-Progressor</i> ou não-progressores a longo prazo
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> ou domínios repetitivos longos terminais
MDC	<i>Macrophage-Derived Chemokine</i> ou quimiocina derivada de macrófago
MIP1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i> ou proteína 1 α inflamatória de macrófago
MIP1 β	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1β</i> ou proteína 1 β inflamatória de macrófago
NK	<i>Natural Killer</i>

NSI	<i>Non-Syncicium Inducer</i> ou não-indutor de sincício
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ou células mononucleares de sangue periférico
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> ou fitohemaglutinina
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> ou fator expresso e secretado normalmente por células T e regulado por ativação
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> ou Transcriptase Reversa
SDF	<i>Stromal cell-Derived Factor</i> ou fator derivado de célula do estroma
SI	<i>Syncicium Inducer</i> ou indutores de sincícios
SIV	Vírus de Imunodeficiência de Símios
Tc	T citotóxica
T _{CM}	<i>T_{CENTRAL MEMORY}</i> ou T de memória central
TCR	<i>T Cell Receptor</i> ou receptor de célula T
T _{EM}	<i>T_{EFFECTOR MEMORY}</i> ou T de memória efetora
T _M	T de memória
T _N	T <i>naive</i>

GLOSSÁRIO

Cadeia γ comum (γ_C) - é uma cadeia polipeptídica transmembranar (CD132) que é comum ao subgrupo dos receptores de citocinas de classe I. Tem papel importante na sinalização intracelular mediada por esses receptores (ex: IL-2/4/7/15/21R γ_C).

CAF - fator antiviral de células T CD8+ que inibe a replicação de HIV ao suprimir a expressão de proteínas virais dirigidas por LTR.

CCR5 - receptor de quimiocina cujos ligantes naturais são precisamente MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES. É o principal co-receptor para os vírus M-trópicos.

CD27 - é uma molécula transmembranar que, junto com receptores de TNF, CD40 e Fas (CD95) pertence à superfamília TNF/NGF-R. Interage com a molécula co-estimulatória CD70 e é necessária para a geração e manutenção da memória de célula T.

CD4 - é um co-receptor de células do sistema imunológico do tipo T, macrófagos, monócitos e células dentríticas, presentes na pele e em mucosas, principalmente dos órgãos genitais. É uma proteína receptora da glicoproteína gp120 do vírus HIV.

CD45R - participa da transdução de sinal, provavelmente através de sua atividade proteína tirosina fosfatase, com substratos principais incluindo Lck e Fyn. Isoformas CD45RA e CD45RO. Após ativação celular, ocorre transição de expressão de CD45RA para CD45RO.

CD57 (conhecida como antígeno Leu-7 ou HNK-1) - é uma glicoproteína expressa em células NK e subpopulações de células CD4+ ou CD8+ em indivíduos normais.

CD8 - trata-se de uma glicoproteína expressa na superfície de células T citotóxicas. Liga-se a molécula MHC classe I.

Citocinas γ_c - são um subgrupo das hematopietinas que utilizam o receptor comum gama.

Co-receptor - é uma proteína de superfície celular que aumenta a sensibilidade do receptor de antígeno, unindo-se a ligantes correlatos e participando da sinalização para ativação. CD4 e CD8 são co-receptores MHC-ligantes em células T, ao passo que CD19 faz parte de um complexo que constitui o co-receptor de células B. Ou, no caso da infecção pelo HIV, co-receptor de ligação à molécula gp120, importante para o tropismo celular.

CXCR4 ou fusina - receptor de quimiocina, membro da superfamília de receptores de sete domínios transmembranares acoplado à proteína G. Junto com CD4, CXCR4 é necessário para a fusão com envelope de cepas T-trópicas, mas não M-trópicas.

Ensaio agudo - mede a atividade antiviral de linfócitos CD8+ utilizando-se uma variedade de vírus e diferentes alvos celulares CD4+.

Ensaio endógeno - mede a capacidade de células T CD8+ de um indivíduo infectado suprimir a replicação de seus próprios vírus crescendo em suas células T CD4+.

HIV-1 R5 - CCR5-específico, geralmente correspondente aos variantes M-trópicos e NSI.

HIV-1 X4R5 - usa ambos CXCR4 e CCR5, geralmente correspondente aos variantes duo-trópicos.

HIV-1 X4 - CXCR4-específico, geralmente correspondente às cepas T-trópicas e SI.

Naïve - célula “virgem” ou “não-primada”.

Quimiocinas - fazem parte de uma família especializada de citocinas, que funcionam como potentes mediadores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos, são citocinas quimiotáticas. As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos em resposta a estímulos externos, e as quimiocinas que regulam o tráfego celular através dos tecidos são produzidas constitutivamente por várias células nesses tecidos.

RANTES – trata-se de uma quimiocina, também denominada CCL5. RANTES é quimiotática para células T, eosinófilos e basófilos, cujo papel ativo está no recrutamento de linfócitos para os locais de inflamação. Com a ajuda de certas citocinas (como IL-2 e IFN- γ) que são liberadas por células T, RANTES induz também a proliferação e a ativação de determinadas células NK, para formar células CHAK (quimiocinas-CC ativadoras de morte).

Receptores *Homing* - moléculas de adesão expressas na superfície de linfócitos que são responsáveis pelas diferentes vias de recirculação de linfócitos e endereçamento tecidual. Receptores *homing* ligam moléculas expressas nas células endoteliais, em particular no leito vascular.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figuras e Quadro de INTRODUÇÃO

Figura I.1 _____	5
Tropismo de HIV-1 de acordo com o modelo de uso de co-receptores CCR5 ou CXCR4.	
Figura I.2 _____	7
Esquema do curso da infecção pelo HIV-1, ilustrando a relação entre carga viral, contagem de células T CD4+, células T CD8+ HIV-1-específicas, e evolução viral.	
Figura I.3 _____	13
Estágios de diferenciação de células T CD8+ e alterações na infecção por HIV-1.	
Quadro I.1 _____	35
Citocinas e moléculas relacionadas às citocinas com efeitos regulatórios sobre a replicação do HIV-1.	

Figuras de ESTUDO 1

Figura 1.1. _____	54
Expressão das moléculas CD27 e CD45RA ou CD45RO em células CD8+ de culturas de PBMC ou CBMC não-infectadas ou infectadas por HIV-1.	
Figura 1.2. _____	55
Expressão das moléculas CD28 e CD45RA em células CD8+ em culturas de PBMC não-infectadas ou infectadas por HIV-1.	
Figura 1.3. _____	56
Expressão da molécula CD27 nas células CD8+ em culturas de PBMC ou CBMC não-infectadas ou infectadas por HIV-1.	
Figura 1.4. _____	57
A perda de expressão de CD27 não apresenta associação específica a variantes de HIV-1.	
Figura 1.5. _____	58
Expressão do fenótipo CD8+CD57+ de células T em culturas de PBMC ou CBMC não-infectadas ou infectadas por HIV-1.	
Figura 1.6. _____	59
A expressão do marcador de senescência CD57 aumenta em linfócitos CD8+ de culturas de CBMC infectadas por variante de HIV-1 X4, mas não R5.	

Figuras de ESTUDO 2

- Figura 2.1.** _____ 72
Produção de HIV-1_{RF} por CD8dPBMC ativado por PWM ou co-culturas de CD8dPBMC com CD8⁺CD57⁺ ativadas por PWM.
- Figura 2.2.** _____ 73
Comparação dos efeitos inibitórios das subpopulações CD57⁺ ou CD57⁻ de células CD8⁺ sobre a produção de HIV-1_{RF} e proliferação celular em co-culturas estimuladas por PWM.
- Figura 2.3.** _____ 74
Comparação dos efeitos inibitórios das subpopulações CD57⁺ ou CD57⁻ de células CD8⁺ sobre a produção de HIV-1_{RF} e proliferação celular em co-culturas estimuladas por PHA.
- Figura 2.4.** _____ 75
Comparação dos efeitos inibitórios das populações CD57⁺ e CD57⁻ de populações CD8⁺ na produção de HIV-1_{RF} e proliferação celular em co-culturas estimuladas por IL-2.

Figuras de ESTUDO 3

- Figura 3.1.** _____ 93
As citocinas γ c IL-2 e IL-15 são melhores promotoras da produção da variante X4 de HIV-1 por células CD8⁺ ativadas do que IL-4 ou IL-7.
- Figura 3.2.** _____ 94
A co-expressão de CD4 é essencial para a infecção por HIV-1_{RF} das células CD8⁺.
- Figura 3.3.** _____ 95
Níveis de co-expressão de CD4 em células CD8⁺ purificadas a fresco de PBMC ou mantidas por 3 dias na presença de diferentes citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA ou não estimuladas.
- Figura 3.4.** _____ 97
Expressão dos co-receptores CXCR4 e CCR5 em células CD8⁺ purificadas obtidas a fresco de PBMC ou depois de 3 ou 7 dias na presença de diferentes citocinas γ c, em culturas estimuladas ou não com PHA.
- Figura 3.5.** _____ 98
Produção de HIV-1_{RF} por CD4dPBMC, CD8dPBMC, PBMC ou células CD4⁺ na presença de diferentes citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA ou não estimuladas.

Figura 3.6.	99
Produção de HIV-1 _{RF} por CBMC, CD8dCBMC, CD4dCBMC ou células CD8 ⁺ na presença de diferentes citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA ou não estimuladas.	
Figura 3.7.	100
Supressão da produção de HIV-1 _{RF} em co-culturas de células CD8 ⁺ e CD4 ⁺ purificadas ou co-culturas de CD8 ⁺ /CD8dPBMC.	
Figura 3.8.(A)	102
Cinética da produção de HIV-1 _{RF} em culturas ativadas por PHA+IL-2 ou PHA+IL-15, e expressão de CD4 e CD8 em células p24 ⁺ .	
Figura 3.8.(B)	103
Cinética da produção de HIV-1 _{RF} em culturas ativadas por PHA+IL-4 ou PHA+IL-7, e expressão de CD4 e CD8 em células p24 ⁺ .	
Figura 3.9.	104
Carga proviral de HIV-1 _{RF} em culturas de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ ou em co-culturas quantificada por Taqman real-time PCR.	

Figuras de ESTUDO 4

Figura 4.1.	118
Atividade antiviral de células T CD8 ⁺ em co-cultura com células T CD4 ⁺ ou em co-culturas DC/CD4/CD8.	
Figura 4.2.	119
Células T CD8 ⁺ produzem HIV-1 quando co-cultivadas com DCs autólogas “pulsadas” com o vírus.	
Figura 4.3.	120
Produção de HIV-1 _{RF} em co-culturas DC/CD8 ⁺ CD28 ⁺ ou DC/CD8 ⁺ CD28 ⁻ alogeneicas ou autólogas, sem ou com adição de IL-15.	
Figura 4.4.	121
Co-expressão de CD4 em células CD8 ⁺ CD28 ⁺ e CD8 ⁺ CD28 ⁻ após 1 semana em co-cultura com DCs alogeneicas ou autólogas.	

Figura 4.5. _____ 122

Expressão de co-receptores de HIV-1 nas subpopulações CD28+ e CD28- de células T CD8+ após contato com células dendríticas autólogas ou alogeneicas.

Figura 4.6. _____ 124

Papel de IL-15 endógena e exógena na inibição de produção viral em co-culturas DC/CD4/CD8 em comparação com DC/CD4.

Figura 4.7. _____ 125

IL-15 promove a produção viral e a atividade antiviral de células T CD8+ em co-culturas com células dendríticas autólogas.

Figura de DISCUSSÃO**Figura D.1.** _____ 145

Modelo de imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 que considera a infecção de células CD8+ (CD4-CD8+ ou CD4+CD8+).

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
I. Infecção pelo HIV-1	2
I. 1. HIV-1, tropismos celulares e co-receptores	2
I.2. História Natural da Infecção pelo HIV-1	3
II. Células dendríticas e sua participação na transmissão e produção de HIV-1	8
III. Células T CD8+ e sua participação na infecção pelo HIV-1	9
III. 1. Diferenciação de células T CD8+ e suas alterações na infecção pelo HIV-1	10
III. 2. Alterações de células T CD8+ na infecção pelo HIV-1	16
III.3. Atividade antiviral não citolítica de células T CD8+ sobre produção de HIV-1	23
III.4. Mecanismos de inibição viral por células T CD8+	26
IV. Citocinas da família de receptor comum gamma (citocinas γc) e sua participação na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1	30
IV.1. Citocinas γc e homeostasia de células T	30
IV. 2. Papel de citocinas γc na imunopatogênese da infecção pelo HIV	34
OBJETIVOS	44
RELEVÂNCIA DO ESTUDO E OBJETIVOS	45
ESTUDO 1.	46
<i>Alterações fenotípicas de células T CD8+ em culturas de CBMC e PBMC infectadas pelo HIV-1.</i>	
Racional e Objetivos	47
Resumo	48
Introdução	49
Metodologia	51
Culturas celulares	51
Vírus	51
Infecção in vitro por HIV	51
Análise fenotípica de células CD8+	52
Análise estatística	52

Resultados	53
Culturas de CBMC ou PBMC infectadas pelo HIV-1 apresentam maior aumento relativo de linfócitos T CD8+, porém menor número absoluto de células T CD8+ que culturas não infectadas	53
O padrão fenotípico de células T CD8+ durante a infecção <i>in vitro</i> pelo HIV-1 assemelha-se ao observado em pacientes	53
A perda de expressão de CD27 não apresenta uma associação específica aos variantes de HIV-1	56
A expressão do marcador de senescência CD57 aumenta em linfócitos CD8+ de culturas de CBMC infectadas por variante de HIV-1 X4, mas não R5	57
Discussão	60
ESTUDO 2.	62
<i>A subpopulação T CD8+CD57+ exerce efeito inibidor sobre a proliferação celular e a produção de HIV-1 do tipo X4.</i>	
Racional e Objetivos	63
Resumo	65
Introdução	66
Metodologia	68
Vírus	68
Culturas celulares	68
Purificação de Subpopulações Celulares	69
Ensaio de atividade supressora das subpopulações CD8+CD57+ e CD8+CD57- sobre a replicação de HIV-1	70
Ensaio <i>Mini RT</i> de atividade da enzima Transcriptase Reversa	71
Ensaio de atividade supressora da proliferação celular das subpopulações CD8+CD57+ e CD8+CD57-	71
Resultados	72
As células CD8+CD57+ são capazes de inibir a produção de variante X4 HIV-1 <i>in vitro</i>	72
A inibição da produção viral mediada por células CD8+CD57+ parece estar relacionada à sua atividade inibitória da proliferação celular, enquanto células CD8+CD57- foram capazes de inibir a replicação viral sem afetar a proliferação celular	74
A citocina IL-2 aumenta a atividade inibitória de células CD8+CD57- e CD8+CD57+	

sobre a replicação viral	75
Discussão	77
ESTUDO 3.	80
<i>Duplo papel de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1: alvos e supressores da replicação viral.</i>	
Racional e Objetivos	81
Resumo	83
Introdução	84
Metodologia	86
Purificação de subpopulações celulares	86
Anticorpos monoclonais e citometria de fluxo	87
Infecção in vitro por HIV-1	88
Ensaio Mini RT de atividade da enzima Transcriptase Reversa	88
Deteção de antígenos do HIV-1 por citometria de fluxo	89
Ensaio de atividade antiviral sobre a produção de HIV-1 <i>in vitro</i> de células T CD8+ ou de suas subpopulações CD8+CD28+ ou CD8+CD28-	90
Ensaio <i>Taqman Real-Time PCR</i> para quantificação de DNA HIV-1 proviral	91
Análise estatística	91
Resultados	92
A co-expressão de CD4 em células T CD8+ é essencial para a infecção por HIV-1, entretanto a produção de vírus depende do estímulo e das citocinas do ambiente	92
Níveis de expressão de CXCR4 não parecem ser responsáveis pela produção diferencial da variante X4 de HIV-1 por células CD8+ T na presença de IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15	96
PBMC depletado de células CD4+ apresenta um perfil semelhante de produção de HIV-1 ao de células T CD8+ purificadas, enquanto células T CD4+ respondem igualmente a diferentes citocinas γc	97
Células CD8+ de neonato também são passíveis de infecção produtiva por variante X4 de HIV-1 por mecanismo CD4-dependente	98
Células CD8+ ativadas apresentam atividade antiviral na presença de IL-2 e IL-15, mas não de IL-4 ou IL-7	99
As citocinas γc IL-2 e IL-15 promovem o papel dual de células T CD8+ como alvos e	

supressores da replicação do HIV	101
Carga proviral de células CD4+ excede a de células CD8+ durante a cinética de infecção por variante X4 HIV-1 _{RF}	104
Discussão	105
ESTUDO 4.	107
<i>Papel de IL-15 endógena e exógena sobre a susceptibilidade de linfócitos T CD8+ à infecção produtiva por HIV-1 e sua atividade antiviral em modelo de interação de células dendríticas com linfócitos T CD4+ autólogos.</i>	
Racional e Objetivos	108
Resumo	110
Introdução	111
Metodologia	113
Vírus	113
Purificação de Subpopulações Celulares	113
Anticorpos Monoclonais e Citometria de Fluxo	114
Preparação de células dendríticas	114
Infecção <i>in vitro</i> com HIV-1	115
Ensaio Mini RT de atividade da enzima Transcriptase Reversa	115
Avaliação dos efeitos de IL-15 endógena ou exógena	116
Ensaio de supressão viral	116
Análise estatística	116
Resultados	117
Em presença de células dendríticas alogeneicas, células T CD8+ são infectadas produtivamente por HIV-1 e apresentam menor atividade antiviral	117
Células T CD8+ em co-cultura com células dendríticas alogeneicas ou autólogas apresentam produção de HIV-1, especialmente a subpopulação CD8+ CD28+	118
A maior produção de HIV-1 do tipo X4 em células CD8+CD28+ que CD8+CD28- pode ser explicada pela maior expressão de CD4 e de co-receptor CXCR4 após interação com células dendríticas alogeneicas ou autólogas	120
IL-15 promove a produção viral, bem como a atividade antiviral de células T CD8+, em co-culturas de células dendríticas com linfócitos T autólogos	123
Discussão	128

DISCUSSÃO	132
<i>As alterações fenotípicas de células T CD8+ se agravam com a progressão da doença. Elas estariam relacionadas à presença de diferentes variantes X4 ou R5 de HIV-1?</i>	133
<i>Células T CD8+CD57+ acumuladas após extensa ativação imunológica modulam a replicação de HIV-1?</i>	136
<i>A infecção de células CD8+ por HIV-1 contribui para a replicação viral total através de sua própria produção e/ou por afetar sua atividade antiviral não citolítica?</i>	139
<i>Citocinas γc são capazes de promover a infecção produtiva de células T CD8+ e/ou modular sua função antiviral não citolítica?</i>	141
<i>Linfócitos T CD8+ seriam infectados produtivamente quando co-cultivados com células dendríticas autólogas “pulsadas” com HIV-1? Isso levaria a uma menor atividade antiviral das células T CD8+ quando em contato com linfócitos T CD4+ e células dendríticas?</i>	143
<i>Qual seria o papel de IL-15 na modulação da replicação viral quando linfócitos T CD4+ e CD8+ interagem com células dendríticas?</i>	144
<i>Como entendemos a participação de células T CD8+ na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 à luz de nossos resultados e da literatura?</i>	144
<i>Como nossos resultados podem contribuir para melhor planejar imunoterapias ou vacinas direcionadas para HIV-1?</i>	156
CONCLUSÕES	160
PERSPECTIVAS FUTURAS	164
REFERÊNCIAS	166
ANEXO - PUBLICAÇÃO	221
<i>Therapeutic role of CD8+ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication.</i>	

Introdução

INTRODUÇÃO

I. INFECÇÃO PELO HIV-1:

I. 1. HIV-1, tropismos celulares e co-receptores:

O **Vírus de Imunodeficiência Humana tipo-1 (HIV-1)** foi isolado três anos após os primeiros casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) serem relatados em 1981. HIV-1 é membro da família Retroviridae, a qual é caracterizada pela enzima Transcriptase Reversa (RT), que permite ao vírus copiar seu RNA em DNA dupla-fita, de modo a se replicar. Dentro desta família, o HIV é classificado como um lentivírus, assim como o SIV (Vírus de Imunodeficiência de Símios) e FIV (Vírus de Imunodeficiência de Felinos), devido à progressão geralmente gradual da doença. HIV-1 é a causa mais comum de AIDS, mas o HIV-2, que difere em seu genoma e antigenicidade, é menos patogênico, causando uma síndrome clinicamente semelhante, mas em um período mais prolongado. Este último ocorre mais na África Oriental e Índia, enquanto o HIV-1 tem causado uma pandemia mundial (revisado em Levy, 1993; Rowland-Jones, 2003).

O **genoma** do HIV-1 apresenta a mesma organização de sequências típica dos retrovírus. Em cada extremo do genoma, os LTRs (domínios repetitivos longos terminais) regulam a integração do vírus no genoma do hospedeiro, expressão dos genes virais, e replicação viral. As três maiores regiões codificantes são *gag*, *pol* e *env*, que codificam, respectivamente, proteínas estruturais, as enzimas necessárias à replicação viral, transcriptase reversa (RT), integrase e protease viral, e as glicoproteínas do envelope, gp120 e gp41 (revisado em Emerman e Mali, 1998).

A infecção de uma célula pelo HIV-1 inicia-se quando o complexo glicoproteico do envelope liga-se tanto à molécula CD4 como também a um co-receptor membro da família dos receptores de quimiocinas (revisado em Berger *et al.*, 1999). Este **modelo CD4-dependente** é a via mais importante de fusão/ entrada/ infecção pelo HIV-1, porém, tem sido descritas interações Env/co-receptor na ausência de CD4 para HIV-2 (Endres *et al.*, 1996; Potempa *et al.*, 1997; Reeves & Schulz, 1997; Borsetti *et al.*, 2000), SIV (Potempa *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Edinger *et al.*, 1997), e HIV-1 (Bandres *et al.*, 1998; Hesselgesser *et al.*, 1997; Dumonceaux *et al.*, 1998; Borsetti *et al.*, 2000). Sugere-se que as moléculas gp120 que interagem com co-

receptores de maneira CD4-independente já sofreram (ao menos parcialmente) mudanças conformacionais normalmente induzidas por CD4.

Os principais **alvos de infecção** pelo HIV-1 são os linfócitos T CD4+ e células da linhagem monocitária. Porém, qualquer célula que expresse a molécula CD4 conjuntamente ao co-receptor apropriado pode, potencialmente, ser infectada. Evidências de que a molécula CD4 seria o principal receptor do HIV-1 basearam-se nos primeiros achados de que ocorria uma destruição seletiva de células CD4+ durante a infecção e de estas células CD4+ serem as únicas infectadas *in vitro*, o que foi confirmado pelas observações de que anticorpos monoclonais anti-CD4 inibiam a infecção *in vitro* (McDougal *et al.*, 1986; Maddon *et al.*, 1986).

Contudo, estudos envolvendo a transfecção de CD4 em células não-humanas sugeriu que outros receptores seriam necessários para a entrada eficiente do vírus HIV-1 no interior da célula (Maddon *et al.*, 1986; Alkhatib *et al.*, 1996; Broder & Berger, 1995). Um segundo fenômeno que indicava o papel de co-receptores era a existência de diferentes **tropismos celulares** para diversos isolados de HIV-1, que não apresentavam correlação com a expressão de CD4. Todos os isolados de HIV-1 podem infectar e se replicar em células T ativadas “*in vitro*”. Porém, alguns isolados de HIV-1 infectam culturas primárias de macrófagos, mas não linhagens T (vírus macrófago-trópico ou M-trópico), enquanto outros isolados infectam linhagens T, mas não macrófagos (vírus T-trópico) (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Fenyó *et al.*, 1989). Alguns isolados ainda infectam ambos os tipos celulares (vírus duo-trópicos). Além disso, isolados de HIV-1 são denominados indutores de sincícios (SI) quando induzem a formação de células gigantes, ou sincícios, em algumas linhagens T *in vitro*, enquanto os que não induzem são chamados não-indutores de sincício (NSI). Existe uma sobreposição considerável, embora incompleta, entre os fenótipos T-trópico e SI e entre M-trópico e NSI.

Hoje, sabemos que estes tropismos estão relacionados à expressão de diferentes **receptores de quimiocinas** em macrófagos e células T (veja figura I.1). A proteína chamada *fusin* ou fusina, mais tarde CXCR4, cujo ligante natural é o fator derivado de célula de estroma (*stromal cell-derived factor-SDF*) (Bleu *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996), é um receptor de quimiocina, membro da superfamília de receptores de sete domínios transmembranares acoplado à proteína G. Junto com CD4, CXCR4 é necessário para a fusão com envelope de cepas T-trópicas, mas não M-trópicas. Posteriormente, foi visto que SDF-1 inibe infecção de vírus T-trópicos via CXCR4, sem efeito em vírus M-trópicos (Oberlin *et al.*, 1996). É ainda interessante

citar que certos isolados HIV-2 e HIV-1 T-trópicos podem utilizar CXCR4 diretamente para entrada na ausência de CD4 (Endres *et al.*, 1996).

Cocchi e colaboradores (Cocchi *et al.*, 1995) identificaram fatores supressores derivados de células T CD8+, como as CC-quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , e por ter sido demonstrado que estas CC-quimiocinas suprimiam a infecção por cepas M-trópicas, mas não T-trópicas, procurou-se por receptores de CC-quimiocinas como co-receptor em potencial de cepas M-trópicas. Um novo receptor de quimiocina (CCR5, quinto receptor de CC-quimiocina) foi identificado, cujos ligantes naturais eram precisamente MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Samson *et al.*, 1996; Combadiere *et al.*, 1996; Raport, 1996), e, assim, demonstrou-se que CCR5 é o principal co-receptor para os vírus M-trópicos (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996).

De acordo com estes achados, Berger *et al.* (1998) propuseram uma nova nomenclatura para o fenótipo de HIV-1: **X4** (CXCR4-específico, geralmente correspondente às cepas T-trópicas e SI), **R5** (CCR5-específico, geralmente correspondente aos variantes M-trópicos e NSI) e **X4R5** (usando ambos CXCR4 e CCR5, geralmente correspondente aos variantes duo-trópicos). De fato, existe uma grande correlação entre o fenótipo biológico (incluindo tropismo) e o uso de co-receptor, mas não com os subtipos genéticos de HIV-1 (Zhang *et al.*, 1996; Bjorndal *et al.*, 1997; Trkola *et al.*, 1998).

Estes fenótipos parecem ter importância na transmissão e patogênese de HIV-1 (veja figura I.2). Mudanças de fenótipo viral foram observadas em diferentes estágios da infecção pelo HIV-1 (revisado em Miedema *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1999; Rowland-Jones, 2003). Os isolados M-trópicos ou R5 são o fenótipo viral predominante em indivíduos recém-infectados (Zhang *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1993). Em uma fase tardia da infecção, surge o fenótipo T-trópico/SI ou X4 em aproximadamente 50% dos indivíduos HIV-1-infectados, o que é seguido de um rápido declínio da contagem T CD4+ e progressão clínica da doença (Tersmette *et al.*, 1989a, 1989b; Schuitemaker *et al.*, 1992; Koot *et al.*, 1993; Richman & Bozzette, 1994; Connor *et al.*, 1997; Glushakova *et al.*, 1999). O uso de CXCR4 promoveu a depleção de células T CD4+ em tecidos linfóides *ex vivo* (Glushakova *et al.*, 1997; Penn *et al.*, 1999) ou no modelo SCID (Picchio *et al.*, 1998), sugerindo seu papel no declínio das células T CD4+ ao longo da progressão da infecção *in vivo*. Contudo, HIV-1 R5 ou X4 foram igualmente citopáticos para alvos T em tecido linfóide humano (Grivel & Margolis, 1999).

Células T do tipo *Helper 1* (TH1) apresentam principalmente o co-receptor CCR5 (Loetscher *et al.*, 1998), cuja expressão é aumentada após ativação, o que explicaria em parte a queda precoce de células T CD4+ antígeno-específicas na infecção pelo HIV-1 (Clerici *et al.*, 1989a). Por outro lado, o co-receptor CXCR4 é mais encontrado em células T *naive* (Bleul *et al.*, 1997).

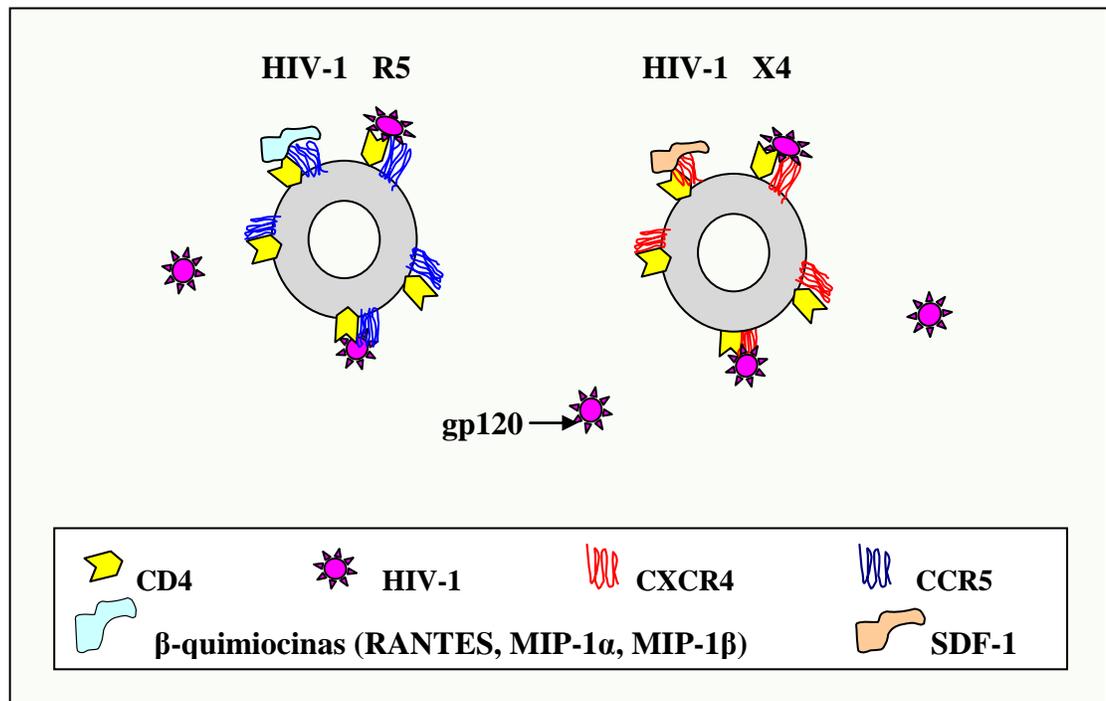


Figura I.1. Tropismo de HIV-1 de acordo com o modelo de uso de co-receptores CCR5 ou CXCR4.

Entrada de vírus M-trópicos é bloqueada pelos ligantes de CCR5: MIP-1α, MIP-1β e RANTES, enquanto a entrada de vírus T-trópicos é bloqueada pelo ligante de CXCR4: SDF-1. Figura adaptada a partir de Fauci (1996).

Células T do tipo *Helper 1* (TH1) apresentam principalmente o co-receptor CCR5 (Loetscher *et al.*, 1998), cuja expressão é aumentada após ativação, o que explicaria em parte a queda precoce de células T CD4+ antígeno-específicas na infecção pelo HIV-1 (Clerici *et al.*, 1989a). Por outro lado, o co-receptor CXCR4 é mais encontrado em células T *naive* (Bleul *et al.*, 1997).

I.2. História Natural da Infecção pelo HIV-1:

Clinicamente, a infecção pelo HIV-1 pode ser dividida em três fases (figura I.2). Durante a **fase inicial**, conhecida como infecção primária, o vírus se replica infectando células que expressam CD4 e o co-receptor apropriado, geralmente o CCR5. Desde o começo da infecção, as células T CD4+ são as células alvo principais (revisado por Haase, 1999; Rowland-Jones, 2003). Dentro de dias após a primeira exposição ao HIV-1, uma replicação viral abundante pode ser detectada nos linfonodos. Esta replicação leva à uma viremia com altos níveis de partículas virais detectáveis, que pode ser acompanhada de uma síndrome aguda de HIV-1, com sintomas semelhantes à mononucleose (Quinn, 1997). Em poucas semanas, o nível plasmático viral decai, coincidindo com o desenvolvimento de uma resposta imunitária ao HIV-1. É nesta fase que ocorre a soroconversão (Daar *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1991). O papel ou importância da imunidade humoral em relação à celular é debatido. Anticorpos neutralizantes são há muito descritos na literatura (Ho *et al.*, 1985; Robert-Guroff *et al.*, 1985; Weiss *et al.*, 1985), porém isolados primários de HIV-1 são bem menos suscetíveis à neutralização que aqueles adaptados em laboratório (Mathews, 1994).

A resposta imunitária celular HIV-1-específica pode ser detectada durante a síndrome viral aguda e correlaciona-se com o controle da viremia plasmática (Pantaleo *et al.*, 1994; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994, Wilson *et al.*, 2000). A atividade supressora não-citolítica de células T CD8+ também foi identificada nesta fase (Mackewicz *et al.*, 1994b). Os efeitos combinados de CTL e outros componentes da resposta imunitária levam a viremia a um *plateau* mais baixo.

A **segunda fase** da infecção pelo HIV-1 é caracterizada por um longo período assintomático, onde ocorrem dois eventos fisiopatológicos característicos desta fase: a replicação viral contínua nos órgãos linfóides periféricos (Pantaleo *et al.*, 1993) e a perda gradual de células T CD4+, bem como de sua atividade (Clerici *et al.*, 1989a, 1989b; Gruters *et al.*, 1991; Musey *et al.*, 1999). Este período é de latência clínica, mas de replicação viral ativa. Porém, uma das características do HIV, como de outros retrovírus, é sua capacidade de estabelecer uma infecção latente, na qual os provírus permanecem quiescentes. Isto parece acontecer em células T CD4+ de memória e macrófagos, importantes reservatórios da infecção, que passam a produzir as partículas virais quando ativadas por um sinal apropriado (revisado em Mann, 1996). As células infectadas são detectáveis nos órgãos linfóides periféricos, e seus números correlacionam-se diretamente com os níveis plasmáticos de vírus, sugerindo que a principal fonte de vírus

plasmático sejam os tecidos linfóides (Pantaleo *et al.*, 1991; Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1997; Hockett *et al.*, 1999).

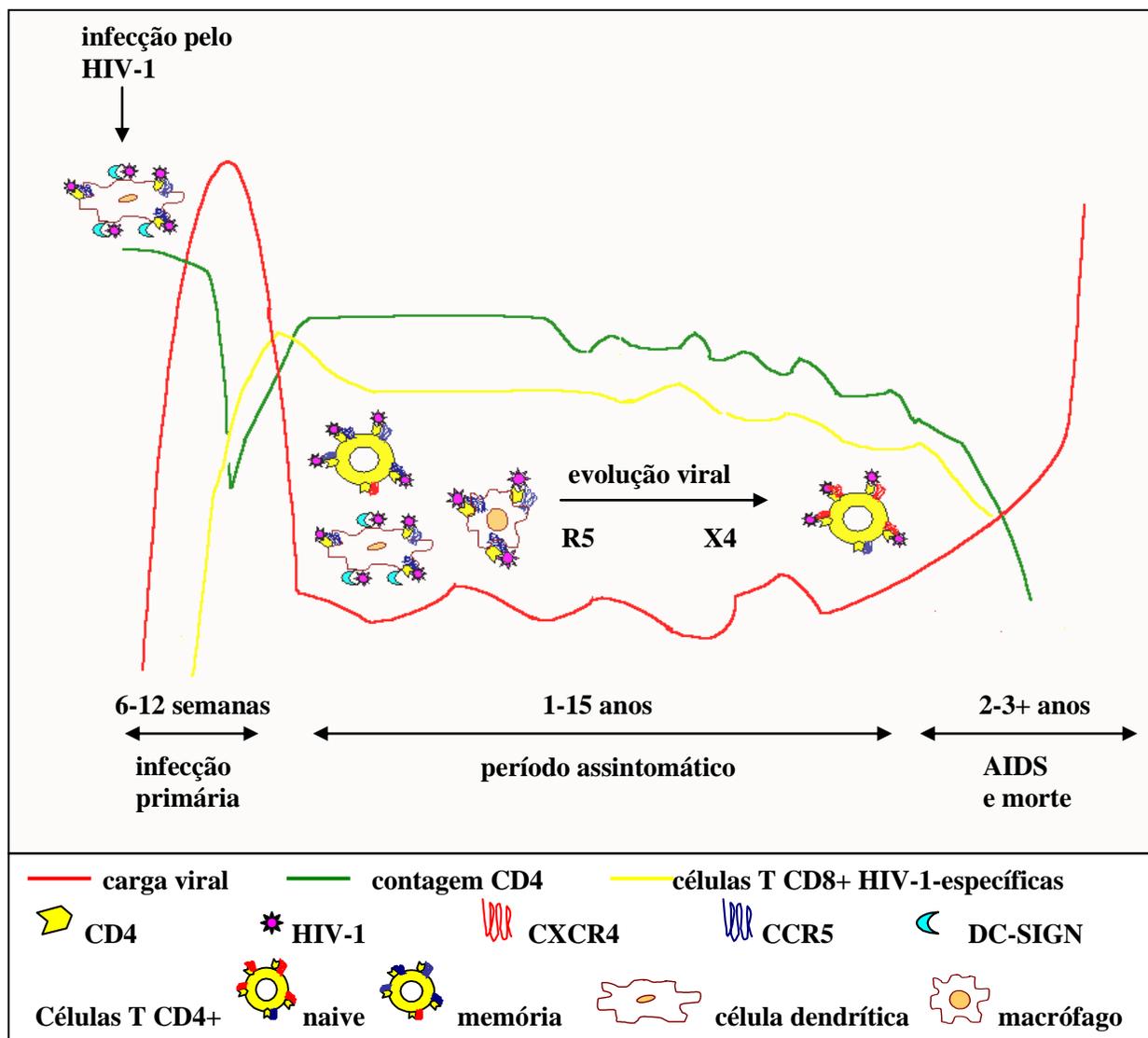


Figura I. 2. Esquema do curso da infecção pelo HIV-1, ilustrando a relação entre carga viral, contagem de células T CD4+, células T CD8+ HIV-1-específicas, e evolução viral.

Adaptado a partir de Rowland-Jones (2003).

A **fase final** da infecção é caracterizada pelo surgimento da imunodeficiência com manifestações clínicas. Os eventos que precedem o desenvolvimento da AIDS (em um ou dois anos), são o aumento da carga viral plasmática, com replicação viral ocorrendo em muitos sítios além dos tecidos linfóides (Reinhart *et al.*, 1997), e um declínio mais rápido de linfócitos CD4+ .

Em alguns casos, a progressão da doença está associada à evolução de vírus R5 para X4 (Fenyo *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1997; Kimata *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1999).

II. CÉLULAS DENDRÍTICAS E SUA PARTICIPAÇÃO NA TRANSMISSÃO E PRODUÇÃO DE HIV-1:

As células dendríticas (DCs) parecem estar envolvidas no início da infecção, carreando vírus do sítio de exposição aos linfonodos regionais, onde as células T CD4+ se tornam infectadas e os vírus se disseminam (Weissman & Fauci, 1997, Rowland-Jones, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que células dendríticas e linfócitos CD4+ formam conjugados, onde ocorre uma replicação viral ativa (Pope *et al.*, 1994). Conjugados semelhantes de células dendríticas e células T CD4+ contendo antígeno HIV foram identificados *in vivo* em tecido linfóide (Frankel *et al.*, 1996), em pequenas quantidades em sangue periférico (Weissman *et al.*, 1995), e em tecido de submucosa após exposição vaginal ao SIV (Spira *et al.*, 1996). Neste estudo de macacos expostos ao SIV por via intra-vaginal, DCs derivadas de medula óssea presentes na mucosa vaginal eram as primeiras células a conter DNA de SIV, detectável 2 dias após exposição. Em observações subsequentes de órgãos linfóides, o padrão de aparecimento e disseminação viral espelhava o curso de migração de DCs dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides (Spira *et al.*, 1996).

Células dendríticas podem reter vírus infecciosos em sua superfície por longos períodos de tempo (Weissman *et al.*, 1995). Este fenômeno parece envolver a molécula **DC-SIGN** (*DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*, ou CD209), a qual permite que células T CD4+ sejam infectadas em *trans* (Geijtenbeek *et al.*, 2000a, 2000b). O vírus HIV-1 adere-se firmemente às células dendríticas imaturas pela ligação de gp120 à molécula DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000a, 2002). Esta interação não resulta em infecção produtiva das DCs pelo HIV-1, e sim permite que o vírus seja carregado aos linfonodos regionais, onde estas células interagem e ativam os linfócitos T CD4+, facilitando sua infecção em *trans*. De fato, as células T CD4+ não são infectadas por baixos títulos virais sem a ajuda de DC-SIGN *in trans* (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). A expressão de DC-SIGN em DCs de tecidos de mucosa e a presença de precursores de DCs DC-SIGN+ no sangue sugerem que esta molécula possa ser crucial para a disseminação viral após transmissão sexual ou contaminação sanguínea, quando os níveis de HIV-1 seriam ainda baixos (revisão de Geijtenbeek & van Kooyk, 2003).

Células dendríticas teciduais e certas preparações de DCs sanguíneas expressam CD4 e múltiplos receptores de quimiocinas, incluindo CCR5, CCR3, CCR2b, e CCR1 (Granelli-Piperno *et al.*, 1996). Geralmente, células dendríticas imaturas expressam níveis maiores de CCR5 e pouca ou nenhuma expressão de CXCR4, enquanto as maduras expressam menos CCR5 e mais CXCR4 (Sallusto *et al.*, 1998, Kawamura *et al.*, 2001). Existem evidências de que isolados M-trópicos de HIV-1 podem infectar DCs imaturas através de CCR5 (Granelli-Piperno *et al.*, 1998, 1999; Rowland-Jones, 1999). Por outro lado, muitos estudos mostraram que a replicação de HIV-1 (i.e., infecção produtiva) em DCs maduras é completamente bloqueada ou ocorre em níveis muito baixos (Cameron *et al.*, 1992; Granelli-Piperno *et al.*, 1998; Bakri *et al.*, 2001).

Em relação às duas maiores subpopulações de DCs presentes em sangue humano: as DCs plasmacitóides CD11c-CD123+, envolvidas em resposta imune inata, e as DCs mielóides CD11c+CD123-, iniciadoras de resposta imune adaptativa, ambas expressam baixos níveis de CCR5 e CXCR4, mas apenas as mielóides expressam DC-SIGN. Os dois tipos são mais suscetíveis à infecção por variantes R5, mas as células dendríticas plasmacitóides CD11c-CD123+ são mais facilmente infectadas pelo HIV-1 (Patterson *et al.*, 2001).

III. CÉLULAS T CD8+ E SUA PARTICIPAÇÃO NA INFECÇÃO PELO HIV-1:

O estudo do papel de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1 tem seguido duas linhas principais de investigação: **atividade citotóxica vírus-específica** e **capacidade antiviral não-citolítica** (revisado em Yang & Walker, 1997). Alguns trabalhos sugerem que estas duas funções efectoras seriam em parte mediadas pela mesma população de células CD8+ (Toso *et al.*, 1995, Buseyene *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1997).

Células T citotóxicas (CTL) anti-HIV-1 surgem ainda na fase aguda da síndrome viral (figura 2), sendo um fator crítico para o controle da infecção primária (Pantaleo *et al.*, 1994; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994, Wilson *et al.*, 2000). Este papel de CTL foi comprovado experimentalmente em um estudo de depleção de células CD8+ em macacos, os quais se tornaram incapazes de controlar a infecção primária (Schmitz *et al.*, 1999). Durante a infecção primária, a frequência de precursores CTL HIV-específicos pode ser tão alta quanto 1/100 células (Koup *et al.*, 1994). Esta resposta é tão potente, que permitiu pela primeira vez, em humanos, a detecção da atividade CTL em sangue periférico (Walker *et al.*, 1987) e pulmões (Plata *et al.*,

1987), o que vem sendo acompanhado atualmente pela metodologia de tetrâmeros MHC-peptídeos (Altman *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2000). A capacidade de recrutar um amplo repertório de CTL durante a infecção primária foi associado a um melhor controle da replicação primária e um melhor prognóstico (Borrow *et al.*, 1994; Ogg *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000), porém a magnitude e especificidade da resposta CTL nem sempre apresenta correlação com a contagem CD4 ou manifestações clínicas (Addo *et al.*, 2003).

Apesar de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1 apresentarem as duas funções efetoras, citotóxica vírus-específica e antiviral não-citolítica, estas células falham em prevenir a progressão da imunodeficiência na maioria dos casos. A atividade supressora não-citolítica de células T CD8+ é identificada já na fase aguda (Mackewicz *et al.*, 1994b), porém diminui com a progressão da doença (revisado em Levy *et al.*, 1996).

Vários fatores parecem contribuir para uma atividade citotóxica HIV-1-específica deficitária (revisado em Lieberman *et al.*, 2001 e McMichael & Rowland-Jones, 2001). Dentre estes, poderíamos incluir a própria infecção de células T CD8+ pelo HIV-1 (De Rossi *et al.*, 1986; Tsubota *et al.*, 1989b, Lusso *et al.*, 1990, 1991, Semenzato *et al.*, 1995, De Maria *et al.*, 1991, 1994, Mercure *et al.*, 1993, Flamand *et al.*, 1998, Kitchen *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1997, Livingstone *et al.*, 1996, McBreen *et al.*, 2001, Imlach *et al.*, 2001, Saha *et al.*, 2001a), a qual discutimos em revisão inclusa em anexo nesta tese, e uma diferenciação alterada de células T CD8+ na infecção pelo HIV-1 (Appay *et al.*, 2000; McMichael & Rowland-Jones, 2001).

III. 1. Diferenciação de células T CD8+ e suas alterações na infecção pelo HIV-1:

Ainda não se chegou a um consenso em relação à via utilizada para o **desenvolvimento de células T CD8+ efectoras e de memória**, mas os vários grupos de pesquisa que vêm estudando este processo de diferenciação dos linfócitos T CD8+ já descobriram alguns marcadores fenotípicos que indicam estágios de maturação destas células (figura I.3).

Diferentes isoformas da glicoproteína de membrana CD45R resultam de *splicing* alternativo de mRNA, **CD45RA** (isoforma de alto peso molecular) e **CD45RO** (isoforma de 180kDa), e são expressas na superfície de células T, dividindo-as em duas subpopulações recíprocas (Terry *et al.*, 1988; Thomas & Lefrançois, 1988). CD45R participa de transdução de sinal, provavelmente através de sua atividade proteína tirosina fosfatase, com substratos

principais incluindo Lck e Fyn (Charbonneau *et al.*, 1988). Após ativação celular, ocorre transição de expressão de CD45RA para CD45RO (Akbar *et al.*, 1988; Deans *et al.*, 1989). Linfócitos T CD45RO⁺ expressam mais moléculas de adesão, como LFA-3, CD2 e LFA-1, e apresentam maior produção de IFN- γ , características de células T de memória (Sanders *et al.*, 1988). Além disso, como a frequência de células T que respondem a antígenos de memória é baixa em células CD45RA⁺ e alta em CD45RO⁺ (Sanders *et al.*, 1988; Merckenschlager *et al.*, 1988; de Jong *et al.*, 1991a), considera-se CD45RA marcador de células *naive* e, CD45RO, de células “primadas” ou de memória. Entretanto, sabe-se que a transição do fenótipo *naive* para memória não é unidirecional, a re-aquisição de CD45RA ocorre na ausência de antígeno (Bell & Sparshott, 1990; Sparshott & Bell, 1994; Bunce & Bell, 1997). De fato, foi também demonstrado que células T CD8⁺ efectoras humanas expressam CD45RA (Hamann *et al.*, 1997). Hamann e colaboradores (1997) distinguem entre células T CD8⁺ de memória e efectoras através de análise conjunta da expressão de CD27 e CD45RA.

CD27 é uma molécula transmembranar que, junto com receptores de TNF, CD40 e Fas (CD95) pertence à superfamília TNF/NGF-R (Camerini *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1993), e interage com a molécula co-estimulatória CD70 (Bowman *et al.*, 1994). Hendriks e colaboradores (2000) demonstraram que a molécula CD27 é necessária para a geração e manutenção da memória de célula T. As respostas primárias de células T CD4⁺ e CD8⁺ ao vírus influenza são prejudicadas em camundongos CD27^{-/-}. Porém, os efeitos da deleção do gene CD27 são ainda mais profundos para a memória T, com uma cinética retardada e redução dos números de células T CD8⁺ vírus-específicas aos níveis encontrados em resposta primária (Hendriks *et al.* 2000).

Depois de prolongada ativação *in vitro*, a expressão de CD27 é gradualmente perdida (de Jong *et al.*, 1991b; Hintzen *et al.*, 1993). Aumento de células CD27⁻ também é observado *in vivo* durante o envelhecimento (Rosenkranz *et al.*, 1992) e em condições imunopatológicas, como esclerose múltipla (Hintzen *et al.*, 1991) e transplante (Chamuleau *et al.*, 1992). Enquanto todas as células CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ expressam CD27, dentro do compartimento de linfócitos T CD8⁺ são encontradas células CD27⁻ em ambas as subpopulações CD45RA⁺ e CD45RA⁻.

O único fenótipo de linfócitos T CD8⁺ presente em sangue de cordão fetal é CD45RA⁺CD27⁺, indicando que este é o fenótipo de células “**não primadas**” ou *naive*. Estes linfócitos CD8⁺ são CD62L⁺ (L-selectina, *homing receptor* para linfonodos) e apresentam

baixos níveis de expressão de CD49d, CD49e, CD29, CD11a/CD18 e CD58. A maioria destas células é CD28+ e não expressa CD45RO (Hamann *et al.*, 1997).

As células CD8+ CD45RA- CD45RO+ CD27+ apresentam várias características de linfócitos T CD8+ de **memória**, tais como altos níveis de expressão de CD95 (Fas) e de membros da família de integrinas CD11a, CD18, CD29, CD49d e CD49e, e secretam além de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-4. Esta subpopulação não possui atividade citolítica sem estímulo prévio *in vitro*, mas contém precursores CTL (Hamann *et al.*, 1997).

Células T CD8+ **efetoras** possuem o fenótipo CD45RA+CD27- e, sem estímulo prévio *in vitro*, estas células apresentam várias características relacionadas à função efetora de CTL, tais como a expressão de perforina, granzimas A e B e o ligante de Fas (FasL ou CD95L), mediando citólise espontânea (Hamann *et al.*, 1997). Além disso, são CD57+ e expressam altos níveis de CD11a, CD11b, CD18 e CD49d, enquanto são negativas para CD62L e CD28 (Hamann *et al.*, 1997). Este fenótipo CD8+CD28-, CD45RA+, CD11a^{high}, CD11b+ e/ou CD57+ foi também demonstrado por outros grupos de pesquisa como sendo de células T CD8+ efetoras com atividade citotóxica (McFarland *et al.*, 1992; Azuma *et al.*, 1993a; Wang *et al.*, 1995; Vingerhoets *et al.*, 1995). Por outro lado, Pittet e colaboradores (2000) mostraram que o fenótipo CD56+CD45RA+ apresentou maior correlação com a função efetora de células T CD8+ (medida por capacidade citolítica direta) do que o fenótipo CD27-CD45RA+.

Foi demonstrado que células T CD8+ deste fenótipo efector CD45RA+CD27- utilizam ambas as vias de exocitose de grânulos e Fas/FasL para induzir apoptose nas células alvos, porém também expressam receptores inibitórios de células NK, sugerindo que a sua atividade citolítica deve ser altamente controlada (Baars *et al.*, 2000; Mingari *et al.*, 2000). A expressão de receptores inibitórios de células NK havia sido observada antes em células T efectoras CD8+CD28- (Speiser *et al.*, 1999). O aumento destes marcadores de células NK em linfócitos T durante ativação crônica ou envelhecimento reflete o acúmulo de células T efectoras/senescentes (Solana & Mariani, 2000; Tarazona *et al.*, 2000). É interessante lembrar que CD56 (NCAM) é uma glicoproteína de membrana pertencente à superfamília Imunoglobulina e, em humanos, é um marcador típico de células NK (Nitta *et al.*, 1989). A molécula **CD57** (conhecida como antígeno Leu-7 ou HNK-1) é uma glicoproteína também expressa em células NK e subpopulações de células CD4+ ou CD8+ em indivíduos normais (Abo *et al.*, 1982; Lanier *et al.*, 1984). Os glicolipídios sulfoglucoronil reativos a HNK-1 são ligantes para L-selectina e P-selectina, mas

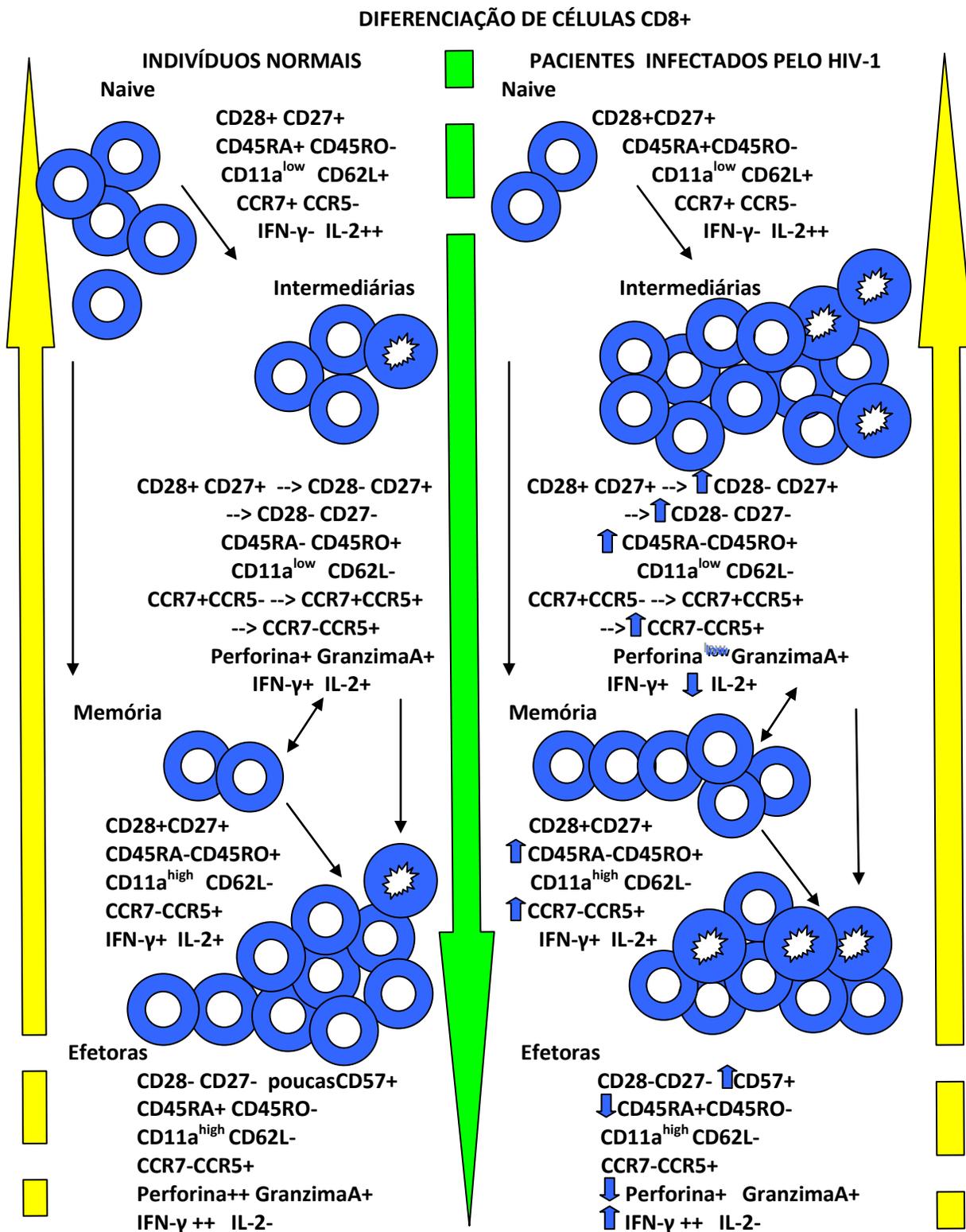


Figura I.3. Estágios de diferenciação de células T CD8+ e alterações na infecção por HIV-1. As setas amarelas representam potencial de proliferação e, a verde, o sentido de direção de diferenciação. Adaptado de Appay *et al.* (2000).

não para E-selectina (Needham & Schnaar, 1993). Como já citamos acima, ambas moléculas estão presentes em células T efetoras terminais.

O fato de células T CD8⁺ efetoras apresentarem o fenótipo CD45RA⁺CD27⁻ parece ser paradoxal, pois CD45RA é encontrado em células “não primadas” (Sanders *et al.*, 1988; Merckenschlager *et al.*, 1988) e a ausência de CD27 é típica de células cronicamente estimuladas (Chamuleau *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1991b; Hintzen *et al.*, 1991, 1993; Rosenkranz *et al.*, 1992). Isto é corroborado pelos achados de o repertório TCR V β de CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ diferir de células “não primadas” CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺, inclusive apresentando expansões oligoclonais, assim como o telômero ser menor em CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ que em CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺, indicando que esta população consiste de células que foram estimuladas por antígeno e evoluíram por vários ciclos celulares (Hamann *et al.*, 1999a). Portanto, CD45RA não pode ser considerado um marcador apenas de células *naive*. Compatível com a seleção *in vivo* por antígenos específicos, estudos utilizando complexos tetraméricos HLA/peptídeos virais demonstraram que células T CD8⁺ específicas com fenótipo CD28⁻ e CD45RA⁺CD27⁻ podem ser encontradas em indivíduos portadores de EBV, HCV e CMV (He *et al.* 1999; Kern *et al.*, 1999). De fato, Wills e colaboradores (1999) observaram que em infecção primária por CMV, um clone individual vírus-específico apresentava-se CD45RO^{high}, mas após resolução da infecção este clone era detectado em ambas as populações CD45RO^{high} e CD45RA^{high}.

Como a proliferação induzida por estímulo via TCR parece ser acompanhada de *downregulation* de CD45RA (Akbar *et al.*, 1988), a população CD45RA⁺CD27⁻ deve adquirir este fenótipo por um **estágio de transição** CD45RA⁻, ou seja, células de memória CD45RA⁻CD27⁺ ou CD45RA⁻CD27⁻ (Hamann *et al.*, 1999a, 1999b). Evidências de como ocorre este processo de diferenciação vêm de achados em infecções virais agudas (Hazenberg *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 2000). Primeiro, em indivíduos infectados por vírus ocorre uma grande expansão de células com fenótipo de memória (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺) que expressam altos níveis do marcador de ciclo celular Ki67. Segundo, na infecção aguda aparecem linfócitos T CD8⁺ que expressam CD27 e não CD28. Isto difere de indivíduos sadios onde a expressão destas duas moléculas é semelhante entre si. Encontra-se então uma expansão considerável de células T CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CD28⁻, boa parte em ciclo (Ki67⁺). Ainda dentro desta subpopulação estão presentes células perforina⁺, indicando a existência de células diferenciadas. Terceiro, aumenta o número de células T CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CD28⁻, raras em indivíduos normais. Esta

subpopulação apresenta baixa expressão de Ki67, mas é enriquecida em células perforina+. Fiorentini e colaboradores (2001) descreveram como uma outra subpopulação intermediária, células CD8+CD28+CD11b+, que se expandem durante infecções virais primárias e voltam aos valores normais após resolução da infecção. Estas células CD8+CD28+CD11b+ apresentam altos níveis de CD45RO enquanto um pequeno percentual é CD57+, produzem IFN- γ , expressam perforina e exercem atividade citolítica, porém produzem também IL-2 e retêm a capacidade de proliferar.

De fato, Callan e colaboradores (1998) observaram que durante a infecção primária por EBV em humanos, a maioria das células T antígeno-específicas era CD45RA-. Ao mesmo tempo a expressão de CD28 era variável, sugerindo que parte destas células perdia CD28 durante o processo de diferenciação em CTL efectoras. Após a infecção aguda, a frequência de células T vírus-específicas era ainda alta, sendo aproximadamente um terço destas CD45RA+; e uma percentagem similar era CD28-, sugerindo que as células T CD8+ efectoras haviam revertido para CD45RA+.

A partir destes dados, Hamann e colaboradores (1999b) propõem que em resposta à infecção viral as células T CD8+ primeiramente sofrem expansão da população CD45RA-CD27+ e que o processo de diferenciação ocorre com perda sucessiva de CD28 e CD27, o que sugere um *downregulation* sequencial de moléculas co-estimulatórias durante a diferenciação T pós-tímica. Durante este processo, as células perdem progressivamente seu potencial de proliferação. Células efectoras completamente diferenciadas, que não proliferam mais quando estimuladas via TCR, passam a re-expressar CD45RA. Este modelo de diferenciação de células T CD8+ é compatível com a “ramificação” de células efectoras a partir de um *pool* de células de memória que proliferam.

Sabe-se ainda que células de memória CD45RO+ diferem de células CD45RA+ pelo seu padrão de migração (revisado em Mackay, 1993). Enquanto os linfócitos CD45RA+ migram quase que exclusivamente para órgãos linfóides, expressando o *homing receptor* CD62L e CCR7, as células de memória CD45RO+ migram por todo o organismo, utilizando as moléculas CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*), integrina $\alpha 4\beta 1$ e CCR4 para direcionamento para pele, $\alpha 4\beta 7$ e CCR5 para mucosa, e ainda CD62L e CCR7 para linfonodos (Campbell *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999).

Sallusto e colaboradores (1999) classificam então os linfócitos T em três subpopulações de acordo com a expressão de CD45RA e CCR7: células T *naive* (CCR7+CD45RA+), células T de memória central (T_{CM}: CCR7+CD45RA-) e células T de memória efetoras (T_{EM}: CCR7-CD45RA-), sendo que dentro da população CD8+ foi ainda identificada uma quarta subpopulação (CCR7-CD45RA+). De fato, em infecção persistente por EBV, foram encontradas duas populações tetrâmeros positivas EBV-específicas, uma semelhante a T_{CM} e outra a T_{EM} (Tussey *et al.*, 2000). Dentro das quatro subpopulações de linfócitos T CD8+, a produção de IFN- γ e a presença de grânulos contendo perforina apresentaram-se restritas às células CCR7- (Sallusto *et al.*, 1999). Esta expressão de perforina mostrou-se predominante na subpopulação CD45RA+CCR7-, que corresponde às células efetoras terminais CD45RA+CD27- descritas por Hamann e colaboradores (1997, 1999a, 1999b). Recentemente, foi confirmada a ausência de CCR7 em células T CD8+ efetoras CD45RA+CD27- (Campbell *et al.*, 2001). Foi ainda observado que as células CD8+ perdem progressivamente a produção de IL-2, provavelmente em função de sua diferenciação de células *naive* para efetoras (Sallusto *et al.*, 1999). Ambas as subpopulações CCR7+ (T_{CM}) e CCR7- (T_{EM}) de indivíduos imunizados com toxóide tetânico respondem bem a um posterior desafio *in vitro* com o antígeno, indicando que células T efetoras permanecem vivas e funcionando bem anos após a imunização inicial (Sallusto *et al.*, 1999). Portanto, a memória seria mantida tanto por células T de memória clássicas (T_{CM}) quanto por células T efetoras (T_{EM}). Baseado em todos estes resultados, Sallusto e colaboradores (1999) propõem que células T *naive* se diferenciam em T_{CM} e, depois, em T_{EM}, o que se opõe ao modelo de diferenciação linear de efector para memória.

III. 2. Alterações de células T CD8+ na infecção pelo HIV-1:

Com a progressão da infecção pelo HIV, a frequência de precursores CTL medida por LDA diminui, o que indica um papel protetor para células T CD8+ (Klein *et al.*, 1995; Koup *et al.*, 1991; Pontesilli *et al.*, 1998). Entretanto é importante lembrar que LDA mede o *pool* de células de memória e não de CTL efetoras. Em algumas circunstâncias, grandes proporções de células T CD8+ estimuladas por antígeno apresentam **deficiência de função efetora** (Gallimore *et al.*, 1998; Zajac *et al.*, 1998), inclusive em infecção por HIV (Carmichael *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1990; revisado em McMichael, 2000 e McMichael & Rowland-Jones, 2001).

Pelo modelo de diferenciação ramificada de células T CD8⁺ (Hamann *et al.*, 1999a), sugere-se que durante infecção viral persistente, através de ativação crônica, CTL vírus-específicas poderiam estar enriquecidas no fenótipo de diferenciação terminal (CTL efetor: CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD27⁻). Entretanto, em infecção por HIV, ocorre expansão de células predominantemente **CD27⁺CD45RO⁺ ou CD27⁻CD45RO⁺** (Ogg *et al.*, 1999; Roos *et al.*, 2000; Hazenberg *et al.*, 2000), enquanto os números de células T CD8⁺ *naive* diminuem progressivamente (Roederer *et al.*, 1995). Ogg e colaboradores (1999) não detectaram enriquecimento de células CD27⁻CD45RO⁻ (correspondente aos CTL efetores) em estudo longitudinal, o que sugere que esta subpopulação deve ter vida-curta, ou que a perda de CD45RO deve ser um fenômeno raro devido à estimulação contínua de infecção viral persistente, com muitas das células CD27⁺CD45RO⁺ (correspondente aos CTL de memória) manifestando função efetora. Ainda neste estudo, a perda das células ligantes de tetrâmeros apresentou correlação com o declínio de células CD4⁺ e aumento de viremia (Ogg *et al.*, 1999).

De fato, muitos trabalhos mostraram que em indivíduos infectados por HIV-1 ocorre a expansão de células T **CD8⁺ CD28⁻**, predominantemente **CD57⁺**, com fenótipo ativado (HLA-DR⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD29⁺ e CD62L⁻) e marcador de memória (CD45RA⁻, CD45RO⁺), mas que apresentam expressão de perforina e atividade citolítica (Ho *et al.*, 1993; Borthwick *et al.*, 1994; Vingerhoets *et al.*, 1995). Células CD8⁺CD28⁻ que exercem atividade citotóxica HIV-específica ou são precursores de CTL HIV-específicos aumentam com o declínio de CD4 (Fiorentino *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1999). Estas subpopulações devem se enquadrar nos fenótipos precursores de células efetoras CD45RA⁺CD27⁻, ou seja os estágios de transição CD45RA⁻, que incluem células de memória CD45RA⁻CD27⁺ ou células intermediárias CD45RA⁻CD27⁻ (Hamann *et al.*, 1999a, 1999b).

Por outro lado, Mollet e colaboradores (2000) encontraram como fenótipo predominante da população produtora de IFN- γ específica para HIV durante o controle eficiente da carga viral células **CD8⁺CD27⁻CD11a^{high}**. Esta subpopulação efetora diminuía somente quando HAART induzia mudanças substanciais na carga viral (Mollet *et al.*, 2000). Kostense e colaboradores também observaram que a proporção de células tetrâmero-positivas HIV-específicas produtoras de IFN- γ mostrou-se correlacionada à sobrevivência sem progressão para AIDS e à maturação para um estágio efetor CD27⁻. Estes autores sugerem que a maioria dos pacientes infectados por HIV apresentam grandes expansões de células HIV-específicas, mas que muitas destas células

não parecem ser funcionais, levando o paciente a manter grandes números de células T CD8+ vírus-específicas frente a uma alta produção viral (Kostense *et al.*, 2001a, 2001b).

Neste sentido, Appay e colaboradores (2000) mostraram que células HIV-específicas produzem citocinas antivirais, mas são defeituosas em sua função citolítica. A maioria das células tetrâmero-positivas específicas para CMV ou HIV secretaram IFN- γ e MIP-1 β , embora uma subpopulação não produzisse TNF- α . Porém, a diferença marcante era que células HIV-específicas expressavam bem menos perforina (<15%) que células CMV-específicas (50%) e exerciam menor citotoxicidade específica *ex vivo*. A falta de perforina foi também associada à expressão persistente de CD27. Além disso, as células T CD8+ HIV-específicas eram **CD28-CD45RA-CD45RO+**, enquanto algumas células T CD8+ CMV-específicas expressavam CD45RA (Appay *et al.*, 2000). Watanabe e colaboradores (2001) fizeram a mesma observação de que a expressão de perforina em células T CD8+ HIV-específicas era significativamente menor que em células T CD8+ CMV-específicas. Em contraste, Sandberg e colaboradores (2001) detectaram *ex vivo* granzima B na maioria das células CD8+ CMV-específicas, enquanto perforina era raramente expressa, apesar de serem ambas as moléculas altamente expressas após ativação antígeno-específica. Foi também detectado que os grânulos citotóxicos de células T CD8+ presentes em tecido linfóide durante a infecção crônica por HIV contêm granzima A, mas não perforina (Andersson *et al.*, 1999). É possível que a própria ausência de perforina em células HIV-específicas favoreça a expansão destas células de fenótipo alterado (Sad *et al.*, 1996; Badovinac *et al.*, 2000), como discutimos mais abaixo.

Mais uma vez comparando células HIV-específicas e CMV-específicas, Champagne e colaboradores (2001) observaram que células T CD8+ maduras específicas para CMV apresentaram o fenótipo CCR7-CD45RA+, enquanto as células específicas para HIV eram **CCR7-CD45RA-**. Ainda neste trabalho, através de análise de capacidade de proliferação, foi demonstrado que este fenótipo CCR7-CD45RA- é um estágio pré-terminal de diferenciação. Resultados semelhantes foram mostrados por Chen e colaboradores (2001). Estes trabalhos sugerem que em infecção por HIV ocorre maturação incompleta de células T CD8+ e, pela ausência de CD62L e CCR7, estas células ainda seriam excluídas dos sítios linfóides, principal local de replicação viral (Pantaleo *et al.*, 1991, 1993; Haase *et al.*, 1996).

É possível que a expansão de células T CD8+ vírus-específicas sem função efetora na infecção pelo HIV ocorra devido à **falta de ajuda do TH**, como mostrado por Zajac *et al.* (1998)

na infecção por LCMV em camundongos. De fato, células HIV-específicas estão presentes em alta frequência em pacientes infectados mesmo quando a contagem CD4 é muito baixa, mas sem atividade efetora direta (Spiegel *et al.*, 2000). Komanduri e colaboradores (2001) verificaram que aqueles pacientes HIV-1-infectados que mantêm a resposta de células T CD4+ ao CMV apresentam também células T CD8+ que se ligam ao epítipo CMV e produzem citocina efetora, sugerindo a correlação entre a atividade TH específica e CTL específica em indivíduos HIV-1-infectados. Kalams *et al.* (1999) observaram esta associação de respostas, em uma coorte de pacientes infectados não tratados, para antígenos HIV-1: níveis de resposta proliferativa específica para p24 apresentaram correlação positiva com níveis de precursores CTL específicos para Gag, e correlação negativa com níveis de RNA viral plasmático. Neste sentido, resposta vigorosa de células T CD4+ HIV-1-específicas foi associada ao controle da viremia (Rosenberg *et al.*, 1997).

O *priming* de células T CD8+ depende da interação entre células TH e **células dendríticas** (Ridge *et al.*, 1998), que deve estar afetada na infecção por HIV em vários aspectos. As células T CD4+ diminuem em número e atividade (Lane *et al.*, 1985; Miedema *et al.*, 1988). Células dendríticas participam da captura e transmissão do vírus para células T CD4+ (Geijtenbeek *et al.*, 2000a), e o funcionamento destas células apresentadoras pode ser prejudicado pela sua própria infecção (Cameron *et al.*, 1996). Tudo isto pode dificultar progressivamente a capacidade de novas respostas primárias de células T CD8+. E estas, por sua vez, devem se tornar cada vez mais necessárias pela alta taxa de mutação viral levar ao escape do controle imune (McMichael & Phillips, 1997), como por exemplo as respostas CTL anti-Tat, que parecem ser muito eficientes no controle dos primeiros estágios da infecção (Allen *et al.*, 2000).

A ativação e diferenciação de células T CD8+ *naive* em efectoras e/ou memória depende de interações com células dendríticas, envolvendo moléculas de membrana, tais como B7-1 e B7-2 (Azuma *et al.*, 1992), e citocinas, como IL-12, as quais podem ser induzidas por células T CD4+ que estimulam as células dendríticas via CD40L-CD40 (Caux *et al.*, 1994; Bennet *et al.*, 1998; Ridge *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998). Os linfócitos TH também podem estimular células dendríticas independentemente de CD40 ou interagir diretamente com linfócitos T CD8+ através de citocinas, como IL-2 (Keene *et al.*, 1982; Lu *et al.*, 2000). Foi ainda observado que o *up-regulation* de CD40L era reduzido em células T CD4+ de pacientes infectados pelo HIV em estágios mais avançados da doença, enquanto em fases iniciais ocorria aumento da produção de

IL-12 mediada por CD40, possivelmente contribuindo para os níveis elevados de várias citocinas (Vanham *et al.*, 1999). **Macrófagos** estimulados por CD40L produzem β -quimiocinas supressoras de HIV-1 (Kornbluth *et al.*, 1998) e fazem *down-regulation* de CD4 e CCR5 (Cotter *et al.*, 2001). Por outro lado, CD40L junto com IL-4 induzem a expressão de CD4 e CXCR4 em linfócitos B, o que os torna suscetíveis à infecção por vírus HIV-1 duo-trópicos ou T-trópicos (Moir *et al.*, 1999). Vingerhoets e colaboradores (1997) observaram que células T CD8+, e não células T CD4+, apresentaram hiporesponsividade à ativação mediada por CD28 ou CD40L em indivíduos infectados por HIV-1, com menor proliferação e menor produção de citocinas. De fato, trímero de CD40L (CD40LT) aumentou significativamente a resposta proliferativa de células T CD4+ de pacientes infectados ao Ag p24 de HIV, de maneira dependente de B7-CD28, algumas vezes associada à maior produção de IFN- γ (Dybul *et al.*, 2000). Por outro lado, CD40LT aumentou a resposta de CTL, em ausência de TH, na maioria dos pacientes infectados, porém de modo variável. Nos pacientes em que havia baixa resposta a CD40LT, a adição de IL-2 ou IL-15 aumentou a resposta CTL em cultura depletada de células T CD4+. Foi demonstrado que IL-15 endógena produzida por células dendríticas estimuladas por CD40LT pode ser um dos mecanismos de expansão de CTL em ausência de TH, quando falta IL-2 (Ostrowski *et al.*, 2000).

Também pode contribuir para a deficiência funcional de CTL o fato de que grande número de células T CD8+ de indivíduos infectados pelo HIV apresentarem ***down-modulation de CD3 ζ*** , além de **CD28**. Após cultura em IL-2, estas células re-adquirem CD3 ζ , mas não CD28, e passam a ter atividade citotóxica, desde que o paciente já não tenha progredido para AIDS (Trimble *et al.*, 2000). De fato, precursores CTL capazes de responder a IL-2 diminuem com a progressão da doença (Jin *et al.*, 1998). Ainda outros estudos demonstraram que IL-2 pode restaurar atividade citotóxica e a produção de IFN- γ de células T CD8+ de indivíduos infectados pelo HIV (Zou *et al.*, 1999; Shankar *et al.*, 2000). Grande expansão de células T CD8+ antígeno-específicas, mas sem atividade efetora, também foi observada em macacos infectados por SIV. As células tetrâmero-positivas específicas para epítipo SIV não apresentaram produção de IFN- γ e IL-2, ou lise celular direta, e eram de fenótipo CD28+CD45RA-. O tratamento por uma semana com IL-2 exógena restaurou a produção de IFN- γ e atividade lítica (Xiong *et al.*, 2001).

De Maria e colaboradores (1997) mostraram que a inibição da atividade citolítica de CTL de pacientes infectados por HIV contra células alvos autólogas envolvia a expressão em sua superfície de receptores inibidores de NK (**iNKR**) específicos para MHC de classe I. Outros

estudos encontraram a co-expressão de vários iNKR em células T CD8+ de indivíduos infectados pelo HIV (De Maria & Moretta, 2000; De Maria *et al.*, 2000). Por outro lado, a redução destes receptores após HAART é muito mais lenta quando comparada a outros marcadores de ativação de células T CD8+, como HLA-DR e CD38, e não apresenta correlação com a queda de contagem CD8 que acontece durante a terapia (Costa *et al.*, 2001). A expressão de iNKR em células T CD8+ de pacientes infectados por HIV-1 poderia estar associada à produção local de algumas citocinas, tais como IL-15 (Mingari *et al.*, 1998) ou TGF- β (Bertone *et al.*, 1999).

O aumento da subpopulação **CD8+CD57+** também poderia ser uma causa da inibição da atividade citotóxica de CTL em infecção por HIV-1. Já foi demonstrado que esta subpopulação é capaz de inibir atividade citolítica (Autran *et al.*, 1991; Sadat-Sowti *et al.*, 1991, 1994a; Mollet *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994), inclusive HIV-específica (Autran *et al.*, 1991; Joly *et al.*, 1989; Sadat-Sowti *et al.*, 1994a, 1994b). Em pacientes com AIDS, a eficiência lítica de CTL anti macrófagos alveolares e células expressando antígenos HIV pode ser inibida por um fator supressor produzido por células CD8+CD57+ alveolares. O declínio de atividade CTL alveolar anti-HIV ocorre em paralelo com o aumento local de células CD8+CD57+ (Autran *et al.*, 1991; Joly *et al.*, 1989).

Um número maior de estudos enfoca a subpopulação **CD8+CD28-**, mas seus resultados nem sempre podem ser interpretados como sinônimos do comportamento da subpopulação CD8+CD57+. Em indivíduos normais ou infectados, a expressão de CD57 em células CD8+ geralmente se restringe à subpopulação CD28-, sendo raras as células CD8+CD28+CD57+ (Azuma *et al.*, 1993a; Vingerhoets *et al.*, 1995; Kern *et al.*, 1996). Por outro lado, uma proporção relativamente alta de células CD8+CD28- não expressa CD57, especialmente em pacientes infectados por HIV (Vingerhoets *et al.*, 1995).

Efros e colaboradores (1996) haviam sugerido que a redução de telômeros, e da capacidade proliferativa de células CD8+CD28-, identificavam a **senescência** de células CD8+ como uma nova característica da imunopatogênese de HIV. Mas a senescência não parece ser sinônimo de disfunção. O fenótipo de células CD8+ citolíticas efetoras foi identificado como CD27-CD28-CD45RA+ (Azuma *et al.*, 1993a; Hamann *et al.*, 1997) e células CD8+ senescentes mantêm sua citotoxicidade (Efros & Pawelec, 1997). Células CD8+CD28- que exercem atividade citotóxica HIV-específica ou são precursores de CTL HIV-específicos aumentam com o declínio de CD4 (Fiorentino *et al.*, 1996; Giorgi *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1999). Weekes *et al.* (1999a)

encontraram número maior de precursores CTL específicos para HIV ou CMV na subpopulação CD8+CD28- que na população CD8+ total. Como para células CD8+CD57+, foi também encontrada uma forte associação entre soropositividade para CMV e expansão de CD8+CD28-, de forma independente da idade (Looney *et al.*, 1999). Dalod e colaboradores (1999) observaram, em pacientes infectados com HIV-1, que a resposta a antígenos HIV-1 é encontrada em células CD8+CD28-, enquanto as respostas aos vírus EBV e influenza nestes mesmos pacientes eram predominantes em células CD8+CD28+. A subpopulação CD8+CD28- deve manter sua citotoxicidade, pois a interação CD28-B7 seria importante apenas para a geração de CTL, não para sua atividade (Azuma *et al.*, 1993b). Por outro lado, Caruso e colaboradores (2000) observaram que grande número das células CD8+CD28- na infecção por HIV são CD11b, dificultando sua capacidade de interagir com endotélio, e apresentando menor capacidade citolítica. A subpopulação CD8+CD28- apresenta ainda correlação com o aumento de produção de IFN- γ durante o envelhecimento (Bandrés *et al.*, 2000) ou a progressão da infecção por HIV-1, persistindo mesmo após um ano de HAART (Sousa *et al.*, 1999). Entretanto, após ativação *in vitro*, ambas as subpopulações CD8+CD28+ e CD8+CD28- apresentaram funções efetoras em termos de citotoxicidade redirecionada por anti-CD3 e produção de IFN- γ (Borthwick *et al.*, 2000). A subpopulação CD8+CD28- pode ainda atuar como supressora de alo-reatividade de células TH, por evitar o *up-regulation* de moléculas B7 em células APC alvo (Liu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999).

Assim como ocorre com a subpopulação CD8+CD57+, a marcante expansão de células CD8+CD28- é evidente *in vivo* em várias patologias, e se contrapõe a outra característica destas células que é o seu baixo potencial de proliferação *in vitro*, o que poderia ser em parte explicado pela redução de telômeros (Efros *et al.*, 1996). Recentemente, Brenchley *et al.* (2003) definiu associação entre senescência e o fenótipo de CD57+, e não CD28-, em células CD8+ HIV-1-específicas.

As alterações de células CD8+ em infecção por HIV, prejudicando suas funções, podem ainda ter outras explicações. Foi observada a presença de células T CD8+ do tipo **Tc2** com reduzida atividade citolítica na infecção pelo HIV-1 (Maggi *et al.*, 1994). Através de estímulo por Nef, as células CD8+ apresentaram diminuição da expressão de FasL, assim como de HLA-DR (Silvestris *et al.*, 1999). É possível que o *downregulation* de **FasL**, descrito em estágios mais

avançados da doença (Sieg *et al.*, 1997), contribua para a função defeituosa de CTL em infecção por HIV.

Uma outra possível causa para a função alterada destes linfócitos em indivíduos HIV-1-infectados seria a **infecção das células T CD8+ com HIV-1**, um dos temas de estudo desta tese.

III.3. Atividade antiviral não citolítica de células T CD8+ sobre produção de HIV-1:

Os primeiros achados de que células T CD8+ são capazes de suprimir a replicação de HIV-1 foram publicados em 1986 pelo grupo de Jay Levy (Walker *et al.*, 1986). Este estudo relatava que PBMC de indivíduos HIV-1-infectados assintomáticos produziam vírus quando células CD8+ eram removidas. Além disso, experimentos de repleção demonstraram que estas células T CD8+ suprimiam de modo dose-dependente. Como esta inibição podia ser mediada por fatores solúveis, e o efeito não parecia ser MHC-restrito, concluiu-se que seria um efeito antiviral não-citolítico. Estes experimentos iniciais demonstraram o papel potencial da resposta celular no controle da infecção pelo HIV-1 e tornaram-se o fundamento de vários outros estudos da atividade antiviral de células T CD8+, inclusive da descoberta do papel de quimiocinas na infecção pelo HIV-1 (Cocchi *et al.* 1996) e, indiretamente, da descoberta de co-receptores HIV-1 (Alkhatib *et al.*, 1996).

Os **ensaios de supressão** são geralmente realizados pela co-cultura de células T CD8+ com células T CD4+ infectadas de forma aguda (a partir de indivíduos soronegativos) ou endógena (de indivíduos infectados). O monitoramento da replicação viral é geralmente realizado através de atividade RT ou concentração de antígeno p24 de HIV-1 em sobrenadante (veja revisões em Levy *et al.*, 1996; Yang & Walker, 1997 e Tomaras & Greenberg, 2001).

O **ensaio endógeno** mede a capacidade de células T CD8+ de um indivíduo suprimir a replicação de seus próprios vírus crescendo em suas células T CD4+. As células T CD4+ e CD8+ são isoladas de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV, geralmente através de separações imunomagnéticas. As células são então ativadas por 2-3 dias em PHA ou CD3 e/ou CD28, e as células T CD8+ são adicionadas às células CD4+ endogenamente infectadas, em várias proporções. Este ensaio dificulta comparar a potência de células T CD8+ entre pacientes, além de a contagem de células T CD4+ de alguns indivíduos infectados ser baixa demais para que se possa realizar o experimento (revisado em Tomaras & Greenberg, 2001).

O *ensaio agudo* pode medir a atividade antiviral de linfócitos CD8⁺ utilizando-se uma variedade de vírus e diferentes alvos celulares CD4⁺. As células T CD8⁺ são obtidas de indivíduos infectados ou não, podendo ser imediatamente utilizadas ou transformadas *in vitro* para gerarem linhagens celulares contínuas. As células alvos CD4⁺ são obtidas de indivíduos saudáveis, portanto quando as células T CD8⁺ são de indivíduos infectados sempre ocorre aloreatividade. Depois de ativadas por 2-3 dias em PHA ou CD3 e/ou CD28, as células alvos CD4⁺ são então infectadas com um inóculo viral conhecido, e as células T CD8⁺ são adicionadas em várias proporções à cultura. Neste sistema pode-se controlar o título e o tipo do vírus. Este ensaio também permite comparar a atividade de diferentes células T CD8⁺ (ou sob diferentes estímulos) enquanto mantém-se o vírus e a célula alvo constante (revisado em Tomaras & Greenberg, 2001).

Outro modelo é a *co-cultura de células dendríticas e células T CD4⁺* (DC-CD4⁺) (Cameron *et al.*, 1992; Pope *et al.*, 1994; Weissman *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 1996; Severino *et al.*, 2000), o qual tenta imitar as interações celulares que ocorrem nos órgãos linfóides, principal sítio de replicação do HIV-1 (Pantaleo *et al.*, 1993; Embretson *et al.*, 1993). Neste modelo, para o estudo de infecção aguda, as células dendríticas são infectadas e então os linfócitos CD4⁺ são adicionados à cultura.

No sistema DC-CD4⁺, o grupo de Anthony Fauci (Barker *et al.*, 1996) verificou que a modulação da replicação de HIV em células T CD4⁺ através de linfócitos CD8⁺ é um fenômeno multifatorial, envolvendo efeitos tanto inibitórios como estimulatórios na replicação de HIV. Observaram dois tipos de atividades antivirais de células T CD8⁺, uma presente em indivíduos não infectados ou infectados (em todos os estágios da doença), a qual é capaz de suprimir a replicação viral no modelo endógeno desta co-cultura, e outra atividade, presente apenas em indivíduos infectados, capaz de suprimir a replicação de HIV no modelo agudo deste ensaio. Estas duas atividades podem ser ainda distinguidas pelo fato de apenas a última ser sensível à irradiação de células T CD8⁺. Por outro lado, células T CD8⁺ autólogas ou alogeneicas adicionadas ao sistema de infecção aguda DC-CD4⁺ não inibem, mas aumentam a produção viral. As tentativas de induzir o efeito supressor de células T CD8⁺ de indivíduos não infectados através de ativadores policlonais levaram, na verdade, ao aumento ainda maior da replicação viral. Acreditamos ser possível a participação de células T CD8⁺ na produção viral em co-culturas com DC, e abordamos esta questão no estudo 4 desta tese.

Este grupo demonstrou ainda neste modelo DC-CD4+ que a supressão mediada por células T CD8+ para infecção endógena não se deve exclusivamente às β -quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, e ainda que estas quimiocinas não inibam a replicação viral aguda, quer de vírus X4 ou R5, embora inibam a replicação de vírus R5 em culturas PHA (Rubbert *et al.*, 1997).

Severino e colaboradores (2000) observaram a atividade supressora de replicação de vírus R5 por células T CD8+ em linfócitos primários CD4+, monócitos e células dendríticas isoladas. Porém, a inibição viral era significativamente diminuída em co-culturas DC/CD4+, sugerindo que estes *clusters* seriam sítios de menor controle de replicação viral por células T CD8+ *in vivo*. Mais uma vez, sugerimos que a não inibição de replicação viral possa ter ocorrido por participação de células T CD8+ na produção.

Várias outras características da supressão por células CD8+ foram verificadas. Apesar de o efeito inibitório ser mediado por fator solúvel, o contato célula a célula é necessário para uma atividade ótima (Walker & Levy, 1989). O efeito antiviral é inversamente correlacionado ao estágio da doença (Walker & Levy, 1989; Brinchmann *et al.*, 1990; Mackewicz *et al.*, 1991, Landay *et al.*, 1993). Em indivíduos assintomáticos saudáveis, baixas proporções de células CD8+ (geralmente 0,25 célula T CD8+/célula T CD4+) inibem a replicação viral, ao contrário de indivíduos com AIDS, nos quais são necessárias proporções de 2 ou mais (Mackewicz *et al.*, 1991). Por outro lado, células T CD8+ de indivíduos não infectados pelo HIV-1 geralmente apresentam efeito supressor quando em proporções ainda mais elevadas (revisado em Levy *et al.*, 1996).

Em infecção aguda, a inibição antiviral não-citolítica por células T CD8+ desenvolve-se anteriormente à produção de anticorpos neutralizantes vírus-específicos, e apresenta correlação temporal com o declínio da viremia (Mackewicz *et al.*, 1994b). Outro estudo onde foi observada uma correlação inversa entre a atividade de células T CD8+ e carga viral demonstrou ainda que linfócitos T CD8+ derivados de linfonodos suprimem a replicação de HIV-1 *in vitro* (Blackbourn *et al.*, 1996). Indivíduos LTNP parecem ter atividade antiviral de células CD8+ preservada, sugerindo um papel para estas células na manutenção da latência clínica (Levy *et al.*, 1996). Por outro lado, Ferbas e colaboradores (1995) observaram que atividade antiviral de células T CD8+ apresentava-se diminuída em indivíduos não-progressores com as menores cargas virais e as maiores contagens T CD4+. É possível que a baixa carga viral leve a uma ausência de estímulo antigênico para células T CD8+ e, desse modo, a uma diminuição de sua atividade.

Em relação à contagem CD4, existem dados conflitantes sobre sua correlação com a atividade antiviral de células T CD8+ em indivíduos infectados. Alguns encontraram correlação (Mackewicz *et al.*, 1991; Gomez *et al.*, 1994), outros não (Kootstra *et al.*, 1997; Copeland *et al.*, 1997). Estes últimos estudos também não encontraram correlação com o estado clínico do indivíduo.

Foram ainda identificadas células CD8+ que inibem replicação de HIV-1 em certas coortes de indivíduos expostos não-infectados (Levy, 1993; Stranford *et al.*, 1999) e em filhos de mães soropositivas não-infectados (Levy, 1993; Levy *et al.*, 1998) ou infectados (Pollack *et al.*, 1997). É difícil interpretar estes resultados pelo fato de células CD8+ de indivíduos não infectados geralmente também apresentarem atividade supressora sob certas condições experimentais (Barker *et al.*, 1996; Brinchmann *et al.*, 1990; Rosok *et al.*, 1997). Os efeitos supressores de células T CD8+ também foram observados para SIV (Kannagi *et al.*, 1988; Ennen *et al.*, 1994), HIV-2 (Rosok *et al.*, 1997) e FIV (Jeng *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000).

III.4. Mecanismos de inibição viral por células T CD8+:

A inibição de replicação viral é mediada por moléculas “supressoras” solúveis ou de membrana de células T CD8+, as quais interagem com as células hospedeiras levando ou à inibição da entrada do vírus ou deflagrando alguma via intracelular de sinalização que afete negativamente o ciclo de vida viral (revisado em Tomaras & Greenberg, 2001 e Copeland, 2001).

O primeiro trabalho a descrever a inibição viral por células T CD8+ propôs que não envolveria citólise, já que a inibição podia ocorrer através de membrana semi-permeável (Walker *et al.*, 1986), embora o contato célula a célula seja necessário para uma atividade ótima (Walker & Levy, 1989). Contudo, estudos semelhantes em humanos e macacos indicam que as células T CD8+ inibem melhor a replicação viral em células autólogas que alogeneicas (Kannagi *et al.*, 1988 e 1990; Tsubota *et al.*, 1989a). Uma possível explicação é o fato de que CTLs específicas para HIV-1 (Yang *et al.*, 1997), HBV (Guidotti *et al.*, 1996) ou sarampo (Finke *et al.*, 1995) produzem fatores solúveis antivirais, como, por exemplo, IFN- γ .

A análise de linhagem celular T CD8+ quando em co-cultura com células T CD4+ comparada com cultura em *transwell* (separadas por membrana semi-permeável), mostrou que vírus R5 foram suprimidos por contato ou fatores solúveis (>90% de inibição), enquanto vírus X4

eram melhor suprimidos por contato (>90%) do que por mediadores solúveis (73%). No caso de vírus R5, aparentemente a atividade mediada por contato ou por fatores solúveis era de potência equivalente quando em proporção de 2:1 CD8+/CD4+, contudo a atividade de contato é de maior potência quando a proporção CD8+/CD4+ é diminuída (Lacey *et al.*, 1998; Tomaras *et al.*, 2000; revisado em Tomaras & Greenberg, 2001). Muito da atividade solúvel anti-vírus R5 nestes estudos pode ser atribuída às β -quimiocinas, pois grande quantidade destas moléculas eram secretadas por esta linhagem celular.

Moléculas de membrana importantes para o efeito supressor de células T CD8+ na replicação viral não foram ainda identificadas. Algumas classes de fatores solúveis inibitórios parecem ser importantes: o Fator Antiviral de Célula T CD8+ (**CAF**, *CD8+ T cell Antiviral Factor*) derivado de linfócitos T CD8+, ainda não identificado, que inibe a replicação viral em nível de transcrição viral, as β -quimiocinas, que bloqueiam via CCR5, e a citocina IL-16.

CAF é encontrado em sobrenadantes de células T CD8+ estimuladas por mitógenos e apresenta atividade inibitória variável para um amplo espectro de vírus M ou T- trópicos de HIV-1, assim como HIV-2 (Mackewicz & Levy, 1992; Brinchmann *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1991; Hsueh *et al.*, 1994), sugerindo que seja independente de especificidade de antígeno ou co-receptor. CAF atua suprimindo a expressão de proteínas virais dirigidas por LTR (Chen *et al.*, 1993; Mackewicz *et al.*, 1995; Copeland *et al.*, 1995). Embora muitas citocinas apresentem atividade anti-HIV, tais como IL-6 (*IFN- β 2*), TNF- α , TNF- β , TGF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-8 e IL-4, estudos com anticorpos bloqueadores demonstram que não são responsáveis pela atividade inibitória de células T CD8+ (Mackewicz *et al.*, 1994a; Brinchmann *et al.*, 1991). CAF apresenta estabilidade em pH tão baixo quanto 2, resistência relativa à tripsina, estabilidade a temperaturas tão altas quanto 56°C por 30 minutos ou 100°C por 10 minutos, e estudos por exclusão de tamanho demonstram que deve ser uma proteína em torno de 30 kDa (revisado em Levy *et al.*, 1996).

Outro fator que suprime a replicação viral de HIV-1 e SIV *in vitro* é a citocina **IL-16** (Baier *et al.*, 1995), originalmente descrita como uma substância que leva ao *downregulation* da molécula CD4 (Cruikshank *et al.*, 1994).

As β -quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES foram primeiramente identificadas por Cocchi e colaboradores (1995) sendo produzidas por células T CD8+ e apresentando atividade antiviral para vírus M-trópicos. Um dos mecanismos de inibição de replicação viral destas β -

quimiocinas é o bloqueio da entrada viral por interação com o co-receptor CCR5 (Dragic *et al.*, 1996), assim como SDF-1 bloqueia a entrada de vírus T-trópicos por ser um ligante de CXCR4, outro co-receptor de HIV-1 (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). Outro mecanismo de inibição por SDF-1 é através de *downregulation* de seu receptor (Amara *et al.*, 1997). Contudo, células T CD8+ não produzem SDF-1 (Lacey *et al.*, 1997) e vários estudos demonstram que as β -quimiocinas não são responsáveis pela totalidade de atividade antiviral de células T CD8+ (Palliard *et al.*, 1996; Mackewicz *et al.*, 1996; Moriuchi *et al.*, 1996; Barker *et al.*, 1998; Leith *et al.*, 1997; Rubbert *et al.*, 1997). MDC (*Macrophage-Derived Chemokine*, ou quimiocina derivada de macrófago), ligante de CXCR4, foi identificada em sobrenadante de células T CD8+ de indivíduos infectados que suprimiam replicação de vírus X4 (Pal *et al.*, 1997). Porém, outros estudos mostraram que MDC não inibia a replicação de HIV em células T (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998) e, portanto, não deve ser responsável por toda a atividade antiviral de células T CD8+. Recentemente, foi demonstrado que a inibição de vírus X4 deve-se a pelo menos duas frações de proteínas, sensíveis ao calor, uma >50 kDa, a qual se liga a heparina, e, outra, <50 kDa, que não se liga. O padrão de secreção destas proteínas mostrou-se diferente de β -quimiocinas, e era produzido em maior quantidade por CTL de indivíduos infectados pelo HIV, em comparação com indivíduos HIV- (Geiben-Lynn *et al.*, 2001). Também foi verificado que a supressão de expressão de genes mediada por HIV-LTR, mecanismo de ação de CAF, não se deve a β -quimiocinas (Copeland *et al.*, 1997; Leith *et al.*, 1997). Ainda em um destes estudos, observou-se que os sobrenadantes de células T CD8+ de indivíduos infectados por HIV-1 apresentavam efeitos opostos na transcrição mediada por LTR em células T e monócitos (Copeland *et al.*, 1997). Na verdade, os sobrenadantes de ambos os linfócitos T CD8+ e CD4+ apresentam este padrão de ação (Leith *et al.*, 1999).

Se a presença ou não de β -quimiocinas é protetora para a progressão da doença é discutível. Nenhuma diferença significativa dos níveis de β -quimiocinas foi encontrada entre estágios assintomáticos ou sintomáticos da infecção pelo HIV-1 em dois estudos (Mackewicz *et al.*, 1996; Rubbert *et al.*, 1997), enquanto outro mostrou que a produção de β -quimiocinas era mais baixa em indivíduos com AIDS (Garzino-Demo *et al.*, 1999). Vários tipos celulares produzem β -quimiocinas, além de linfócitos T CD8+. Aparentemente, a produção de β -quimiocinas por células T CD4+ é mais importante para a proteção de infecção por vírus R5 que a derivada de células T CD8+. Linfócitos T CD4+ produzem MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES

(Paxton *et al.*, 1996; Kinter *et al.*, 1996a, 1996b; 2000; Furci *et al.*, 1997). A secreção destas moléculas por células T CD4+, e não CD8+, apresentou correlação com progressão clínica mais favorável (Saha *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 2001). Em estudo cego prospectivo observou-se que os níveis de produção de RANTES por células T CD4+ e CD8+, assim como de inibição de expressão gênica de HIV por células T CD8+, antes do início de HAART, apresentou associação significativa com a manutenção de carga viral indetectável por mais de 1 ano (Fransen *et al.*, 2000). Outro trabalho demonstrou alta produção de β -quimiocinas por células T CD4+ em LTNP (Scala *et al.*, 1997). C-C quimiocinas também são produzidas por macrófagos (Verani *et al.*, 1997) e células NK (Oliva *et al.*, 1998), suprimindo infecção por HIV-1.

Os fatores antivirais produzidos por células T CD8+ podem estar envolvidos em imunidade protetora. Em estudo de Ahmed e colaboradores (2001), três macacos expostos a HIV-2, mas soronegativos, resistentes ao desafio intra-retal com SIVsm, apresentaram maior produção de RANTES e MIP-1 que outros 39 animais *naive*. Além disso, sobrenadantes de células T CD8+ destes macacos resistentes suprimiam a infecção por SIV, o que era parcialmente neutralizado por anticorpos anti-quimiocinas (Ahmed *et al.*, 2001).

A capacidade de atuar sem contato celular ou restrição HLA (discutido acima) sugere que o principal mecanismo das células efectoras de supressão de replicação de HIV seja não-citolítico e não específico para HIV. Alguns autores até sugerem que as células T citotóxicas sejam danosas pelo fato de eliminarem células T CD4+ (revisado em Zinkernagel, 1995), e que, portanto, fatores como CAF teriam um duplo papel de inibir a replicação viral e proteger células CD4+ da citotoxicidade de células T CD8+ por diminuir a expressão de proteínas virais em células infectadas (revisado em Levy *et al.*, 1996). Por outro lado, as correlações clínicas entre a atividade antiviral de células T CD8+ e atividade citolítica de CTLs HIV-específicas sugerem que ambos os mecanismos sejam exercidos pelas mesmas células (revisado em Yang & Walker, 1997). Mas, devemos ainda considerar que a maioria dos estudos que relatam uma relação inversa entre CTL e viremia HIV inicial utilizou ensaios LDA, que não medem atividade de células T CD8+ efectoras diretamente (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Koup & Ho, 1994).

Foi verificado que células T CD8+ HIV-específicas não citolíticas (sem perforina) podem expressar β -quimiocinas antivirais. Nestes mesmos indivíduos infectados pelo HIV-1, a maioria das células específicas para antígenos de CMV que secretam β -quimiocinas antivirais possuem fenótipo citolítico (Appay *et al.*, 2000). Este estudo sugere que, em algumas circunstâncias, a

síntese de β -quimiocinas (atividade não citolítica) pode divergir do fenótipo citolítico. Mesmo em indivíduos normais, aproximadamente 60% das células T CD8+ que sintetizam MIP-1 β não possuem perforina. Estas células são predominantemente de fenótipo ativado/memória (Kamin-Lewis *et al.*, 2001).

IV. CITOCINAS DA FAMÍLIA DE RECEPTOR COMUM GAMMA (CITOCINAS γ c) E SUA PARTICIPAÇÃO NA IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1:

IV.1. Citocinas γ c e homeostasia de células T:

Os números de células T são controlados, tanto que a contagem de células periféricas é utilizada para monitorar certas doenças, inclusive a progressão da infecção pelo HIV. As células T maduras parecem perceber a ausência de outras semelhantes e respondem através de divisão celular, e o fenômeno não parece discriminar entre células T CD4+ ou T CD8+ (revisado em Freitas & Rocha, 2000; Murrack *et al.*, 2000). Por outro lado, existe evidência de que células T CD4+ e T CD8+ são controladas até certo ponto de forma independente: em camundongos deficientes de CD4, células T CD8+ compensam a falta de células T CD4+ pelo seu aumento em números, mas o inverso não é verdadeiro em animais deficientes de CD8 (Bachmann *et al.*, 1995).

A proliferação, diferenciação e sobrevivência das células T pós-maturação intra-tímica dependem de vários fatores, inclusive contato com células apresentadores de antígeno, envolvendo moléculas de membrana e solúveis. Entretanto, a contribuição relativa de cada fator deve variar em diferentes condições e para cada tipo de células T.

A maioria das células *naive* derivam do timo, e não parece existir *feedback* negativo ou positivo de sua produção. Animais que recebem mais lobos tímicos apresentam maior número de células maduras, enquanto a depleção de células T periféricas não aumenta a produção tímica (Gabor *et al.*, 1997; van Meerwijk *et al.*, 1998), a não ser em algumas situações, como irradiação subletal (Mackall *et al.*, 1997) ou HAART em pacientes HIV-1-infectados (Douek *et al.*, 1998). Apesar de estes dois últimos casos serem situações de depleção de células T periféricas, os tratamentos devem afetar o timo diretamente, por exemplo, diminuindo a infecção e alterações tímicas pelo HIV. De modo geral, o *output* tímico parece depender apenas do próprio timo, mas a

produção não seria o único fator regulador dos números de células *naive*. Após saírem do timo, as células *naive* podem responder aos números de células T encontrados na periferia, e no caso de deficiência, passam a se dividirem reconstituindo o *pool* linfocitário, enquanto sofrem um processo de diferenciação limitado (Murali-Krishna *et al.*, 2000; Goldrath *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2000). Células T CD4⁺ ou CD8⁺ *naive* precisam interagir com moléculas MHC próprias (e peptídeos envolvidos na seleção positiva intra-tímica ou não) para sobreviverem e proliferarem na periferia em condições linfopênicas (Kirberg *et al.*, 1997; Bender *et al.*, 1999; Ernst *et al.*, 1999; Goldrath & Bevan, 1999) enquanto células T de memória não necessitam (Tanchot *et al.*, 1997; Murali-Krishna *et al.*, 1999; Swain *et al.*, 1999).

Várias evidências demonstram que citocinas que se ligam aos receptores contendo a cadeia comum γ (γ c): IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (denominadas aqui citocinas γ c) estão envolvidas na homeostasia de células T (revisado em Malek *et al.*, 1999). Na doença de imunodeficiência severa combinada ligada ao X (X-SCID), caracterizada por desenvolvimento defeituoso de células T, ocorrem mutações em γ c. Baseado nos resultados obtidos de camundongos knockout, a deficiência de IL-2-IL-2R não explica as anomalias associadas à X-SCID; neste caso, os animais apresentam linfoproliferação, fenótipo ativado de células T periféricas, apoptose mediada por Fas prejudicada e autoimunidade (Sadlack *et al.*, 1993; Kneitz *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 1995). Análises das diferentes citocinas γ c revelaram que o sistema IL-7-IL7R é crucial para o desenvolvimento de células T (Peschon *et al.*, 1994, Fry *et al.*, 2001a). Já IL-15 é importante para a diferenciação de células NK (Lodolce *et al.*, 1998). Tanto IL-7 como IL-15 estão envolvidas na proliferação e manutenção de linfócitos intra-epiteliais CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$, ao menos em camundongos (Inagaki-Ohara *et al.*, 1997). De fato, animais deficientes de citocinas γ c apresentam homeostasia e sobrevivência de células T *naive* prejudicadas, mas resposta proliferativa normal ao estímulo antigênico (Nakajima *et al.*, 1997; Lantz *et al.*, 2000).

Para células *naive*, as citocinas envolvidas em sua sobrevivência são: IL-6, *in vitro* (Teague *et al.*, 1997), IL-7 e IL-4, *in vitro* e *in vivo* (Boise *et al.*, 1995; Vella *et al.*, 1997; Hassan & Reen, 1998; Boursalian & Bottomly, 1999a, 1999b; Soares *et al.*, 1998; Kishimoto & Sprent, 1999; Webb *et al.*, 1999; Marrack *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001), em parte pela manutenção dos níveis de Bcl-2 intracelular (Vella *et al.*, 1997). Alguns trabalhos indicam que apenas IL-7, e não IL-4, seria importante para a sobrevivência de células T *naive in vivo* (Tan *et al.*, 2001; Vivien *et al.*, 2001). IL-7 é capaz de expandir células T CD45RA⁺CD45RO⁻ de neonatos ou de adultos *in*

vitro sem alterar seu fenótipo, além de induzir alta atividade de telomerase (Soares *et al.*, 1998). É importante lembrar que no exemplo de grande aumento de células na periferia pela adição de mais lobos tímicos (Berzins *et al.*, 1999), o timo é fonte de IL-7, necessária à sobrevivência de células T maduras.

Durante a resposta ao antígeno, as células ativadas aumentam rapidamente e em grande número. Este aumento envolve as moléculas TCRs e proteínas co-estimuladoras como CD27, CD28, OX40, 4-1BB, LFA-1 e CD2 (Jenkins *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1995; June *et al.*, 1990; Chambers & Allison, 1997; Godfrey *et al.*, 1994). Após ativadas, estas células geralmente são de vida curta. *In vitro*, elas podem ser mantidas vivas por membros da família de citocinas γ c (Boise *et al.*, 1995; Akbar *et al.*, 1996; Vella *et al.*, 1998) e por interferons tipo I (Marrack *et al.*, 1999), mas não por IL-6 (Teague *et al.*, 2000). As atividades de citocinas γ c na indução de proliferação e de sobrevivência podem ser separadas: IL-4 e IL-7 podem prevenir a morte de células ativadas sem causar proliferação substancial, enquanto a sobrevivência e a proliferação são co-induzidas por IL-2 e IL-15 (Boise *et al.*, 1995; Vella *et al.*, 1998). O rápido desaparecimento de células ativadas não afeta os números de células naive e de memória. Para que este processo de eliminação de células ativadas ocorra com grande eficiência, várias vias estão envolvidas, ativadas por Fas, TNF- α R ou radicais livres de oxigênio (Van Parijs *et al.*, 1996; Sytwu *et al.*, 1996; Hildeman *et al.*, 1999).

A presença do antígeno não parece ser essencial para a manutenção de células de memória, sugerindo a existência de mecanismos endógenos (Swain *et al.*, 1999). As células de memória expressam maior quantidade de moléculas de adesão, permitindo uma adesão mais eficiente às células apresentadoras de antígeno, além de mudarem a expressão de vários receptores de quimiocinas, permitindo sua ocupação de diferentes nichos, com conseqüente expansão e/ou sobrevivência em relação às outras células de mesma especificidade (revisado em Freitas & Rocha, 2000). A maior capacidade de resposta de células de memória em relação às células *naive* também pode se dar por expressão de receptores diferentes ou de maior afinidade para citocinas. A divisão de células T CD8+ de memória depende de IL-15, produzida por células de estroma (Zhang *et al.*, 1998), enquanto sua proliferação é inibida por IL-2, produzida por linfócitos T ativados durante as respostas imunes (Ku *et al.*, 2000), mas também mantida ligada à matriz extracelular (Wrenshall *et al.*, 1999).

É possível que, durante o programa de diferenciação de células T, a expressão de receptores de citocinas seja regulado de modo coordenado com moléculas envolvidas no tráfico e localização em tecidos linfóides e não linfóides. Neste sentido, Manjunath e colaboradores (2001) demonstraram recentemente, em um modelo murino transgênico, que as citocinas IL-2 e IL-15 podem modular a diferenciação de células T CD8⁺ em células de memória do tipo T_{EM} ou T_{CM}, respectivamente (Sallusto *et al.*, 1999). Se, após ativação pelo antígeno, as células T CD8⁺ forem cultivadas em altas doses de IL-2, estas se desenvolvem em células de fenótipo e função efetores, tornando-se CCR7⁻ CD62L⁻, expressando altos níveis de CD69, CD25, CD44 e ligante de P-selectina, e sendo capazes de citotoxicidade imediata. Se, ao contrário, forem cultivadas em IL-15, expressam CD62L, CCR7 e CD44, mas não se ligam a P-selectina, e apresentam baixos níveis de CD69 e CD25 (Manjunath *et al.*, 2001). Por outro lado, Geginat e colaboradores (2001) observaram que IL-15, bem como IL-15+IL-7, estimularam muito mais a proliferação de células T CD4⁺ humanas purificadas em T_{EM}, conforme a expressão de CD45RA e CCR7, que de T_{CM}. Apenas as células T naive (T_N) responderam à mistura de citocinas IL-4, TNF- α , IL-6 e IL-10. Mas a adição de TNF- α , IL-6 e IL-10 à cultura com IL-7+IL-15 permitiu o aumento de proliferação de células de memória (T_{CM} e T_{EM}), e ainda a proliferação de T_N. Entretanto, somente as células T_{CM}, e não as T_N, adquiriram o fenótipo T_{EM} nesta última condição de cultura. A presença de células dendríticas nas culturas com IL-7+IL-15 tornaram as células naive também responsivas a estas citocinas, assim como aumentaram a responsividade de células de memória. É interessante que anticorpos anti-MHC não bloquearam estes efeitos das APC.

IFN- γ e perforina também participam de homeostasia de células T CD8⁺, perforina regulando a expansão e, IFN- γ , a imunodominância e a fase de morte celular (Badovinac *et al.*, 2000). A deficiência de perforina poderia aumentar a expansão de células T CD8⁺ por diminuição de morte de APC (Sad *et al.*, 1996; Klenerman *et al.*, 1998), resultando em maior exposição antigênica e maior ativação de precursores *naive*. Perforina também poderia agir diretamente em células Ag-específicas através de controle do balanço entre divisão celular e morte durante a fase de expansão (Gallimore *et al.*, 1998; Matloubian *et al.*, 1999). IFN- γ poderia alterar o proteossoma, modificando a resposta aos epítomos, ou regular moléculas envolvidas em morte celular, ou receptores que levam a sobrevivência, como IL-15R (Marrack *et al.*, 2000). Neste sentido, a ausência de perforina em CTL HIV-específicas favoreceria a expansão destas células de fenótipo alterado (Sad *et al.* 1996).

IV. 2. Papel de citocinas γ c na imunopatogênese da infecção pelo HIV:

O fato de citocinas indutoras de replicação de HIV apresentarem-se em níveis elevados durante a progressão da doença (Rieckmann *et al.*, 1991; Vyakarnam *et al.*, 1990; Merrill *et al.*, 1989; von Sydow *et al.*, 1991; Rautonen *et al.*, 1991) e ocorrer alterações de expressão de citocinas Th1/Th2 (Maggi *et al.*, 1994; Graziosi *et al.*, 1994) indicam seu papel na imunopatogênese da infecção pelo HIV. O aumento de citocinas pró-inflamatórias favorece a replicação viral, já os efeitos da diminuição de produção de IL-2 são menos claros (Lane *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1997; Graziosi *et al.*, 1994).

Múltiplas citocinas regulam a produção viral como observado em vários sistemas, de infecção aguda ou endógena, em células transformadas ou primárias, por manipulação de citocinas endógenas ou exógenas (revisado em Poli & Fauci, 1993, veja Quadro I.1). IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , M-CSF e GM-CSF aumentam a replicação viral em macrófagos derivados de monócitos *in vitro* (Vyakarnam *et al.*, 1990; Kinter *et al.* 1995a, 1995b, 2000; Schuitemaker *et al.*, 1992; Poli *et al.*, 1990; Poli *et al.*, 1994; Perno *et al.*, 1989; Koyanagi *et al.*, 1988; Meltzer *et al.*, 1988; Gendelman *et al.*, 1988; Gruber *et al.*, 1995), mas não ocorre aumento *in vivo* de viremia plasmática em pacientes recebendo GM-CSF junto com terapia antiretroviral (Manfredi *et al.*, 1996; Manfredi *et al.*, 1995). IL-13 e IFN- α/β inibem HIV (Mikovits *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, 1994; Goletti *et al.*, 1996; Poli *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 1992; Poli *et al.*, 1989; Shirazi *et al.*, 1993), enquanto IL-4, IL-10, TGF- β e IFN- γ apresentam efeitos inibitório ou estimulador dependendo das condições experimentais (Schuitemaker *et al.*, 1992; Mikovits *et al.*, 1994; Kazazi *et al.*, 1992; Novak *et al.*, 1990; Weissman *et al.*, 1995; Finnegan *et al.* 1996; Angel *et al.* 1995; Poli *et al.*, 1991; Lazdins *et al.*, 1991; Goletti *et al.*, 1996; Poli *et al.*, 1994). Em células primárias, IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, TNF- α e IFN- γ aumentam, enquanto IL-10 e IFN- α inibem a replicação viral (Kinter *et al.* 1995a, 1995b; Akridge *et al.*, 1994; Kollmann *et al.*, 1996; Kootstra *et al.*, 1994; Masood *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, 1994; Saville *et al.*, 1994; Weissman *et al.*, 1994). Os melhores ativadores de replicação viral são as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, e IL-6. O próprio HIV é capaz de induzir a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 *in vitro*, que por sua vez aumentam a replicação viral, formando uma alça de amplificação autócrina/parácrina (Folks *et al.*, 1989; Clouse *et al.*, 1989; Vyakarnam *et al.*, 1990; Kinter *et al.* 1995a, 1995b; Ramilo *et al.*, 1993). A produção destas citocinas não parece depender da infecção, pois a adição de proteínas do envelope induzem a secreção destas citocinas através da ligação de CD4 na

superfície celular (Weissman *et al.*,1994; Merrill *et al.*, 1989).O estímulo por TNF- α ocorre via ativação de NF-kB, que se liga em sítios do LTR viral, induzindo sua transcrição (Duh *et al.*, 1989; Israel *et al.*, 1989). Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 aumentam replicação de HIV-1, enquanto IL-10 e TGF- β diminuem (Fauci, 1993; Vyakarnam *et al.*, 1990).

Efeitos de citocinas sobre a produção de HIV-1 em		
	Células T CD4+	Macrófagos
IL-1β	↑	↑
IL-2	↑	nt
IL-3	nt	↑
IL-4	↑	↑↓
IL-6	nt	↑
IL-10	↓	↑↓
IL-12	↑	nt
IL-13	nt	↓
IL-15	↑	nt
IFN-α	↓	↓
IFN-γ	↑↓	↑↓
TGF-β	↑↓	↑↓
GM-CSF	nt	↑
M-CSF	nt	↑
TNF-α/β	↑	↑
CD30-ligante	↑	↑

Quadro I. 1. Citocinas e moléculas relacionadas às citocinas com efeitos regulatórios sobre a replicação do HIV-1.

↑ aumento da replicação do HIV-1

↓ supressão da replicação do HIV-1

nt não testado ou nenhum efeito significativo reportado

Baseado em Poli & Fauci (Semin Immunol. 1993; 5(3):165-73).

Apesar de ser evidente a diminuição de atividade Th1 na infecção pelo HIV-1, a predominância de citocinas Th2 é debatida (Meyaard *et al.*, 1994). Clerici e colaboradores (1989a; 1993; 1996) encontraram um padrão Th2 de secreção de citocinas pelos PBMC estimulados de pacientes infectados pelo HIV durante a progressão da doença. Por outro lado, outros grupos de pesquisa observaram uma tendência de produção de citocinas Th0 ao invés de Th2 (Graziosi *et al.*, 1994; Maggi *et al.*, 1994). Em ambos os casos, a replicação de HIV foi maior em clones Th0 e Th2 que Th1 (Maggi *et al.*, 1994; Vyakarnam *et al.*, 1995), ressaltando a importância da resposta Th1, prejudicada na infecção pelo HIV (Clerici *et al.*, 1993, 1996; Clerici & Shearer, 1993, 1994).

Dentre as citocinas γ c, **IL-2** é uma das mais estudadas em relação à infecção pelo HIV-1. Assim como *in vivo* ocorre diminuição dos níveis de IL-2 durante a progressão da doença, inclusive de seu mRNA, em PBMC e células de linfonodos (Graziosi *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1985), *in vitro* a infecção de células T CD4⁺ diminui sua capacidade de produzir IL-2, e células T CD4⁺ isoladas de pacientes respondem com baixa secreção de IL-2 quando estimuladas por mitógenos ou estímulo antigênico (Graziosi *et al.*, 1994). Recentemente, foi demonstrado que a menor produção de IL-2 em células T CD4⁺ ativadas CD69⁺ é uma disfunção seletiva, apresentando-se dissociada da produção de IFN- γ , o que deve ser levado em consideração ao se medir a frequência de células antígeno-específicas através de IFN- γ intracelular (Sieg *et al.*, 2001). Uma recuperação significativa da frequência de células produtoras de IL-2 só foi observada em pacientes infectados pelo HIV que apresentaram manutenção do controle da replicação viral durante HAART (Sousa *et al.*, 1999). A reduzida produção de IL-2 por células T CD4⁺ de indivíduos infectados pelo HIV é acompanhada por menor resposta proliferativa e maior suscetibilidade à apoptose (Lane *et al.*, 1985; Miedema *et al.*, 1988; Clerici *et al.*, 1989a, 1989b, 1993; Groux *et al.*, 1992; Meyaard *et al.*, 1992). Neste sentido, a adição de IL-2 às células T de pacientes infectados pelo HIV aumenta a proliferação (Seder *et al.*, 1995) e protege da apoptose *in vitro* (Adachi *et al.*, 1996). A diminuição de apoptose parece estar relacionada à normalização do ciclo celular de linfócitos por ação de IL-2 (Paiardini *et al.*, 2001). IL-2 restaura funções citotóxica e de produção de IFN- γ de CTL de indivíduos infectados pelo HIV ou macacos infectados pelo SIV (Trimble *et al.*, 2000, Zou *et al.*, 1999; Shankar *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2001) e tem efeitos estimulador ou inibidor da atividade não citolítica de células T CD8⁺ dependendo das condições de cultura (Barker *et al.*, 1995; Kinter *et al.* 1995a, 1995b,

1996a, 1996b). Por outro lado, para células T CD4+ ativadas, IL-2 parece ser o estimulador mais potente da replicação viral, provavelmente devido à sua dependência para a proliferação dos linfócitos (Gallo *et al.*, 1984; Hazan *et al.*, 1990). Embora IL-2 possa atuar de forma independente de outras citocinas (Weissman *et al.*, 1996), IL-2 ativa a alça de amplificação autócrina ou parácrina de citocinas induzidas por HIV. Quando IL-2 é adicionada às culturas de PBMC ou CD8dPBMC infectadas com HIV, ocorre a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 e IFN- γ . Se estas citocinas endógenas são neutralizadas, a replicação viral é diminuída (Vyakarnam *et al.*, 1990; Kinter *et al.*, 1995a, 1995b; Ramilo *et al.*, 1993). O fato da adição de IL-2 às culturas de células mononucleares de pacientes infectados restaurar parcial ou completamente várias funções celulares, mas por outro lado aumentar a produção viral, enfatiza a correlação entre a ativação imune e a replicação viral (revisado em Kinter *et al.*, 2000). IL-2 é ainda capaz de aumentar a expressão do co-receptor CCR5 em células T CD4+ (Bleul *et al.*, 1997), e de CXCR4 em células T CD4+ de memória CCR7+ (Jourdan *et al.*, 2000).

Os *trials* clínicos com administração de IL-2 demonstraram que são seguros em conjunto com terapia antiretroviral e que os pacientes apresentam aumento da contagem de células T CD4+ (revisado em Smith, 2001 e Mitsuyasu, 2001). Não houve aumento da viremia plasmática em indivíduos infectados pelo HIV tratados com IL-2 e terapia antiretroviral em relação aos níveis basais dos pacientes controles (apenas recebendo terapia antiretroviral), embora ocorra um aumento transitório na fase aguda do tratamento e, no caso de pacientes com baixa contagem CD4, os números de células T CD4+ não foram aumentados e a viremia foi elevada (Kovacs *et al.*, 1996, 2001; Davey *et al.*, 1997, 2000). A terapia com IL-2 também não foi capaz de melhorar a diversidade de repertório T em pacientes em estágio mais avançado da doença que apresentavam depleção de vários clones T CD4+ (Heath *et al.*, 1995). Por outro lado, em modelo SCID-hu, IL-2 (bem como IFN- γ) manteve timócitos imaturos sem aumentar a carga viral, enquanto IL-4 ou IL-7, apesar de retardarem a depleção de timócitos imaturos, aumentaram a carga viral (Uittenbogaart *et al.*, 2000). A administração diária de IL-2 levou à expansão de células NK, mas a imunoterapia intermitente com IL-2 causou mudanças agudas em ambas as populações CD4+ e CD8+, e a longo prazo, após interrupção da terapia, apenas o *pool* de células T CD4+ manteve-se aumentado (Jacobson, 1996; Khatir *et al.*, 1998; Kovacs *et al.*, 2001). Após apenas 5 dias de tratamento com IL-2, Zou e colaboradores (1999) observaram linfopenia aguda de Th naive ou memória, associada a um grande aumento de expressão de CCR5 em ambas as

subpopulações T CD4+, enquanto antes da terapia CCR5 era restrito às células CD4+CD62L-CD45RO+. Aumentos transitórios de CD38 e HLA-DR foram observados em células CD4+ e CD8+, porém CD25 aumentou exclusivamente em células T CD4+, de fenótipo naive ou memória (Kovacs *et al.*, 2001). Mais interessante é o achado de que a administração intermitente de IL-2 durante HAART reduziu o reservatório de HIV em células T CD4+ quiescentes (Chun *et al.*, 1999a). Porém, ao interromper-se o tratamento em pacientes em que não se detectavam vírus capazes de replicação em células T CD4+ quiescentes, altos níveis de viremia eram observados, sugerindo que ao se parar HAART com IL-2, vírus passaram a ser produzidos de sítios reservatórios não identificados (Chun *et al.*, 1999b; Davey *et al.*, 1999).

IL-4, uma citocina γ c que define o padrão Th2, encontra-se aumentada em pacientes infectados pelo HIV, como demonstrado por marcação intracelular, hibridização *in situ*, e por maior frequência de clones Th2; em crianças infectadas, alta replicação de HIV-1 foi correlacionada aos altos níveis de IL-4 em linfonodos (Mikovits *et al.*, 1994; Kazazi *et al.*, 1992; Novak *et al.*, 1990). IL-4 sozinha, ou em conjunto com IL-2, estimula a replicação de HIV em células T CD4+, provavelmente pela ativação de sua proliferação (Weissman *et al.*, 1996), mas também por outros mecanismos. Células Th2 expressam mais CXCR4 que Th1, o que apresenta correlação com sua maior produção de HIV-1 (Galli *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). A própria IL-4 modula a expressão de receptores de quimiocinas em células T CD4+ (Jourdan *et al.*, 1998; Valentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998), aumentando a expressão de CXCR4 e inibindo a de CCR5, sugerindo um papel para esta citocina na progressão da doença, quando ocorre mudança de vírus R5 para X4 (Valentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Além disso, IL-4 estimula a expressão de HIV-1 via mecanismos de ativação de transcrição (Valentin *et al.*, 1998). Para macrófagos derivados de monócitos, IL-4 pode ter efeito estimulador ou inibidor da replicação viral (Schuitemaker *et al.*, 1992; Mikovits *et al.*, 1994; Kazazi *et al.*, 1992; Novak *et al.*, 1990). IL-4 mesmo sem afetar a expressão de CCR5 pode aumentar a produção de HIV em monócitos/macrófagos primários (Valentin *et al.*, 1998). Células T CD8+ do tipo TC2 são observadas na infecção pelo HIV-1, apresentando reduzida atividade citolítica (Maggi *et al.*, 1994), e IL-4 parece limitar a ativação, expansão e diferenciação de células T CD8+ com potencial citolítico, como mostrado em camundongos imunizados com peptídeos derivados de gp120 de HIV_{IIIB} (Villacres & Bergmann, 1999). O papel prejudicial de IL-4 na imunopatogênese da infecção pelo HIV é também sugerido pela associação entre as maiores proporções de células

produtoras de IL-4, dentro da população CD4+, e especialmente da CD8+, e o re-aparecimento da viremia em pacientes submetidos à HAART (Sousa *et al.*, 1999).

IL-7 é uma citocina γ c importante na linfopoiese (revisado em Malek *et al.*, 1999) e na homeostasia de linfócitos T (Schluns *et al.*, 2000; Fry *et al.*, 2001b; Mackall *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2001). Como IL-7 é produzida por células de estroma e não por células linfóides, como células epiteliais tímicas, células epiteliais intestinais (Watanabe *et al.*, 1995), queratinócitos (Heufler *et al.*, 1993) e células dendríticas (de Saint-Vis *et al.*, 1998), altos níveis de IL-7 podem ser gerados em condições linfopênicas, ressaltando sua importância como regulador endógeno da homeostasia.

De fato, através de imunohistoquímica com análise quantitativa de imagem foi demonstrado que IL-7 é produzida por células dendríticas em tecidos linfóides periféricos com depleção de células T mediada pela infecção pelo HIV (Napolitano *et al.*, 2001). Alguns estudos mostram uma forte relação inversa entre níveis circulantes de IL-7 e números de células T CD4+ (Mackall *et al.*, 2001), inclusive na infecção pelo HIV-1 (Llano *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2001). Altos níveis de IL-7 encontraram-se associados a uma carga viral aumentada (Napolitano *et al.*, 2001). Também foram detectados níveis mais altos de IL-7 em pacientes infectados pelo HIV com variantes SI e contagem CD4 menor que 200 células/ μ l (Llano *et al.*, 2001). Neste sentido, IL-7 induziu a expressão de CXCR4 em PBMC *in vitro* (Llano *et al.*, 2001), como também já havia sido observado por Jourdan e colaboradores (2000) em células T de memória CD4+CCR7+. É interessante que a administração de IL-7 em camundongos aumentou a proliferação basal de células T CD4+ e T CD8+ em 4 e 14X respectivamente, provocando um aumento desproporcional de células T CD8+ e alteração da relação CD4/CD8, sem induzir a expressão de marcadores de ativação (Geiselhart *et al.*, 2001), enquanto *in vitro* IL-7 induziu a expressão de CD25, CD71, CD11a, CD40L e CD95 (Armitage *et al.*, 1990; Fukui *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 1989). A possibilidade de IL-7 contribuir para a expansão de células CD8+ e inversão da relação CD4/CD8 observadas na infecção pelo HIV-1 deve ser ainda estudada, pois foi detectada menor expressão de IL-7R α em células T CD8+ de pacientes infectados pelo HIV-1 (Vingerhoets *et al.*, 1998).

O papel de IL-7 na imunopatogênese de HIV é enfatizado pela sua associação *in vivo* com maior carga viral e variantes X4, bem como com sua ação estimuladora da replicação viral *in vitro* de PBMC e tímócitos. Culturas de CD8dPBMC isolado de pacientes assintomáticos

apresentaram replicação viral e níveis de DNA proviral aumentados pela adição de IL-7, enquanto IL-2 induziu maior proliferação e menor replicação viral (Smithgall *et al.*, 1996). IL-7 parece tornar células T CD4+ suscetíveis à infecção por HIV-1 independente da estimulação de sua proliferação (Unutmaz *et al.*, 1999; Dardalhon *et al.*, 2001). IL-7, junto com TNF- α , é importante para a replicação de HIV-1 em tímócitos maduros CD4+CD8-CD3+ que interagem com células epiteliais tímicas (Chene *et al.*, 1999) e favorece a persistência de vírus nestes tímócitos maduros CD4+ através de continuada indução de Bcl-2 (Guillemard *et al.*, 2001). De fato, apesar de retardar a depleção de tímócitos imaturos, IL-7 aumenta a carga viral (Uittenbogaart *et al.*, 2000). Por outro lado, IL-7 pode exercer alguns efeitos benéficos, como induzir a atividade citotóxica de células T CD8+ (Hickman *et al.*, 1990), inclusive HIV-específica (Carini & Essex, 1994; Ferrari *et al.*, 1995), bem como sua atividade supressora de replicação viral (Smithgall *et al.*, 1996).

IL-15 é uma outra citocina que compartilha com IL-2, além da cadeia β , a cadeia comum γ de seus receptores, esta última também presente em IL-4 e IL-7 (revisado em Waldmann & Tagaya, 1999). Ao contrário de IL-2, que é secretada por linfócitos T ativados, IL-15 é expressa por macrófagos (Doherty *et al.*, 1996), células dendríticas (Jonuleit *et al.*, 1997; Blauvelt *et al.*, 1996), células endoteliais (Mohamadzadeh *et al.*, 1996), queratinócitos (Blauvelt *et al.*, 1996), e outros tipos celulares; e sua produção é aumentada em infecções virais (Flamand *et al.*, 1996; Atedzoe *et al.*, 1997). De fato, os níveis séricos de IL-15 encontram-se elevados em pacientes infectados pelo HIV, e parecem apresentar associação com a hipergamaglobulinemia observada (Kacani *et al.*, 1997). Apesar de ambas as citocinas, IL-2 e IL-15, estimularem a replicação de HIV, alguns estudos observaram que IL-15 induziu menor produção viral que IL-2 (Bayard-McNeeley *et al.*, 1996; Patki *et al.*, 1996; Chehimi *et al.*, 1997; Lucey *et al.*, 1997; Al-Harhi *et al.*, 1998), o que pode estar associado ao fato de IL-15 raramente ter aumentado a proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV, apenas corrigindo a resposta a antígeno (Patki *et al.*, 1996). Na verdade, nos estudos de Al-Harhi e colaboradores (1998) e Unutmaz e colaboradores (1999), a indução de expressão de HIV-1 mediada por citocinas (IL-2, IL-12, IL-15 e IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, respectivamente) apresentaram-se independentes da proliferação celular, não induziram atividade LTR, aumentando a replicação por um mecanismo pós-transcricional (Al-Harhi *et al.*, 1998). O efeito de IL-15 sobre HIV-1 em PBMC foi ainda independente de citocinas endógenas (Al-Harhi *et al.*, 1998).

Perera e colaboradores (1999) observaram que IL-15 induziu a expressão de CCR5 em linfócitos T purificados não ativados. Apesar de IL-15 haver estimulado a produção de MIP-1 α , MIP-1 β , e RANTES por estes linfócitos T, ainda assim promoveu a entrada de isolado viral primário NSI (HIV_{US-1}), capaz de utilizar apenas o co-receptor CCR5, e sua replicação. Por outro lado, Jourdan e colaboradores (2000) mostraram que IL-15, assim como IL-2, IL-4 e IL-7, foram capazes de induzir a expressão de CXCR4 em células T de memória em repouso CD4+CCR7+, com conseqüente aumento de suscetibilidade às cepas X4 de HIV-1.

IL-15 estimulou a expansão de CTL HIV-específicos (Kanai *et al.*, 1996), sendo que IL-15 endógena, produzida por células dendríticas estimuladas por CD40LT, pode contribuir para a expansão de CTL de pacientes infectados pelo HIV em culturas depletadas de TH, onde falta IL-2 (Ostrowski *et al.*, 2000). Também o aumento da citotoxicidade (inclusive com aumento de granzima B e perforina) de células NK de pacientes infectados pelo HIV induzido por IL-15 foi independente de IL-2, bem como de IFNs, TNF- α , ou IL-12, embora IL-15 restaure a produção de IL-12 por PBMC (Chehimi *et al.*, 1997). Assim como IL-2, IL-15 induziu atividade LAK e aumentou a produção de IFN- γ em indivíduos não infectados ou infectados pelo HIV (Lucey *et al.*, 1997). IL-15 parece favorecer o recrutamento de células T CD8+ em tecidos extravasculares que participam do controle da infecção (Agostini *et al.*, 1999), além de promover sua ativação e proliferação (Agostini *et al.*, 1997). Neste sentido, é interessante que em infecção primária por SIV, os níveis de IL-15 aumentaram em PBMC e células de BAL, mas não em células de linfonodos (Caufour *et al.*, 2001). Macrófagos alveolares de pacientes infectados pelo HIV-1 também apresentaram maior expressão de IL-15 que aqueles derivados de indivíduos HIV- (Agostini *et al.*, 2001).

IL-15 estimulou a expansão de CTL HIV-específicos (Kanai *et al.*, 1996), sendo que IL-15 endógena, produzida por células dendríticas estimuladas por CD40LT, pode contribuir para a expansão de CTL de pacientes infectados pelo HIV em culturas depletadas de TH, onde falta IL-2 (Ostrowski *et al.*, 2000). Também o aumento da citotoxicidade (inclusive com aumento de granzima B e perforina) de células NK de pacientes infectados pelo HIV induzido por IL-15 foi independente de IL-2, bem como de IFNs, TNF- α , ou IL-12, embora IL-15 restaure a produção de IL-12 por PBMC (Chehimi *et al.*, 1997). Assim como IL-2, IL-15 induziu atividade LAK e aumentou a produção de IFN- γ em indivíduos não infectados ou infectados pelo HIV (Lucey *et al.*, 1997). IL-15 parece favorecer o recrutamento de células T CD8+ em tecidos extravasculares

que participam do controle da infecção (Agostini *et al.*, 1999), além de promover sua ativação e proliferação (Agostini *et al.*, 1997). Neste sentido, é interessante que em infecção primária por SIV, os níveis de IL-15 aumentaram em PBMC e células de BAL, mas não em células de linfonodos (Caufour *et al.*, 2001). Macrófagos alveolares de pacientes infectados pelo HIV-1 também apresentaram maior expressão de IL-15 que aqueles derivados de indivíduos HIV-1 (Agostini *et al.*, 2001).

Chehimi e colaboradores (1997) observaram que a adição de IL-15 preveniu a apoptose espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV, mas não a induzida por mitógeno. Naora & Gougeon mostraram que IL-15, assim como IL-2, não inibe a apoptose *in vitro* induzida por CD95, mas que IL-15 age como um importante fator de sobrevivência na prevenção de apoptose espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV-1, bem como de células T naive CD4+CD45RO- (Naora & Gougeon, 1999a, 1999b). Apesar de ocorrer maior sobrevivência promovida por IL-15, associada à maior expressão de bcl-2, além de IL-15 estimular maior proliferação celular que IL-2, os números de células viáveis não foram maiores com IL-15, provavelmente devido à sua maior ativação linfocitária e consequente aumento da suscetibilidade à apoptose (Naora & Gougeon, 1999b). Células Tc1 de fenótipo CD8+CD45RO+ isoladas de BAL de pacientes infectados pelo HIV sofrem grande apoptose espontânea quando em cultura, o que é inibido pela adição de IL-15 (Agostini *et al.*, 2001), o que sugere que esta citocina contribua para a expansão de CTL pulmonares na infecção pelo HIV não só por favorecer seu recrutamento (Agostini *et al.*, 1999), mas também sua ativação, proliferação (Agostini *et al.*, 1997) e sobrevivência (Agostini *et al.*, 2001). Células T CD8+ presentes nos pulmões foram encontradas expressando HIV (Semenzato *et al.*, 1995), mas não há estudos sobre o possível papel de IL-15 na infecção de células T CD8+.

Todas estas citocinas γ c, IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 podem tornar células T CD4+ em repouso suscetíveis à infecção por vírus HIV-1 R5 e ainda suportam a transdução de células T CD8+ com vetor HIV-1 com eficiência semelhante ou maior que células CD4+ (Unutmaz *et al.*, 1999). Citocinas do tipo Th1 ou Th2 participam do controle da replicação de HIV-1. Citocinas Th2 aumentam a produção de HIV-1 X4, porém apresentam efeito inibitório sobre a produção de HIV-1 R5, enquanto citocinas Th1 têm efeito oposto em ambos os tipos de HIV-1 (Salgame *et al.*, 1998; Galli *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). Estas diferenças devem estar correlacionadas em parte com a regulação diferencial de expressão de co-receptores CCR5 e

CXCR4 por citocinas Th1 e Th2 em células T CD4+, i.e., citocinas Th1 aumentam expressão de CCR5 (Patterson *et al.*, 1999) e diminuem a de CXCR4 (Galli *et al.*, 1998), enquanto citocinas Th2 aumentam expressão de CXCR4 (Valentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Patterson *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999) e diminuem a de CCR5 (Patterson *et al.*, 1999).

Aparentemente, citocinas do tipo Th1 aumentam os efeitos inibitórios de células T CD8+, enquanto as de tipo Th2 diminuem seus efeitos supressores. Assim, IL-2 aumenta a capacidade supressora de células T CD8+ de indivíduos infectados pelo HIV, enquanto cultura em IL-4 e IL-10 inibem sua atividade antiviral. Contudo, a adição de IL-2 pode superar os efeitos inibitórios de citocinas Th2 sobre a atividade supressora de células T CD8+ (Barker *et al.*, 1995). Como as células T dependem de IL-2 para sua proliferação, não é surpresa que a atividade antiviral de células T CD8+ seja aumentada por IL-2. Neste sentido, o co-estímulo por CD28, importante para a expressão tanto de IL-2 como de IL-2R (CD25), também aumenta a capacidade antiviral de células T CD8+ (Barker *et al.*, 1997). Outro estudo sugere que TNF- α pode afetar negativamente a capacidade de células T CD8+ suprimirem a replicação viral (Kubo *et al.*, 1997).

No modelo de infecção aguda em co-cultura DC-CD4+, citocinas que estimulam a proliferação de células T, como IL-2 e IL-4, aumentaram a replicação viral, enquanto os efeitos de IL-12 foram mais complexos. A produção de HIV-1 foi inibida pelo bloqueio de IL-2 produzida de modo endógeno, bem como pela adição de IL-10, a qual bloqueia secreção de IL-2, funções de APC e ativação T. Citocinas pró-inflamatórias induziram um aumento moderado da replicação viral em co-culturas de DC pulsadas com HIV e células T CD4+ não estimuladas (Weissman *et al.*, 1996).

O papel das citocinas na regulação de produção viral foi observado em vários sistemas, como descrito acima, entretanto, muitos aspectos dessa regulação ainda continuam em aberto demandando mais pesquisas.

Objetivos

RELEVÂNCIA DO ESTUDO E OBJETIVOS

O estudo do papel de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1 tem seguido duas linhas principais de investigação: atividade citotóxica vírus-específica e capacidade antiviral não-citolítica (revisado em Yang & Walker, 1997). Alguns trabalhos sugeriram que estas duas funções efetoras seriam em parte mediadas pela mesma subpopulação de células CD8+ (Toso *et al.* 1995, Buseyene *et al.* 1996, Yang *et al.* 1997).

Como as células T CD8+ apresentam alterações fenotípicas e funcionais que comprometem seu papel protetor durante a progressão da doença (revisões de Lieberman *et al.*, 2001 e McMichael & Rowland-Jones, 2001), o estudo destas alterações pode contribuir, portanto, para um melhor entendimento da imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, bem como para o melhor desenho de vacinas e/ou imunoterapias. Há de se considerar também que o fato de as próprias células T CD8+ serem alvos de infecção pelo vírus (discutido na revisão de Meireles-de-Souza & Shattock, em anexo) teria impacto na imunopatogênese e no desenvolvimento de vacinas e/ou imunoterapias.

Assim, o objetivo geral desta tese foi estudar alterações fenotípicas e funcionais de células T CD8+, em modelos *in vitro* de infecção pelo HIV-1, além de sua própria infecção pelo vírus como potencial fator de distúrbio.

Procuramos relacionar fenótipos, como p. ex. as subpopulações CD28+ ou CD57+, com

- 1) infecção por variantes X4 ou R5 de HIV-1, em culturas de CBMC ou PBMC;
- 2) funções, tais como inibição de proliferação celular ou de produção viral; ou ainda com
- 3) a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, inclusive durante sua interação com células dendríticas.

Do mesmo modo, investigamos a possível associação entre a infecção das células CD8+ e

- 4) sua atividade antiviral, ou
- 5) contribuição para a produção total de HIV-1, utilizando para isso culturas de PBMC, co-culturas de células CD8+ e CD4+, ou ainda modelo de interação com células dendríticas.

Além disso, como a progressão da infecção pelo HIV-1 é acompanhada por alterações no perfil de citocinas, decidimos analisar os efeitos de citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) sobre

- 6) a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, e
- 7) atividade antiviral dos linfócitos T CD8+,

incluindo o papel de IL-15 endógena ou exógena durante a interação com células dendríticas.

Estudo 1

ESTUDO 1

RACIONAL E OBJETIVOS

A progressão da infecção pelo HIV-1 é acompanhada por alterações não só do sistema imune, mas também do vírus, predominando aqueles que utilizam o co-receptor CCR5 em estágios iniciais e os que utilizam o co-receptor CXCR4 em estágios avançados (revisado em Miedema *et al*, 1994; Berger *et al*, 1999; Rowland-Jones, 2003). Não se sabe ao certo o porquê destas alterações, mas é plausível que tanto o sistema imune possa interferir no processo de mudança na utilização de co-receptores pelo HIV-1, como também os diferentes tipos de vírus possam afetar de modo diverso as células do sistema imune.

No caso dos linfócitos T citotóxicos, é bem conhecida a pressão seletiva que exercem sobre os vírus, inclusive o HIV-1 (Nowak *et al.*, 1995; Koenig *et al.*, 1995), assim como alterações fenotípicas e funcionais que comprometem seu papel protetor durante a progressão da infecção pelo HIV-1 (Champagne *et al.*, 2001; revisões de Lieberman *et al.*, 2001 e McMichael & Rowland-Jones, 2001). Alguns trabalhos propõem que estas alterações seriam derivadas de um processo de senescência acelerado (revisado em Appay & Rowland-Jones, 2002). Entretanto, não existem relatos da possível influência de variantes R5 ou X4 de HIV-1 sobre as alterações de células T CD8+.

Assim, neste primeiro estudo, objetivamos:

1. Analisar a influência do vírus HIV-1, de variante R5 ou X4, sobre o fenótipo de células T CD8+.
2. Comparar os efeitos de HIV-1 sobre o fenótipo de células T CD8+ de neonatos com seus efeitos em células T CD8+ de adultos, incluindo análise de marcadores de senescência.

Para isso, infectamos, *in vitro*, células mononucleares de sangue de cordão umbilical (CBMC), utilizadas como fonte de células *naive*, ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos, com variantes R5 (HIV-1_{BaL}) ou X4 (HIV-1_{III B} e HIV-1_{RF}).

ESTUDO 1

Alterações fenotípicas de células T CD8+ em culturas de CBMC e PBMC infectadas pelo HIV-1.

RESUMO

Durante a progressão da infecção por HIV-1, ocorre expansão das células T CD8+, predominantemente as de fenótipo CD28-, com expressão aumentada de CD57, HLA-DR, CD45RO e CD38. A aquisição da expressão de CD57 (e perda de CD28) pode resultar da ativação em longo prazo das células T CD8+, embora alguns estudos sugiram uma expansão antígeno-específica das células CD8+CD57+. Para avaliar a contribuição do vírus HIV-1 nas mudanças fenotípicas de células T CD8+, analisamos a expressão de CD57, CD28, CD27, CD45RA e CD45RO após infecção de células mononucleares de sangue de cordão umbilical (CBMC), ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos, com variantes R5 (HIV-1_{BaL}) ou X4 (HIV-1_{IIIB} e HIV-1_{RF}). Encontramos, *in vitro*, um padrão fenotípico similar ao que ocorre durante a progressão da infecção *in vivo* (embora não estatisticamente significativo): redução do fenótipo *naive* (CD8+CD27+CD45RA+), aumento do fenótipo ativado/de memória (CD8+CD27+CD45RA- ou CD8+CD27+CD45RO+), bem como de células do estágio intermediário (CD8+CD27-CD45RA-), raras em indivíduos normais. Em culturas de CBMC, utilizadas como fonte de células *naive*, observamos um aumento de células CD8+CD57+ em culturas infectadas por vírus X4, enquanto a queda de expressão de CD27 em linfócitos T CD8+ nestas culturas infectadas não apresentou uma associação específica ao vírus X4. Estes mesmos marcadores, em células T CD8+ de adultos, apresentaram níveis de expressão *in vitro* diretamente relacionados à idade do doador. Portanto, nossos dados sugerem que o vírus HIV-1 pode influenciar, direta ou indiretamente, as mudanças fenotípicas das células T CD8+, e que o uso de modelos de infecção *in vitro* pode ser útil para o estudo destas alterações e manipulações terapêuticas.

INTRODUÇÃO

Durante a progressão da infecção por HIV-1, ocorre expansão de células T CD8+ predominantemente CD28-, com aumento da expressão de CD57, HLA-DR, CD45RO e CD38 (Ho *et al.*, 1993, Borthwick *et al.*, 1994, Vingerhoets *et al.*, 1995, Lynne *et al.*, 1998, Tomiyama *et al.*, 2000), enquanto os números de células T CD8+ com o fenótipo *naive* diminuem (Roederer *et al.*, 1995).

Em indivíduos normais, a molécula CD57 é encontrada essencialmente na subpopulação CD8+ que expressa o fenótipo efetor CD8+CD27-CD28-CD45RA+ (revisão por Hamann *et al.*, 1999a). Em resposta à infecção viral, ocorre uma expansão inicial de células CD8+ com o fenótipo de memória CD27+CD28+CD45RA-CD45RO+ e, no processo de diferenciação de linfócitos CD8+; há uma perda sucessiva de CD28 e CD27 e aumento da expressão de CD57 (Hamann *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Entretanto, em pacientes infectados com HIV-1, o amadurecimento de células CD8+ T específicas para o HIV-1, mas não para o CMV, parece deficiente, com células CD8+ específicas para o HIV-1 apresentando expressão persistente de CD27, baixos níveis de perforina e o fenótipo CD28-CD45RA-CD45RO+ ou CD45RA-CCR7- (Andersson *et al.*, 1999; Appay *et al.*, 2000, Champagne *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001, revisões de McMichael, 2000; McMichael & Rowland-Jones, 2001 e Lieberman *et al.*, 2001).

A aquisição da expressão de CD57 (e perda de CD28) pode resultar da ativação crônica das células T CD8+. O fato de que as células CD8+ são submetidas a grande expansão durante infecções virais poderia por si contribuir para as alterações fenotípicas observadas durante a progressão dessas doenças. Os processos de diferenciação envolvem ciclos de proliferação celular sucessivos, que por fim conduzem as células à senescência (Effros *et al.*, 1996, revisto por Globerson & Effros, 2000). De fato, a expressão de CD57 em células T CD8+ esteve associada à senescência derivada da proliferação celular e à apoptose induzida por ativação (Brenchley *et al.*, 2003). No entanto, as subpopulações CD8+CD57+ e/ou CD8+CD28- são acumuladas *in vivo* durante infecções virais (Borthwick *et al.*, 1994, Vingerhoets *et al.*, 1995), ou *in vitro*, quando mantidas em presença de IL-2, com ou sem estímulos prévios com PHA ou anti-CD3 (Mollet *et al.*, 1998, Borthwick *et al.*, 2000).

Por outro lado, alguns estudos sugeriram uma expansão antígeno-específica de células CD8+CD57+. A expressão de CD57 foi associada a uma infecção prévia com CMV (Maher *et al.*, 1985, Wursch *et al.*, 1985, Wang *et al.*, 1993, Hooper *et al.*, 1999), mesmo em indivíduos infectados com HIV-1 (Evans *et al.*, 1999). Já as culturas de PBMC oriundas de indivíduos infectados com HIV-1 apresentaram expansão da subpopulação CD8+CD57+ se estimulados com APC carregadas com HIV-1 (Mollet *et al.*, 1998) ou com fibroblastos transfectados com *nef* (Silvestris *et al.*, 1999).

Entretanto, não existem relatos da possível influência de variantes R5 ou X4 de HIV-1 sobre as alterações de células T CD8+. Desse modo, objetivamos nesse estudo analisar a influência de cepas de HIV-1 do tipo R5 ou X4 sobre o fenótipo de células T CD8+ após infecção *in vitro* de células mononucleares de sangue de cordão umbilical (CBMC), utilizadas como fonte de células *naive*, ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos. Comparamos os efeitos de HIV-1 sobre o fenótipo de células T CD8+ de neonatos com seus efeitos em células T CD8+ de adultos, utilizando como marcadores de diferenciação e senescência CD27, CD28, CD45RA, CD45RO e CD57.

METODOLOGIA

Culturas celulares

PBMC e CBMC foram isolados por gradiente de centrifugação em Ficoll-Hypaque (*Sigma, Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA*) a partir de sangue obtido de voluntários adultos saudáveis ou de cordão umbilical proveniente de partos sem complicações, com a aprovação do Comitê de Ética do *St. George's Hospital Medical School (University of London, UK)*.

As culturas foram estabelecidas em densidade celular de 1×10^6 /ml (37°C, 5% CO₂) em meio RPMI 1640 completo: suplementado com 10% soro fetal bovino (FCS), glutamina, penicilina e estreptomicina (*Sigma*). Culturas de PBMC e CBMC foram estimuladas com 10 µg/ml PHA (*Sigma*) por 3 dias e a partir daí mantidas em meio de cultura completo suplementado com IL-2 (30 UI/ml, *Boehringer-Mannheim, Roche Diagnostics Ltd, East Sussex, UK*). O meio foi trocado duas vezes por semana.

Vírus

As variantes R5 (HIV-1_{BaL}) e X4 (HIV-1_{IIIB} and HIV-1_{RF}) de HIV-1 foram obtidas da *Centralised Facility for AIDS Reagents (Medical Research Council, UK)*. Estoques virais de HIV-1_{BaL} foram crescidos em culturas de PBMC ativadas por PHA, enquanto HIV-1_{IIIB} e HIV-1_{RF} foram crescidos em células CEM (também obtidas da *Centralized Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council, UK*).

Infecção in vitro por HIV

Cada cultura estimulada por PHA de PBMC ou CBMC foi fracionada: parte foi mantida como controle e parte foi infectada por HIV-1_{BaL}, HIV-1_{IIIB} ou HIV-1_{RF} a MOI 0.01, por 2 horas a 37°C, e então lavadas 3X em PBS. As culturas não infectadas e infectadas foram mantidas na presença de IL-2 (30 UI/ml, Roche) durante toda a cinética.

Análise fenotípica de células CD8+

Para analisar o fenótipo das células T CD8+ em culturas infectadas ou controle, os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados em estudos de marcação tripla: anti-CD27-Fluorescein IsoThioCyanate (FITC), anti-CD27-R-Phycoerythrin (RPE), anti-CD28-FITC, anti-CD28-Cy-ChromeTM (CyCh), anti-CD57-FITC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45RA-RPE, anti-CD45RO-RPE, anti-CD45RO-CyCh, anti-CD8-RPE e anti-CD8-CyCh (*PharMingen, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*), bem como anti-CD27-FITC, anti-CD57-FITC, anti-CD45RA-Phycoerythrin (PE) and anti-CD8-Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) (*Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*). Os controles utilizados foram: anti-IgG1-FITC, anti-IgM-FITC, anti-IgG1-PE, anti-IgG2a-RPE, anti-IgG2a-CyCh, anti-IgG2b-FITC, anti-IgG2b-RPE, anti-IgG1-CyCh (*PharMingen*), anti-IgG1-FITC, anti-IgM-FITC, anti-IgG2b-PE e anti-IgG1-PerCP (*Becton-Dickinson*).

As células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Becton-Dickinson*) e os dados analisados por *software WinMDI version 2.8* (disponível em <http://facs.scripps.edu>).

Análise estatística

As subpopulações celulares em diferentes condições de cultura foram comparadas através do teste t de Student, utilizando o *software GraphPadPrism version 4*.

RESULTADOS

Culturas de CBMC ou PBMC infectadas pelo HIV-1 apresentam maior aumento relativo de linfócitos T CD8+, porém menor número absoluto de células T CD8+ que culturas não infectadas.

Culturas de PBMC ou CBMC estimuladas com PHA e mantidas em presença de IL-2 apresentam expansão de linfócitos T CD8+ (Mollet *et al.*, 1998, Borthwick *et al.*, 2000), entretanto o aumento numérico de células CD8+ foi menor em culturas infectadas que naquelas não infectadas. Culturas infectadas apresentaram menor viabilidade celular que as não infectadas, sendo menor a viabilidade das culturas infectadas por vírus X4 (HIV-1_{IIIB} < HIV-1_{RF}) que das infectadas por vírus R5 HIV-1_{BaL} (dados não mostrados). Em consequência, o aumento absoluto de células foi menor em culturas infectadas (HIV-1_{IIIB} < HIV-1_{RF} < HIV-1_{BaL}), incluindo o de células T CD8+.

Por outro lado, como era de se esperar pela morte de linfócitos T CD4+, encontramos aumento percentual de células CD8+ nas culturas infectadas em relação às não infectadas, o qual foi maior para CBMC (em torno de 40%) que para PBMC (aproximadamente 15 a 20%).

O padrão fenotípico de células T CD8+ durante a infecção *in vitro* pelo HIV-1 assemelha-se ao observado em pacientes.

Em culturas de CBMC ou PBMC infectadas pelo HIV-1, observamos uma diminuição da subpopulação de células T CD8+ *naive* (TN), com fenótipo CD27+CD45RA+ (figura 1.1A) ou CD27+CD45RO- (figura 1.1B), especialmente nas culturas infectadas pelo vírus X4 (IIIB), ainda que não estatisticamente significativo, sugerindo um paralelo à perda de linfócitos CD8+ *naive* durante a progressão da doença (Roederer *et al.*, 1995). De fato, ao contrário do que ocorre em culturas não infectadas, nas quais o fenótipo *naive* de células T CD8+ de neonatos permanece predominante, mesmo que estimuladas *in vitro* com PHA, a diminuição do percentual de células T CD8+CD27+CD45RA+ (figura 1.1A) nas culturas de CBMC infectadas com variante X4 é tal que passa a apresentar expressão do fenótipo *naive* similar ao de cultura não infectada do doador PB1 (mais jovem que PB2).

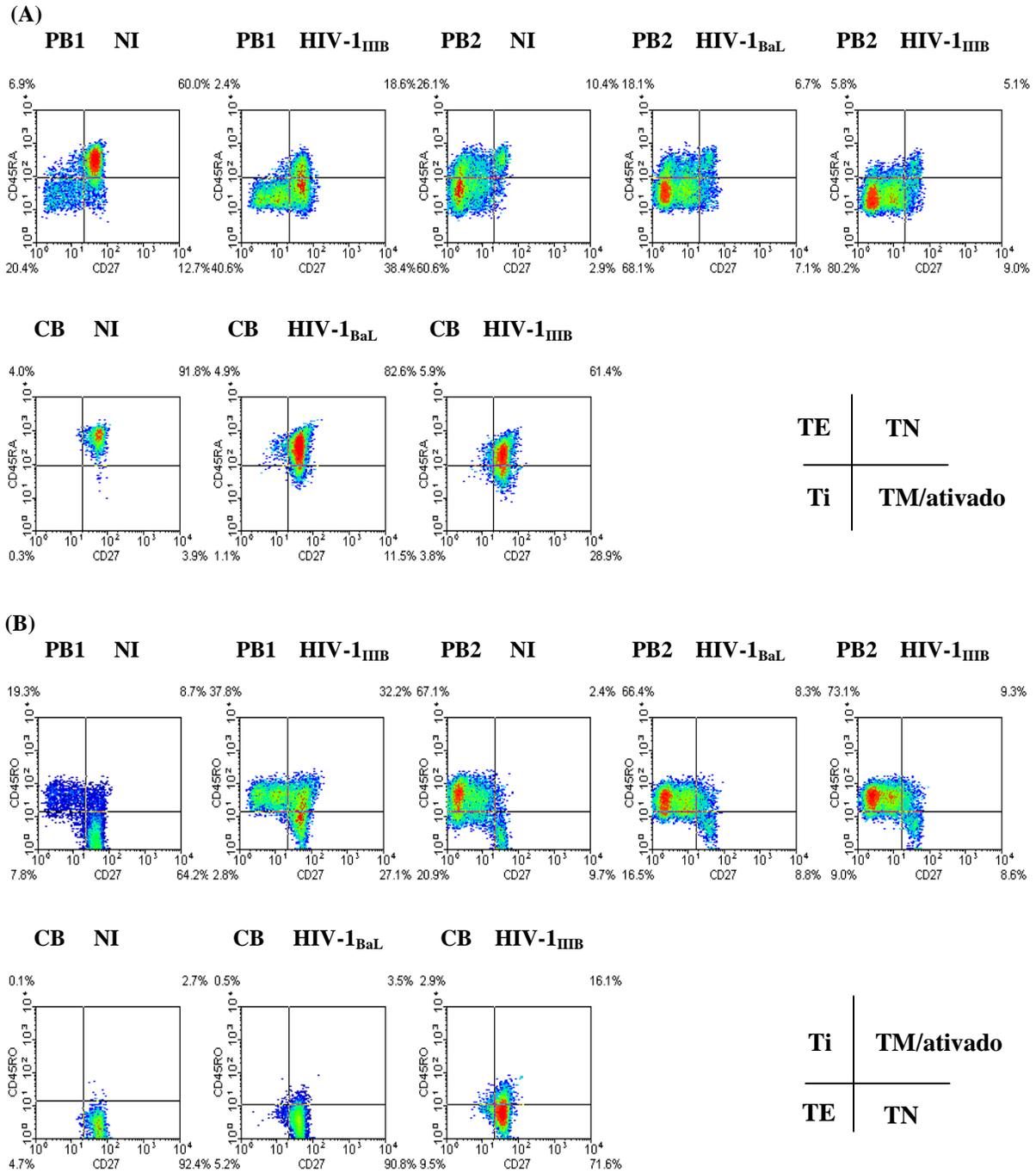


Figura 1.1. Expressão das moléculas (A) CD27 e CD45RA, ou (B) CD27 e CD45RO, em células CD8+ (*gating* na população CD8+) em culturas de PBMC (de 2 diferentes doadores saudáveis: PB1, com 21 anos de idade, e PB2, com 36 anos de idade) ou CBMC (CB) não-infectadas (NI) ou infectadas pelos variantes X4 (HIV-1_{IIB}) ou R5 (HIV-1_{BaL}) de HIV-1, no dia 30 após o estímulo com PHA. No inserto estão representadas as localizações nos quadrantes das subpopulações de células CD8+: TN (T Naive), TM/ativado (T Memória/ativado), TE (T Efetora), Ti (T intermediária).

Neste sentido, o incremento de percentual da subpopulação CD8+CD27-CD45RA+, considerada de fenótipo efetor (TE), nas culturas de CBMC infectadas com HIV-1 pode ter surgido pela aceleração da perda de expressão de CD27 nestas células *naive* CD8+CD45RA+ de neonato. Se a presença do vírus HIV-1 induziu ou não a diferenciação de células T CD8+ *naive* em efectoras só poderia ser avaliado por estudos funcionais, porém, a presença de IL-2 nestas culturas poderia ser um fator predisponente a este fenômeno.

Em contraposição à diminuição de células CD8+ *naive*, observamos um aumento do fenótipo memória/ativado (TM/ativado) CD27+CD45RA- (figura 1.1A) ou CD27+CD45RO+ (figura 1.1B) de células CD8+ em culturas infectadas de PBMC ou CBMC, maior para HIV-1_{IIIb} do que para HIV-1_{BaL}, comparado aos controles, embora não significativo estatisticamente. O aumento do fenótipo TM/ativado em maior proporção nas culturas de células de neonatos que adultos parece estar em linha com o maior aumento percentual de células CD8+ em CBMC que PBMC (dados não mostrados).

Células CD8+ com fenótipo TM/ativado CD28+CD45RA- foram também encontradas em níveis mais altos em culturas de PBMC infectadas pelo variante X4 que R5 (figura 1.2).

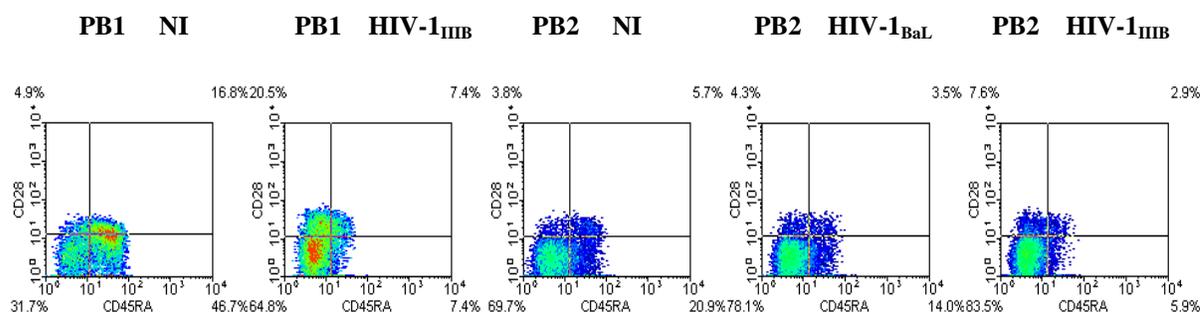


Figura 1.2. Expressão das moléculas CD28 e CD45RA em células CD8+ (*gating* na população CD8⁺) em culturas de PBMC (de 2 diferentes doadores saudáveis: PB1, com 21 anos de idade, e PB2, com 36 anos de idade) não-infectadas (NI) ou infectadas pelos variantes X4 (HIV-1_{IIIb}) ou R5 (HIV-1_{BaL}) de HIV-1, no dia 30 após o estímulo com 10 µg/ml PHA (culturas mantidas em presença de 30 UI/ml IL-2).

Estas populações parecem corresponder à expansão inicial de células CD8+ com o fenótipo de memória/ativado CD27+CD28+CD45RA-CD45RO+ descrito em resposta à infecção viral (Hamann *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Por outro lado, o aumento da subpopulação

intermediária CD28-CD45RA-/CD45RO+ (figura 1.2), ou CD27-CD45RA-/CD45RO+ (figura 1.1) em culturas de PBMC infectadas com HIV-1, especialmente pelo variante X4, sugere um amadurecimento deficitário de células CD8+ T, como relatado *in vivo* em pacientes infectados (McMichael & Rowland-Jones, 2001; Lieberman *et al.*, 2001). Provavelmente devido ao n pequeno, não fomos capazes de encontrar significância estatística.

A perda de expressão de CD27 não apresenta uma associação específica aos variantes de HIV-1.

Ainda indicando uma diferenciação alterada de células T CD8+ em presença do vírus HIV-1, observamos que nem sempre houve perda da expressão de CD27 em culturas de PBMC infectadas em relação às culturas não infectadas (PB2, na figura 1.3). De fato, em pacientes infectados com HIV-1, células CD8+ específicas para o HIV-1 apresentam expressão persistente de CD27 (Appay *et al.*, 2000).

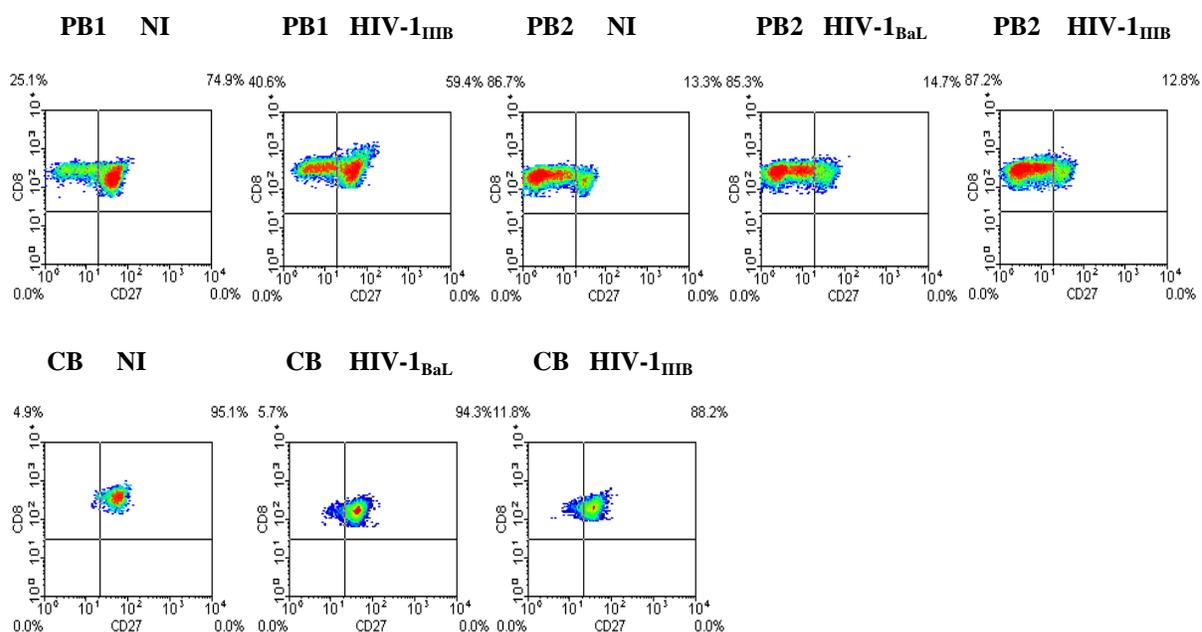


Figura 1.3. Expressão da molécula CD27 nas células CD8+ (*gating* em CD8+) em culturas de PBMC (de 2 diferentes doadores saudáveis: PB1, com 21 anos de idade, e PB2, com 36 anos de idade) ou CBMC (CB) não-infectadas (NI) ou infectadas pelos variantes X4 (HIV-1_{IIB}) ou R5 (HIV-1_{BaL}) de HIV-1, no dia 30 após o estímulo com PHA.

Por outro lado, apesar de células T CD8⁺ de neonatos permanecerem predominantemente CD27⁺ mesmo quando estimuladas por mitógeno, observamos diminuição da expressão de CD27 ($p < 0,05$) na população CD8⁺ (*gated*) em culturas de CBMC infectadas, sem uma associação específica aos variantes de HIV-1 (figura 1.4).

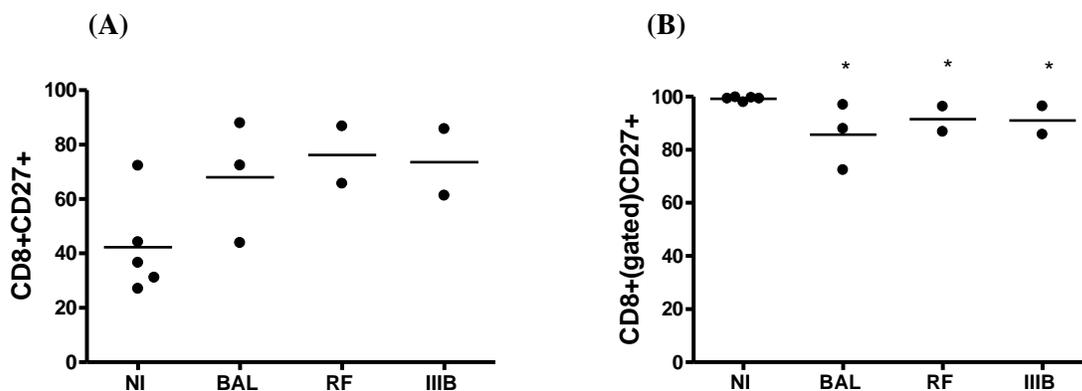


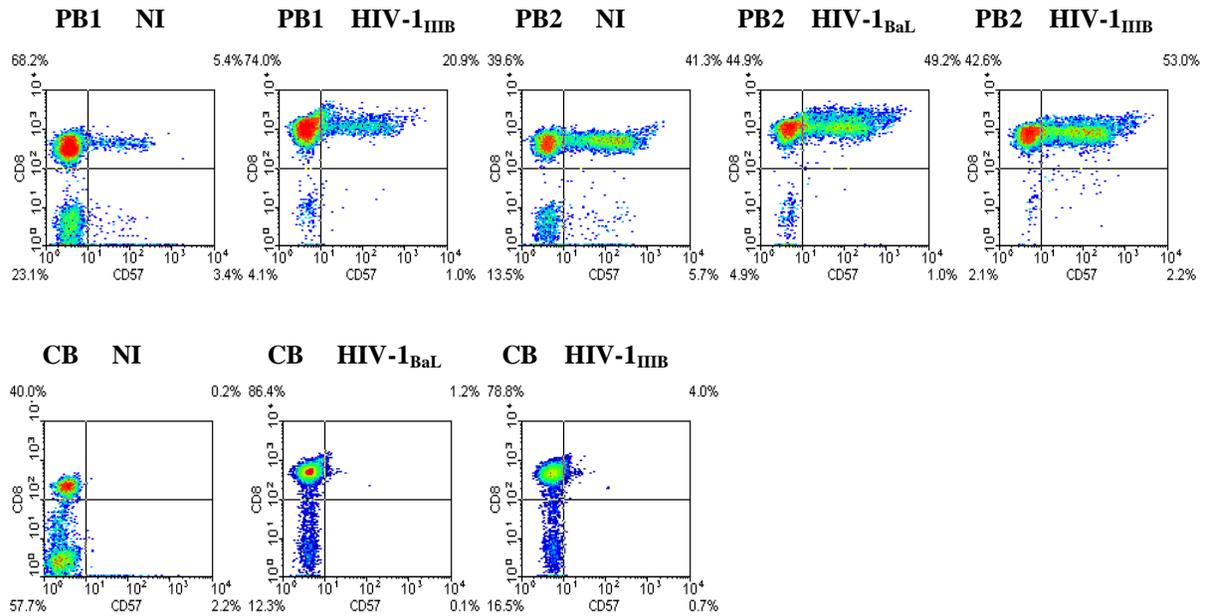
Figura 1.4. A perda de expressão de CD27 não apresenta uma associação específica aos variantes de HIV-1. (A) Percentual da subpopulação CD8⁺CD27⁺ em culturas de CBMC. (B) Percentual da subpopulação CD27⁺ em células CD8⁺ (*gated*) em culturas de CBMC. NI (não infectadas), BAL (variante R5 HIV-1_{BAL}), RF (variante X4 HIV-1_{RF}) e IIIB (variante X4 HIV-1_{IIIB}). (* $p < 0,05$, teste t não pareado, bicaudal).

A expressão do marcador de senescência CD57 aumenta em linfócitos CD8⁺ de culturas de CBMC infectadas por variante de HIV-1 X4, mas não R5.

É interessante notar que o incremento da população CD8⁺CD57⁺ foi proporcionalmente maior em culturas de CBMC que PBMC, o que poderia estar relacionado à maior expansão de células CD8 em culturas de células mais jovens. Neste sentido, também foi maior o aumento da população CD8⁺CD57⁺ na cultura do doador PB1 (indivíduo mais jovem) que PB2, embora não estatisticamente significativo (figura 1.5). De acordo com a literatura, encontramos percentuais mais altos de CD8⁺CD57⁺ (figura 1.5) e CD8⁺CD27⁻ (figura 1.3), em células CD8⁺ de indivíduos mais velhos, mesmo em culturas não-infectadas, sustentando a associação dessas subpopulações CD8⁺ à senescência do sistema imune. De fato, a presença da molécula CD57 foi detectada predominantemente em células CD8⁺CD28⁻ de culturas de PBMC, enquanto

em culturas de CBMC esteve presente principalmente na subpopulação CD8+CD28+ (dados não mostrados).

(A)



(B)

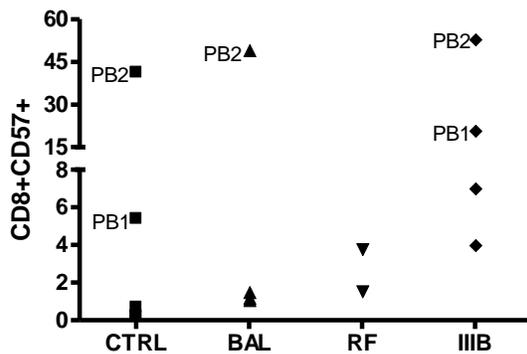


Figura 1.5. (A) Expressão do fenótipo CD8+CD57+ (quadrante superior direito) de células T (*gating* em células CD3+) em culturas de PBMC (de 2 diferentes doadores saudáveis: PB1, com 21 anos de idade, e PB2, com 36 anos de idade) ou CBMC (CB) não-infectadas (NI) ou infectadas pelos variantes X4 (HIV-1_{IIIIB}) ou R5 (HIV-1_{BaL}) de HIV-1, no dia 30 após o estímulo com PHA. (B) Percentual da subpopulação CD8+CD57+ (*gating* em células CD3+) em culturas NI (não infectadas), ou infectadas por BAL (variante R5 HIV-1_{BaL}), RF (variante X4 HIV-1_{RF}) e IIIIB (variante X4 HIV-1_{IIIIB}). Culturas de PBMC indicadas na figura como PB1 ou PB2 (de seus respectivos doadores), as outras culturas são de CBMC.

Células *naive* não expressam a molécula CD57 (Hamann *et al.*, 1999a, 1999b). Porém, quando as culturas de CBMC previamente estimuladas com PHA foram infectadas com HIV-1, observamos aumento da expressão da CD57 ($p < 0,05$) em culturas infectadas por variante X4 HIV-1_{III B} (ou HIV-1_{RF}), mas não pelo variante R5 HIV-1_{BaL}, quando comparadas às culturas não infectadas (figura 1.6), sugerindo um papel para o vírus X4 na modulação da expressão de CD57.

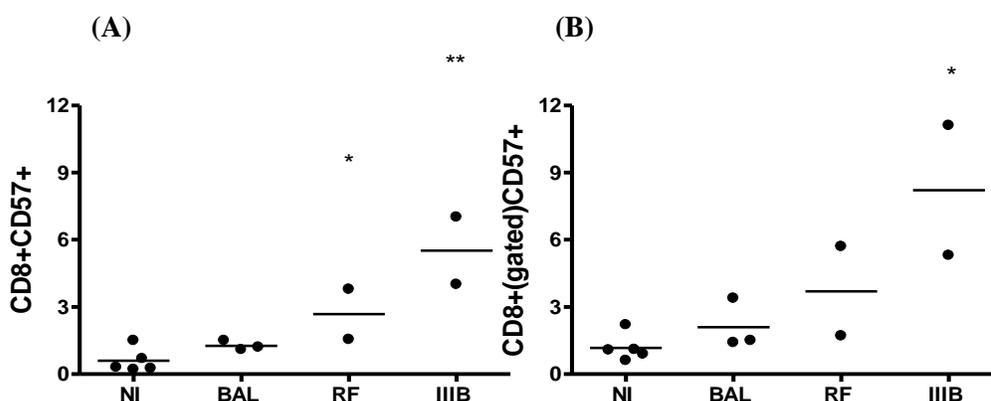


Figura 1.6. A expressão do marcador de senescência CD57 aumenta em linfócitos CD8+ de culturas de CBMC infectadas por variante de HIV-1 X4, mas não R5. (A) Percentual da subpopulação CD8+CD57+ em culturas de CBMC. (B) Percentual da subpopulação CD57+ em células CD8+ (*gating* em CD8^{high}) em culturas de CBMC. NI (não infectadas), BAL (variante R5 HIV-1_{BaL}), RF (variante X4 HIV-1_{RF}) e III B (variante X4 HIV-1_{III B}). (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$, teste t não pareado, bicaudal).

DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos que a infecção *in vitro* com vírus HIV-1 induziu alterações do fenótipo de células T CD8+ próximas daquelas observadas *in vivo* durante a progressão da infecção pelo HIV-1, como diminuição do fenótipo *naive* de células T CD8+ (Roederer *et al.*, 1995), aumento de células senescentes CD8+CD57+ (Borthwick *et al.*, 1994, Mollet *et al.*, 1998) e TM/ativadas CD8+CD45RO+ ou CD45RA- (Ogg *et al.*, 1999, Ross *et al.*, 2000). As alterações fenotípicas foram sempre mais evidentes com HIV-1 X4 que R5, assim como *in vivo* as mudanças que ocorrem em células T CD8+ são acentuadas com a progressão da infecção (revisado em Cohen *et al.*, 1997), a qual apresenta associação com a variante X4 (revisado em Berger *et al.*, 1999).

Como células *naive* não expressam CD57 (Hamann *et al.*, 1999a), a expansão da subpopulação CD57+ de células CD8+ de neonatos, observado na infecção por HIV-1_{IIIb} (p<0,005) ou HIV-1_{RF} (p<0,05), mas não HIV-1_{BaL}, sugere que o vírus HIV-1, especialmente de tipo X4, levaria ao aumento de expressão da molécula CD57 em células T CD8+ durante a progressão da doença. A molécula CD57 pode aparecer na superfície de células T CD8+ como resultado de ativação a longo-prazo de células CD57- que perdem a sua capacidade de proliferar após atingir estágio de diferenciação terminal (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994, Mollet *et al.*, 1998). De acordo com opinião de Kern e colaboradores (1996), estas células CD8+CD57+ não representariam um marcador do desenvolvimento de imunodeficiência, e sim de diferenciação terminal/ativação imune. Neste contexto, em relação ao perfil de secreção de citocinas, esta subpopulação de células CD8+CD28-CD57+ parece apresentar mais características de células em estágio terminal de diferenciação, com maior produção de IFN- γ e, geralmente, sem produção de IL-2 (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994, Van den Hove *et al.*, 1998, Kern *et al.*, 1999, Silvestris *et al.*, 1999).

Não podemos afirmar se estas células CD8+CD57+ são específicas para antígenos de variantes X4 de HIV-1. A expansão desta subpopulação *in vitro* com estímulo por células apresentadoras de antígeno carregadas com peptídeos HIV-1 (Mollet *et al.*, 1998) ou por fibroblastos transfectados com *nef* (Silvestris *et al.*, 1999), e o fato das células CD8+CD57+ serem oligoclonais (Batliwalla *et al.*, 1996, Morley *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1995, Weekes *et al.*, 1999b) sugerem a expansão específica da subpopulação CD8+CD57+.

Encontramos expressão de CD57 inclusive naquelas células CD8+ que co-expressam CD28 (dados não mostrados), o que é raro em indivíduos normais (Azuma *et al.*, 1993a, Vingerhoets *et al.*, 1995, Kern *et al.*, 1996). É possível que as células CD28+CD57+ detectadas em nossas culturas infectadas com HIV-1 correspondam a um estágio precursor de células CD28-CD57+, já que em receptores de transplante alogeneico de rim a reativação de CMV induziu mobilização de células CD28+CD57+ antes da expansão de células CD28-CD57+ no compartimento de linfócitos T CD8+ (Hazzan *et al.*, 1997). Por outro lado, uma proporção relativamente alta de células CD8+CD28- não expressa CD57, como já observado, especialmente em pacientes infectados por HIV-1 (Vingerhoets *et al.*, 1995).

O fato de que a modulação da expressão das moléculas CD27, CD28 e CD57 nos linfócitos T CD8+ ocorre após sucessivas proliferações celulares, como demonstrado *in vitro* (de Jong *et al.*, 1991b; Hintzen *et al.*, 1993; Mollet *et al.*, 1998; Labalette *et al.*, 1999; Borthwick *et al.*, 2000), e indicado pela sua senescência (Globerson & Effros, 2000; Brenchley *et al.*, 2003), sugerem que essas mudanças fenotípicas podem resultar da ativação crônica de células T CD8+. De fato, em indivíduos normais, durante o envelhecimento, a expressão de CD27 e CD28 em linfócitos CD8+ está diminuída, enquanto as células CD8+CD57+ se acumulam (Rosenkranz *et al.*, 1992; Bandrés *et al.*, 2000). Neste sentido, nós encontramos percentuais mais altos de CD57+ e CD27- em células CD8+ de indivíduos mais velhos, mesmo em culturas não-infectadas, sustentando a associação dessas subpopulações CD8+ à senescência do sistema imune.

É possível que o vírus HIV-1 possa exacerbar alterações fenotípicas típicas de senescência em células CD8+. De fato, muitos trabalhos propuseram que o HIV-1, através de ativação direta ou indireta, pode acelerar mudanças fenotípicas e funcionais no sistema imune típicas do envelhecimento (revisado em Appay & Rowland-Jones, 2002).

Estudo 2

ESTUDO 2

RACIONAL E OBJETIVOS

As células T CD8+CD57+, predominantemente CD28-, que se encontram expandidas durante a progressão da infecção por HIV-1 (Ho *et al.* 1993, Borthwick *et al.* 1994, Vingerhoets *et al.* 1995, Lynne *et al.* 1998, Tomiyama *et al.* 2000), estão associadas a uma série de atividades supressoras que diferem dependendo da origem dessas células ou estímulos. A subpopulação T CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 pode inibir a atividade citotóxica anti-HIV-1 (Joly *et al.*, 1989, Sadat-Sowti *et al.*, 1991, 1994a, 1994b) e produzir fator solúvel que inibe a proliferação de células PBMC estimuladas com os mitógenos *pokeweed* (PWM) e fitohemaglutinina (PHA). Entretanto, células CD8+CD57+ de indivíduos saudáveis suprimem, por contato de membrana, a resposta proliferativa de PBMC ao PWM, mas não ao PHA, e não inibem a resposta citotóxica anti-HIV-1 (Wang *et al.*, 1993, 1994).

Considerando o papel supressor de células T CD8+CD57+ na replicação do HIV-1, Plaeger-Marshall *et al.* (1992), observaram que as células T CD8+ depletadas da subpopulação CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 não inibem a replicação viral. Entretanto, Landay *et al.* (1993) não encontraram diferenças na atividade supressora da replicação de HIV-1 entre as subpopulações CD57+ e CD57- de células T CD8+ não-estimuladas de pacientes infectados com HIV-1 ou de células T CD8+ ativadas com PHA de indivíduos saudáveis.

Os dados *in vivo* também são contraditórios ao considerar o papel supressor da subpopulação CD8+CD57+ na replicação HIV-1. A emergência de células T CD8+CD57+ durante a infecção por HIV-1 mostrou-se associada a um *setpoint* viral reduzido (Lieberman *et al.*, 1999). Entretanto, na progressão da doença, a expansão desta subpopulação mostrou-se associada a níveis plasmáticos aumentados de RNA viral (Levacher *et al.*, 1992, Mathé *et al.*, 1994). Em contraste, Mollet *et al.* (1998) não encontraram correlação significativa entre a expansão de células CD8+CD57+ e carga plasmática viral em pacientes infectados HIV-1.

Nesse estudo, nós objetivamos reavaliar a atividade inibitória de células CD8+CD57+ na produção de HIV-1 em culturas estimuladas por PHA ou PWM e/ou mantidas na presença de interleucina 2 (IL-2), analisando dessa vez se o prejuízo da proliferação celular em culturas

estimuladas com PWM, mas não em culturas ativadas com PHA, contribuiria para a inibição da produção de HIV-1 mediada por células CD8+CD57+ derivadas de indivíduos saudáveis.

Assim, neste segundo estudo, tivemos como objetivos:

- 1- Avaliar se em presença das subpopulações CD8+CD57+ ou CD8+CD57- haveria inibição de proliferação celular em co-culturas com CD8dPBMC (estimuladas por PHA ou PWM e/ou mantidas na presença de IL-2).
- 2- Avaliar se em presença das subpopulações CD8+CD57+ ou CD8+CD57- haveria inibição da produção viral de HIV-1 do tipo X4 em co-culturas com CD8dPBMC (estimuladas por PHA ou PWM e/ou mantidas na presença de IL-2) infectadas in vitro.

ESTUDO 2

A subpopulação T CD8+CD57+ exerce efeito inibidor sobre a proliferação celular e a produção de HIV-1 do tipo X4.

RESUMO

Considerando a participação de células T CD8+CD57+ na supressão da replicação do HIV-1, dados anteriores *in vivo* e *in vitro* são contraditórios. A subpopulação CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 inibe a atividade citotóxica anti-HIV-1 e produz fator solúvel que inibe a proliferação de PBMC induzida por *pokeweed* (PWM) ou fitohemaglutinina (PHA), enquanto células CD8+CD57+ de indivíduos saudáveis suprimem, via contato célula a célula, a resposta proliferativa de PBMC ao PWM, mas não ao PHA, e não inibem a citotoxicidade contra o vírus. No presente estudo, nós reavaliamos a atividade supressora de células CD8+CD57+ na replicação do HIV-1 em culturas estimuladas pelos mitógenos PHA ou PWM e/ou mantidas na presença de interleucina 2 (IL-2), analisando dessa vez se a inibição da proliferação celular em culturas estimuladas com PWM, e não com PHA (já que tais células CD8+CD57+ seriam oriundas de indivíduos saudáveis), contribuiria para a supressão da produção de HIV-1. Nossos resultados mostraram que a subpopulação CD8+CD57+ inibiu a produção do variante X4 HIV-1_{RF} em co-culturas de PBMC depletadas de CD8 e estimuladas com PWM (CD8dPBMC), mas não em co-culturas estimuladas com PHA ou mantidas na presença de IL-2, sugerindo que sua atividade antiviral estaria relacionada à inibição da proliferação celular. Por outro lado, células T CD8+CD57- inibiram a produção de HIV-1 X4 mesmo na presença de proliferação celular. Nesse sentido, células T CD8+CD57- responderam melhor a IL-2 e apresentaram inibição mais acentuada da produção de HIV-1_{RF}. Portanto, nossos dados dão suporte à dependência do *status* de ativação da célula alvo para a replicação viral e à identidade de células CD8+CD57-, inclusive de indivíduos sadios, como fonte de atividade supressora de produção de HIV-1 X4 semelhante à CAF (fator antiviral de células CD8), a qual não prejudica a proliferação celular.

INTRODUÇÃO

Durante a progressão da infecção por HIV-1 ocorre expansão de células T CD8+ predominantemente CD28-, com aumento de expressão de CD38, HLA-DR, CD45RO e CD57 (Ho *et al.* 1993, Borthwick *et al.* 1994, Vingerhoets *et al.* 1995, Lynne *et al.* 1998, Tomiyama *et al.* 2000), enquanto os números de células T CD8+ de fenótipo *naive* diminuem (Roederer *et al.* 1995).

A exata função das subpopulações CD8+ CD28- e CD57+ na infecção pelo HIV-1 não é bem conhecida, tendo sido associada tanto à atividade citotóxica como à supressão desta mesma atividade. Células CD8+ CD28- e CD57+ se enquadram no fenótipo de CTL efetoras (Hamann *et al.* 1999a, 1999b), e em pacientes infectados pelo HIV-1 foi verificado que elas expressam perforina e funcionalmente podem exercer citotoxicidade, assim como produzem IFN- γ (Fiorentino *et al.* 1996, Ho *et al.* 1993, Borthwick *et al.* 1994, Dalod *et al.* 1996, Mollet *et al.* 1998, Lewis *et al.* 1999, Lieberman *et al.* 1999, Weekes *et al.* 1999a, 1999b; Eylar *et al.* 2001). Por outro lado, células CD8+CD57+ podem inibir atividade citotóxica anti-HIV-1 (Joly *et al.* 1989, Autran *et al.* 1991, Sadat-Sowti *et al.* 1994a, 1994b). De fato, grandes proporções de células T CD8+ apresentam deficiência de função efetora citotóxica em pacientes infectados pelo HIV-1 (revisado em McMichael & Rowland-Jones, 2001 e Lieberman *et al.* 2001).

Alguns estudos sugerem que a expressão de CD57 em células T CD8+ está associada à infecção prévia com CMV (Maher *et al.* 1985, Wursch *et al.* 1985, Hooper *et al.* 1999, Wang *et al.* 1993), mesmo em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Evans *et al.* 1999). Células CD8+CD57+ purificadas não proliferam *in vitro* com estímulos como PHA, Con A, anticorpos anti-CD2, anti-CD3, ou anti-CD3/anti-CD28 (Ruthlein *et al.* 1988, Rouleau *et al.* 1993, Borthwick *et al.* 1994, Mollet *et al.* 1998), porém respondem a fibroblastos infectados com CMV, mas não com vírus herpes simplex tipo 1 ou com varicella zoster (Wang *et al.* 1995). Entretanto, culturas de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV-1 também apresentam expansão da subpopulação CD8+CD57+ quando estimuladas *in vitro* por células apresentadoras de antígeno carregadas com peptídeos HIV-1 (Mollet *et al.* 1998) ou por fibroblastos transfectados com *nef* (Silvestris *et al.* 1999), sugerindo ativação específica pelos antígenos HIV-1.

Os estudos já publicados sobre o fenótipo de células T CD8+ supressoras da replicação de HIV-1 *in vitro* são contraditórios em relação à participação da subpopulação CD8+CD57+. Enquanto Plaeger-Marshall e colaboradores (1992) observaram que células CD8+ depletadas da

subpopulação CD57+ não inibiam tão bem a replicação viral quanto a população total de células T CD8+, Landay e colaboradores (1993) não encontraram diferença significativa entre as subpopulações CD8+CD57+ e CD8+CD57-, ambas suprimindo a replicação viral. Por outro lado, este último trabalho mostrou que o efeito supressor de células T CD8+ sobre a replicação de HIV-1 está associado ao fenótipo HLA-DR+ e CD28+, como também verificado por Barker e colaboradores (1997), especialmente após a ativação de células CD8+CD28+ com anticorpos anti-CD28.

Os dados *in vivo* também parecem contraditórios em relação ao papel supressor da subpopulação CD8+CD57+ sobre a replicação de HIV-1. O aparecimento das células CD8+CD57+ na infecção primária por HIV-1 foi associado à carga viral inicial reduzida, sugerindo que elas possam contribuir para a contenção do vírus no início da doença (Lieberman *et al.* 1999). Porém, com a progressão da doença, esta subpopulação é ainda mais expandida e passa a apresentar-se associada ao aumento dos níveis de RNA viral plasmático (Levacher *et al.* 1992, Mathé *et al.* 1994). Neste sentido, sabe-se que a atividade antiviral não citolítica de células T CD8+ diminui com a progressão da doença (revisado em Levy *et al.* 1996). Por outro lado, Mollet e colaboradores (1998) não observaram correlação significativa entre a expansão de células CD8+CD57+ em pacientes infectados pelo HIV-1 e a carga viral plasmática.

As células CD8+CD57+ já foram também relacionadas à supressão de proliferação de PBMC em resposta a PWM (Wang *et al.* 1993, Frassanito *et al.* 1998); ou a PHA e aloantígenos (Quan 1993). Desse modo, é possível que a presença desta subpopulação em maior percentual durante a progressão da infecção pelo HIV-1 possa suprimir a replicação viral pela inibição de proliferação celular.

Portanto, nesse estudo objetivamos reavaliar a atividade inibitória de células CD8+CD57+ na produção de HIV-1 em culturas estimuladas por PHA ou PWM e/ou mantidas na presença de interleucina 2 (IL-2), analisando dessa vez se o prejuízo da proliferação celular em culturas estimuladas com PWM, mas não em culturas ativadas com PHA, contribuiria para a inibição da produção de HIV-1 mediada por células CD8+CD57+ derivadas de indivíduos saudáveis. Além disso, por utilizarmos vírus X4 (HIV-1_{IIIb}) nos ensaios de supressão viral, cuja produção não é inibida por β -quimiocinas, poderemos inferir se estas subpopulações são capazes de inibir a replicação viral através de atividade semelhante ao CAF (*Cellular Antiviral Factor* ou Fator Celular Antiviral), o qual não afeta a proliferação celular (revisado em Levy *et al.* 1996).

METODOLOGIA

Vírus

Estoques virais de HIV-1_{RF}, uma variante X4 de HIV-1, foram crescidos em células CEM (ambos obtidos da *Centralized Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council, UK*).

Culturas celulares

Nós coletamos amostras de sangue em duas ocasiões de 4 voluntários saudáveis para estabelecer linhagens CD8⁺ e então purificar as frações celulares a serem usadas em co-culturas autólogas. PBMC foram isolados de amostras heparinizadas de sangue por densidade de centrifugação em Fycoll-Hypaque (*Sigma, Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA*).

PBMC foram preparados e processados, como destacado abaixo, para produzir as seguintes condições de cultura: 1) PBMC depletado de células CD8 (CD8dPBMC) e 2) CD8dPBMC mais células autólogas CD8⁺CD57⁺ ou 3) CD8dPBMC mais células autólogas CD8⁺CD57⁻ cells. As culturas foram estabelecidas na densidade de 1×10^6 células / ml (37°C, 5% CO₂) em RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (FCS), glutamina, penicilina e estreptomicina (Sigma). As células foram mantidas na presença de IL-2 (30IU/ml, *Boehringer-Mannheim, Roche Diagnostics Ltd, East Sussex, UK*) desde o dia 0 ou ativadas com os mitógenos PHA (10 µg/ml, Sigma) ou PWM (1:80, *Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France*) nos dias 0 e depois de 3 ou 6 dias o meio foi trocado e a IL-2 foi acrescentada. Essas condições de cultura foram mencionadas no texto como IL-2, PHA ou PWM, respectivamente. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana.

Linhagens celulares CD8⁺ foram obtidas a partir de culturas a longo prazo (por mais de 1 mês) de PBMC estimuladas com PHA e posteriormente mantidas em IL-2 (30 IU/ml, BM), sendo re-estimuladas em intervalos de 2 semanas com PHA (10 µg/ml, Sigma), IL-2 (30 IU/ml, BM) e PBMC alogeneico tratado previamente com 40µg/ml de mitomicina C (mit. C, Sigma) a 37°C por 30 minutos. Após 3 dias, o meio era trocado e suplementado novamente apenas com IL-2.

Purificação de Subpopulações Celulares

As depleções e purificações celulares necessárias para os estudos funcionais foram realizadas utilizando-se o sistema de seleção celular com partículas super-paramagnéticas acopladas a anticorpos específicos (*MicroBeads*) da Miltenyi Biotec, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Estas *MicroBeads* (50 nm de diâmetro) são biodegradáveis, e não interferem em ensaios biológicos, como previamente descrito (Manyonda *et al.* 1992).

As células foram ressuspensas em PBS suplementado com 0,5% BSA (Sigma) e 2 mM EDTA (Sigma), e incubadas com *MicroBeads* (15 min/6^o-12^oC). Após lavadas e ressuspensas no mesmo tampão, foram passadas por uma coluna de separação do tipo *MS+* (para até 10⁷ células positivas) ou *LS+* (para até 10⁸ células positivas). Estas colunas foram colocadas em campo magnético de um separador *MACS* (*Magnetic Cell Separator*, *MiniMACS* ou *MidiMACS*, respectivamente). As células magneticamente marcadas eram retidas na coluna, enquanto as não marcadas passavam. Estas células não marcadas constituíam as populações depletadas. Após a remoção da coluna do campo magnético, foi encaixado um êmbulo à sua parte superior e utilizamos pressão para retirar as células magneticamente retidas (fração celular positivamente selecionada). Para a obtenção de maior pureza, a fração positiva foi aplicada a uma nova coluna e repetiu-se todo o processo.

A população depletada de células CD8⁺ é aqui denominada CD8dPBMC, e foi isolada a partir de PBMC recém-obtido utilizando-se *CD8 MicroBeads*. Para facilitar a obtenção de maior número de células CD8⁺CD57⁺, bem como CD8⁺CD57⁻, estas subpopulações de células T CD8⁺ foram purificadas de linhagens celulares CD8⁺, previamente estabelecidas a partir de sangue do mesmo doador. Para a seleção destas células CD8⁺ utilizamos o *MACS CD8 Multisort Kit* (MB). As células foram magneticamente marcadas com *CD8 MultiSort MicroBeads*, lavadas, e aplicadas à coluna, a qual foi colocada sobre o campo magnético do separador *MACS*. As células que passavam pela coluna foram coletadas como outra fração CD8dPBMC, não utilizada nos ensaios funcionais. As células da fração positiva (CD8⁺) eram aplicadas a uma nova coluna, e, posteriormente, incubadas com o reagente *Multisort Release* (10 min/6^o-12^oC), o qual liberava as *Multisort Microbeads* enzimaticamente. Após serem lavadas, as células foram ainda incubadas com o reagente *MultiSort Stop*, para inibir a reação de liberação em etapas subsequentes. Estas

células CD8⁺ purificadas foram separadas em subpopulações CD57⁻ e CD57⁺ incubando-se primeiramente com anticorpo monoclonal anti-CD57-FITC (Pharmlingen) e, após lavadas, com *anti-FITC Microbeads* (em gelo/30 min, cada incubação). As células foram ressuspensas no tampão PBS/BSA/EDTA, depois de haverem sido novamente lavadas, e então aplicadas à coluna, utilizando-se os mesmos princípios de seleção negativa e positiva acima descritos para o fracionamento celular.

A pureza das frações celulares foi verificada através de citometria de fluxo em *FACScan* (BD).

Ensaio de atividade supressora das subpopulações CD8⁺CD57⁺ e CD8⁺CD57⁻ sobre a replicação de HIV-1

A fração fresca CD8⁺PBMC foi plaqueada a uma densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços com fundo em U (*Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA*) isoladamente ou em co-cultura com células autólogas previamente expandidas CD8⁺CD57⁺ e CD8⁺CD57⁻ em razões de diluição de 50:1, 10:1 ou 2:1 (em triplicatas). Essas células foram cultivadas nas condições IL-2, PHA ou PWM, como descrito acima. Depois de 3 ou 6 dias em cultura, as células foram infectadas por HIV-1_{RF} por 2 horas a 37°C, e então lavadas 3X em PBS. As culturas infectadas foram mantidas na presença continuada de IL-2 a 37°C por pelo menos 20 dias, e analisadas quanto à produção de HIV-1_{RF}.

A produção viral foi quantificada pela atividade da enzima transcriptase reversa (RT), como descrito abaixo, e foi expressa como cpm/5µl (volume de sobrenadante de cultura usado no mini ensaio RT). A percentagem de supressão da produção viral mediada por células CD8⁺CD57⁺ ou CD8⁺CD57⁻ foi calculada usando os valores de RT encontrados em cada dia da cinética em que ocorreu o pico da produção viral por CD8⁺PBMC, através da fórmula:

$$\% \text{ Supressão} = \frac{100 - (\text{valor em cpm da co-cultura da subpopulação CD8}^+/\text{CD8dPBMC})}{(\text{valor em cpm da cultura CD8dPBMC})} \times 100$$

Nós consideramos o limiar de supressão como 40%, de acordo com as baixas percentagens de células CD8⁺ usadas nesses ensaios, e o fato de que elas foram derivadas de doadores saudáveis (veja os comentários por Levy *et al.*, 1996 e Tomaras & Greenberg, 2001).

Ensaio Mini RT de atividade da enzima Transcriptase Reversa

Sobrenadantes de culturas infectadas foram coletados periodicamente e mantidos a -80°C até que sua atividade RT fosse medida através do ensaio “mini” RT descritos por Willey *et al.* (1988). Em resumo, $5\mu\text{l}$ de sobrenadante de cultura foi adicionado a triplicata a uma mistura de $25\mu\text{l}$ contendo poli (A), oligo (dT), MgCl_2 and ^{32}P DTTP (^{32}P marcado com deoxitimidina trifosfato 5'; *Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, UK*). Depois de 2 horas de incubação a 37°C , $5\mu\text{l}$ da mistura de reação foi pipetada para filtros de papel DE81 (*Whatman LabSales, Hillsboro, OR, USA*). Os filtros foram secados e lavados 5x em 2X SSC e mais duas vezes em etanol 95%. Os filtros foram secados novamente e a atividade RT foi medida pela radioatividade contada com o 1450 Microbeta Plus Wallac (*Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, UK*).

Ensaio de atividade supressora da proliferação celular das subpopulações CD8+CD57+ e CD8+CD57-

A atividade supressora de proliferação celular das subpopulações de células T CD8+CD8+CD57+ and CD8+CD57-foi avaliada em paralelo à sua atividade antiviral não citolítica, nas mesmas condições de cultura utilizadas para o ensaio de supressão viral, exceto pela infecção.

A incorporação de $1\mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina (*Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, UK*) foi realizada por 18 horas após 3 ou 6 dias de estímulo sob as condições de cultura PHA, IL-2 ou PWM, e a contagem foi feita em 1450 Microbeta Plus Wallac (Perkin-Elmer). Para a representação gráfica, expressamos a proliferação celular em índice de estimulação (IE), calculado através da fórmula:

$$\text{IE} = \frac{\text{(valor em cpm de co-cultura de subpopulação CD8+/CD8dPBMC)}}{\text{(valor em cpm de cultura CD8dPBMC)}}$$

RESULTADOS

As células CD8+CD57+ são capazes de inibir a produção de variante X4 de HIV-1 *in vitro*.

Células CD8+CD57+, de indivíduos saudáveis, expandidas previamente *in vitro*, mostraram-se capazes de inibir a produção da variante X4 de HIV-1_{RF} de forma dose-dependente, quando presentes em co-culturas com CD8dPBMC autólogas estimuladas com PWM (figura 2.1 e figura 2.2A e 2.2C). Supressão acima de 50% foi observada a uma razão de 1:2 CD8+CD57+/CD8dPBMC, mas não sempre em razões mais baixas.

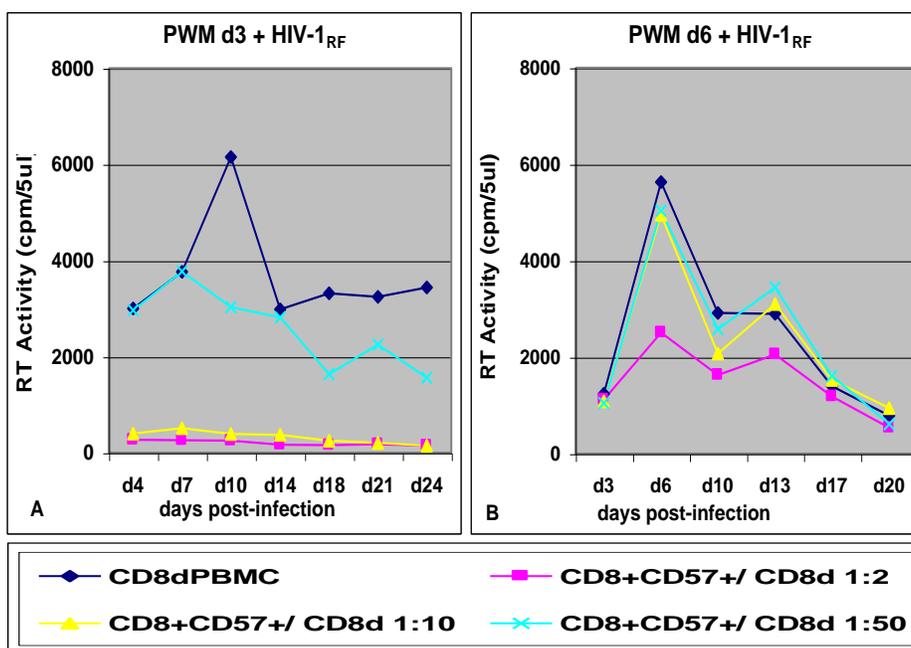


Figura 2.1. A produção de HIV-1_{RF} por CD8dPBMC ativado por PWM ou co-culturas de CD8dPBMC com CD8+CD57+ (CD8+CD57+/CD8d) ativadas por PWM, em diferentes razões, foi detectada pela atividade da transcriptase reversa (RT), como descrito no mini ensaio RT. Culturas foram infectadas com HIV-1_{RF} a MOI 0.01 por 2h/37°C, no dia 3 (A) ou 6 (B) após o estímulo. As cinéticas de produção viral em A e B foram realizadas com células de mesmo doador.

Em co-culturas estimuladas com PWM e infectadas no dia 3, os níveis da supressão viral mediada por células CD8+CD57+ foram maiores do que aqueles induzidos pela subpopulação CD8+CD57- (figura 2.2A). De forma contrária, em co-culturas estimuladas por PWM e infectadas no dia 6, encontramos uma melhor inibição da produção viral mediada por células CD8+CD57- do que por CD8+CD57+ (figuras 2.2A and 2.2C).

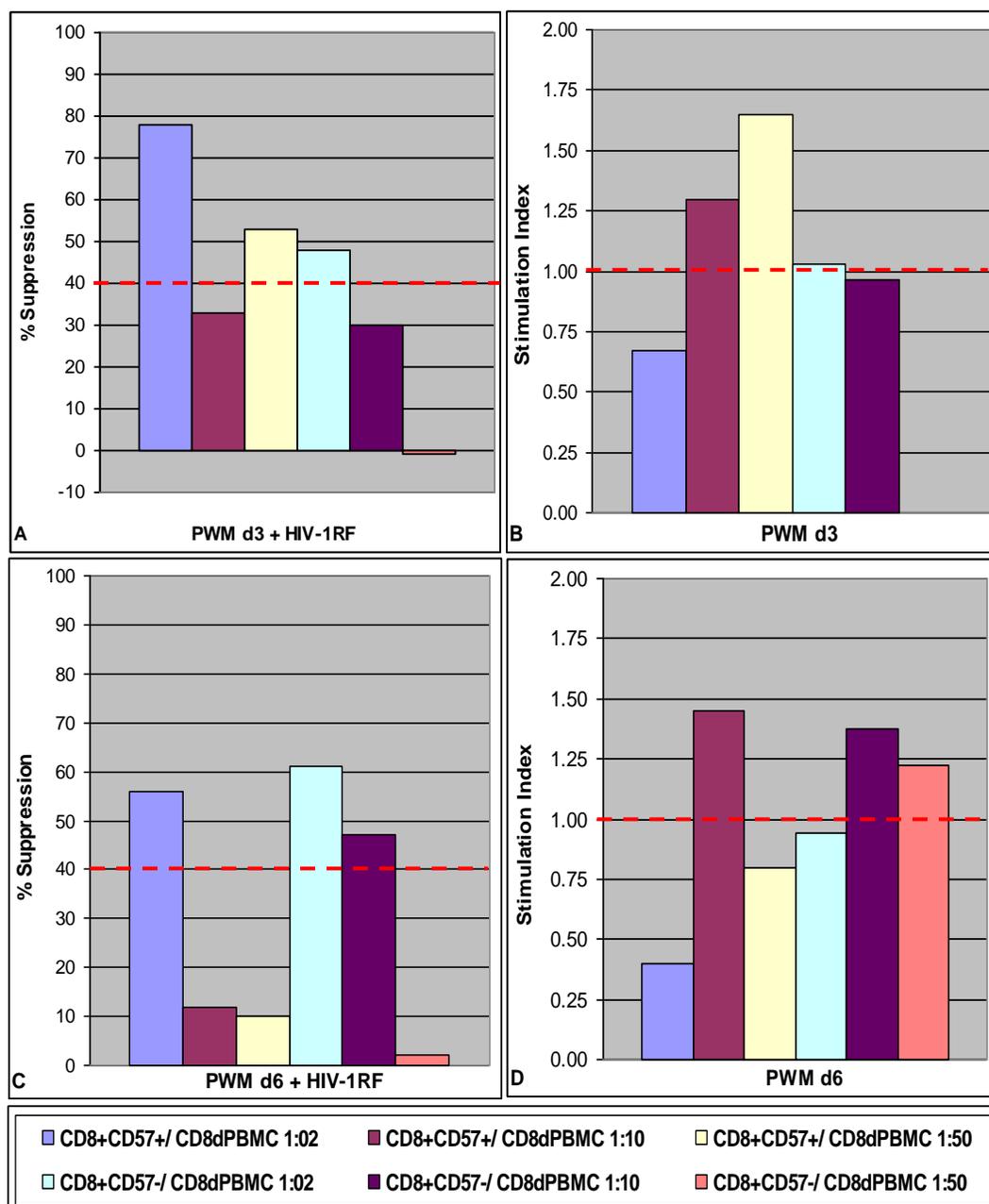


Figura 2.2. Comparação dos efeitos inibitórios das subpopulações CD57+ ou CD57- de células CD8+sobre a produção de HIV-1_{RF} (A e C) e proliferação celular (B e D) em co-culturas estimuladas por PWM de CD8+CD57+ ou CD8+CD57- com CD8dPBMC autólogas frescas. Os ensaios de proliferação celular foram realizados em paralelo aos ensaios de atividade antiviral, sob as mesmas condições de cultura, exceto a própria infecção. As culturas foram infectadas por HIV-1_{RF} a MOI 0.01 por 2h/37°C, no dia 3 (A) ou dia 6 (C) após o estímulo. Os dados em A e B são de um doador, e em C e D, de outro doador. Linha vermelha delimita limiar de inibição de produção viral (A e C) ou de proliferação celular (B e D).

A inibição da produção viral mediada por células CD8+CD57+ parece estar relacionada a sua atividade inibitória da proliferação celular, enquanto células CD8+CD57- foram capazes de inibir a replicação viral sem afetar a proliferação celular

Como mostrado acima, em co-culturas de CD8+CD57+/CD8dPBMC (a uma razão de 1:2) estimuladas com PWM, observamos inibição da produção de vírus e da proliferação celular (figura 2.2). Entretanto, em co-culturas estimuladas com PHA ou com IL-2, a subpopulação CD57+ de células CD8+ não foi capaz de inibir a produção viral ou a proliferação celular, mesmo em uma razão de 1:2 CD8+CD57+/CD8dPBMC (figuras 2.3 e 2.4).

Por outro lado, a inibição da produção de HIV-1_{RF} mediada pela subpopulação CD8+CD57- em qualquer uma das condições de co-cultura não foi associada a reduções da proliferação, ou mesmo ocorreu em relação direta com a proliferação celular observada nessas co-culturas (figuras 2.3 e 2.4).

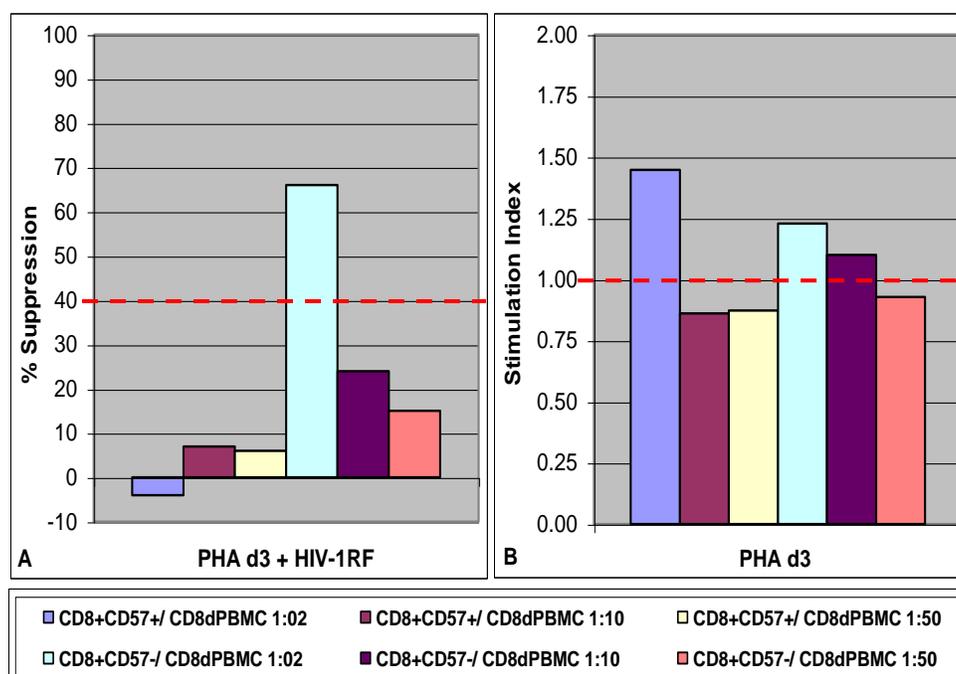


Figura 2.3. Comparação dos efeitos inibitórios das subpopulações CD57+ ou CD57- de células CD8+sobre a produção de HIV-1_{RF} (A e C) e proliferação celular (B e D) em co-culturas estimuladas por PHA de CD8+CD57+ ou CD8+CD57- com CD8dPBMC autólogas frescas. O ensaio de proliferação celular foi realizado em paralelo ao ensaio de atividade antiviral, sob as mesmas condições, exceto a infecção. As culturas foram infectadas por HIV-1_{RF} a MOI 0.01 por 2h/37°C, no dia 3 (A) após estímulo. Os dados em A e B são do mesmo doador. Linha vermelha delimita limiar de inibição de produção viral (A e C) ou de proliferação celular (B e D).

A citocina IL-2 aumenta a atividade inibitória de células CD8+CD57- e CD8+CD57+ sobre a replicação viral:

Ambas as subpopulações de células CD8+ apresentam uma tendência à capacidade aumentada de inibir a replicação viral se expostas a IL-2 por um período de tempo mais longo (6 dias x 3 dias) anterior à infecção das co-culturas (figura 2.4A). No caso das células CD8+CD57-, a inibição viral por células previamente estimuladas com IL-2 por 6 dias parece ocorrer em relação direta com a proliferação celular observada nessas co-culturas (figuras 2.3 e 2.4)

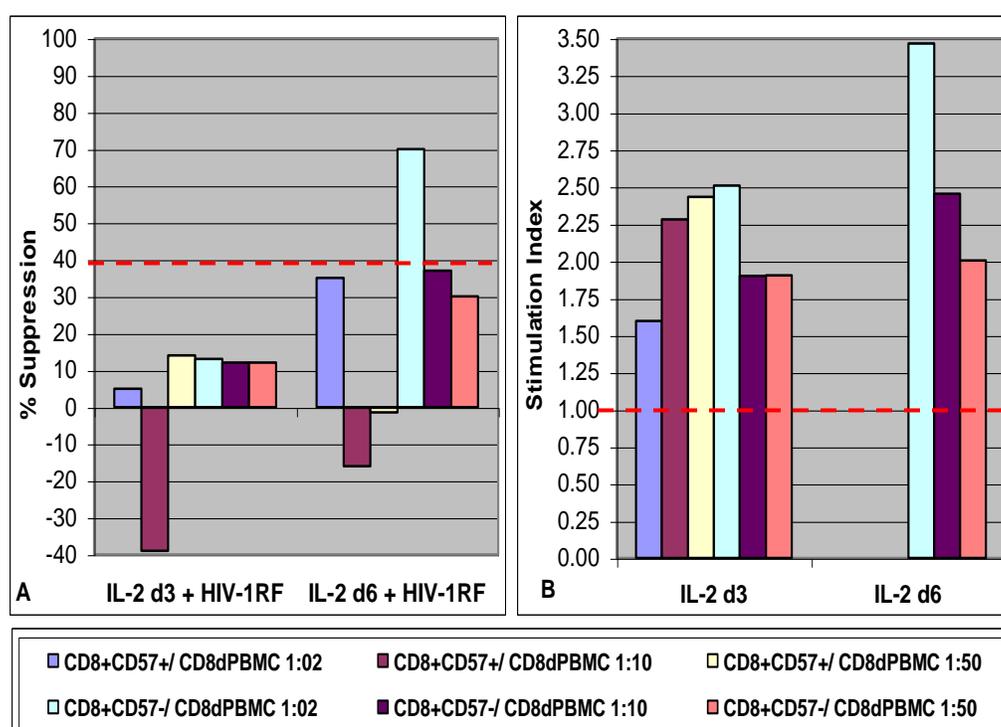


Figura 2.4. Comparação dos efeitos inibitórios das populações CD57+ e CD57- de populações CD8+ na produção de HIV-1_{RF} (A) e a proliferação celular (B) em co-culturas estimuladas por IL-2 de CD8+CD57+ ou CD8+CD57- com CD8dPBMC autólogas frescas. O ensaio de proliferação celular foi realizado em paralelo ao de atividade antiviral, sob as mesmas condições de cultura, exceto pela infecção. As células foram infectadas por HIV-1_{RF} a MOI 0.01 por 2h/37°C, depois de 3 ou 6 dias em cultura na presença de IL-2. Os dados em A e B são do mesmo doador. Linha vermelha delimita limiar de inibição de produção viral (A e C) ou de proliferação celular (B e D).

As próprias células CD8+CD57- são bem mais capazes de proliferar que as células CD8+CD57+ quando estimuladas com PHA (dados não mostrados), bem como de responderem a IL-2 (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994; Mollet *et al.*, 1998). Neste sentido, encontramos IE de células CD8+CD57- após 3 (IE = 2,3) ou 6 (IE = 6,3) dias em presença de IL-2 bem mais alto que o de cultura de CD8dPBMC (IE = 1).

Desse modo, corroboramos dados anteriores de que o fenótipo de células T CD8+ que suprimem a replicação viral seria o de células ativadas (CD25+, HLA-DR+ e CD28+) (Landay *et al.* 1993; Toso *et al.*, 1995; Kinter *et al.*, 1995a, 1995b) e de que a atividade CAF não diminui a proliferação celular (revisado em Levy *et al.* 1996).

Por outro lado, a supressão de proliferação celular também contribuiu para uma menor produção viral, o que está de acordo com os achados de que a ativação celular favorece a replicação de HIV-1 (revisado em Cohen *et al.* 1997). Parece-nos que as duas subpopulações, CD8+CD57+ e CD8+CD57-, podem contribuir para a diminuição da replicação viral, porém, através de mecanismos diferentes.

DISCUSSÃO

A expansão da subpopulação CD8+CD57+ é um fenômeno bem conhecido que ocorre na infecção por HIV e outros vírus, e muitos estudos abordaram o papel dessas células. Aparentemente, células CD8+CD57+ são terminalmente diferenciadas e senescentes (Hamann *et al.*, 1999a, Brenchley *et al.*, 2003), resultando de ativação antigênica crônica (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994, Mollet *et al.*, 1998), presente na infecção por HIV-1 (revisto por Lawn *et al.*, 2001) e outras imunopatologias (Kern *et al.*, 1996, Lynne *et al.*, 1998). A capacidade dessas células de exercer atividade citotóxica e supressão anti-citotóxica pode contribuir para controlar a função efetora citolítica dos linfócitos T CD8+ durante infecções virais persistentes ou transplantes (Kern *et al.*, 1996, Mollet *et al.*, 1998).

Uma outra função efetora de células CD8+ que pode desempenhar um papel na contenção da infecção da infecção por HIV-1 é a supressão não-citolítica da replicação do HIV-1 (Walker *et al.*, 1986; reviews by Yang & Walker, 1997, Tomaras & Greenberg 2001). Trabalhos preliminares encontraram que as células CD8+CD57+ exerceram essa função melhor ou tão bem quanto as CD8+CD57- (Plaeger-Marshall *et al.*, 1992; Landay *et al.*, 1993). Entretanto, esses mesmos estudos e outros mais recentes associaram a atividade supressora anti-HIV de células CD8+ ao fenótipo ativado HLA-DR+ CD25+ Ki67+ CD8+CD28+ (Landay *et al.*, 1993, Barker *et al.*, 1997, Wilkinson *et al.*, 2002). O achado de que a subpopulação CD8+CD57+ pode exercer supressão não citolítica da replicação de HIV-1 pode ser explicado pelo uso de células T CD8+ não-estimuladas derivadas de pacientes infectados com HIV-1 nesses estudos iniciais, uma vez que essas células apresentaram um fenótipo ativado CD38+ HLA-DR+ CD45RO+ ou CD45RA- nos adultos (Prince & Jensen, 1991) ou crianças (Plaeger-Marshall *et al.*, 1993). Por outro lado, o fenótipo HLA-DR+ CD25+ Ki67+ CD8+CD28+ *in vitro* pode refletir uma maior resposta da subpopulação CD8+CD57-CD28+ a PHA, IL-2, anti-CD28 ou outros ativadores de linfócitos T (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994, Barker *et al.*, 1997, Mollet *et al.*, 1998). Entretanto, é curioso que Kinter *et al.* (1995a, 1995b) tenham previamente demonstrado que a citocina IL-2 é um importante indutor da atividade supressora da replicação viral de células T CD8+ e que aquela população CD8+CD25+ apresentou expressão aumentada de CD57. Isso pode estar relacionado ao fato de que altas doses de IL-2 podem promover a expressão de CD57 após vários ciclos celulares de linfócitos T CD8+CD57- (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994). Nesse contexto, a

terapia com IL-2 aplicada a pacientes infectados com HIV-1, embora a longo prazo pudesse contribuir para a expansão da população CD8+CD57+, a curto prazo poderia aumentar o status de ativação de células CD8+ e sua atividade antiviral. De fato, nossos resultados mostram que a IL-2 aumenta a atividade antiviral de ambas CD8+CD57+ e CD8+CD57-, mesmo quando essa última subpopulação é mais susceptível a responder a esta citocina.

Nesse sentido, nós encontramos que as células CD8+CD57- apresentaram maior resposta proliferativa a IL-2 ou PHA do que a subpopulação CD8+CD57+ (dados não mostrados). É interessante que em co-culturas ativadas por PHA, ou mantidas em IL-2 desde o dia 0, a subpopulação CD8+CD57- contribuiu para a proliferação aumentada de uma forma dose-dependente, e geralmente apresentou atividade inibitória sobre a replicação viral mais alta do que as células CD8+CD57+, embora a supressão estivesse usualmente abaixo do limiar em nossos experimentos. Portanto, a subpopulação CD8+CD57-, enriquecida no fenótipo CD28+, pode exercer atividade antiviral sem afetar a proliferação celular, corroborando dados anteriores que mostram que essas células seriam a fonte de CAF (fator antiviral de células CD8+, revisto por Levy *et al.*, 1996, Barker, 1999 and Copeland, 2001).

De fato, CAF é descrito como incapaz de prejudicar a proliferação celular e é ativo contra as variantes X4 de HIV-1, enquanto β -quimiocinas podem bloquear a infecção por variantes R5 (revisto por Yang & Walker, 1997 e Copeland, 2001). Entretanto, a subpopulação CD8+CD57+ foi capaz de suprimir a produção da variante X4 HIV-1_{RF} em co-culturas estimuladas com PWM, condições de cultura em que essas células também mediaram a inibição da proliferação celular, assim provavelmente sem envolvimento de CAF, uma vez que esse fator é considerado independente da atividade anti-proliferativa (revisto por Levy *et al.*, 1996, Yang & Walker, 1997, Tomaras & Greenberg 2001).

Portanto, ambas as populações CD57+ e CD57-(CD28+) de células CD8+ parecem exercer atividade supressora sobre a produção de uma variante X4 de HIV-1 através de mecanismos diferentes. A capacidade de células CD8+CD57+ em suprimir a produção da variante X4 HIV-1_{RF} em associação a inibição da proliferação celular está em concordância com o conceito de que a ativação celular favorece a replicação do HIV-1 (revisto por Lawn *et al.*, 2001). Esses resultados indicam a possibilidade de que células CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 possam exercer atividade antiviral através da inibição da resposta proliferativa de células infectadas. Entretanto, ainda é necessário abordar essa questão em

experimentos *ex vivo*, já que as atividades supressoras desta subpopulação diferem dependendo da fonte dessas células.

A subpopulação CD8+CD57+ de indivíduos infectados com HIV-1, bem como de pacientes de mieloma múltiplo (MM) ou receptores de transplante de medula óssea, inibe a resposta proliferativa induzida por PWM através de fator solúvel (revisado por Wang & Borosysiewicz, 1995, Frassanito *et al.*, 1998). Curiosamente, células CD8+CD57+ de pacientes MM também inibem a proliferação espontânea (Frassanito *et al.*, 1998), e células CD8+CD57+ de pessoas saudáveis suprimem a proliferação de células T induzida por antígenos (Landay *et al.*, 1983). Se essa mesma atividade fosse detectada na subpopulação CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1, nós poderíamos supor que sua expansão durante a progressão da doença pudesse contribuir para a manutenção de reservatórios de HIV-1 em células quiescentes. A esse respeito, é importante notar que aumentos percentuais de CD8+CD57+ parecem estar associados a uma menor razão CD4/CD8 em pacientes apresentando MM (Frassanito *et al.*, 1998) ou imunodeficiência comum variável (Jaffe *et al.*, 1993a, 1993b). Em pacientes infectados com HIV-1, foi encontrada uma correlação inversa entre os números de células CD8+CD57+ e células T CD4+ ou a razão CD4/CD8 (Piras *et al.*, 1990) ou nenhuma correlação com a depleção de CD4 (Mollet *et al.*, 1998).

Em oposição à atividade antiviral de células T CD8+, observamos que a adição de células T CD8+ às culturas de CD8dPBMC levou ao aumento da replicação viral em algumas condições de cultura. Nestes casos, podemos levantar a hipótese de que as células T CD8+ estariam contribuindo para a produção viral, indiretamente através da secreção de citocinas ou quimiocinas, pois RANTES aumenta a replicação de HIV-1 X4 (Kinter *et al.* 1998, Gordon *et al.* 1999, Appay & Rowland-Jones 2001), ou diretamente, já que o estímulo mitogênico por PHA ou PWM induz a co-expressão de CD4 em células T CD8+. Nós abordamos essa questão no próximo estudo desta tese e encontramos que a produção direta de HIV-1 por células T CD8+ usualmente não afeta os resultados observados da supressão da replicação viral *in vitro*, devido a uma cinética mais lenta de replicação viral nas células T CD8+ comparada àquela de células CD4+.

Estudo 3

ESTUDO 3

RACIONAL E OBJETIVOS

A atividade supressora não-citolítica de células T CD8+ contribui para o controle da produção de HIV (revisões de Yang & Walker, 1997; Copeland, 2001 e, Tomaras & Greenberg, 2001). Contudo, esta atividade antiviral de células T CD8+, bem como sua capacidade citotóxica, são afetadas durante a progressão da infecção pelo HIV-1 (revisões de Yang & Walker, 1997; Lieberman *et al.*, 2001; McMichael, 2000; McMichael & Rowland-Jones, 2001).

Se a infecção de células T CD8+ pelo HIV-1, demonstrada *in vitro* (De Rossi *et al.*, 1986; Tsubota *et al.*, 1989b; Lusso *et al.*, 1990, 1991; De Maria *et al.*, 1991; Mercure *et al.*, 1993; Stanley *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Kitchen *et al.*, 1997; 1998; Flamand *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Zloza *et al.*, 2003) e em pacientes infectados (Semenzato *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1996; McBreen *et al.*, 2001; Imlach *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 2001a, 2001b), especialmente na fase AIDS, teria algum impacto sobre as atividades antivirais destas células permanece indefinido. Neste estudo, investigamos se a infecção produtiva de células T CD8+ afetaria sua atividade supressora da replicação de HIV-1 *in vitro*.

Muitos trabalhos anteriores demonstraram a atividade supressora de células T CD8+ sobre a produção de HIV-1 *in vitro*, atividade esta geralmente induzida por estímulo mitogênico (revisões de Levy *et al.*, 1996; Yang & Walker, 1997; Tomaras & Greenberg, 2001). Pressupõe-se que neste tipo de ensaio somente as células T CD4+ ou a população de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* ou células mononucleares de sangue periférico) depletada de células CD8+ (CD8dPBMC) seriam infectadas, enquanto a supressão de replicação viral seria dada pela ação de células T CD8+ sobre estas células alvos. Estes pressupostos não são válidos diante de alguns achados. Por um lado, sabe-se atualmente que mesmo as células T CD4+ podem contribuir para a inibição de replicação viral (Paxton *et al.*, 1996, Kinter *et al.*, 1996a, 1996b, Furci *et al.*, 1997). E por outro lado, já há algum tempo conhece-se o fato de em culturas deste tipo ser possível ocorrer a infecção de células T CD8+, primeiramente explicada pelo contato íntimo entre as células T citotóxicas e suas células alvos (De Maria *et al.*, 1991, 1994, Mercure *et al.*, 1993). Mesmo a população de PBMC depletada de células CD4+ (CD4dPBMC) pode ser infectada *in vitro*. Através de estímulo por PHA, anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, ou contato com células dendríticas alogeneicas, a fração CD8+ de PBMC passa a co-expressar a molécula

CD4 e torna-se susceptível à infecção pelo vírus HIV-1 (Flamand *et al.*, 1998, Kitchen *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1998).

É possível, então, que as células T CD8+ contribuam para a produção total de HIV-1 não apenas através de suas atividades antivirais, mas também pela sua própria produtividade. Assim, a menor inibição de replicação viral encontrada em co-culturas de linfócitos CD4+ e CD8+ sob certos estímulos poderia ocorrer não só pela menor atividade supressora das células CD8+, mas também pelo fato de as células CD8+ produzirem HIV-1 nestas condições.

Além disso, uma vez que a atividade anti-HIV-1 de células CD8+ varia de acordo com a citocina presente no ensaio (revisto por Levy *et al.*, 1996), nós procuramos analisar se citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 promovem a produção de HIV-1 por células CD8+ T e portanto afetam o resultado da função antiviral. Estudos anteriores já haviam mostrado que a atividade supressora não citolítica é criticamente dependente de citocinas presentes no ensaio (Barker *et al.* 1995, Kinter *et al.* 1995a, 1995b; Smithgall *et al.* 1996, revisões de Kinter *et al.* 2000, Levy *et al.* 1996). Por exemplo, a IL-2 aumenta a supressão CD8+ antiviral, como também outras citocinas Th1, como interferon- γ (IFN- γ , enquanto a IL-4 e a IL-10 não (Barker *et al.* 1995, Kinter *et al.* 1995a, 1995b, 1996a, 1996b, revisões de Clerici & Shearer 1993, 1994, Kinter *et al.* 2000, Levy *et al.* 1996). Assim, nesse trabalho, pela primeira vez comparamos os efeitos de IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 sobre a atividade antiviral de células CD8+ e sua contribuição para a produção de HIV-1 pelas próprias células CD8+.

Portanto, são objetivos deste estudo:

- 1- Analisar se a infecção produtiva de linfócitos CD8+ contribui para a produção viral total em co-cultura com linfócitos CD4+ ou em culturas de PBMC depletadas de CD8.
- 2- Comparar a capacidade de produção viral de linfócitos CD8+ infectados com HIV-1 do tipo X4 com os níveis de co-expressão de CD4 e CXCR4 em presença de diferentes citocinas γ .
- 3- Verificar se esta co-expressão de CD4 é essencial para a infecção produtiva com HIV-1.
- 4- Comparar as cinéticas de produção viral de linfócitos T CD4+ e CD8+ sob diferentes estímulos, tais como as citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15.
- 5- Comparar as cinéticas de produção viral com as de supressão viral sob diferentes estímulos.

ESTUDO 3

Duplo papel de linfócitos T CD8+ na infecção pelo HIV-1: alvos e supressores da replicação viral.

RESUMO

Células CD8+ T contribuem para controlar a infecção por HIV-1 através de atividades supressoras citotóxicas e não-líticas, entretanto, uma série de evidências vem mostrando que elas também são alvo do HIV-1. Nós objetivamos investigar se a infecção produtiva de células CD8+ poderia afetar sua atividade supressora. Uma vez que essa função antiviral de células CD8+ varia de acordo com a citocina presente nesse ensaio, nós procuramos analisar a produção viral em co-culturas de linfócitos CD4+ e CD8+ sob a influência de algumas citocinas γ c alteradas durante a infecção por HIV-1 (IL-2, IL-4, IL-7 or IL-15). Para isso, as células CD4+ e CD8+ foram previamente ativadas com PHA e então expostas ao X4 HIV-1_{RF}, cada tipo celular separadamente. Como controles, utilizamos células que não foram submetidas ao mitógeno. Paradoxalmente, nós observamos que os mesmos estímulos PHA+IL-2 e PHA+IL-15 que induziram níveis mais altos de infecção produtiva de CD8 foram aqueles que promoveram a supressão da produção viral medidas em co-culturas CD8+/CD4+ (razão 1:1) no momento de pico de atividade RT de culturas CD4+. Isso pode em parte ser explicado pela cinética mais lenta de produção viral por células CD8+ comparadas às células CD4+, que pode fazer delas reservatórios virais potenciais. Portanto, as células CD8+ contribuem para a produção total de HIV-1 não apenas por atividades antivirais, mas também por sua própria produtividade. Terapias utilizando as citocinas γ c IL-2 ou IL-15 na infecção por HIV-1 podem ter que considerar a ativação não apenas dos reservatórios em células T CD4+, mas também de células T CD8+.

INTRODUÇÃO

Como a atividade supressora de células T CD8⁺ é modulada pelas citocinas presentes durante o ensaio *in vitro* (Barker *et al.* 1995, Kinter 1995a, 1995b, Smithgall *et al.* 1996, revisões de Kinter *et al.* 1996a, 2000, Levy *et al.* 1996), decidimos analisar em culturas infectadas os efeitos de algumas citocinas γ c (que utilizam a cadeia comum γ) alteradas na infecção pelo HIV-1, como interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-7 ou IL-15. Enquanto os níveis de IL-2 (Clerici *et al.*, 1989a, 1989b, 1993; Clerici & Shearer, 1993, 1994; Sieg *et al.*, 2001) e IL-15 (d’Ettorre *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, 2003) encontram-se diminuídos nesta infecção, a produção de IL-4 (Clerici *et al.*, 1993; Clerici & Shearer, 1993, 1994; Sousa *et al.*, 1999) e IL-7 (Kacani *et al.*, 1997; Llano *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2001) são aumentadas.

Células T CD8⁺ apresentam diferentes padrões de supressão da replicação de HIV-1 quando estimuladas com PHA e citocinas do tipo Th1 ou Th2 (Barker *et al.* 1995, revisado em Levy *et al.* 1996). Como observamos em nosso estudo anterior, e de acordo com trabalhos prévios (Barker *et al.* 1995, Kinter *et al.* 1995a, 1995b), a adição de IL-2, citocina γ c do tipo Th1, aumenta a atividade antiviral de células T CD8⁺, apesar de IL-2 ser bastante conhecida por sua capacidade de estimular a replicação viral em células CD4⁺, mesmo quiescentes (revisado em Kinter *et al.* 2000). Por outro lado, IL-4, citocina γ c do tipo Th2, diminui o potencial de inibição de replicação viral de células T CD8⁺ (Barker *et al.* 1995). Embora ambas as citocinas IL-2 e IL-15, que compartilham IL-2R β , além do receptor γ c, estimulem a replicação de HIV-1, alguns estudos mostraram que IL-15 induz menor produção viral que IL-2 (Lucey *et al.* 1997, Bayard-McNeeley *et al.* 1996, Patki *et al.* 1996), o que pode estar associado ao fato de IL-15 raramente ter aumentado a proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV-1, apenas corrigindo a sua resposta a antígeno (Patki *et al.* 1996). Já os efeitos de IL-15 sobre a atividade supressora de células T CD8⁺ não foram ainda avaliados. Uma outra citocina γ c, IL-7, apresenta-se em níveis aumentados na infecção pelo HIV-1 (Mackall *et al.* 2001, Llano *et al.* 2001; Napolitano *et al.* 2001), assim como IL-15 (Kacani *et al.* 1997). Sabe-se que IL-7 é capaz de induzir a replicação de HIV-1 (Smithgall *et al.* 1996, Dardalhon *et al.* 2001), mas pode também estimular a atividade citotóxica de células T CD8⁺ (Hickman *et al.* 1990), inclusive específica para HIV-1 (Carini & Essex 1994; Ferrari *et al.* 1995), bem como sua atividade supressora de replicação viral (Smithgall *et al.* 1996).

Assim, neste estudo, abordamos os efeitos das citocinas γ c IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 simultaneamente sobre a produção de HIV-1 por células T CD8+ e sua atividade antiviral não-citolítica *in vitro*. Comparamos também as cinéticas de produção viral pelos dois tipos linfocitários, CD4+ e CD8+, com as cinéticas de supressão de replicação viral em co-culturas. Desse modo, pretendemos avaliar a contribuição relativa de células CD4+ e CD8+ para a produção total de HIV-1 sob influência das diferentes citocinas γ c, e se haveria alguma correlação entre a produtividade de células CD8+ e a co-expressão de CD4 e co-receptores de HIV-1 CXCR4 e CCR5, ou ainda seu menor efeito supressor em algumas condições de cultura. A produção viral foi analisada através de ensaios de atividade de transcriptase reversa, citometria de fluxo para antígenos virais ou detecção de DNA proviral por *Taqman Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Os resultados obtidos podem ser de relevância para o planejamento de terapias imunomoduladoras, especialmente em estágios mais avançados da infecção pelo HIV-1, quando a contribuição de células T CD8+ para a produção viral seria maior (Livingstone *et al.* 1996; McBreen *et al.* 2001; Imlach *et al.* 2001).

METODOLOGIA

Purificação de subpopulações celulares

Para estudo de linfócitos de adultos, voluntários saudáveis doaram amostras de sangue periférico, ou obtivemos *buffy-coats* do banco de sangue do *St. George's Hospital Medical School (University of London, UK)*. Para estudo de linfócitos de neonatos, amostras de sangue de cordão umbilical provenientes de partos sem complicações foram obtidos com a aprovação do Comitê de Ética do *St. George's Hospital Medical School (University of London, UK)*. PBMC ou CBMC foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (*Sigma, Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA*).

As depleções e purificações celulares necessárias para o estudo da produção e supressão viral sob diferentes estímulos foram realizadas utilizando-se o sistema de seleção celular com partículas super-paramagnéticas acopladas a anticorpos específicos (*MicroBeads*) adquiridos da Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Estas *MicroBeads* (50 nm de diâmetro) são biodegradáveis, e não interferem em ensaios biológicos, como previamente descrito (Manyonda e cols. 1992).

As células foram ressuspensas em PBS suplementado com 0,5% BSA (Sigma) e 2 mM EDTA (Sigma), e incubadas com *MicroBeads* (15 min/6^o-12^oC). Após lavadas e ressuspensas no mesmo tampão, foram passadas por uma coluna de separação do tipo *MS+* (para até 10⁷ células positivas) ou *LS+* (para até 10⁸ células positivas). Estas colunas foram colocadas em campo magnético de um separador *MACS (Magnetic Cell Separator, MiniMACS ou MidiMACS, respectivamente)*. As células magneticamente marcadas eram retidas na coluna, enquanto as não marcadas passavam. Estas células não marcadas constituíam as populações depletadas. Após a remoção da coluna do campo magnético, foi encaixado um êmbulo à sua parte superior e utilizamos pressão para retirar as células magneticamente retidas (fração celular positivamente selecionada). Para a obtenção de maior pureza, a fração positiva foi aplicada a uma nova coluna e repetiu-se todo o processo.

Células CD8⁺ foram positivamente selecionadas utilizando-se *CD8 MicroBeads (MB)*. A população depletada de células CD8⁺ é aqui denominada CD8dPBMC ou CD8dCBMC, e parte desta podia ser utilizada para a seleção de células CD4⁺, através de *CD4 MicroBeads (MB)*. Quando as células CD4⁺ foram selecionadas a partir de população total, obtinhamos também a

fração CD4dPBMC ou CD4dCBMC.

Para a seleção de subpopulações de células CD8⁺ (CD28⁺ e CD28⁻) utilizamos o *MACS CD8 Multisort Kit* (MB). As células foram magneticamente marcadas com *CD8 MultiSort MicroBeads*, lavadas, e aplicadas à coluna, a qual foi colocada sobre o campo magnético do separador *MACS*. As células que passavam pela coluna foram coletadas como fração CD8dPBMC. As células da fração positiva (CD8⁺) eram aplicadas a uma nova coluna, e, posteriormente, incubadas com o reagente *Multisort Release* (10 min/6^o-12^oC), o qual liberava as *Multisort Microbeads* enzimaticamente. Após serem lavadas, as células foram ainda incubadas com o reagente *MultiSort Stop*, para inibir a reação de liberação em etapas subsequentes. Estas células CD8⁺ purificadas foram separadas em subpopulações CD28⁺ e CD28⁻ incubando-se primeiramente com anticorpo monoclonal anti-CD28-FITC (Pharmlingen) e, após lavadas, com *anti-FITC Microbeads* (em gelo/30 min, cada incubação). As células foram ressuspensas no tampão PBS/BSA/EDTA, depois de haverem sido novamente lavadas, e então aplicadas à coluna, utilizando-se os mesmos princípios de seleção negativa e positiva acima descritos para o fracionamento celular. A pureza das frações celulares foi verificada através de citometria de fluxo em *FACScan* (BD), como descrito abaixo.

Anticorpos monoclonais e citometria de fluxo

Para análise da co-expressão de CD4 em células T CD8⁺ de culturas de PBMC, bem como para avaliação da pureza de frações celulares e estudo da expressão de co-receptores em células T CD4⁺ e CD8⁺, utilizamos os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD4-FITC (FITC= IsoTioCionato de Fluoresceína), anti-CD3-PE (PE= Ficoeritrina), anti-CXCR4-PE, anti-CCR5-PE, anti-CD28-FITC, anti-CD28-CyCh (CyCh = *Cy-Chrome*TM), anti-CD57-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD8-CyCh (Pharmlingen). Os controles foram anti-IgG1-FITC, anti-IgM-FITC, anti-IgG1-PE, anti-IgG2b-PE e anti-IgG1-CyCh (Pharmlingen).

Incubamos 10⁵-10⁶ células/tubo com diferentes combinações destes anticorpos (em volume de 10 µl cada anticorpo) por 30 min, em gelo e protegidas da luz. Após lavadas 3x em PBS 2% FCS, as células foram ressuspensas em 0.5 ml de 2% paraformaldeído tamponado, e adquiridas em citômetro de fluxo *FACScan* (BD). As populações viáveis foram determinadas através de sua granularidade e tamanho celular. A análise dos dados foi realizada através do programa *WinMDI* versão 2.8 (fornecido pelo site <http://facs.scripps.edu/>).

Infecção *in vitro* por HIV-1

Estoques virais do isolado X4 HIV-1_{RF} foram crescidos em células CEM (ambos obtidos do *Centralized Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council, UK*).

Culturas de PBMC, CD8dPBMC, CD4dPBMC e frações celulares CD4⁺ ou CD8⁺ foram estabelecidas na densidade celular de 1×10^6 /ml (37°C, 5% CO₂) em meio completo: RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (FCS), 2mM glutamina, 100 U/ml penicilina e estreptomicina (Sigma). Cada cultura foi estimulada com PHA (1µg/ml, Sigma) por 3 dias, na presença das citocinas γ c IL-2 (30IU/ml, *Boehringer-Mannheim, Roche Diagnostics Ltd, East Sussex, UK*), IL-4, IL-7 e IL-15 (10 ng/ml, *R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK*) antes da infecção. Em paralelo, as mesmas frações foram simplesmente mantidas na presença de citocinas γ c pelo mesmo período antes da infecção.

Cada fração celular foi plaqueada em triplicata (a 2×10^5 cells/well) em placas de 96 poços com fundo em U (*Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA*). CD8dPBMC ou células CD4⁺ foram co-cultivadas com células CD8⁺ autólogas nas razões celulares de 1:2, 1:1 or 2:1 (em triplicatas). As células foram infectadas com HIV-1_{RF} na multiplicidade de infecção de 1.0 (MOI), por 2 horas a 37°C, e então lavadas 3x em PBS. As culturas infectadas foram mantidas em meio completo suplementado com a mesma citocina γ c presente previamente durante a estimulação, por pelo menos 20 dias. O meio foi trocado duas vezes por semana. Sobrenadantes da cultura infectada foram coletados periodicamente e mantidos a -80°C antes de serem ensaiados para a produção de HIV-1_{RF}.

Para checar se a infecção de células T CD8⁺ era dependente de células CD4, nós usamos 10 µg/ml de anticorpo neutralizante anti-CD4 (monoclonal murino ADP 318/C4120, obtido da *Centralised Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council, UK*) 30 minutos antes e durante a exposição ao HIV-1_{RF}.

Ensaio Mini RT de atividade da enzima Transcriptase Reversa

A atividade da transcriptase reversa foi medida no ensaio mini RT descrito por Willey *et al.* (1988). Em resumo, 5µl de sobrenadante de cultura foi adicionado em triplicata a 25µl da

mistura contendo poli (A), oligo (dT), $MgCl_2$ e ^{32}P DTTP (deoxitimidina 5'-trifosfato ^{32}P -marcado) (*Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, UK*). Depois de 2 horas de incubação a $37^{\circ}C$, 5 μ l da reação de mistura foram pipetados em papel de filtro DE81 (*Whatman LabSales, Hillsboro, OR, USA*). Os filtros foram secados, lavados 5x em 2X citrato-salina padrão (SSC) e duas vezes mais em etanol 95%. Os filtros foram secados novamente e a atividade RT foi medida por contagem de radiação com o 1450 Microbeta Plus Wallac (*Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, UK*).

A atividade média RT das triplicatas foi expressa em cpm/ μ l, e a produção viral foi considerada positiva quando essa atividade RT esteve acima de 250 cpm/ μ l.

Detecção de antígenos do HIV-1 por citometria de fluxo

Para detectar antígenos do HIV-1 nas populações celulares CD4+ ou CD8+ de culturas infectadas, nós usamos anticorpos monoclonais KC57-RD1 (*RD1 = Phycoerythrin, Coulter International Corp., Miami, Florida, USA*), que reconhecem em *Western blot* as proteínas 55, 39, 33 e 24 kDa (mencionadas no texto como anticorpo anti-p24) do *core* viral do HIV-1, em conjunto com anti-CD4-FITC e anti-CD8-CyCh antibodies (Pharmingen). Como controles, nós usamos os anticorpos anti-IgG2b-RD1 (Coulter), anti-IgG1-FITC e anti-IgG1-CyCh (Pharmingen).

As células (10^5 - 10^6 /tubo) foram incubadas por 40 minutos com o reagente ORTHOPermeaFix (*Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA*) à temperatura ambiente (rt), de acordo com as instruções do fabricante. Depois de permeabilizadas, as células foram lavadas com 5% BSA 0.0055% EDTA PBS e o pellet celular foi ressuspensionado e incubado simultaneamente com os anticorpos que reconhecem antígenos virais ou os marcadores CD4 e CD8, ou seus controles (10 μ l each, 40 min/rt). As células então foram lavadas novamente, centrifugadas, ressuspensionadas em tampão e analisadas em citômetro de fluxo FACScan (*Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*).

Ensaio de atividade antiviral sobre a produção de HIV-1 *in vitro* de células T CD8+ ou de suas subpopulações CD8+CD28+ ou CD8+CD28-

Em ensaios de efeito supressor de células T CD8+ ou suas subpopulações CD28+ ou CD28- sobre a replicação viral utilizamos apenas HIV-1_{RF}, que por ser um variante X4 não é sensível às ações inibitórias de β-quimiocinas, permitindo o reconhecimento de atividade antiviral de células T CD8+ do tipo CAF (*Cellular Antiviral Factor* ou Fator Celular Antiviral) (revisado em Levy *et al.* 1996).

Ativamos em separado PBMC ou CBMC ou suas subpopulações celulares com PHA (1μg/ml, Sigma) e alguma das citocinas γc por 3 dias, ou mantivemos as células pelo mesmo tempo em presença de apenas alguma das citocinas γc, antes da infecção viral. Utilizamos 2 x 10⁵ células de PBMC ou CBMC, ou de suas frações depletadas de CD8 (CD8dPBMC ou CD8dCBMC), ou suas células CD4+, em cada poço (em triplicata) de placa de 96 poços com fundo em U (Falcon, BD) e, as células CD8+ (de PBMC ou CBMC) ou as suas subpopulações CD8+CD28+ ou CD8+CD28- foram adicionadas a CD8dPBMC, ou CD8dCBMC, ou células CD4+ (de PBMC ou CBMC), em proporções de 1:2, 1:1 ou 2:1.

A produção viral foi quantificada pela atividade RT, e foi expressa em cpm/5μl (volume do sobrenadante de cultura usado no “mini” ensaio RT). O cálculo do percentual de inibição da replicação viral por células CD8+ ou suas subpopulações CD8+CD28+ ou CD8+CD28- foi realizado utilizando-se os valores RT encontrados no dia da cinética em que ocorreu o pico de produção viral pela cultura de CD8dPBMC, ou CD8dCBMC, ou células CD4+ (de PBMC ou CBMC), através das fórmulas:

$$\% \text{ supressão} = 100 - \frac{(\text{valor RT de co-cultura CD8+ / CD4+} \times 100)}{(\text{valor RT de cultura CD4+})}$$

ou

$$\% \text{ supressão} = 100 - \frac{(\text{valor RT de co-cultura CD8+ / CD8d} \times 100)}{(\text{valor RT de cultura CD8d})}$$

onde CD8+ corresponde a células CD8+ totais ou suas subpopulações CD8+CD28+ ou CD8+CD28- (de PBMC ou CBMC) em co-cultura com células CD4+ (de PBMC ou CBMC), ou com CD8dPBMC ou CD8dCBMC (representados na fórmula como CD8d).

Ensaio *Taqman Real-Time PCR* para quantificação de DNA HIV-1 proviral

Escolhemos este método para quantificação de DNA de HIV-1 por ser de alta sensibilidade e reprodutibilidade (Désiré *et al.*, 2001). Aplicamos à detecção de provírus, em alguns pontos da cinética de infecção por HIV-1, em linfócitos CD4+ e CD8+ (1×10^6 /ml) cultivados isoladamente ou em co-cultura separadas por membrana com poros de $1 \mu\text{m}$ (co-cultura em *transwell*, com *Falcon*TM *Cell Culture Inserts* e *Falcon*TM *Companion Tissue Culture Plates*, BD). Como controle, utilizamos a linhagem celular OM-10.1 (obtida da *Centralised Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council*, Grã-Bretanha), que contém uma cópia proviral por célula.

DNA das células em cultura foi extraído através de digestão, *overnight* a 55°C e 5 min a 95°C , com proteinase K ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$), Nonidet P-40 (0.1% vol/vol) (Sigma), e tampão PCR II (PE). O DNA viral foi purificado utilizando-se colunas de centrifugação QIAamp (Qiagen). PCR quantitativo proviral para DNA LTR (LTR = *Long Terminal Region* ou Região Longa Terminal) de HIV-1 foi realizado através de *real-time PCR* em sistema de detecção de sequência ABI Prism 7700 (PE) como previamente descrito (Greenhead *et al.*, 2000). Os seguintes reagentes foram utilizados para este ensaio: LTR *forward primer*, 5'-CAC ACA AGG CTA CTT CCC TGA-3' (59 a 79); LTR *reverse primer*, 5'-TCT CTG GCT CAA CTG GTA CTA GCT T-3' (141 a 165); sonda 5'-(6-carboxi-fluoresceína [FAM]) AGA ACT ACA CAC CAG GGC CAG GGA TCA G (6-carboxi-tetrametil-rodamina [TAMRA])-3' (85 a 112) (baseado na sequência referência para HIV-1, isolado HXB2; GenBank número de acesso K03455); β -actina *forward primer*, 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT AGC A-3' (486 a 510); *reverse primer*, 5'-AGT CAG TCA GGT CCC GGC C-3' (567 a 585); sonda 5'-(VIC *proprietary dye*) ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT (Q) (TAMRA)-3' (GenBank, número de acesso AB004047). *Primers* e sonda marcada com FAM foram obtidos de MWG e sonda de β -actina marcada com VIC foi obtida de PE. β -actina foi utilizada como um controle interno, permitindo a normalização do número de cópias relativas de HIV ao número de equivalentes genoma da amostra.

Análise estatística

Diferentes condições de cultura foram comparadas através do teste t de Student, utilizando o software *GraphPadPrism version 4*.

RESULTADOS

A co-expressão de CD4 em células T CD8+ é essencial para a infecção por HIV-1, entretanto a produção de vírus depende do estímulo e das citocinas do ambiente.

Está bem estabelecido que a IL-2 ativa reservatórios de HIV-1 (Chun *et al.*, 1999a; Stellbrink *et al.*, 2002; Siliciano *et al.*, 2003; revisão de Pau & Tavel, 2002). Mais recentemente, demonstrou-se que a IL-7 estimula a produção de vírus por células T CD4+ latentemente infectadas (Scripture-Adams *et al.*, 2002). Uma vez que linfócitos T CD8+ atuam como reservatórios virais e contribuem para a compartimentalização do HIV-1 (MacBreen *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2003), a possibilidade de usar citocinas γ c como imunoterapias anti-HIV-1 levanta a questão de se existe um efeito diferencial dessas citocinas na produção de HIV-1 por células T CD8+ infectadas.

Um trabalho anterior mostrou que PBMC depletado de células CD4 (CD4dPBMC) estimulado por PHA e cultivado na presença de IL-2 passa a expressar CD4 e essas células CD8+CD4+ se tornam susceptíveis à infecção por X4 HIV-1 (Flamand *et al.*, 1998). Nesse estudo, nós comparamos a capacidade produtora de HIV-1 de células CD8+ positivamente selecionadas derivadas do PBMC e ativadas por PHA na presença das citocinas γ c IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15, ou simplesmente mantidas na presença dessas citocinas sem estímulo antigênico. Nós encontramos que células T CD8+ estimuladas com PHA+IL-2 ou PHA+IL-15 conseguiram produzir X4 HIV-1_{RF} em níveis mais elevados ($p < 0.05$ e $p < 0.001$, respectivamente) do que aqueles observados em culturas de CD8+ ativadas por PHA+IL-4 ou PHA+IL-7 (figura 3.1). Não houve diferença estatística significativa entre a produção viral por células CD8+ ativadas por mitógeno na presença de IL-2 ou IL-15. Mais ainda, quando todas as culturas de células CD8+ ativadas por PHA+IL-2 (7/7) ou PHA+IL-15 (6/6) foram positivas para a produção de HIV-1_{RF}, apenas 3 de 5 culturas de CD8+ ativadas por PHA+IL-4, e 3 de 4 ativadas por PHA+IL-7, foram positivas.

Surpreendentemente, células CD8+ não estimuladas por mitógenos apresentaram produção detectável de HIV-1_{RF} na presença de IL-15 (produção de vírus acima do basal em 3 de 4 experimentos), mas não quaisquer outras citocinas γ c testadas (figura 3.1). Embora IL-15

compartilhe algumas propriedades com IL-2 (Grabstein *et al* 1994, Giri *et al* 1995, Fehniger & Caligiuri 2001), os níveis de produção de HIV-1 nas culturas de células CD8+ mantidas na presença de IL-15 foram significativamente diferentes daquelas encontradas na presença de IL-2 ($p < 0.05$).

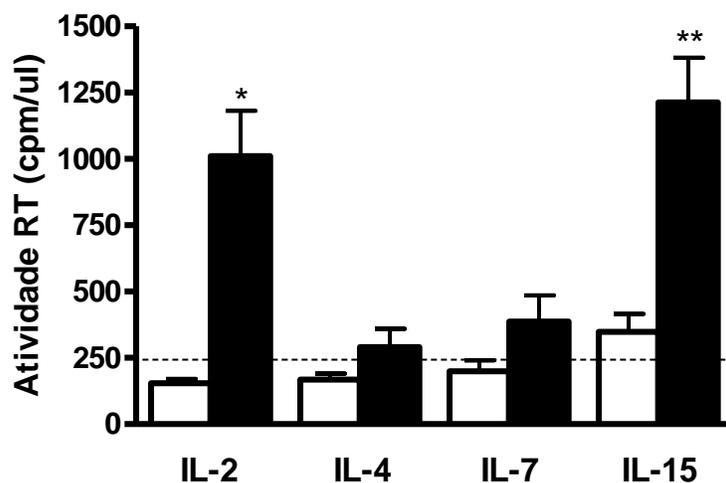


Figura 3.1. As citocinas γ IL-2 e IL-15 são melhores promotoras da produção da variante X4 de HIV-1 por células CD8+ ativadas do que IL-4 ou IL-7. Produção de X4 HIV-1_{RF} por células CD8+ purificadas mantidas na presença de diferentes citocinas γ , com estímulo prévio por PHA (preto) ou não (branco) antes da exposição ao vírus. Células CD8+ positivamente selecionadas foram ativadas por PHA por 3 dias na presença das citocinas γ IL-2 (30 IU/ml), IL-4 (10 ng/ml), IL-7 (10 ng/ml) ou IL-15 (10 ng/ml), lavadas e mantidas por mais 24-48h na presença daquela citocina γ , e então plaqueadas em triplicatas e expostas a HIV-1_{RF}. Essas culturas infectadas foram mantidas em meio suplementado com a mesma citocina γ previamente presente durante a estimulação, por toda a cinética de produção de HIV-1_{RF}. Como controles, células CD8+ purificadas foram mantidas na presença de citocinas γ pelo mesmo período antes da exposição ao HIV-1_{RF}, bem como depois. As células CD8+ foram consideradas produtivamente infectadas se o valor de RT estava acima do limite superior de *background* de 250 cpm/ μ l (para células CD8+ ativadas por PHA, a produção de HIV-1 acima do *background* foi encontrada em 7/7 experimentos na presença de IL-2, 3/5 experimentos na presença de IL-4 e 3/4 experimentos na presença de IL-7). As barras representam a média + SEM para os valores mais altos da atividade da transcriptase reversa (RT) detectada em cada condição das culturas de CD8+ independente do dia da cinética (cada condição em triplicata em cada experimento). O pico de produção do vírus pelas culturas CD8+ foi geralmente observado depois de 15 dias de exposição ao HIV-1_{RF}. As médias são referentes a pelo menos 3 diferentes doadores para experimentos em cada uma das condições.

De acordo com estudos anteriores (Flamand *et al.*, 1998, revisão de Meireles-de-Souza & Shattock, em anexo da tese), nós observamos que a infecção por HIV-1 de células CD8⁺ foi dependente da molécula CD4, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes monoclonais anti-CD4 bloqueou completamente a produção de HIV-1 ($p < 0.05$, figura 3.2).

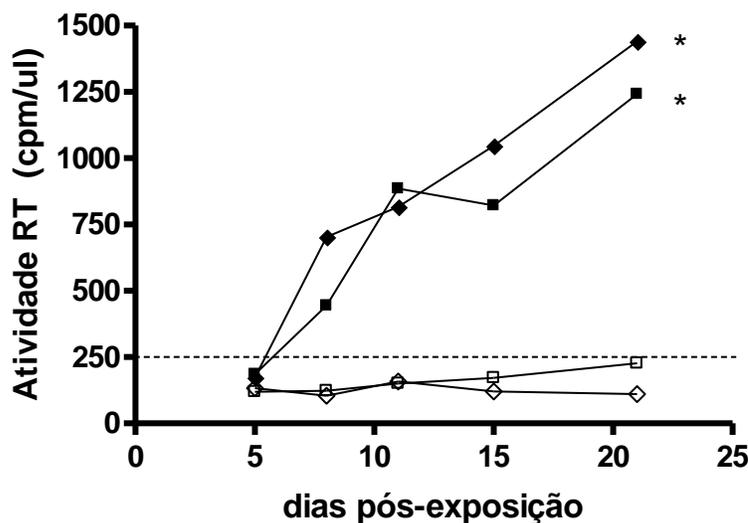
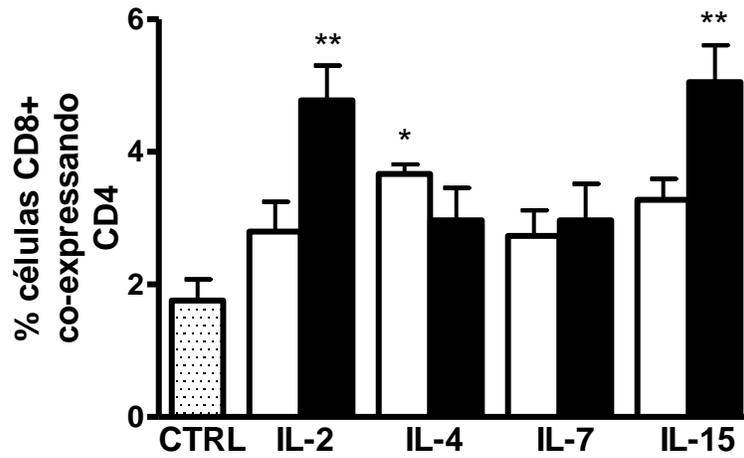


Figura 3.2. A co-expressão de CD4 é essencial para a infecção por HIV-1_{RF} das células CD8⁺. O uso de 10 µg/ml de anticorpo anti-CD4 neutralizante (símbolos abertos), 30 minutos antes e durante a exposição ao HIV-1_{RF}, bloqueou completamente a infecção produtiva de culturas de células CD8⁺ ativadas por PHA e mantidas na presença de IL-2 (quadrados pretos, $p=0,0279$) ou IL-15 (losangos pretos, $p=0,0282$). Os dados são representativos de 2 experimentos (realizados em triplicatas).

Neste sentido, em concordância com os níveis de produção de vírus observados em culturas, a co-expressão de CD4 em células CD8⁺ ativadas por PHA foi estatisticamente mais significativa em culturas estimuladas na presença de IL-2 e IL-15 ($p < 0.01$) do que na presença de IL-4 e IL-7 ($p < 0.05$) comparada aos controles (células CD8⁺ purificadas a fresco) (figura 3.3). Por outro lado, células CD8⁺ não estimuladas por mitógenos apresentaram aumento da expressão de CD4 comparadas aos controles após 3 dias de exposição a IL-4 and IL-15 ($p < 0.01$), mas não a IL-2 ou IL-7 (figura 3.3). Entretanto, a expansão de células CD8⁺CD4⁺ promovida pela citocina γ c IL-4 não resultou em infecção viral produtiva, o que foi observado em algumas culturas de células CD8⁺ na presença de IL-15 (figura 3.1). Esses dados sugerem que a infecção produtiva de células CD8⁺ é dependente não apenas da expressão de CD4, mas também do estímulo e das citocinas presentes no ambiente.

(A)



(B)

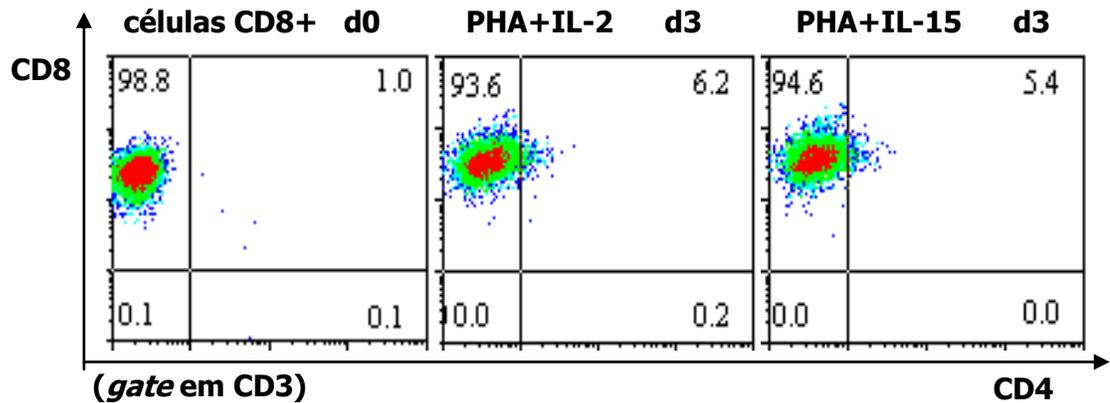


Figura 3.3. (A) Níveis de co-expressão de CD4 foram analisados por citometria de fluxo em células CD8+ purificadas a fresco de PBMC (controle) e mantidas por 3 dias na presença de diferentes citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA (preto) ou não estimuladas (branco). As barras representam a média \pm SEM das porcentagens de CD4+CD8+ em diferentes preparações de células CD8+. Médias são representativas de pelo menos 3 doadores / condição. (B) Células CD8+ co-expressando CD4 podem ser visualizadas no quadrante superior direito. Estas células CD8+ foram purificadas a fresco de PBMC (d0) e mantidas por 3 dias na presença das citocinas γ c IL-2 ou IL-15 em culturas ativadas por PHA.

Níveis de expressão de CXCR4 não parecem ser responsáveis pela produção diferencial da variante X4 de HIV-1 por células CD8+ T na presença de IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15.

Citocinas influenciam a atividade de HIV-1 através da modulação de seus co-receptores (revisões de Kinter *et al.* 2000, Alfano & Poli, 2001). Nós então investigamos a expressão de CXCR4 em células CD8+ mantidas na presença de citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15 e ativadas ou não por PHA como uma possível explicação para a produção diferencial de X4 HIV-1 por células CD8+ T cells em diferentes condições de cultura.

Um forte aumento da expressão de CXCR4 induzido por IL-4 foi previamente descrito em PBMC e nas células T CD4+ (Jourdan *et al.*, 1998; Valentin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998, Unutmaz *et al.* 1999). De modo concordante, nós observamos o nível mais alto de expressão de CXCR4 no dia 3 das culturas de células CD8+ não estimuladas por mitógenos na presença da citocina γ IL-4 (figura 3.4). Demonstrou-se que a IL-7 aumenta a expressão de CXCR4 e dá suporte a produção de X4 HIV-1 (Moran *et al.* 1993, Smithgall *et al.* 1996, Llano *et al.*, 2001, Schmitt *et al.*, 2003). De fato, IL-4 e IL-7 permitem níveis mais altos de expressão de CXCR4 em culturas de células CD8+ não estimuladas por mitógenos do que IL-2 ou IL-15 (figura 3.4). O mesmo padrão de expressão de CXCR4 na presença de citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 foram anteriormente observados para a subpopulação de memória CD4+ CXCR4- CCR7+ (Jourdan *et al.*, 2000).

Embora células CD8+ ativadas por PHA tenham apresentado maior produção de vírus na presença de IL-2 e IL-15 do que IL-4 ou IL-7, nós observamos o nível mais alto de expressão de CXCR4 por células CD8+ no dia 3 após a estimulação mitogênica, quando as células foram infectadas, novamente na presença de IL-4 (figura 3.4). Entretanto, níveis aumentados de expressão de CXCR4 em células CD8+ estimuladas com PHA foram encontrados na presença de citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15 após uma semana em cultura (figura 3.4).

Ao contrário da expressão de CXCR4, as células CD8+ não estimuladas por mitógeno apresentaram expressão reduzida de CCR5 após 3 dias na presença de IL-4, enquanto IL-15 induziu um notável aumento na expressão de CCR5 (figura 3.4), de uma forma similar àquela previamente reportada em células CD4+ (Valentin *et al.* 1998). De fato, foi descrito que a IL-4 estimula a replicação de variantes de HIV-1 X4 e inibe a de R5 em células CD4+ (Valentin *et al.* 1998). Entretanto, muito embora IL-4 induza a expressão de CD4 (figura 3.3A) e CXCR4 (figura

3.4) em células CD8⁺ não estimuladas por mitógeno, nenhuma infecção produtiva de células CD8 por HIV-1_{RF} foi detectada nessas condições de cultura. Esses dados sugerem que fatores adicionais podem ser necessários para que células CD8⁺ sejam produtivamente infectadas, além da expressão de CD4 e do co-receptor CXCR4.

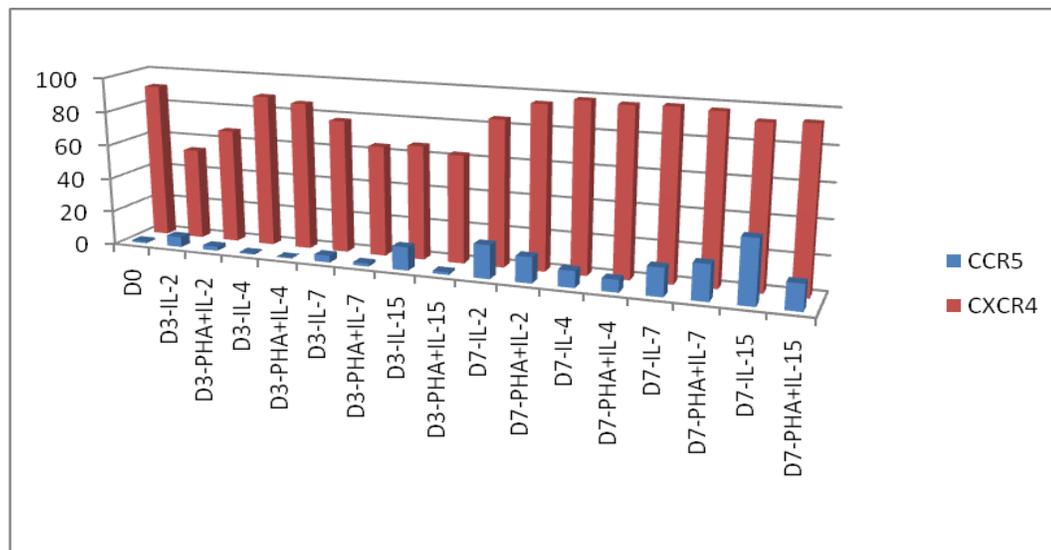


Figura 3.4. Expressão dos co-receptores CXCR4 e CCR5 em células CD8⁺ purificadas obtidas a fresco de PBMC (dia 0 = D0) ou depois de 3 (D3) ou 7 dias (D7) na presença de diferentes citocinas γ c, em culturas estimuladas ou não com PHA. Os dados são representativos de 2 experimentos.

PBMC depletado de células CD4⁺ apresenta um perfil semelhante de produção de HIV-1 ao de células T CD8⁺ purificadas, enquanto células T CD4⁺ respondem igualmente a diferentes citocinas γ c.

PBMC depletado de células CD4 (CD4dPBMC) apresentou a mesma tendência seletiva de produção de HIV-1 na presença de diferentes citocinas γ c que a observada para células T CD8⁺ (compare figura 3.1 e figura 3.5), embora em níveis mais altos de atividade RT (exceto para células mantidas na presença de IL-15 sem estímulo por PHA). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na produção de HIV-1_{RF} entre as condições de cultura de CD4dPBMC.

Por outro lado, a população CD4⁺ apresentou infecção produtiva pela variante X4 HIV-1_{RF} em todas as condições de cultura, bem como PBMC e as populações depletadas de CD8 (CD8dPBMC) (figura 3.5). Nós também não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa na produção de vírus por células T CD4⁺, CD8dPBMC ou PBMC entre as culturas

na presença de diferentes citocinas γ , com ou sem ativação prévia por PHA.

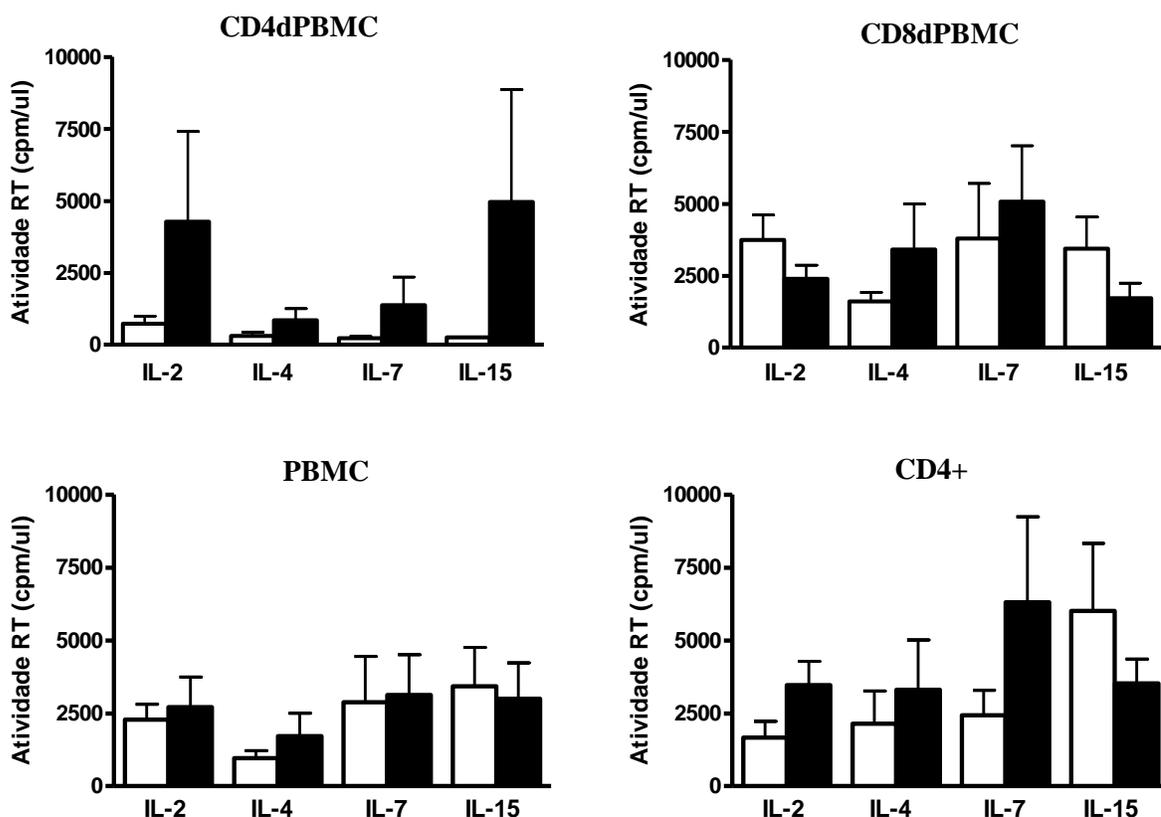


Figura 3.5. Produção de HIV-1_{RF} por CD4dPBMC, CD8dPBMC, PBMC ou células CD4+ na presença de diferentes citocinas γ (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA (preto) ou não estimuladas (branco). As barras representam a média+ SEM dos maiores valores da atividade da transcriptase reversa em cada condição de cultura. As médias são relativas a pelo menos 3 experimentos para cada condição (cada experimento em triplicata).

Células CD8+ de neonato também são passíveis de infecção produtiva por variante X4 de HIV-1 por mecanismo CD4-dependente.

A subpopulação CD8+ purificada de sangue de cordão umbilical não apresentou infecção produtiva pelo variante X4 HIV_{RF} se mantida em presença das citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15 sem estímulo prévio por mitógeno. Por outro lado, estas células CD8+ *naive* estimuladas com PHA, e mantidas em cultura com IL-2 ou IL-15, apresentaram alguma atividade RT detectável (figura 3.6). Como esperado, o uso de anticorpos neutralizantes anti-CD4 no momento de infecção bloqueou a produção viral, indicando mecanismo de entrada CD4-dependente (dados não mostrados).

Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa na produção de vírus por CBMC, CD8dCBMC ou CD4dCBMC na presença de diferentes citocinas γ c, com ou sem ativação prévia por PHA (figura 3.6), aparentemente células de neonatos foram mais sensíveis à ação de IL-4 e IL-7 que células de adultos, talvez porque estas citocinas estimulam melhor a proliferação de células *naive* que IL-2 ou IL-15 (Soares *et al.*, 1998).

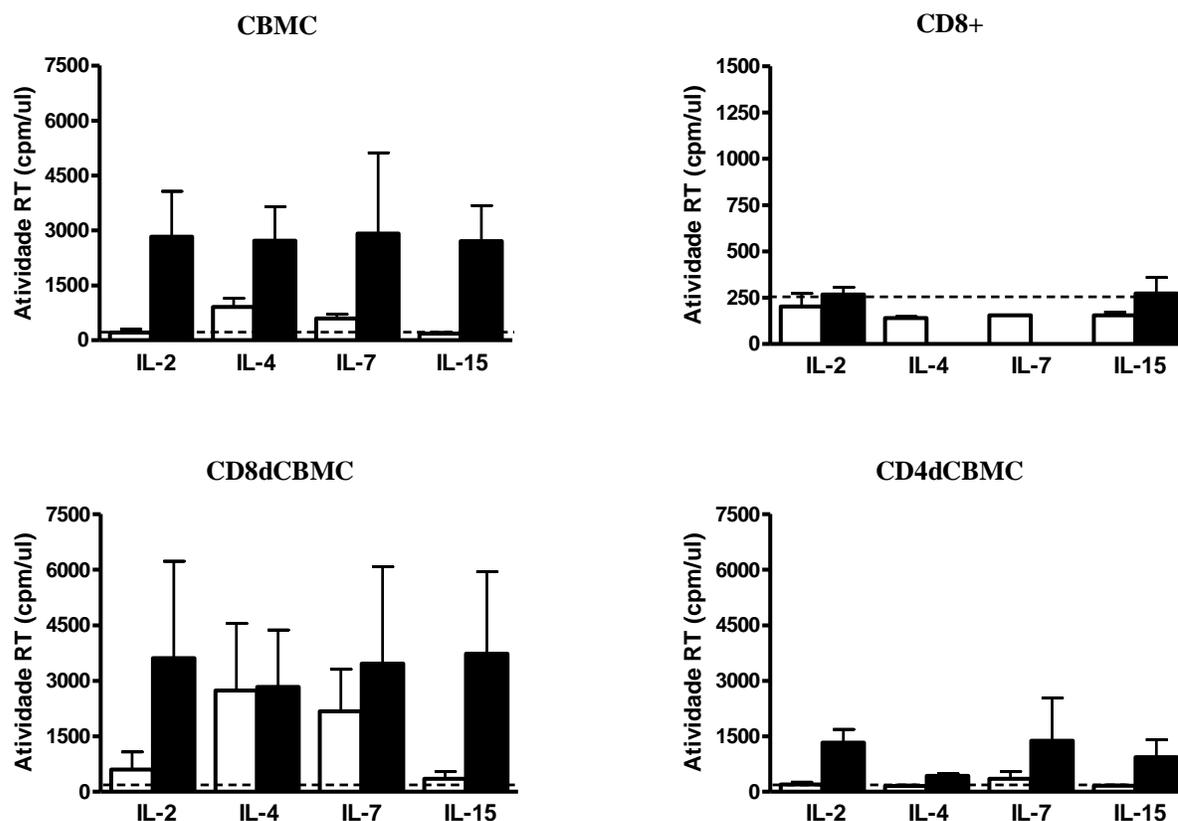


Figura 3.6. Produção de HIV-1_{RF} por CBMC, CD8dCBMC, CD4dCBMC ou células CD8+ na presença de diferentes citocinas γ c (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) em culturas ativadas por PHA (preto) ou não estimuladas (branco). As barras representam a média+ SEM dos maiores valores da atividade da transcriptase reversa em cada condição de cultura. As médias são relativas a pelo menos 2 experimentos para cada condição de cultura (sempre em triplicatas), exceto condições PHA+IL-4 e PHA+IL-7 não testadas em culturas de células CD8+ purificadas de sangue umbilical.

Células CD8+ ativadas apresentam atividade antiviral na presença de IL-2 e IL-15, mas não de IL-4 ou IL-7.

IL-2 e IL-15 promoveram a supressão da produção de vírus em co-culturas de CD4+ e CD8+ estimuladas por mitógenos comparadas a culturas de células CD4+ sozinhas estimuladas por PHA (em torno de 90% de inibição da produção viral, figura 3.7A). Na presença de IL-4 ou

IL-7, células CD8⁺ estimuladas com PHA apresentaram alguma atividade antiviral (em torno de 50% de inibição da produção viral, figura 3.7A).

Embora células CD8⁺ ativadas com PHA tenham apresentado inibição da produção viral em co-culturas de CD8⁺/CD8dPBMC, nenhuma condição de cultura apresentou 90% de supressão da produção de HIV-1_{RF} (figura 3.7B). Novamente, a IL-2 e a IL-4 deram suporte à produção viral aumentada em co-culturas CD8⁺/CD8dPBMC comparadas a culturas CD8dPBMC (figura 3.7B). Por outro lado, IL-7 e IL-15 levaram à diminuição da produção de vírus em co-culturas de CD8⁺/CD8dPBMC comparadas às culturas CD8dPBMC. (figura 3.6B). Enquanto as células CD8⁺ ativadas por PHA na presença de IL-15 promoveram uma supressão de 90% da produção viral em co-culturas com células T CD4⁺ (figura 3.7A), o mesmo não foi verdadeiro para co-culturas com CD8dPBMC (figura 3.7B).

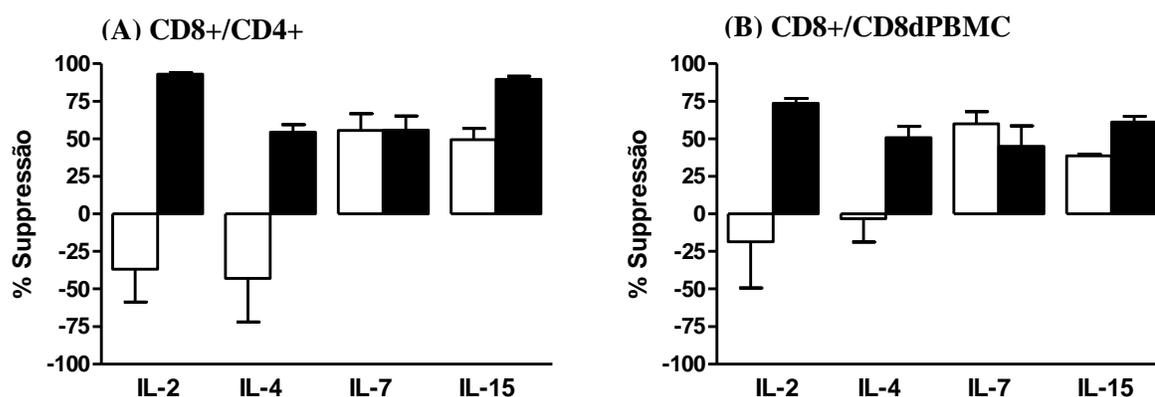


Figura 3.7. (A) Supressão da produção de HIV-1_{RF} em co-culturas de células CD8⁺ e CD4⁺ purificadas (a uma razão de 1:1). As barras representam a média±SEM da percentagem de supressão da produção de HIV-1_{RF} medida em co-culturas em relação às culturas de CD4⁺ no mesmo momento do pico da produção viral. As médias são representativas de pelo menos 3 experimentos para cada condição (em triplicata). Nós observamos que as percentagens de supressão foram inferiores em menores razões CD8⁺/CD4⁺ nas culturas e superiores em maiores razões, indicando um mecanismo dose-dependente (dados não mostrados). **(B) Supressão da produção de HIV-1_{RF} em co-culturas de células CD8⁺ purificadas com fração CD8dPBMC** (a uma razão de 1:1). As barras representam média±SEM da percentagem de supressão da produção de HIV-1_{RF} medida em co-culturas com relação a culturas de CD8dPBMC no momento de pico da produção viral. As médias são representativas de pelo menos 3 experimentos para cada condição (em triplicatas). Nós observamos que as percentagens de supressão foram inferiores em razões menores de CD8⁺/CD8dPBMC em co-culturas e superiores em razões maiores de CD8⁺/CD8dPBMC em co-culturas, indicando um mecanismo dependente de dose (dados não mostrados).

As citocinas γ c IL-2 e IL-15 promovem o papel dual de células T CD8+ como alvos e supressores da replicação do HIV.

Considerando o papel dual das células CD8+ como alvos do HIV-1 e supressores da replicação do HIV-1, o balanço entre ambas as atividades de linfócitos CD8+ pode contribuir para a produção viral líquida. Paradoxalmente, nós observamos que as mesmas citocinas IL-2 e IL-15 que induziram níveis mais altos de infecção produtiva de células CD8+ ativadas por PHA, foram as que promoveram a maior supressão da produção de vírus em co-culturas de CD4+ e CD8+ estimuladas por mitógeno (figuras 3.1 e 3.7A).

Esses dados aparentemente contraditórios podem ser explicados pela cinética da produção viral por células T CD8+ estimuladas com PHA comparadas às células CD4 (figura 3.8).

De fato, uma vez que a inibição da produção viral em co-culturas CD8+/CD4+ é medida no momento do pico da atividade RT de culturas de células CD4+, a atividade supressora de células CD8+ prevaleceu sobre a produtividade em momentos mais iniciais de tais culturas estimuladas com PHA+IL-2 ou PHA+IL-15 (figura 3.8A). Curiosamente, co-culturas CD4+/CD8+ apresentaram níveis mais baixos de produção de HIV-1_{RF} do que culturas de CD4+ ou CD8+ no mesmo ponto da cinética, sugerindo que os linfócitos T CD4+ também exercem supressão da replicação viral em células CD8+.

Durante a supressão da replicação viral em co-culturas de CD8/CD4 previamente ativadas por PHA, a maior parte das células produtoras de HIV-1 na presença de IL-2 e IL-15 são CD8+CD4- (figura 3.8A), enquanto a IL-7 parece manter as células CD4+ e CD4-CD8- como principais células produtoras de HIV-1 (figura 3.8B). Neste sentido, as co-culturas CD8+/CD4+ estimuladas com PHA+IL-7 preservaram uma proporção mais elevada de células CD4+ (dados não mostrados)

Portanto, o resultado dos ensaios de supressão viral parece depender do balanço entre a produção do vírus e a atividade antiviral não-citolítica de células T CD8+, bem como da cinética diferente de produção do vírus por células CD4+, CD8^dPBMC e CD8+.

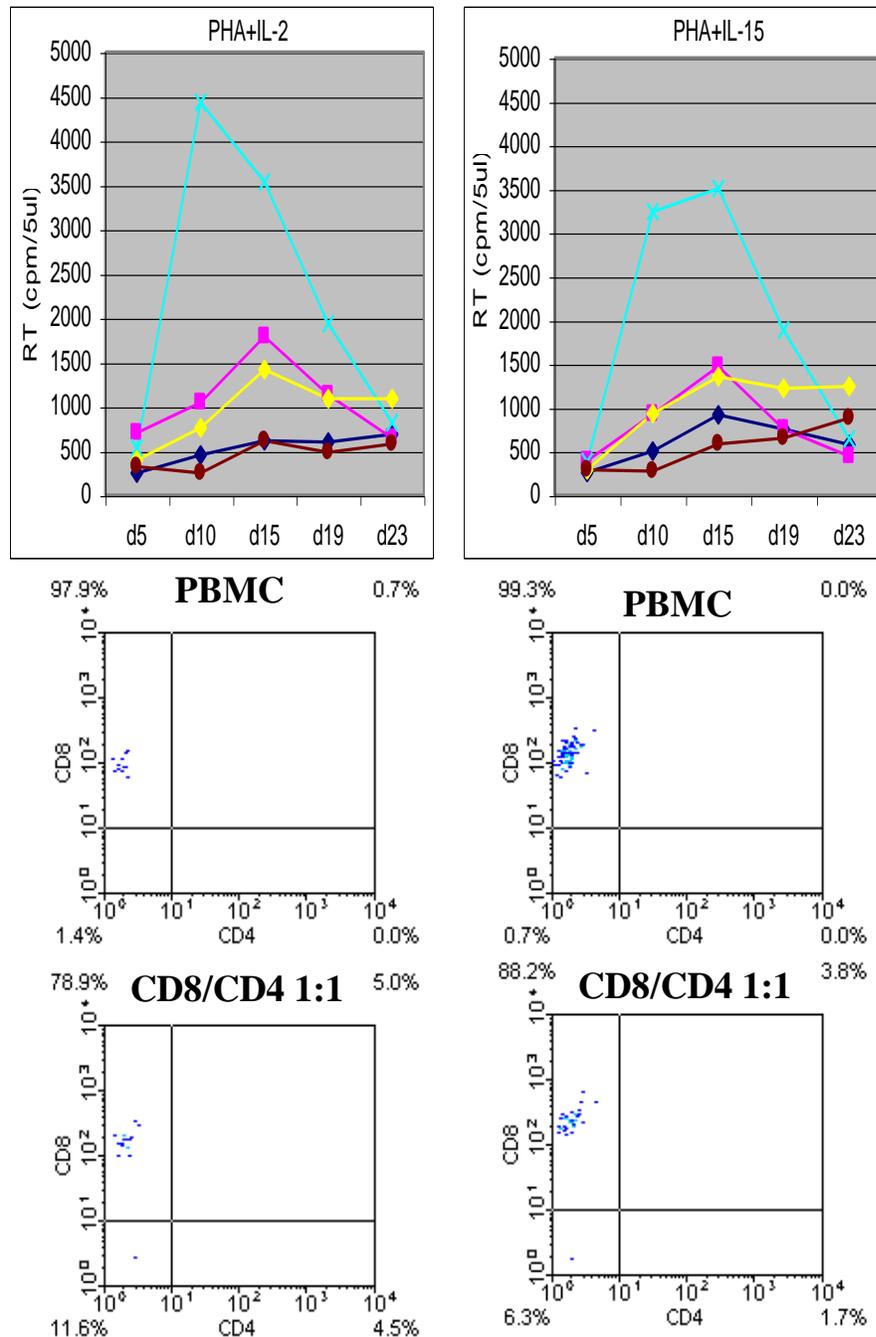


Figura 3.8(A) Cinética da produção de HIV-1_{RF} em culturas ativadas por PHA+IL-2 ou PHA+IL-15 (os dados são representativos de 3 experimentos, realizados em triplicatas). As cinéticas de atividade transcriptase reversa (RT) de cada população estão representadas (em azul escuro: PBMC, rosa: CD8dPBMC, azul claro: CD4+, amarelo: CD8+ e magenta: co/cultura CD8+/CD4+ a razão de 1:1). Abaixo dos gráficos de cinética, está representada a expressão de CD4 e CD8 em células produtoras de vírus (*gating* em células KC57+ ou p24+) no dia 16 da mesma cinética.

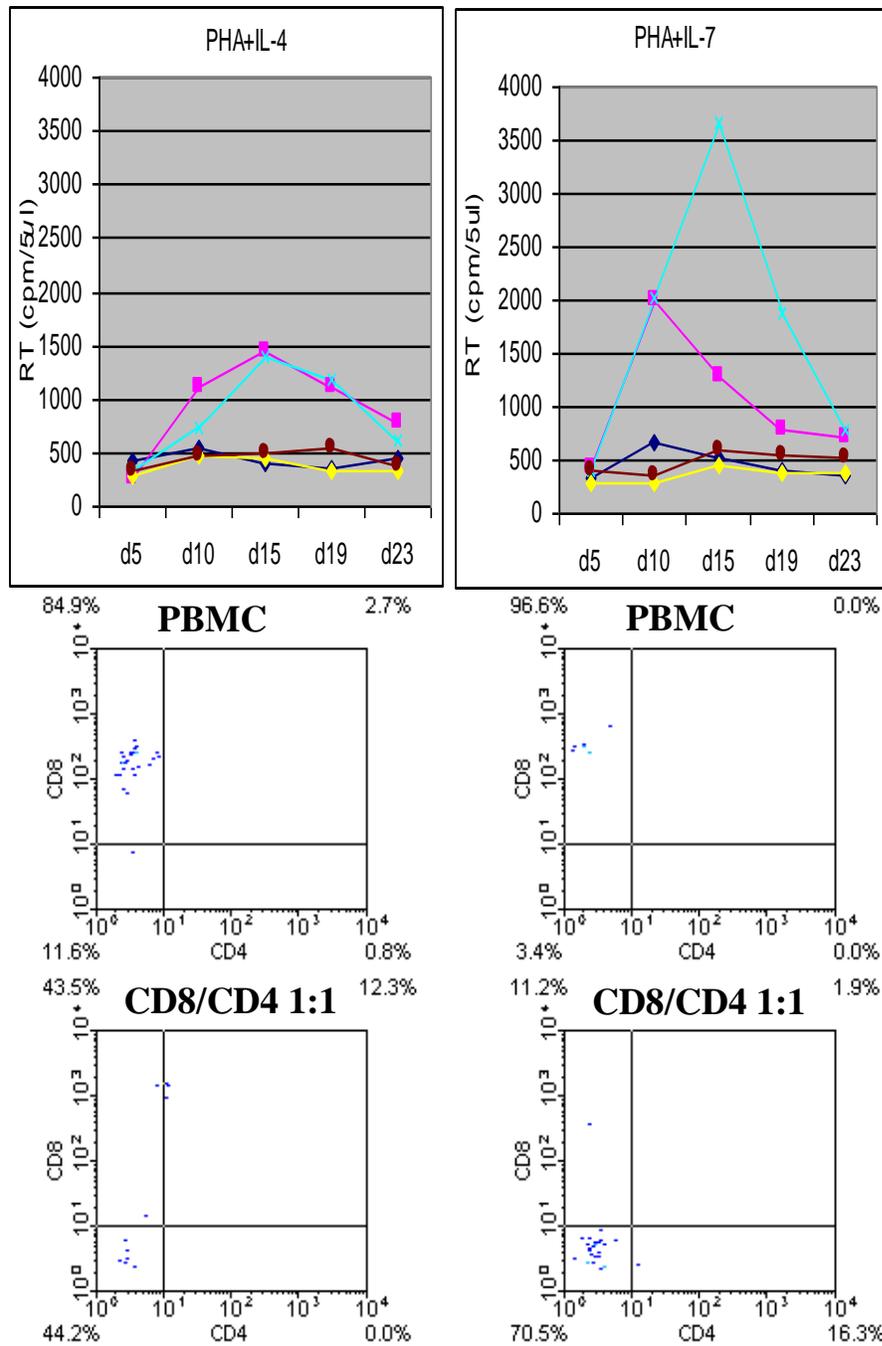


Figura 3.8(B) Cinética da produção de HIV-1_{RF} em culturas ativadas por PHA+IL-4 ou PHA+IL-7 (os dados são representativos de 3 experimentos, realizados em triplicatas). As cinéticas de atividade transcriptase reversa (RT) de cada população estão representadas (em azul escuro: PBMC, rosa: CD8dPBMC, azul claro: CD4+, amarelo: CD8+ e magenta: co/cultura CD8+/CD4+ a razão de 1:1). Abaixo dos gráficos de cinética, está representada a expressão de CD4 e CD8 em células produtoras de vírus (*gating* em células KC57+ ou p24+) no dia 16 da mesma cinética.

Carga proviral de células CD4⁺ excede a de células CD8⁺ durante a cinética de infecção por variante X4 HIV-1_{RF}

A carga proviral acumulada ao longo da cinética de infecção por variante X4 HIV-1_{RF} foi maior em células CD4⁺ que CD8⁺, mesmo em culturas estimuladas com PHA e mantidas em presença de IL-2 ou IL-15, nas quais observamos maior produção viral por células CD8⁺ ao final da cultura (figura 3.7A). Estes dados indicam que, apesar de células T CD8⁺ poderem se tornar reservatórios de HIV-1, as células CD4⁺ permanecem como principal fonte do vírus.

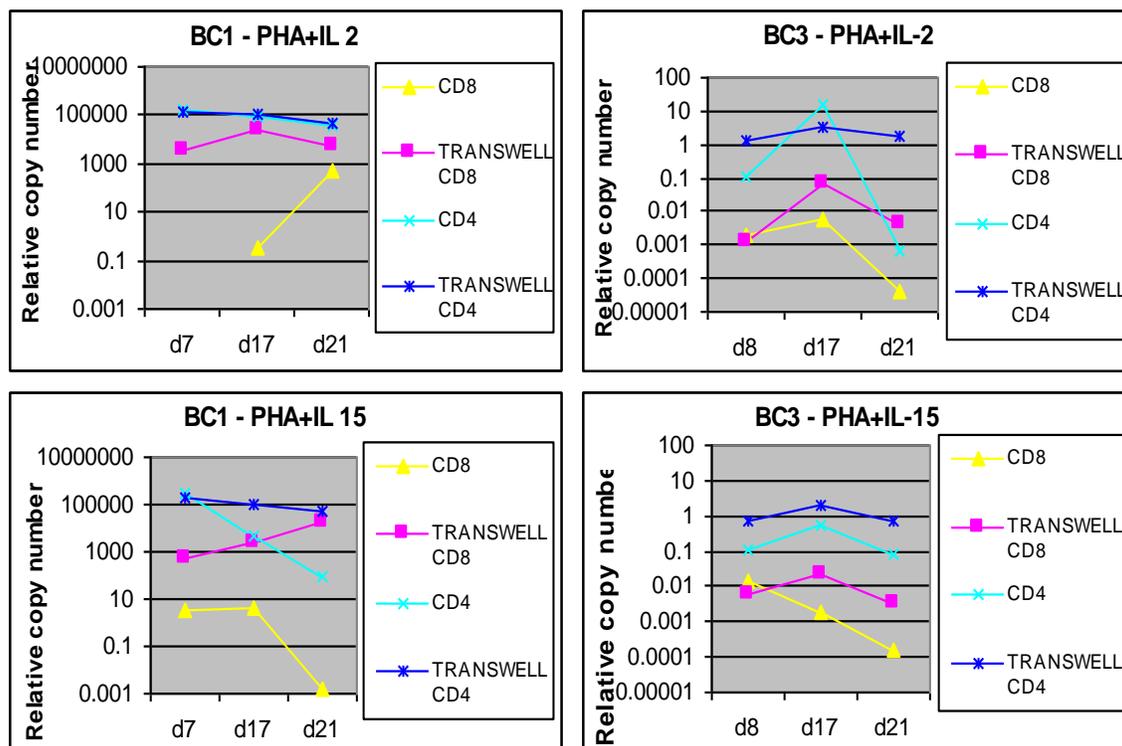


Figura 3.9. Carga proviral de HIV-1_{RF} em culturas de células CD4⁺, CD8⁺ ou em co-culturas foi quantificada por Taqman real-time PCR, como descrito na metodologia. Células CD4⁺ e CD8⁺ foram purificadas a partir de *buffy-coats* em três experimentos similares, realizados em triplicatas (BC1 e BC3 são dois diferentes *buffy-coats*).

DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores demonstraram que as células CD8⁺ podem ser produtivamente infectadas *in vitro* (De Rossi *et al.*, 1986; Tsubota *et al.*, 1989b, Lusso *et al.*, 1990, 1991, De Maria *et al.*, 1991, 1994, Mercure *et al.*, 1993, Flamand *et al.*, 1998, Kitchen *et al.*, 1997, 1998, Yang *et al.*, 1998, Stanley *et al.*, 1993, Su *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1997). Nesse estudo, nós analisamos a influência de certas citocinas γ c alteradas durante a infecção por HIV-1, como IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-15, nos níveis de produção de HIV-1 por células T CD8⁺. Nós também avaliamos a atividade antiviral de células CD8⁺ sob as mesmas condições de cultura.

Nossos resultados mostraram que o *status* de ativação das células CD8⁺ determina o papel dual destas células como alvo do HIV-1 e efector anti-HIV. Nesse sentido, células CD8⁺ ativadas apresentam níveis muito mais elevados de co-expressão de CD4, que conjuntamente com CXCR4 e CCR5, promovem a infecção por HIV-1. De fato, o uso de anticorpos monoclonais neutralizantes bloqueou a infecção produtiva de células CD8⁺ de outra forma observada quando as células foram ativadas com PHA e mantidas na presença de IL-2 ou IL-15. Esse experimento confirma relatos prévios de que a infecção por HIV-1 de células CD8⁺ é dependente de CD4 (Flamand *et al.*, 1998), embora isolados de HIV-1 que usam CD8 ao invés de CD4 como receptor primário tenham sido detectados em um paciente infectado (Saha *et al.*, 2001a).

Entretanto, a expressão de CD4 e CXCR4 não parecem ser suficientes para determinar a infecção produtiva de células CD8⁺ pelo X4 HIV-1_{RF}. Nós encontramos altos níveis de expressão desses co-receptores, essenciais para a entrada do vírus, em células CD8⁺ ativadas na presença de IL-4, entretanto, nós não detectamos infecção produtiva dessas células. Por outro lado, quando estas mesmas células foram co-cultivadas com células dendríticas alogênicas, depois de 20 dias de uma primeira tentativa de infectá-las, passamos a detectar produção de HIV-1 (dados não mostrados), sugerindo que o *status* de ativação das células CD8⁺ é crucial para determinar a produção do vírus.

De fato, o *status* de ativação é tido como uma condição *sine qua non* para a replicação do vírus HIV-1 (Zack *et al.*, 1990; Bukrinsky *et al.*, 1991), de tal forma que as co-infecções levam ao aumento da carga viral em pacientes (revisito por Lawn *et al.*, 2001). As citocinas produzidas

durante as respostas imunes contra antígenos de HIV-1 e outros podem contribuir para aumentar o *status* de ativação de células produtoras de vírus, incluindo os linfócitos CD8+. Nesse sentido, nós encontramos que a IL-2 e a IL-15 dão suporte à produção de HIV-1_{RF} por células CD8+ ativadas. Por outro lado, as células CD8+ *naive* derivadas do cordão umbilical foram mais sensíveis ao efeito da IL-7 do que as células CD8+ do PBMC, embora a IL-2 e a IL-15 tenham promovido a produção viral por estas células depois da ativação com PHA. Neste sentido, a IL-2 e a IL-15 sabidamente mantêm linfócitos ativados vivos (Boise *et al.*, 1995; Vella *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002), e há evidências de que a IL-2 e a IL-15 aumentem a sobrevivência e a função de células CD8+ específicas para HIV-1 (Kinter *et al.* 1996a, 1996b; Mueller *et al.*, 2003a, 2003b), enquanto a IL-7 é importante para a sobrevivência de células T *naive* (Tan *et al.*, 2001; Vivien *et al.*, 2001). Ainda mais recentemente o papel da IL-15 na expansão e na diferenciação de células humanas virgens CD8+ tem sido relatado (Alves *et al.*, 2003).

O *status* de ativação, influenciado pelas citocinas do ambiente, podem afetar ambos os papéis das células CD8+ como alvos e supressores de replicação viral. Nesse sentido, a IL-2 e a IL-15 promoveram a mais forte atividade antiviral de células CD8+ ativadas por PHA. Para células CD8+ não-ativadas, IL-7 e IL-15 contribuíram para alguma inibição da produção viral.

As respostas paradoxais de células CD8+ ativadas à IL-2 e IL-15 com respeito à produção viral podem ser explicadas pela cinética lenta de produção de HIV-1 por células CD8+. Mesmo quando o provirus está acumulado em células CD8+ durante a progressão da infecção, células CD4+ são ainda o seu principal reservatório do vírus. Entretanto, em alguns pacientes infectados, os linfócitos CD8+ contribuem para uma proporção de carga proviral mais alta do que as células CD4+ (Livingstone *et al.*, 1996; Marodon *et al.*, 1999). A elucidação dos mecanismos que governam a frequência relativa de células CD8+ infectadas durante a progressão da doença e sua contribuição relativa para a carga viral total requer investigação mais aprofundada e será crucial para entender seu papel na patogênese da infecção por HIV-1.

Estudo 4

ESTUDO 4

RACIONAL E OBJETIVOS

O fato de células T CD8⁺ serem passíveis de infecção pelo HIV-1 pode contribuir para a imunopatogênese da infecção pelo HIV-1. Trabalhos anteriores demonstraram que linfócitos T CD8⁺ purificados ou PBMC depletado de CD4 eram induzidos a co-expressarem CD4 quando ativados por estímulos como mitógenos, anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28 ou células dendríticas alogeneicas, tornando-os susceptíveis à infecção produtiva por HIV-1 (Flamand *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 1998).

Em nosso Estudo 3, observamos que células T CD8⁺ purificadas estimuladas com PHA e mantidas em presença de diferentes citocinas γ c se tornam de fato susceptíveis à infecção por HIV-1 do tipo X4. Entretanto, a produção viral foi significativamente maior em presença de IL-2 e IL-15, do que em presença de IL-4 ou IL-7.

Paradoxalmente, estas mesmas citocinas IL-2 e IL-15 promoveram maior atividade antiviral de células T CD8⁺ ativadas com PHA ($\geq 90\%$ de supressão de produção de HIV-1 do tipo X4 em co-culturas CD8⁺/CD4⁺) que IL-4 ou IL-7. É ainda interessante dizer que, comparando os efeitos de IL-2 e IL-15 em células T CD8⁺ não estimuladas por mitógeno, IL-15 promoveu a atividade antiviral destas células em co-culturas CD8⁺/CD4⁺ (inibição de quase 50%), enquanto IL-2 aumentou a produção viral nestas co-culturas.

Em outro modelo de co-cultura, em que células T interagem com células dendríticas (DCs), foi também observado que IL-2 aumenta a produção viral em co-culturas DC/CD4⁺ (Weissman *et al.*, 1996). Neste modelo de co-cultura DC/CD4⁺, a presença de células T CD8⁺ autólogas ou alogeneicas de indivíduos não infectados promove a supressão viral da infecção endógena, enquanto estas células T CD8⁺ adicionadas ao sistema DC/CD4⁺ de infecção aguda *in vitro* não inibem, mas aumentam a produção viral (Barker *et al.*, 1996). De fato, vários trabalhos demonstraram que o controle da replicação viral por células T CD8⁺ é menor neste último modelo de co-cultura de linfócitos CD4⁺ com células dendríticas (Barker *et al.*, 1996; Rubbert *et al.*, 1997; Severino *et al.*, 2000), especialmente se os linfócitos CD8⁺ adicionados a esta co-cultura forem de indivíduos não infectados pelo HIV-1 ou se houver alguma aloreatividade neste sistema. Tentativas de induzir o efeito supressor de células T CD8⁺ através do uso de ativadores policlonais levaram a um aumento ainda maior da replicação viral neste sistema (Barker *et al.*, 1996).

Dentro dessa linha de estudo, procuramos investigar se haveria alguma correlação entre o menor efeito supressor dos linfócitos CD8+ no modelo de co-cultura DC/CD4+/CD8+ e sua susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Além de utilizarmos DC alogeneicas, testamos se em contato com células dendríticas autólogas ocorreria também a infecção de células T CD8+ por HIV-1.

E, como células dendríticas são estimuladas a produzirem IL-15 por vírus (Azimi *et al.*, 2000), é possível supor que esta IL-15 endógena seria capaz de aumentar a produção de HIV-1 por células T CD4+, ou mesmo CD8+, no sistema de co-cultura com células dendríticas. Assim, objetivamos também neste estudo avaliar os efeitos de IL-15 endógena e exógena sobre a replicação viral em co-culturas de DC e células T.

Assim, neste quarto estudo, nossos objetivos foram:

- 1- Investigar se haveria alguma correlação entre o menor efeito supressor dos linfócitos CD8+ no modelo de co-cultura DC/CD4/CD8 e sua susceptibilidade à infecção pelo HIV-1.
- 2- Testar a possibilidade de células T CD8+ serem infectadas produtivamente quando co-cultivadas com células dendríticas pulsadas com HIV-1, quer alogeneicas ou autólogas, imaturas ou maduras.
- 3- Avaliar os efeitos de IL-15 endógena ou exógena sobre a produção viral e a atividade antiviral de células T CD8+ em co-culturas com células dendríticas.

ESTUDO 4

Papel de IL-15 endógena e exógena sobre a susceptibilidade de linfócitos T CD8+ à infecção produtiva por HIV-1 e sua atividade antiviral em modelo de interação de células dendríticas com linfócitos T CD4+ autólogos.

RESUMO

Um modelo de co-cultura de células dendríticas (DC) e linfócitos que mimetiza as interações celulares dentro dos órgãos linfóides representa um sistema relativamente fisiológico para estudar o papel das citocinas e das subpopulações celulares na infecção por HIV-1. Vários estudos demonstraram que o controle da replicação viral por células CD8+ é mais difícil em co-culturas DC/CD4/CD8 do que em CD4/CD8. No presente estudo, nós objetivamos investigar se poderia haver alguma correlação entre o menor efeito supressor de linfócitos CD8+ e a alta susceptibilidade à infecção por HIV-1 nesse sistema. Uma vez que DC estimuladas por vírus podem produzir IL-15, que nós previamente demonstramos promover infecção produtiva de células T CD8+, bem como sua função antiviral, nós também avaliamos o papel de IL-15 endógena e exógena na atividade RT de X4 HIV-1_{RF} em co-culturas de células T CD8+ e/ou CD4+ com DCs autólogas. Pela primeira vez, nós observamos produção viral por linfócitos T CD8+ em contato com DCs autólogas previamente pulsadas com HIV-1, sugerindo que células CD8+ também podem ser trans-infectadas. Infecção dessas células CD8+ pode ser explicada pela co-expressão de CD4 e CXCR4, provavelmente com o suporte da interação CD28/B7, uma vez que as células CD8+CD28+ apresentaram níveis mais altos de co-receptores e produtividade de HIV-1 do que as células CD8+CD28-. O uso de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-15 diminuiu a produção viral em co-culturas DC/CD4+, indicando que a IL-15 endógena promove atividade RT em células CD4+. Por outro lado, nós só detectamos produção viral por co-culturas autólogas DC/CD8 na presença de IL-15 exógena. Entretanto, a adição de IL-15 promoveu uma menor produção viral em co-culturas DC/CD4/CD8 do que em co-culturas DC/CD4, sugerindo que a atividade antiviral e a produtividade de HIV-1 ocorrem simultaneamente em células T CD8+ sob influência de IL-15. Portanto, muito embora a IL-15 promova produção viral por células CD4+ ou CD8+, essa citocina γ c parece ser um estímulo importante para a atividade antiviral CD8+, merecendo pesquisa mais aprofundada como potencial imunoterapêutica.

INTRODUÇÃO

Os tecidos linfóides são o principal reservatório e local de replicação de HIV-1 (Pantaleo *et al.*, 1991; 1993; Harris *et al.*, 1997; revisado em Pierson *et al.*, 2000). Assim, um modelo de cultura que imite as interações celulares que ocorrem nos órgãos linfóides representa um sistema relativamente fisiológico para se estudar o papel de citocinas e subpopulações celulares na infecção pelo HIV-1.

No modelo de co-cultura de células dendríticas e linfócitos CD4⁺ (DC/CD4), Barker *et al.* (1996) observaram que a modulação da replicação de HIV-1 em células T CD4⁺ através de linfócitos CD8⁺ é um fenômeno multifatorial, envolvendo efeitos tanto inibitórios quanto estimulatórios sobre a replicação de HIV-1. Neste modelo de co-cultura DC/CD4, a presença de células T CD8⁺ autólogas de pacientes ou alogeneicas de indivíduos não infectados promove a supressão viral da infecção endógena, enquanto estas células T CD8⁺ adicionadas ao sistema DC/CD4 de infecção aguda *in vitro* não inibem, mas aumentam a produção viral (Barker *et al.*, 1996). De fato, vários trabalhos demonstraram que o controle da replicação viral por células T CD8⁺ é menor neste último modelo de co-cultura de linfócitos CD4⁺ com células dendríticas, especialmente se os linfócitos CD8⁺ adicionados a esta co-cultura forem de indivíduos não infectados pelo HIV-1 ou se houver alguma aloreatividade neste sistema (Barker *et al.*, 1996; Rubbert *et al.*, 1997; Severino *et al.*, 2000). Tentativas de induzir o efeito supressor de células T CD8⁺ através do uso de ativadores policlonais levaram a um aumento ainda maior da replicação viral (Barker *et al.*, 1996).

Considerando os achados prévios de que a ativação mitogênica ou o contato com células dendríticas alogeneicas induzem linfócitos T CD8⁺ a co-expressarem CD4 e, dessa forma, a se tornarem susceptíveis à infecção pelo HIV-1 (Flamand *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 1998), é possível que as células T CD8⁺ contribuam para o aumento de produção viral neste sistema. Assim, neste estudo procuramos investigar: (1) a possibilidade de células T CD8⁺ serem infectadas produtivamente quando co-cultivadas com células dendríticas pulsadas com HIV-1, quer alogeneicas ou autólogas, imaturas ou maduras; (2) se haveria alguma correlação entre o menor efeito supressor dos linfócitos CD8⁺ no modelo de co-cultura DC/CD4/CD8 e sua susceptibilidade à infecção pelo HIV.

No modelo de co-cultura com células dendríticas utilizado neste estudo, o único estímulo fornecido aos linfócitos CD4+ ou CD8+ é o próprio contato com as DCs. Entretanto, como células dendríticas são ativadas por vírus a produzirem IL-15 (Azimi *et al.*, 2000), citocina esta que demonstramos promover tanto a infecção produtiva de células T CD8+ quanto seu efeito supressor sobre a replicação viral (dados apresentados no estudo anterior desta tese), nós objetivamos também: (3) avaliar os efeitos de IL-15 endógena ou exógena sobre a produção viral, bem como (4) analisar os efeitos desta citocina, de forma endógena ou exógena, sobre a atividade antiviral de células T CD8+ em co-culturas com células dendríticas.

METODOLOGIA

Vírus

Os estoques virais de HIV-1_{RF} foram crescidos em células CEM (ambos fornecidos pela *Centralised Facility for AIDS Reagents, Medical Research Council, Grã-Bretanha*).

Purificação de Subpopulações Celulares

Voluntários sadios nos doaram sangue periférico por 2 vezes, em diferentes ocasiões, a primeira para a preparação de cultura de células dendríticas, e a segunda para obtenção de linfócitos frescos para co-culturas autólogas ou alogeneicas.

PBMC foi isolado através de centrifugação em Ficoll-Hypaque (*Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, EUA*). Para a seleção de células CD8⁺ e células CD4⁺, utilizamos *CD8 MicroBeads* e *CD4 MicroBeads* (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha*), respectivamente, conforme descrito no Estudo 3 e resumido abaixo.

As células foram ressuspensas em PBS suplementado com 0,5% BSA (Sigma) e 2 mM EDTA (Sigma), e incubadas com *MicroBeads* (15 min./6^o-12^oC). Após lavadas e ressuspensas no mesmo tampão, foram passadas por uma coluna de separação (Miltenyi Biotec) do tipo *MS+* (para até 10⁷ células positivas) ou *LS+* (para até 10⁸ células positivas), as quais eram colocadas em campo magnético de um separador *MACS* (*Magnetic Cell Separator, MiniMACS* ou *MidiMACS*, respectivamente).

A separação das subpopulações CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CD28⁻ foi realizada através de incubações sequenciais com *MACS CD8 Multisort Kit* (Miltenyi Biotec), anticorpo monoclonal anti-CD28-FITC (*Pharmingen, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA*), e anti-FITC *Microbeads* (Miltenyi Biotec). Células CD8⁺ foram purificadas utilizando-se *CD8 MultiSort MicroBeads*. O reagente *Multisort Release* (10 min./6^o-12^oC) liberava as *Multisort Microbeads* da fração CD8 positiva. Após serem lavadas, as células foram ainda incubadas com o reagente *MultiSort Stop*, para inibir a reação de liberação em etapas subseqüentes. A fração CD8 positiva foi separada em subpopulações CD28⁺ e CD28⁻ incubando-se primeiramente com anticorpo monoclonal anti-CD28-FITC (Pharmingen) e, após lavadas, com *anti-FITC Microbeads* (em gelo/30 min., cada incubação). As células foram ressuspensas em

tampão PBS/BSA/EDTA, depois de terem sido novamente lavadas, e então aplicadas à coluna *MS+* ou *LS+* (Miltenyi Biotec).

Anticorpos Monoclonais e Citometria de Fluxo

Para análise da pureza das frações celulares ou da expressão de CD4 e de co-receptores para HIV-1 em células T CD8+, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: anti- CD4-FITC, CD3-PE, CXCR4-PE, CCR5-PE, CD28-FITC, CD28-CyCh, CD8-PE e CD8-CyCh (Pharmingen). Os controles foram IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG2b-PE, IgG1-CyCh (Pharmingen).

As células foram incubadas (10^5 - 10^6 células/tubo) com diferentes combinações destes anticorpos para marcações triplas (em volume de 10 μ l cada anticorpo), por 30 min., em gelo e protegidas da luz. Depois de lavadas 3x em PBS 2% FCS, as células foram ressuspensas em 0.5 ml de 2% paraformaldeído tamponado, e adquiridas em citômetro de fluxo *FACScan* (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA). As populações viáveis foram determinadas através de sua granularidade e tamanho celular. A análise dos dados foi realizada através do programa *WinMDI* versão 2.8 (fornecido pelo *site* <http://facs.scripps.edu/>).

Preparação de células dendríticas

PBMC (1×10^6 células/ml) foi cultivado (37°C , 5% CO_2) em meio completo (MC): RPMI 1640 suplementado com 10% FCS, glutamina, penicilina e estreptomicina (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, França). Após 2 horas de aderência ao plástico (em placas de 6 poços, *Falcon*TM, *Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA*), as células não aderentes foram retiradas gentilmente, lavando-se com PBS. Os monócitos aderentes foram cultivados em MC fresco suplementado com 50 ng/ml IL-4 e 100 ng/ml GM-CSF (*R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Grã-Bretanha*). Após 7 dias, as células não aderentes foram coletadas, lavadas em PBS e purificadas por seleção negativa, através de incubação com *Dynabeads* (Dynal AS, Oslo, Noruega) anti-CD2, anti-CD3 e anti-CD19 (na proporção de 4:1 células alvo), por 20 min. a 4°C , com rotação. As células ligadas às *Dynabeads* foram removidas em magneto (Dynal), e o sobrenadante contendo DCs imaturas foi obtido, e novamente aplicado ao magneto para aumentar a pureza celular. Para estimularmos a maturação de DCs, incubamos com 10 ng/ml de

lipopolissacarídeo (LPS, Sigma) a partir do dia 6 de cultura, e cultivamos por mais 48 horas. Para a realização de experimentos em paralelo, culturas de DCs imaturas, em ausência de LPS, foram estendidas por mais 1 dia, para que as duas preparações de DCs fossem completadas simultaneamente.

Infecção *in vitro* com HIV-1

As preparações de DCs imaturas ou maduras foram plaqueadas em placas de 96 poços (*FalconTM*), na concentração de 1×10^4 células/poço. Estas culturas de DCs foram “pulsadas” com HIV-1 X4 (HIV-1_{RF}) através de exposição aos vírus, por 2 horas a 37°C, em multiplicidade de infecção de 0,01. Após “pulsadas”, as células dendríticas foram lavadas por 3x em PBS. Linfócitos T CD4+ e/ou CD8+ (ou suas subpopulações), purificados de PBMC fresco, como descrito acima, foram então, imediatamente, adicionados (2×10^5 células/poço, em triplicatas) às culturas de DCs.

Algumas preparações de DCs receberam tratamento com 40 µg/ml mitomicina C (Sigma), a 37°C/30 min./5% CO₂, antes de serem “pulsadas” com HIV-1.

Os sobrenadantes de culturas foram coletados periodicamente e guardados a -80 °C até serem utilizados para a dosagem de atividade da transcriptase reversa, conforme descrito abaixo.

Ensaio Mini RT de atividade da enzima Transcriptase Reversa

Como parâmetro de produtividade viral, dosamos a atividade RT das culturas celulares utilizando um “mini” ensaio. Resumidamente, 5µl de sobrenadante de cultura foram adicionados em triplicata a 25µl de uma mistura contendo poli(A), oligo(dT) (Pharmacia), MgCl₂ e ³²P DTTP (deoxitimidina 5'-trifosfato marcada com ³²P) (*Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, Grã-Bretanha*). Após incubação por 2 horas a 37°C, 5µl da mistura de reação foram pipetados sobre papel DE81 (*Whatman LabSales, Hillsboro, OR, EUA*). O papel foi seco ao ar, lavado 5 vezes em 2X SSC e mais duas vezes em etanol 95%. Os filtros foram secos novamente, e a contagem radioativa foi realizada em contador 1450 Microbeta Plus Wallac (*Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, Grã-Bretanha*).

A produção viral foi expressa em cpm/µl (consideramos como positiva a atividade RT igual ou maior a 300cpm/µl).

Avaliação dos efeitos de IL-15 endógena ou exógena

Para analisarmos os efeitos de IL-15 endógena sobre a susceptibilidade à infecção por HIV-1 ou atividade antiviral de linfócitos CD8+, as culturas foram mantidas sem adição de citocinas (condição de cultura denominada “Not”) ou em presença de anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-15 (10 µg/ml, *R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Grã-Bretanha*) (condição de cultura denominada “anti-IL-15”).

Os efeitos de IL-15 exógena foram avaliados em culturas com adição da citocina IL-15 (10ng/ml, R&D) (condição de cultura denominada “IL-15”).

Ensaio de supressão viral

O efeito supressor de células T CD8+ em co-culturas com células dendríticas e células CD4+ (DC/CD4/CD8) foi medida em relação à maior atividade RT detectada em co-culturas DC/CD4+ através da fórmula:

$$\% \text{ supressão} = 100 - \frac{(\text{valor RT de co-cultura DC/CD4/CD8} \times 100)}{(\text{valor RT de co-cultura DC/CD4})}$$

Em alguns casos, comparamos o efeito supressor de células T CD8+ em co-culturas DC/CD4/CD8 com a atividade supressora das mesmas células CD8+ em co-cultura apenas com células CD4+ autólogas. O percentual de supressão nas co-culturas CD8/CD4 foi medida em relação à maior atividade RT detectada em cultura de células CD4+ através da fórmula:

$$\% \text{ supressão} = 100 - \frac{(\text{valor RT de co-cultura CD8/CD4} \times 100)}{(\text{valor RT de cultura CD4})}$$

Análise estatística

Para comparação de diferentes condições de co-cultura de linfócitos e células dendríticas de mesmos doadores foi utilizado teste t de Student pareado bicaudal através do *software GraphPadPrism version 4*.

RESULTADOS

Em presença de células dendríticas alogeneicas, células T CD8+ são infectadas produtivamente por HIV-1 e apresentam menor atividade antiviral.

Células T CD8+ alogeneicas e/ou ativadas com mitógeno quando adicionadas a co-culturas de linfócitos CD4+ com células dendríticas autólogas “pulsadas” com HIV-1 (DC/CD4) aumentam a produção viral (Barker *et al.*, 1996). Considerando os achados prévios de que a ativação mitogênica ou o contato com células dendríticas alogeneicas induzem linfócitos T CD8+ a co-expressarem CD4 e, dessa forma, a se tornarem susceptíveis à infecção pelo HIV-1 (Flamand *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 1998), é possível que a infecção produtiva de células T CD8+ contribua para o aumento de produção viral neste sistema.

Em nosso estudo anterior (Estudo 3), mostramos que as citocinas γ -c IL-2 ou IL-15 promovem tanto a infecção produtiva de células T CD8+ ativadas por mitógeno quanto sua atividade antiviral. Neste estudo, decidimos utilizar apenas as células dendríticas como estímulo para os linfócitos T e testarmos o papel de IL-15, citocina produzida por células dendríticas ativadas por vírus (Azimi *et al.*, 2000).

Comparamos, então, a atividade antiviral e produção de HIV-1 por células T CD8+ em 2 diferentes modelos de co-cultura com células T CD4+ autólogas. No primeiro modelo, as células T CD8+ foram co-cultivadas com células T CD4+ autólogas (na proporção de 1:1 CD4/CD8), e ambas expostas aos vírus. No segundo modelo, células CD4+ e CD8+ (também na proporção 1:1) foram co-cultivadas com DCs alogeneicas previamente “pulsadas” com HIV-1. Nestes 2 modelos, utilizamos células T não estimuladas com mitógeno e mantidas em presença de IL-15, o que nos permite distinguir o papel de IL-15 independente da presença de células dendríticas.

Observamos que a atividade antiviral de células T CD8+ foi menor quando os linfócitos foram mantidos em contato com células dendríticas alogeneicas (figura 4.1). É possível que a infecção produtiva de células T CD8+ tenha contribuído para a menor inibição de produção viral neste modelo, pois detectamos atividade de transcriptase reversa (RT) em co-culturas de células CD8+ com DCs alogeneicas previamente “pulsadas” com HIV-1 (fig. 4.1B), mas não em culturas de apenas células CD8+ não estimuladas, mesmo que em presença de IL-15 (fig. 4.1A).

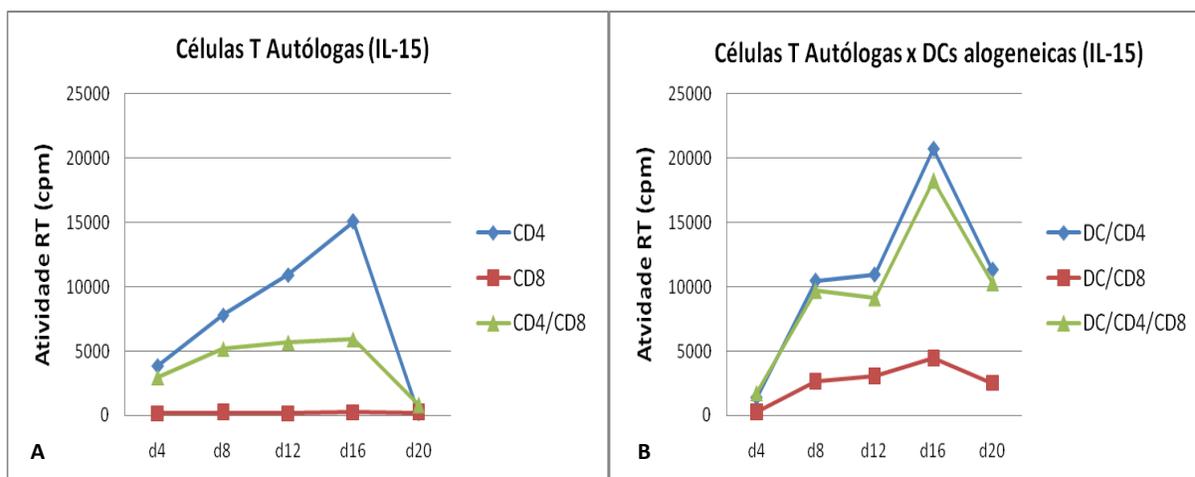


Figura 4.1. Atividade antiviral de células T CD8⁺ em co-cultura com células T CD4⁺ ou em co-culturas DC/CD4/CD8. (A) Células T CD4⁺ e CD8⁺ purificadas de PBMC foram cultivadas isoladamente ou em co-cultura (proporção 1:1). Neste experimento, linfócitos CD8⁺ inibiram a replicação viral em 61% comparada à produção observada em culturas de células CD4⁺. (B) Em co-cultura com DCs alogeneicas, células T CD8⁺ foram infectadas produtivamente com HIV-1_{RF}, e a inibição de replicação viral diminuiu para 12%. Todas as culturas foram feitas em triplicatas e mantidas em presença de IL-15 (10ng/ml); dados representativos de 2 experimentos realizados.

Células T CD8⁺ em co-cultura com células dendríticas alogeneicas ou autólogas apresentam produção de HIV-1, especialmente a subpopulação CD8⁺ CD28⁺

Kitchen e colaboradores (1998) haviam descrito que células T CD8⁺ quando em contato com células dendríticas alogeneicas ou estimuladas por anti-CD3/anti-CD28 passam a expressar CD4, além de CXCR4 e CCR5, e são infectadas quando depois expostas diretamente ao HIV-1. Neste estudo, investigamos se o contato com células dendríticas autólogas também levaria células T CD8⁺ a se tornarem susceptíveis à infecção pelo HIV-1. E, como provavelmente a interação CD28-B7 estaria relacionada à indução de expressão da molécula CD4 e dos co-receptores de HIV-1, CXCR4 e CCR5, em linfócitos CD8⁺, consideramos relevante estudarmos se as subpopulações CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CD28⁻ seriam moduladas de modo diferente. A susceptibilidade destas subpopulações à infecção por vírus HIV-1 quando em contato com células

dendríticas autólogas ou alogeneicas previamente “pulsadas” com HIV-1_{RF} também foi testada com adição ou não de IL-15 às co-culturas DC/CD8.

Pela primeira vez, observamos produção viral quando células T CD8⁺ foram co-cultivadas com células dendríticas autólogas previamente “pulsadas” com HIV-1 (figura 4.2).

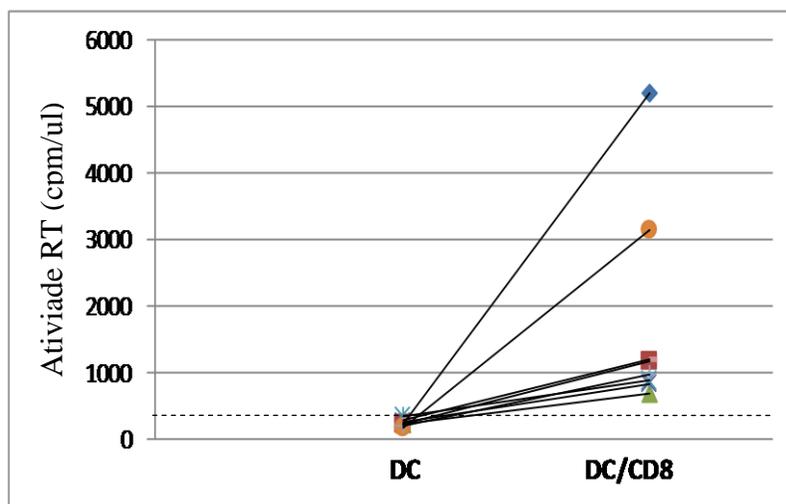


Figura 4.2. Células T CD8⁺ produzem HIV-1 quando co-cultivadas com DCs autólogas “pulsadas” com o vírus. Produção viral foi detectada em co-culturas de linfócitos T CD8⁺ com células dendríticas autólogas previamente “pulsadas” com HIV-1_{RF} (DC/CD8), mas não em culturas das mesmas DCs “pulsadas”. Células T CD8⁺ foram co-cultivadas na proporção de 20:1 DC, em presença de IL-15 (10ng/ml). Dados são derivados de 8 experimentos, realizados com DCs imaturas ou maduras. A atividade de transcriptase reversa (RT) igual ou > 300cpm/μl (demarcada pela linha tracejada) foi considerada positiva.

Nossos resultados mostraram que as subpopulações CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CD28⁻ se comportam de modo diferente quando expostas às células dendríticas alogeneicas ou autólogas. Células T CD8⁺CD28⁺, mas não CD8⁺CD28⁻, apresentaram produção viral em co-culturas com DCs alogeneicas previamente “pulsadas” com vírus HIV-1_{RF} (figura 4.3A), sem suplementação de citocinas (condição “Not”). Porém, com adição de IL-15 (condição “IL-15”) detectamos atividade RT em co-culturas DC/CD8 de ambas subpopulações, embora as co-culturas DC/CD8+CD28⁺ fossem mais produtivas. Por outro lado, apenas co-culturas de DCs autólogas, “pulsadas” com HIV-1_{RF}, com a subpopulação CD8⁺CD28⁺ apresentaram produção viral (fig. 4.3B).

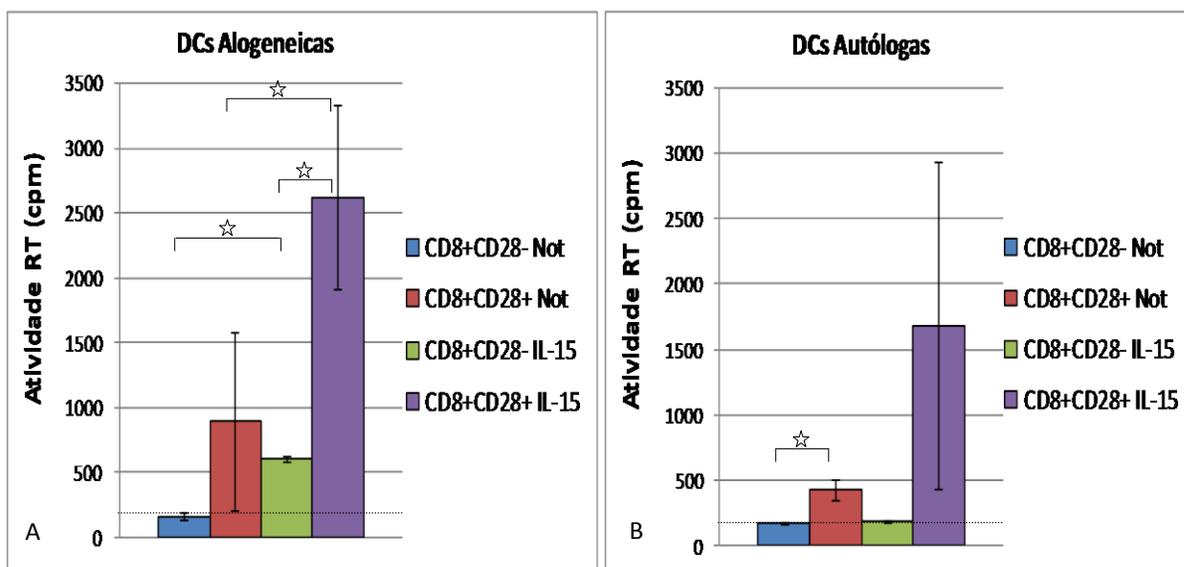


Figura 4.3. Produção de HIV-1_{RF} em co-culturas DC/CD8+CD28+ ou DC/CD8+CD28- alogeneicas (A) ou autólogas (B), sem (“Not”) ou com adição de 10 ng/ml da citocina IL-15 (“IL-15”). Culturas foram realizadas em triplicatas, com células dendríticas imaturas tratadas com mitomicina C, e células CD8+CD28+ e CD8+CD28- recém-purificadas de PBMC de um mesmo doador (n=4 doadores, médias ± DP). Atividade RT foi considerada positiva se igual ou maior que 300 cpm/μl (demarcada pela linha tracejada). Diferenças significativas (p<0,05) entre as co-culturas estão marcadas com o símbolo de estrela.

A maior produção de HIV-1 do tipo X4 em células CD8+CD28+ que CD8+CD28- pode ser explicada pela maior expressão de CD4 e de co-receptor CXCR4 após interação com células dendríticas alogeneicas ou autólogas

Células T CD8+ recém-purificadas em subpopulações CD8+CD28+ e CD8+CD28-, não ativadas por mitógeno, foram expostas às células dendríticas alogeneicas ou autólogas, porém não “pulsadas” com HIV-1, por 1 semana antes de avaliarmos a sua expressão de CD4, CXCR4 e CCR5.

Após contato com células dendríticas alogeneicas, observamos que a subpopulação CD8+CD28+ apresentou maior expressão de CD4 do que a subpopulação CD8+CD28- (figura 4.4). Células CD8+CD28+ também foram induzidas a expressar CD4 quando em co-cultura com células dendríticas autólogas (figura 4.4), embora em percentual menor que em contato com células dendríticas alogeneicas, explicando nossos achados de produção viral (figura 4.3).

#1 CD8+CD28+ #1 CD8+CD28- #2 CD8+CD28+ #2 CD8+CD28-

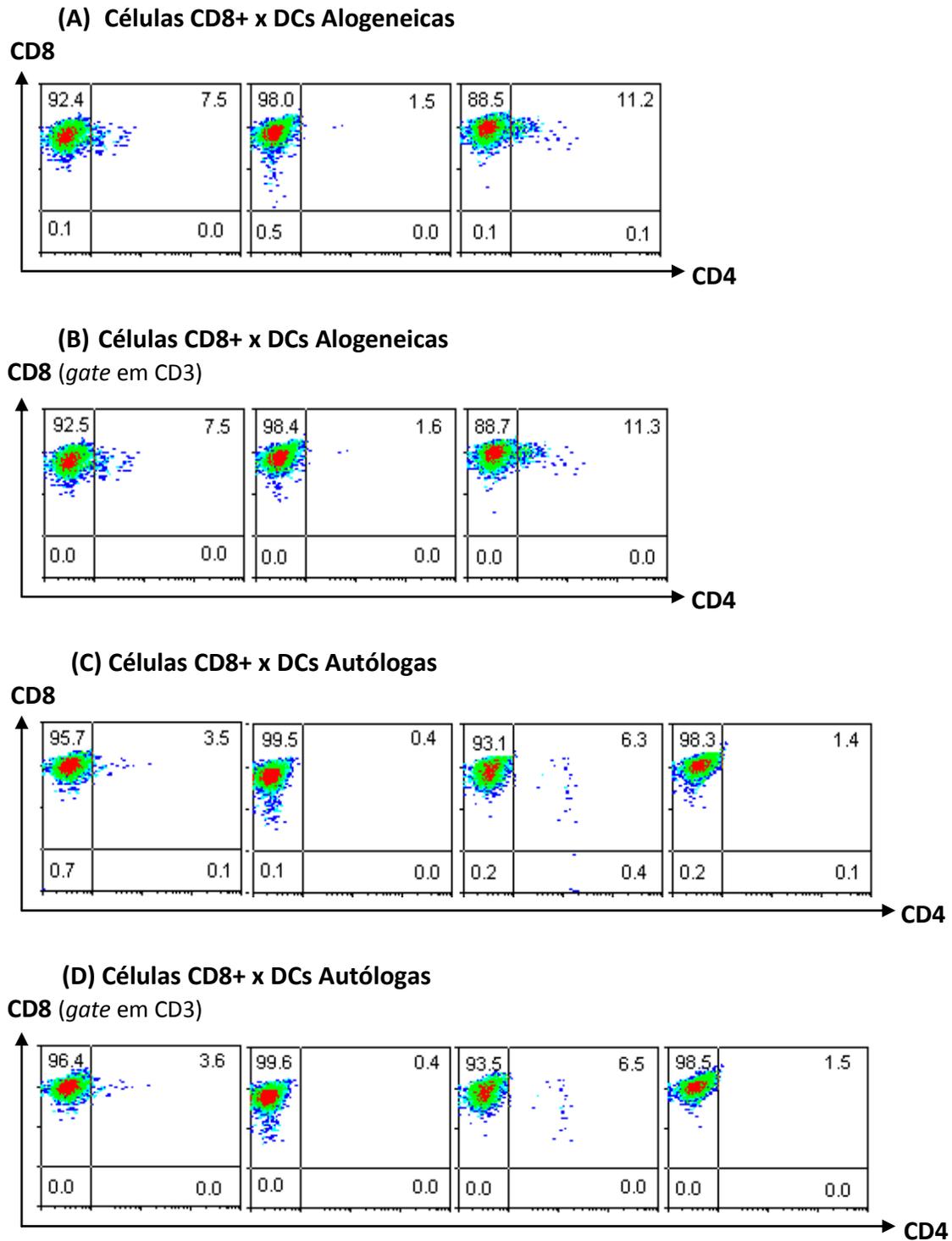


Figura 4.4. Co-expressão de CD4 em células CD8+CD28+ e CD8+CD28-, isoladas a partir de PBMC de dois doadores (#1 e #2), após 1 semana em co-cultura (1:20 DC/CD8) com DCs alogeneicas (A-B) ou DCs autólogas (C-D) imaturas (tratadas com mitomicina C).

Após contato com células dendríticas alogeneicas, observamos que a subpopulação CD8+CD28+ apresentou maior expressão do co-receptor CXCR4 que a subpopulação CD8+CD28-, o inverso ocorrendo para CCR5 (figura 4.5). A expressão de CXCR4 pelas subpopulação CD8+CD28+ e CD8+CD28- foi maior em contato com células dendríticas autólogas que alogeneicas (figura 4.5).

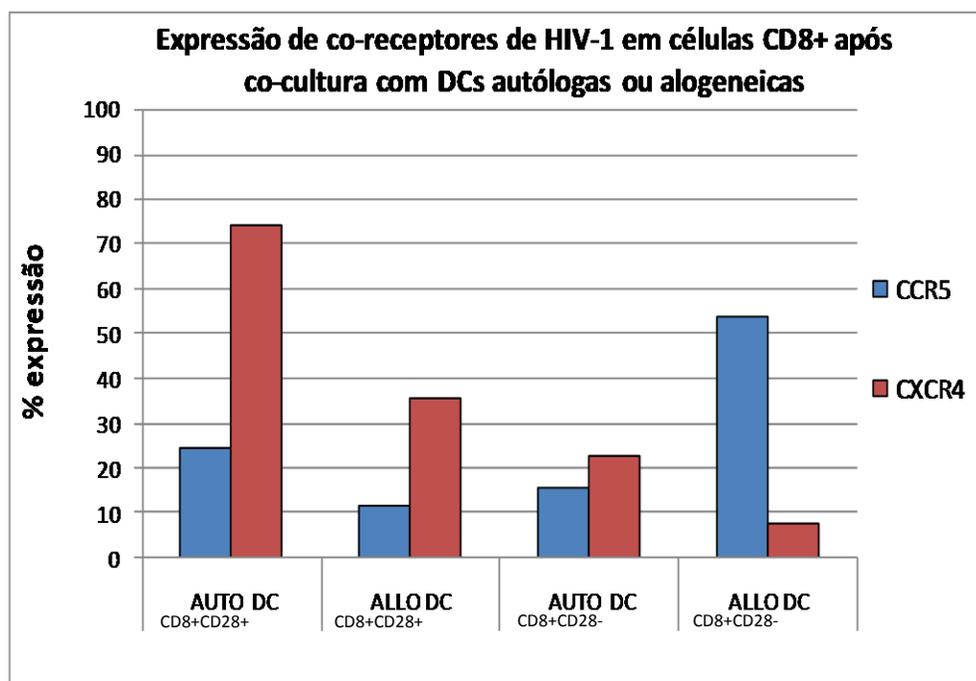


Figura 4.5. Expressão de co-receptores de HIV-1 nas subpopulações CD28+ e CD28- de células T CD8+ após contato com células dendríticas autólogas ou alogeneicas. Células CD8+CD28+ e CD8+CD28- recém-purificadas a partir de PBMC foram co-cultivadas por 1 semana com DCs autólogas (AUTO DC) ou DCs alogeneicas (ALLO DC) (1:20 DC/CD8) imaturas (previamente tratadas com mitomicina C) antes da marcação com anticorpos específicos anti-CXCR4 e CCR5. Dados apresentados referentes a um mesmo doador, representativos de experimentos realizados com 2 doadores.

A maior produção de HIV-1_{RF} por células CD8+CD28+ que por CD8+CD28- em co-culturas com DCs alogeneicas ou autólogas “pulsadas” com vírus (fig. 4.3) poderia, então, ser explicada pela maior expressão de CD4 (fig. 4.4) e CXCR4 (fig. 4.5) pela subpopulação CD28+ que CD28- de linfócitos T CD8+ quando expostas às DCs alogeneicas ou autólogas.

IL-15 promove a produção viral, bem como a atividade antiviral de células T CD8+, em co-culturas de células dendríticas com linfócitos T autólogos.

Estudos prévios (Barker *et al.*, 1996) e nossos resultados (fig. 4.1) sugerem que linfócitos T CD8+ apresentam menor inibição de replicação de HIV quando em presença de DCs alogeneicas, talvez pela sua própria infecção produtiva pelo vírus. Como detectamos produção de HIV-1_{RF} não só em co-culturas DC/CD8 alogeneicas, mas também autólogas, decidimos estudar em co-culturas DC/CD4/CD8 autólogas a atividade antiviral de linfócitos CD8+. Analisamos neste modelo os efeitos de IL-15 endógena e exógena sobre a atividade inibitória de células T CD8+, já que DCs podem ser fonte de IL-15, especialmente em situações de infecção viral (Azimi *et al.*, 2000), e esta citocina favorece a infecção produtiva de linfócitos CD8+, bem como sua atividade supressora (dados apresentados no Estudo 3).

Em presença de IL-15 exógena, a inibição de produção viral em co-culturas DC/CD4/CD8 comparadas às co-culturas DC/CD4 foi geralmente superior a 40% (figura 4.6). Esta atividade antiviral sobre a produção de HIV-1_{RF} foi similar àquela observada no Estudo 3 para co-culturas de linfócitos T CD4/CD8 (1:1) não estimulados com mitógeno e mantidos em presença de IL-15.

Sem adição de citocinas, não observamos atividade antiviral. O uso de anticorpos neutralizantes anti-IL-15 pareceu diminuir a atividade antiviral de células T CD8+ em relação à condição “Not”, sugerindo um papel para IL-15 endógena no controle de produção viral.

Entretanto, este aparente efeito da neutralização de IL-15 endógena sobre a atividade antiviral pode ser explicado pela diminuição da produção de HIV-1 por células CD4+ observada em co-culturas DC/CD4 na condição “anti-IL-15” (figura 4.7A). Estes resultados sugerem que a produção viral de células T CD4+ em co-cultura com células dendríticas autólogas depende de IL-15 endógena.

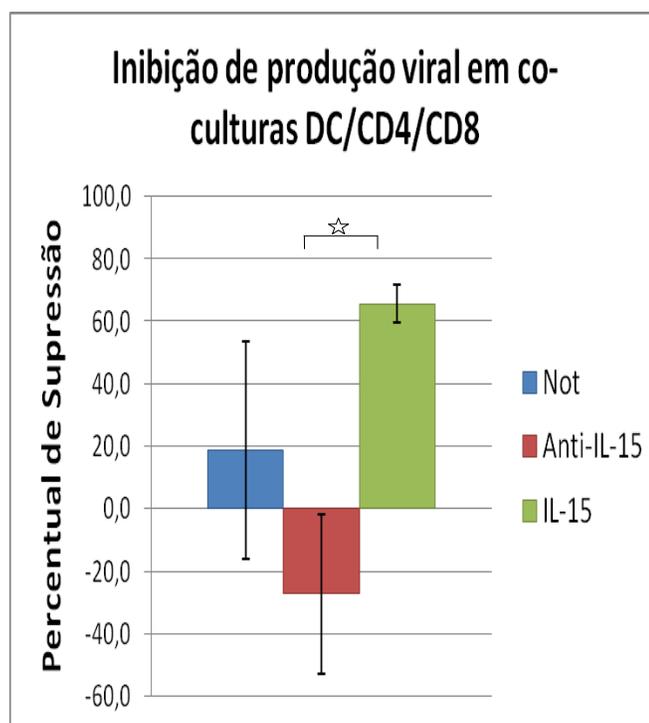


Figura 4.6. Papel de IL-15 endógena e exógena na inibição de produção viral em co-culturas DC/CD4/CD8 (proporção 1:1 CD4/CD8) em comparação com DC/CD4. Papel de IL-15 endógena foi avaliada nas condições “Not” (sem adição de citocinas) e “Anti-IL-15” (com adição de 10 µg/ml de anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-15). Papel de IL-15 exógena foi avaliada na condição “IL-15” (com adição de 10ng/ml de IL-15). Dados apresentados representam as médias de resultados de 5 experimentos (médias ± DP) realizados com células dendríticas maduras, “pulsadas” com HIV-1_{RF}, e linfócitos T autólogos de 5 diferentes doadores (proporção 1:20 DC/linfócitos). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as co-culturas estão marcadas com o símbolo de estrela.

Enquanto IL-15 endógena parece ser importante para a produção viral em linfócitos T CD4⁺ (não pré-estimulados) co-cultivados com DCs autólogas “pulsadas” com HIV-1_{RF}, a adição de IL-15 exógena às co-culturas de DCs autólogas, imaturas ou maduras, aumentou a produção viral de células T CD4⁺ e pôde promover a de células T CD8⁺ (fig. 4.7A), sem deixar de estimular a atividade antiviral dos linfócitos T CD8⁺ (fig. 4.7B). O efeito de IL-15 exógena sobre a produção viral e atividade antiviral de linfócitos T CD8⁺ foi mais evidente para a subpopulação CD8⁺CD28⁺ (fig. 4.7C).

(A)

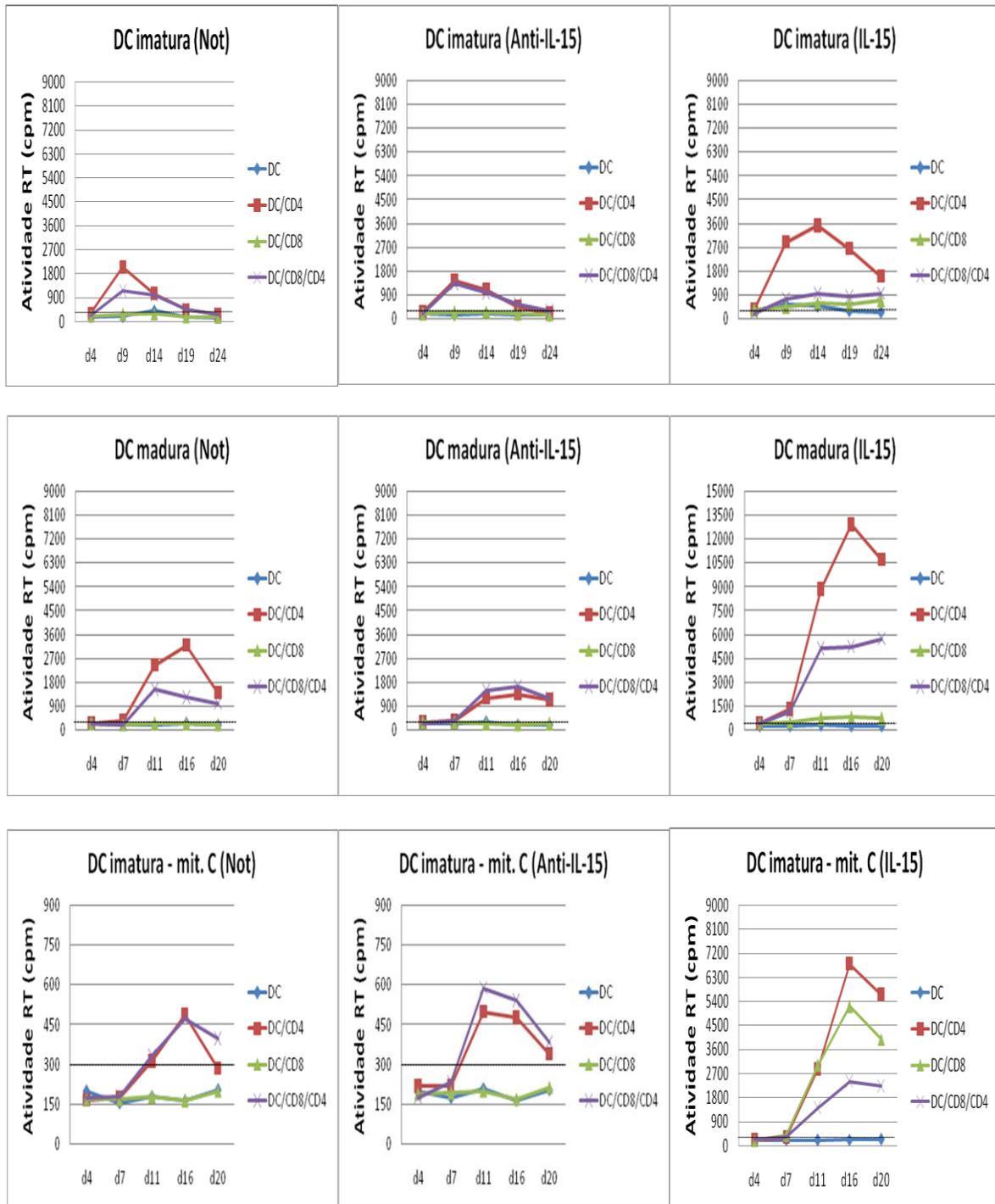
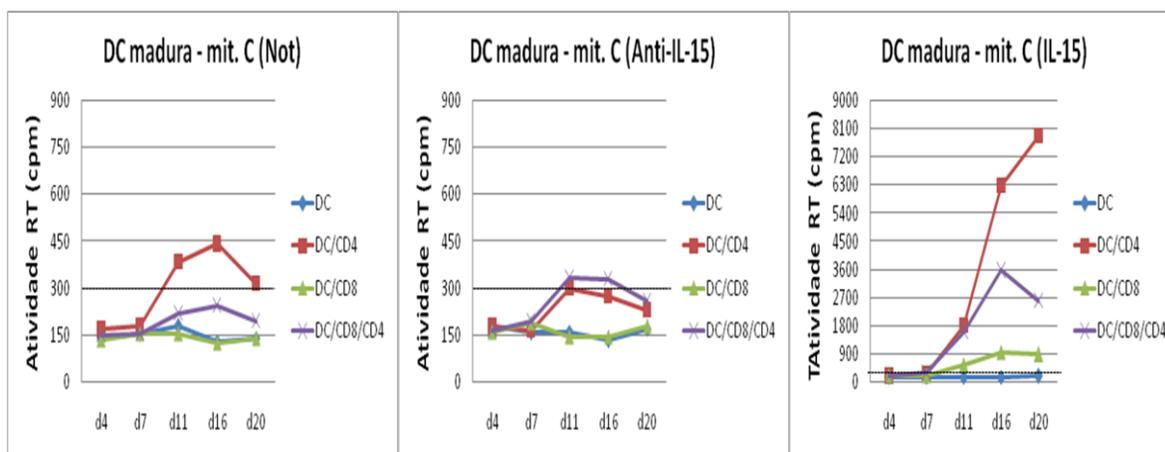
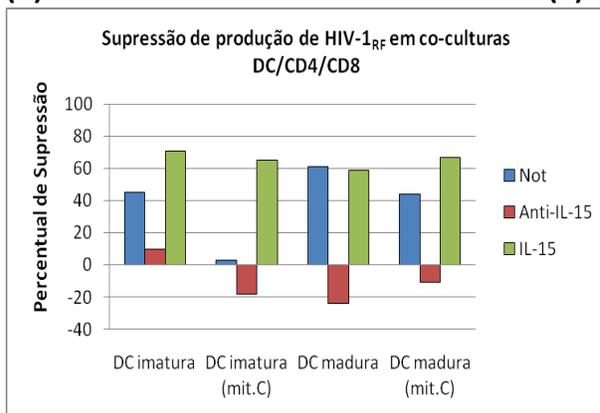


Figura 4.7. IL-15 promove a produção viral e a atividade antiviral de células T CD8+ em co-culturas com células dendríticas autólogas. Em (A), mostramos as cinéticas de produção viral observada em co-

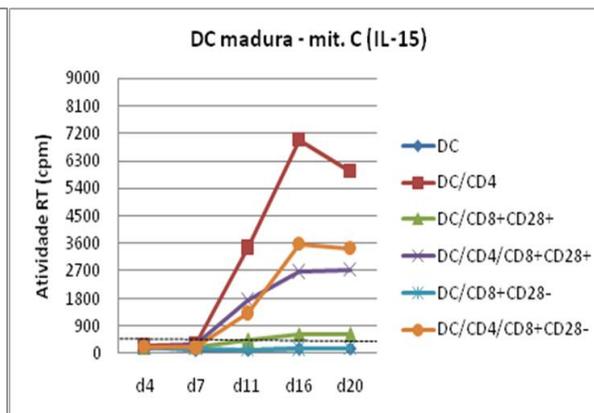
(A)



(B)



(C)



culturas autólogas de DC/CD4, DC/CD8 e DC/CD4/CD8 (proporção 1:1 CD4/CD8) ou culturas das mesmas DCs “pulsadas” com HIV-1, nas condições “Not” (sem adição de citocinas), “Anti-IL-15” (com adição de 10 µg/ml de anticorpo monoclonal neutralizante anti-IL-15) e “IL-15” (com adição de 10ng/ml de IL-15). A atividade de transcriptase reversa (RT) igual ou > 300cpm/µl (demarcada pela linha tracejada) foi considerada positiva. Dados apresentados são representativos de 9 experimentos realizados com células autólogas de 5 diferentes doadores. Células dendríticas, imaturas ou maduras, foram “pulsadas” com HIV-1_{RF} antes de linfócitos T autólogos recém-isolados serem adicionados às culturas (proporção 1:20 DC/linfócitos). Estes linfócitos T não foram pré-estimulados com mitógenos ou citocinas. Algumas culturas de células dendríticas foram previamente tratadas com mitomicina C (mit. C, 40 µg/ml). Em (B), apresentamos o percentual de inibição de produção viral observado nas co-culturas DC/CD4/CD8, comparadas às co-culturas DC/CD4, mostradas em (A). Em (C), mostramos as cinéticas de produção viral de co-culturas de células dendríticas com linfócitos T CD4+ e/ou subpopulações CD28+ e CD28- de linfócitos T CD8+ autólogos, representativas de experimentos realizados com 2 diferentes doadores.

Enquanto IL-15 endógena parece ser importante para a atividade viral em linfócitos T CD4⁺ (não pré-estimulados) co-cultivados com DCs autólogas “pulsadas” com HIV-1_{RF}, a adição de IL-15 exógena às co-culturas de DCs autólogas, imaturas ou maduras, aumentou a produção viral de células T CD4⁺ e pôde promover a de células T CD8⁺ (fig. 4.7A), sem deixar de estimular a atividade antiviral dos linfócitos T CD8⁺ (fig. 4.7B). O efeito de IL-15 exógena sobre a produção viral e atividade antiviral de linfócitos T CD8⁺ foi mais evidente para a subpopulação CD8⁺CD28⁺ (fig. 4.7C).

DISCUSSÃO

Células T CD8⁺ exercem importante papel no controle da replicação do vírus HIV-1, a qual ocorre principalmente nos órgãos linfóides (Pierson *et al.*, 2000). Nestes tecidos, a presença de células dendríticas deve contribuir para a transmissão dos vírus e para sua produção, quer por estímulos de membrana ou citocinas secretadas que ativem a replicação viral nos linfócitos T ou pela próprias DCs (Weissman & Fauci 1997; Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Assim, é importante que se avalie a atividade antiviral de células T CD8⁺ quando em contato com células dendríticas, em especial autólogas.

Em estudos anteriores sobre a atividade antiviral de células T CD8⁺ em presença de células dendríticas, foram observados efeitos tanto inibitórios quanto estimulatórios sobre a replicação de HIV-1 (Barker *et al.*, 1996). Como o controle da replicação viral por células T CD8⁺ foi menor em presença de células dendríticas se estes linfócitos eram alogeneicos (Barker *et al.*, 1996), nós postulamos ser possível que a produção de vírus por estes mesmos linfócitos CD8⁺ poderia contribuir para sua menor supressão viral quando em co-cultura com DCs e células CD4⁺. Baseamos esta hipótese sobre o fato de o contato com células dendríticas alogeneicas induzir linfócitos T CD8⁺ a co-expressarem CD4 e, dessa forma, a se tornarem susceptíveis à infecção pelo HIV-1 (Kitchen *et al.*, 1998).

Corroborando estes estudos, nossos resultados mostraram que células T CD8⁺ apresentaram menor atividade antiviral em presença de células dendríticas alogeneicas (veja fig. 4.1). É possível que a infecção produtiva de células T CD8⁺ tenha contribuído para a menor inibição de produção viral no modelo DC/CD4/CD8, pois culturas de células CD8⁺ não estimuladas apresentaram produção viral apenas quando em contato com DCs alogeneicas previamente “pulsadas” com HIV-1.

A infecção de células T CD8⁺ por HIV-1 do tipo X4 nestas co-culturas pode ser explicada pela expressão de CD4 e CXCR4 após contato com DCs alogeneicas (figuras 4.4 e 4.5), como mostrado anteriormente (Kitchen *et al.*, 1998). Em nosso modelo, entretanto, poderia ainda participar a molécula DC-SIGN, pois a única fonte de vírus foram DCs previamente “pulsadas” com HIV-1_{RF}, enquanto no estudo de Kitchen e colaboradores (1998) as células T CD8⁺ foram expostas aos vírus após o contato com DCs alogeneicas. Assim, é possível que também células T CD8⁺ sejam trans-infectadas quando co-cultivadas com DCs “pulsadas” com

HIV-1. Neste sentido, observamos que células dendríticas “pulsadas” com HIV-1, mesmo quando não produtivas, são capazes de passar o vírus para linfócitos T CD4+, corroborando trabalhos prévios (Cameron *et al.* 1994, 1996, Weissman & Fauci 1997, Rowland-Jones 1999, Geijtenbeek *et al.*, 2000a).

Diferentemente de estudos anteriores, células T CD8+ foram expostas e mantidas em co-cultura com as células dendríticas “pulsadas” com HIV-1, situação mais próxima do que ocorre durante a infecção *in vivo*. Detectamos produção viral em co-culturas DC/CD8 não só alogeneicas, mas também autólogas, em especial se as células T CD8+ fossem da subpopulação CD28+ e se a citocina IL-15 fosse adicionada *in vitro* (veja figuras 4.2 e 4.3).

Pela primeira vez mostramos que células CD8+ passam a co-expressar CD4 quando em contato com células dendríticas autólogas, e não apenas com células dendríticas alogeneicas como visto anteriormente (Kitchen *et al.*, 1998). A co-expressão de CD4, principalmente na subpopulação CD8+CD28+ em contato com DCs autólogas (fig. 4.4), deve explicar a possibilidade de infecção produtiva em co-culturas DC/CD8 autólogas, sem a necessidade de estímulo prévio com mitógeno (pré-requisito demonstrado no Estudo 3).

O estímulo para a expressão de CD4 em linfócitos T CD8+ parece envolver a interação das moléculas CD28/B7 durante o contato de células T CD8+ e DCs, pois a subpopulação CD8+CD28+ apresentou maior expressão de CD4 e susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 que a subpopulação CD8+CD28- (figuras 4.3 e 4.4). Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Kitchen e colaboradores (1998), em que células T CD8+ estimuladas por anti-CD3/anti-CD28 passaram a expressar CD4, além de CXCR4 e CCR5. Segundo Jourdan *et al.* (2000), o aumento de expressão de CXCR4 pela interação com células dendríticas autólogas seria dependente das interações CD40-CD154 e CD134-CD134L, talvez facilitada quando as células CD8+ são CD28+. É interessante notar que se durante a interação com DCs autólogas houvesse ativação de CD3, prevenia-se a indução de expressão de CXCR4 neste estudo (Jourdan *et al.*, 2000), o que pode ser interpretado como um fenômeno similar aos nossos resultados de menor expressão de CXCR4 por células CD8+CD28+ quando em contato com células dendríticas alogeneicas (fig. 4.5).

Além da maior expressão de CD4 e CXCR4, outro fator que explicaria a maior produtividade da subpopulação CD8+CD28+ seria o fato de, reconhecidamente, os linfócitos T

CD8+CD28+ serem mais capazes de proliferar que os linfócitos CD8+CD28- (Efros *et al.* 1996), o que facilitaria a replicação viral na subpopulação CD28+.

A adição da citocina IL-15 mostrou-se um importante estímulo para a infecção produtiva por HIV-1 em co-culturas DC/CD8 autólogas, como também observamos anteriormente para células T CD8+ ativadas por mitógeno (Estudo 3). A ativação de proliferação de células T CD8+ por IL-15, bem como a maior indução de expressão de CD4 em presença desta citocina (dados mostrados no Estudo 3), podem contribuir para produção de HIV-1 em co-culturas DC/CD8 autólogas.

Pelo fato de células dendríticas poderem ser fonte de IL-15, especialmente em situações de infecção viral (Azimi *et al.*, 2000), analisamos o papel de IL-15 endógena comparando co-culturas autólogas sem adição de citocinas com co-culturas em presença de anticorpos neutralizantes anti-IL-15. Observamos que IL-15 endógena, e não somente a exógena, promove a produção viral em co-culturas de linfócitos T CD4+ mantidos em contato com DCs autólogas previamente “pulsadas” com HIV-1, a qual é diminuída em presença de anticorpos neutralizantes anti-IL-15 (fig. 4.7). É interessante notar que o tratamento de DCs com mitomicina C antes de serem “pulsadas” com HIV-1 parece diminuir sua capacidade de transmitir e/ou estimular a replicação de HIV-1 em linfócitos T CD4+ na condição “Not”, talvez por uma menor produção de IL-15. Neste sentido, observamos que a neutralização de IL-15 causou menor efeito em co-culturas DC/CD4 tratadas com mitomicina C do que naquelas não tratadas, bem como em co-culturas de DCs maduras que imaturas. Assim, nossos resultados sugerem que a atividade viral de células T CD4+ em co-cultura com células dendríticas autólogas depende de IL-15 endógena. Por outro lado, não detectamos efeito desta citocina endógena sobre a produção viral de co-culturas DC/CD8 ou atividade antiviral destes linfócitos CD8+. É possível que a produção endógena de IL-15 seja diminuída em DCs “pulsadas” com HIV-1, impedindo que se detectem quaisquer prováveis efeitos sobre os linfócitos T CD8+.

Apesar de a adição de IL-15 promover replicação viral quando células T CD8+ são mantidas em contato com DCs autólogas previamente “pulsadas” com HIV-1, esta produção do vírus não parece contribuir para diminuição da atividade antiviral de linfócitos CD8+ em co-culturas DC/CD4/CD8 autólogas, ao contrário do que observamos em co-culturas alogeneicas. De fato, a inibição de produção viral observada nestas co-culturas com DCs autólogas foi similar

àquela observada no Estudo 3 para co-culturas de linfócitos T CD4/CD8, autólogos e não estimulados, mantidos em presença de IL-15 exógena.

Portanto, de acordo com nossos resultados do Estudo 3, a adição de IL-15 parece promover tanto a produção viral quanto a atividade antiviral mediada por células T CD8+, sugerindo um duplo papel para estes linfócitos na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, como alvos e supressores da replicação viral. Ainda corroborando nossos dados do Estudo 3 e trabalho de Landay *et al.*, 1993, observamos que a subpopulação CD28+ de linfócitos T CD8+ apresenta melhor atividade antiviral que a subpopulação CD28-, embora sejam mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1 quando em contato com DCs “pulsadas” com o vírus.

Assim, o modelo de co-cultura com células dendríticas parece ser útil para melhor compreensão não só da imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, bem como para o desenho de vacinas, microbicidas e imunoterapias. Neste sentido, nossos resultados sugerem que, em caso de vacinas terapêuticas com células dendríticas, seria preferível DCs autólogas e não alogeneicas, pois estas últimas parecem estimular mais o papel de linfócitos T CD8+ como alvos que supressores da replicação de HIV-1. Além disso, como no modelo de co-cultura com DCs autólogas o papel de linfócitos T CD8+ como inibidor da replicação viral foi promovido com a adição de IL-15, apesar desta citocina estimular a replicação do vírus em células T CD4+ e CD8+, é possível que IL-15 possa ser utilizada como adjuvante em vacinas não só pelo seu reconhecido efeito de ativação de células T CD8+ de memória, como também pelo estímulo à atividade antiviral destes linfócitos. Estas propriedades também tornam esta citocina uma imunoterapia em potencial, em especial se acoplada à terapia antiretroviral, para que não contribua para aumentar os reservatórios virais.

Discussão

DISCUSSÃO

Linfócitos T CD8+ são primordiais para o controle da replicação viral em indivíduos infectados pelo HIV-1, no entanto, na infecção crônica, células T CD8+ HIV-1-específicas não controlam adequadamente a infecção, apresentando defeitos funcionais mais graves em doença avançada (Lieberman *et al.*, 2001). Vários fatores parecem contribuir para isso, dentre estes, poderíamos incluir evidências cumulativas da própria infecção de células T CD8+ pelo HIV-1 (De Rossi *et al.*, 1986; Tsubota *et al.*, 1989b, Lusso *et al.*, 1990, 1991, Semenzato *et al.*, 1995, De Maria *et al.*, 1991, 1994, Mercure *et al.*, 1993, Flamand *et al.*, 1998, Kitchen *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1997, Livingstone *et al.*, 1996, McBreen *et al.*, 2001, Imlach *et al.*, 2001, Saha *et al.*, 2001a), e uma diferenciação alterada dos linfócitos T citotóxicos na infecção pelo HIV-1 (Appay *et al.*, 2000; McMichael & Rowland-Jones, 2001), incluindo declínio de células T CD8+ (Margolick *et al.*, 1995), especialmente de fenótipo CD45RA+ (Rabin *et al.*, 1995; Roederer *et al.*, 1995).

Assim, em nosso trabalho, decidimos analisar alguns aspectos fenotípicos e funcionais de células T CD8+, em modelos *in vitro* de infecção pelo HIV-1, além de sua própria infecção pelo vírus como potencial fator de distúrbio, no intuito de contribuir para um melhor entendimento da imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, bem como para o melhor desenho de vacinas e/ou imunoterapias.

Discutiremos, a seguir, algumas questões abordadas pela primeira vez em nossos Estudos 1-4 desta tese.

As alterações fenotípicas de células T CD8+ se agravam com a progressão da doença. Elas estariam relacionadas à presença de diferentes variantes X4 ou R5 de HIV-1?

Nossos dados indicam que o HIV-1 pode influenciar, direta ou indiretamente, as mudanças fenotípicas das células T CD8+, e que o uso de modelos de infecção *in vitro* pode ser útil para o estudo destas alterações e manipulações terapêuticas. As alterações fenotípicas foram mais evidentes com HIV-1 X4 que R5, assim como *in vivo* as mudanças que ocorrem em células T CD8+ são acentuadas com a progressão da infecção (Ho *et al.*, 1993, Borthwick *et al.*, 1994, Roederer *et al.*, 1995; Vingerhoets *et al.*, 1995, Lynne *et al.*, 1998, Tomiyama *et al.*, 2000).

O padrão fenotípico de células T CD8+ durante a infecção *in vitro* pelo HIV-1 apresentou semelhanças ao observado em pacientes durante a progressão da doença. Em culturas infectadas, especialmente pela variante X4 de HIV-1, encontramos redução do fenótipo *naive* e aumento do estágio intermediário e fenótipo ativado/de memória de células CD8+, embora não estatisticamente significativos.

A diminuição da subpopulação CD45RA+ de células T CD8+ de neonatos e adultos, em especial em culturas infectadas por variante X4 HIV-1_{III}B, sugere um paralelo à perda de linfócitos T CD8+ *naive* durante a progressão da doença (Roederer *et al.*, 1995). Isto poderia ser explicado pela maior expressão de CXCR4 em células *naive* (Bleul *et al.*, 1997). Em contraposição à diminuição de células CD8+ *naive*, observamos um aumento do fenótipo memória/ativado (TM/ativado) CD27+/CD28+/CD45RA-/CD45RO+, também descrito em resposta a infecções virais (Hamann *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). O aumento da subpopulação intermediária CD27-/CD28-/CD45RA-/CD45RO+ observado em culturas de PBMC infectadas com HIV-1, especialmente por variantes X4, também foi relatado *in vivo* em pacientes infectados (Roos *et al.*, 2000; Tomiyama *et al.*, 2002).

Por outro lado, o fato de nem sempre encontrarmos diminuição da expressão de CD27 em culturas de PBMC infectadas está de acordo com os achados de Appay *et al.* (2000) de expressão persistente de CD27 em células CD8+ específicas para o HIV-1. Em estudo longitudinal de pacientes infectados pelo HIV-1, não foi detectado enriquecimento de células CD27-CD45RO- (ou CD45RA+), correspondente aos CTL efetores, o que sugere que esta subpopulação deve ter vida-curta, ou que a perda de CD45RO deve ser um fenômeno raro devido à estimulação contínua de infecção viral persistente (Ogg *et al.*, 1999), como deve ocorrer em nossas culturas infectadas.

Em culturas de CBMC infectadas, embora a perda de expressão de CD27 fosse significativa, esta não apresentou uma associação específica aos variantes de HIV-1. Sabe-se que após prolongada ativação *in vitro*, a expressão de CD27 é gradualmente perdida (de Jong *et al.*, 1991b, Hintzen *et al.*, 1993). Neste sentido, o incremento de percentual da subpopulação CD27-CD45RA+ não deve ser considerado como indicativo de diferenciação das células T CD8+ *naive* em células T CD8+ efectoras de neonatos, o que só poderia ser comprovado pelo estudo da expressão de perforina ou IFN- γ , ou pela sua atividade citotóxica frente a células alvos.

Dentre as alterações fenotípicas observadas durante a infecção *in vitro* pelo HIV-1, a mais significativa foi o aumento da subpopulação CD57⁺ de células CD8^{high} de neonatos em culturas infectadas por variantes X4 HIV-1_{IIB} (p<0,005) ou HIV-1_{RF} (p<0,05), sugerindo um papel, direto ou indireto, para o vírus X4 na modulação da expressão de CD57. De fato, células *naive* não expressam CD57 (Hamann *et al.*, 1999a), e a expansão da subpopulação CD8⁺CD57⁺ quando estimuladas *in vitro* por células apresentadoras de antígeno carregadas com peptídeos HIV-1 (Mollet *et al.* 1998) ou por fibroblastos transfectados com *nef* (Silvestris *et al.* 1999), sugerem ativação específica pelos antígenos HIV-1. A expansão específica de células CD8⁺CD57⁺ é também sugerida pela sua oligoclonalidade (Batliwalla *et al.*, 1996, Morley *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1995, Weekes *et al.*, 1999b).

Por outro lado, a expansão da subpopulação CD8⁺CD57⁺ pode resultar de ativação antigênica crônica (Dupuy d'Angeac *et al.*, 1994, Mollet *et al.*, 1998). Além da grande ativação causada pelo estímulo antigênico devido à contínua produção viral (McMichael & Rowland-Jones 2001 e Lieberman *et al.*, 2001), a participação de co-fatores, como as infecções oportunistas poderiam contribuir para as alterações fenotípicas de células T CD8⁺. Neste sentido, alguns estudos sugerem que a expressão de CD57 em células T CD8⁺ está associada à infecção prévia com CMV (Maher *et al.* 1985, Wursch *et al.* 1985, Hooper *et al.* 1999, Wang *et al.* 1993), mesmo em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Evans *et al.* 1999).

Após HAART, com o controle da carga viral, algumas das alterações fenotípicas são atenuadas, como, por exemplo, a diminuição de expressão de marcadores de ativação e memória em células T CD8⁺ (Autran *et al.*, 1997, Bisset *et al.*, 1998, Al-Harhi *et al.*, 2000). O fato de que as células CD8⁺ são submetidas a grande expansão durante infecções virais poderia por si contribuir para as alterações fenotípicas observadas durante a progressão dessas doenças. Os processos de diferenciação envolvem ciclos de proliferação celular sucessivos, que por fim conduzem as células à senescência (Effros *et al.*, 1996, revisto por Globerson & Effros, 2000). Recentemente, Brenchley *et al.* (2003) defenderam que a expressão de CD57 seria um marcador de senescência mais importante que a perda de expressão de CD28. De acordo com a literatura (Bandrés *et al.*, 2000, Brenchley *et al.*, 2003), encontramos percentuais mais altos de CD8⁺CD57⁺ em células CD8⁺ de indivíduos mais velhos, mesmo em culturas não-infectadas, corroborando a associação desta subpopulação à senescência do sistema imune. O acúmulo de células CD8⁺ senescentes poderia se dar pela resistência à apoptose dos linfócitos que passaram

por múltiplas proliferações antígeno-específicas (Spaulding *et al.*, 1999). Se o acúmulo de células CD8⁺ CD57⁺ ou CD28⁻ ocorre por menor morte celular é debatido (Rouleau *et al.*, 1993, Lewis *et al.*, 1994, Borthwick *et al.*, 1994, Frassanito *et al.*, 1998, Mollet *et al.*, 1998, Van den Hove *et al.*, 1998, Posnett *et al.*, 1999, Mugnaini *et al.*, 1999, Borthwick *et al.*, 2000).

O aumento de expressão de CD57 observado em células CD8⁺ de neonatos sugere que o vírus HIV-1, direta ou indiretamente, pode exacerbar o processo de senescência do sistema imunitário, em especial variantes X4 de HIV-1, associados à progressão da doença (revisado em Miedema *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1999; Rowland-Jones, 2003). De fato, muitos trabalhos propuseram que o HIV-1, através de ativação direta ou indireta, pode acelerar mudanças fenotípicas e funcionais no sistema imune típicas do envelhecimento (revisado em Effros & Pawelec, 1997; Appay & Rowland-Jones, 2002). É importante aqui citar que a mortalidade e a incidência de AIDS aumentam de forma altamente relacionada à idade do paciente na época da soroconversão (*Collaborative Group on AIDS Incubation and HIV Survival* including the CASCADE EU Concerted Action*, 2000). Seria interessante investigar se a expansão de células CD8⁺CD57⁺, presente em indivíduos mais velhos, contribuiria para o pior prognóstico destes pacientes.

Se o papel funcional de células T CD8⁺CD57⁺ está relacionado à sua senescência, então poderíamos supor que células deste fenótipo, expandidas após estímulo antigênico, poderiam modular a replicação de HIV-1. Assim, perguntamos:

Células T CD8⁺CD57⁺ acumuladas após extensa ativação imunológica modulam a replicação de HIV-1?

Levando em consideração que a expansão de células CD8⁺CD57⁺ seria resultado de uma extensa ativação imunológica que por fim as tornariam senescentes, utilizamos em nosso estudo subpopulações CD57⁺ ou CD57⁻ purificadas a partir de culturas a longo prazo de PBMC estimuladas e re-estimuladas com mitógeno e alo-antígenos.

Nossos resultados mostraram que **ambas as subpopulações CD57⁺ e CD57⁻ (CD28⁺) de linfócitos CD8⁺ podem exercer atividade supressora sobre a produção de variante X4 de HIV-1 através de mecanismos diferentes.**

Enquanto células CD8+CD57+ suprimem a produção do vírus X4 HIV-1_{RF} ao inibir a proliferação celular, a atividade supressora de células CD8+CD57- (CD28+) sobre a replicação viral ocorre em presença de proliferação celular.

O potencial da subpopulação CD8+CD57+ inibir resposta proliferativa poderia contribuir para a manutenção de reservatórios de HIV-1 em células quiescentes durante a progressão da doença. Por outro lado, a possível associação entre a expansão de células CD8+CD57+ e a queda de contagem CD4 durante a progressão da infecção pelo HIV-1 merece ainda mais estudos. Em pacientes infectados com HIV-1, foi encontrada uma correlação inversa entre os números de células CD8+CD57+ e células T CD4+ ou razão CD4/CD8 (Piras *et al.*, 1990) ou nenhuma correlação com a depleção de CD4 (Mollet *et al.*, 1998). Porém, em pacientes com mieloma múltiplo (Frassanito *et al.*, 1998) ou imunodeficiência comum variável (Jaffe *et al.*, 1993a, 1993b) o aumento de linfócitos CD8+CD57+ foi associado a uma menor razão CD4/CD8.

A senescência de células CD8+CD57+ em nossas culturas foi comprovada pela ausência de capacidade proliferativa frente a estímulos mitogênicos ou em resposta à IL-2. Ainda assim, ambas as subpopulações apresentaram uma tendência a maior atividade supressora de replicação viral se expostas por um período de tempo mais longo à IL-2. Apenas para a subpopulação CD8+CD57- este aumento de inibição viral ocorreu em relação direta com a proliferação celular, sugerindo que estas células exercem melhor atividade antiviral quando ativadas.

Considerando que a atividade não citolítica anti-HIV exercida por fator antiviral de células CD8+ (CAF) é descrita não prejudicar a proliferação celular e é ativa contra as variantes X4 de HIV-1 (revisito por Yang & Walker, 1997 e Copeland, 2001), nossos resultados indicam a subpopulação CD8+CD28+CD57- como produtora deste fator. Em estudos anteriores, o papel de células CD8+CD57+ na inibição não citolítica da replicação viral é contraditório: Plaeger-Marshall *et al.* (1992) sugeriram inibição de replicação viral, Landay *et al.* (1993) não encontraram diferença significativa entre as subpopulações CD8+CD57+ e CD8+CD57-, ambas suprimindo a replicação viral. Por outro lado, este último grupo mostrou que o efeito supressor de células T CD8+ sobre a replicação de HIV-1 está associado ao fenótipo HLA-DR+ e CD28+, como também verificado por Barker *et al.* (1997), especialmente após a ativação de células CD8+CD28+ com anticorpos anti-CD28. Assim, corroboramos estes últimos trabalhos.

As células CD8+CD28+ poderiam ser responsáveis ainda por outra atividade antiviral não citolítica, já que células T CD8+ HIV-específicas não citolíticas (sem perforina) podem expressar β -quimiocinas antivirais, sugerindo que, em algumas circunstâncias, a síntese de β -quimiocinas (atividade não citolítica) pode divergir do fenótipo citolítico (Appay *et al.*, 2000). Mesmo em indivíduos normais, aproximadamente 60% das células T CD8+ que sintetizam MIP-1 β não possuem perforina. Estas células são predominantemente de fenótipo ativado/memória (Kamin-Lewis *et al.*, 2001).

Portanto, **a perda de expressão de CD28 e a expansão de células CD8+CD57+ são alterações fenotípicas de linfócitos T CD8+ que podemos relacionar à queda de atividade antiviral não citolítica** descrita durante a progressão da infecção pelo HIV-1 (Walker & Levy, 1989; Brinchmann *et al.*, 1990; Mackewicz *et al.*, 1991, Landay *et al.*, 1993). Em relação à atividade citolítica, embora células T CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 expressem perforina e funcionalmente podem exercer citotoxicidade, assim como produzem IFN- γ (Fiorentino *et al.* 1996, Ho *et al.* 1993, Borthwick *et al.* 1994, Dalod *et al.* 1996, Mollet *et al.* 1998, Lewis *et al.* 1999, Lieberman *et al.* 1999, Weekes *et al.* 1999a, 1999b; Eylar *et al.* 2001), também tem sido descrito que esta mesma subpopulação CD57+ de linfócitos CD8+ de pacientes seria capaz de inibir atividade citotóxica anti-HIV-1 (Joly *et al.* 1989, Autran *et al.* 1991, Sadat-Sowti *et al.* 1994a, 1994b).

A menor atividade funcional de linfócitos T CD8+ em estágios mais avançados da doença poderia ainda ser correlacionada à presença de células T CD8+ infectadas pelo HIV-1, especialmente na fase AIDS (Semenzato *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1996). A frequência de células CD8+ infectadas em sangue periférico e a sua contribuição para o total de carga proviral em PBMC aumentam com a progressão da doença. Em indivíduos com contagens de células CD4+ < 200/ μ l, a maioria das células infectadas do sangue periférico eram células dendríticas ou linfócitos CD8+ e, em alguns pacientes de AIDS, a infecção de células CD8+ contribuiu para 66-97% da carga proviral total (Livingstone *et al.*, 1996). Como ao longo da progressão da infecção pelo HIV-1 a diminuição da atividade antiviral de células T CD8+ parece ocorrer em paralelo à maior contribuição destes linfócitos para a carga proviral total, decidimos estudar se a infecção de células T CD8+ afetaria seu papel supressor não citolítico.

A infecção de células CD8+ por HIV-1 contribui para a replicação viral total através de sua própria produção e/ou por afetar sua atividade antiviral não citolítica?

Ao considerar o duplo papel de células T CD8+ como alvos de HIV-1 e supressores da replicação HIV-1, o equilíbrio entre ambas as atividades de linfócitos CD8+ talvez contribua para a produção viral líquida. Abordamos esta pergunta em nosso Estudo 3 e verificamos que **em pontos iniciais da cinética de co-culturas de células CD4+ e CD8+ purificadas, a atividade supressora de células T CD8+ prevaleceu sobre sua própria produção de HIV-1**. Entretanto, as co-culturas CD4+/CD8+ apresentaram níveis inferiores de produção do variante X4 HIV-1_{RF} que culturas de linfócitos T CD4+ ou culturas de linfócitos T CD8+ no mesmo ponto da cinética, sugerindo que **também os linfócitos T CD4+ exerceram supressão da replicação viral em células T CD8+ nas co-culturas CD4+/CD8+**.

Estudos anteriores mostraram que em fases tardias de culturas de PBMC ativadas por lectina, células CD8+CD4- são as principais células contendo HIV-1 ou DNA proviral SIV (De Maria *et al*, 1991; Montaner *et al*, 1990; Tsubota *et al*, 1989b), primeiramente explicado pelo contato íntimo entre as células T citotóxicas e suas células alvos (De Maria *et al.*, 1991, 1994, Mercure *et al.*, 1993). O pico da produção de vírus por tais células T CD8+ ocorreu cerca de 30 a 40 dias pós-infecção (Mercure *et al*, 1993; Montaner *et al*, 1990; Tsubota *et al*, 1989b). A re-estimulação destas células CD8+CD4- por anti-CD2 ou PHA induz replicação viral, demonstrando infecção produtiva (De Maria *et al*, 1991; Tsubota *et al*, 1989b), e pode propagar vírus para linfócitos CD4+ não infectados (De Maria *et al*, 1991). Em culturas de PBMC ativado por lectina infectadas pelo HIV-1 ou SIV, embora células CD4+CD8- portadoras do vírus diminuam com o tempo, células CD8+CD4- aumentam (Montaner *et al*, 1990; Tsubota *et al*, 1989b). Tal declínio em células T CD4+ em culturas infectadas poderia ser uma consequência da morte de células ou da redução da expressão de CD4.

Neste sentido, em nossas culturas, quando células CD4+ e CD8+ (purificadas de PBMC e, em seguida, estimuladas por PHA+IL-2 ou PHA+IL-15, antes da infecção com HIV-1_{RF}), foram comparadas, o **pico de produção do HIV-1 pelos linfócitos CD4+ precedeu o derivado de células CD8+, indicando a cinética mais lenta de replicação do HIV-1 em linfócitos CD8+**. Níveis de produção de HIV-1 por células CD8+ foram inferiores aos observados em culturas de células CD4+, provavelmente devido à baixa percentagem de linfócitos CD8+ produtivamente infectados (< 5 %, dados não mostrados). A carga proviral acumulada ao longo da cinética de

infecção foi maior em células CD4+ que CD8+, mesmo em culturas estimuladas com PHA e mantidas em presença de IL-2 ou IL-15, nas quais observamos maior produção viral por células CD8+ ao final da cultura. Assim, **apesar de células T CD8+ poderem se tornar reservatórios de HIV-1, as células CD4+ permaneceram como principal fonte do vírus.** Digno de nota, uma cinética mais lenta da replicação viral em linfócitos CD8+ do que em CD4+ também foi demonstrada para isolados CD8-trópico de HIV-1 (Saha *et al.*, 2001a).

A cinética lenta e a baixa susceptibilidade à infecção de células CD8+ observadas *in vitro* pode refletir a compartimentalização de seqüências de HIV-1 detectadas em linfócitos CD8+ e CD4+ *in vivo* (Livingstone *et al.*, 1996; McBreen *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2003). Com efeito, estudos recentes demonstraram que linfócitos CD8+ infectados *in vivo* podem conter isolados filogeneticamente distintos que mostram grau mais baixo de diversidade genética quando comparados às populações de linfócitos T CD4+ e monócito/macrófago infectados (Potter *et al.*, 2003). Estes dados podem significar uma menor população infectada, menores quantidades de vírus fundador e reduzido *turnover* viral. Isso é consistente com a observação de que a frequência de células CD8+ infectadas é relativamente estável ao longo da terapia anti-retroviral apesar da diminuição correspondente de linfócitos CD4+ infectados (McBreen *et al.*, 2001) e que eles exibem menos mutações resistentes à droga (Potter *et al.*, 2003).

A infecção por HIV-1 de células CD8+ mostrou-se dependente da molécula CD4, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes monoclonais anti-CD4 bloqueou completamente a produção de HIV-1. A co-expressão de CD4 em células T CD8+ dependente de ativação pós estimulação por lectina tinha sido documentada anteriormente (Blue, *et al.*, 1985), e muitos estudos têm descrito replicação de HIV-1 ou SIV em células T CD8+ após infecção *in vitro* de PBMC ativado por lectina (De Maria, *et al.*, 1991; Mercure, *et al.*, 1993; Montaner, *et al.*, 1990; Tsubota, *et al.*, 1989b). Assim, enquanto a infecção por HIV-1 de células CD8+CD4- purificadas de PBMC ativado não tenha sido possível, a menos que se co-cultive com CD4+CD8- autólogas anteriormente infectadas (De Maria, *et al.*, 1991), a expressão de CD4 induzida por ativação torna células T CD8+ então duplas positivas e suscetíveis a infecções por HIV-1. Isto, por sua vez, deve levar à supressão da expressão de CD4 de superfície (Kitchen *et al.*, 1997), gerando o fenótipo CD8+CD4- responsável por um segundo pico de produção de vírus em cultura (De Maria, *et al.*, 1991, Mercure, *et al.*, 1993; Montaner, *et al.*, 1990; Tsubota *et al.*, 1989b). A demonstração de que a infecção de células T CD8+ poderia ocorrer dependente da

co-expressão de CD4 veio de estudos posteriores. Em PBMC depletado de células CD4+ pode ser detectada a co-expressão transitória de CD4 por células CD8+ após estimulação com PHA e outros ativadores de célula T, incluindo anti-CD3 e superantígenos como enterotoxina B de *Staphylococcus* ou toxina da síndrome do choque tóxico-1. Tal estimulação tornou linfócitos CD8+ sensíveis à infecção pela variante X4 HIV-1_{IIIB}, que foi inibida por tratamento com o anticorpo monoclonal de CD4 (Flamand *et al.*, 1998).

Embora o modelo dependente de CD4 seja considerado o mecanismo dominante de infecção pelo HIV *in vivo*, interações entre env/co-receptor podem ocorrer *in vitro* na ausência de expressão de CD4. Este fenômeno foi observado com o HIV-2 (Endres, *et al.*, 1996; Potempa, *et al.*, 1997; Reeves, *et al.*, 1997) SIV (Edinger, *et al.*, 1997; Martin, *et al.*, 1997; Potempa, *et al.*, 1997) e HIV-1 (Bandres, *et al.*, 1998; Dumonceaux, *et al.*, 1998; Hesselgesser, *et al.*, 1997). No entanto, enquanto a eficiência da infecção independente de CD4 pelo HIV-2 é comparável ao SIV, ambas são nitidamente superiores às do HIV-1 (Reeves *et al.*, 1999). De fato, a eficiência da interação env/co-receptor para a maioria dos isolados de HIV-1 é muito baixa para que desempenhe um papel importante na infecção de células T CD8+ *in vivo*.

Um trabalho recente sugeriu que isolados de HIV-1 podem infectar diretamente células CD8+ usando a molécula CD8 ao invés de CD4 como um receptor primário (Saha *et al.*, 2001a). Dois isolados virais derivados *ex vivo* de clones de célula T CD8+ infectados por HIV-1 (Saha *et al.*, 2001a) promoveram infecção direta de células CD8+ *in vitro* independente de CXCR4 e CD4, mantendo a capacidade de infectar células T CD4+ (Saha *et al.*, 2001a). Prova de que estes isolados de HIV-1 usaram CD8 como receptor foram: 1) expressão de CD8 foi reduzida após a infecção; 2) anticorpos anti-CD8 bloquearam a entrada viral e sua replicação em células CD8+; e 3) células resistentes tornaram-se sensíveis após expressão de CD8. Estudos mais aprofundados são necessários para avaliar adequadamente a frequência de tais variantes em uma população mais ampla.

Citocinas γ são capazes de promover a infecção produtiva de células T CD8+ e/ou modular sua função antiviral não citolítica?

Em todos os estudos anteriores a manutenção dos linfócitos após ativação por lectina era realizada em presença da citocina IL-2. Uma vez que linfócitos T CD8+ podem atuar como reservatórios virais e contribuir para a compartimentalização do HIV-1 (MacBreen *et al.*, 2001;

Potter *et al.*, 2003), a possibilidade de usar citocinas γ como imunoterapias anti-HIV-1 levanta a questão de se existe um efeito diferencial dessas citocinas na produção de HIV-1 por células T CD8+ infectadas, e se isso afetaria a sua atividade antiviral. A IL-2 já havia sido relatada aumentar a supressão antiviral mediada por células CD8+, como também outras citocinas Th1, como IFN- γ , enquanto a IL-4 e a IL-10 não (Barker *et al.* 1995, Kinter *et al.* 1995a, 1995b, revisões de Clerici & Shearer 1993, 1994, Kinter *et al.* 1996a, 2000, Levy *et al.* 1996). Procuramos então analisar se citocinas γ IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 promovem a produção de HIV-1 por células CD8+ T e portanto afetariam como resultado a sua função antiviral.

Nossos resultados mostraram que **citocinas γ IL-2 e IL-15 promovem o papel dual de células T CD8+ como alvos e supressores da replicação do HIV**. IL-2 e IL-15, que compartilham além da cadeia comum γ de seu receptor, também a cadeia β , promovem a infecção produtiva de células T CD8+ previamente ativadas com a lectina PHA, bem como dão suporte à sua atividade antiviral não citolítica, suprimindo a replicação do variante X4 HIV-1_{RF} em co-culturas CD4+/CD8+. As células T CD8+ estimuladas com a lectina PHA e mantidas em presença das citocinas IL-2 ou IL-15 produziram HIV-1_{RF} em níveis mais elevados do que aquelas mantidas em presença de IL-4 ou IL-7. Em concordância com os níveis de produção de vírus observados nestas culturas, a co-expressão de CD4 em células CD8+ ativadas por PHA foi estatisticamente mais significativa em culturas estimuladas na presença de IL-2 e IL-15 do que na presença das citocinas γ IL-4 e IL-7. Por outro lado, encontramos altos níveis de expressão de CD4 e CXCR4, co-receptores essenciais para a entrada do variante X4 de HIV-1, em células CD8+ mantidas em presença de IL-4 sem ativação mitogênica prévia, porém não detectamos infecção produtiva dessas células. Estes dados demonstraram que **a infecção produtiva de células CD8+ é dependente não apenas da expressão de CD4 e co-receptor, mas também do estímulo e das citocinas presentes no ambiente**, já que a expressão de CD4 e CXCR4 não foi suficiente para determinar a infecção produtiva de células CD8+ por variante X4 de HIV-1.

Estímulos essenciais para os linfócitos T são o reconhecimento de antígeno via TCR e a interação CD28-B7, e estes são capazes de induzir a co-expressão de CD4 em células T CD8+ como demonstrado através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD3 ou anti-CD3/anti-CD28 para ativar linfócitos T CD8+ (Flamand *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 1998). Estas ligações ocorrem durante a interação com células apresentadoras profissionais, e, de fato, o contato com

células dendríticas alogeneicas torna as células T CD8+ susceptíveis à infecção produtiva por HIV-1 (Kitchen *et al.*, 1998).

Como o controle da replicação viral por células T CD8+ é menor em modelo de co-cultura de linfócitos CD4+ com células dendríticas (Barker *et al.*, 1996; Rubbert *et al.*, 1997; Severino *et al.*, 2000), especialmente se os linfócitos CD8+ adicionados a esta co-cultura forem aloreativos ou se tiver utilizado ativadores policlonais (Barker *et al.*, 1996), supomos que as células T CD8+ pudessem contribuir para a maior produção viral nestas situações, já que são estímulos capazes de induzir a co-expressão de CD4. Por isso, conduzimos o nosso Estudo 4, procurando responder às perguntas abaixo:

Linfócitos T CD8+ seriam infectados produtivamente quando co-cultivados com células dendríticas autólogas “pulsadas” com HIV-1? Isso levaria a uma menor atividade antiviral das células T CD8+ quando em contato com linfócitos T CD4+ e células dendríticas?

De acordo com os trabalhos anteriores, **células T CD8+ apresentam menor atividade antiviral em presença de células dendríticas alogeneicas**, o que mostramos estar **associada à infecção produtiva destes linfócitos T CD8+ pelo HIV-1**.

A ativação CD28/B7 parece ser importante para a indução de expressão de co-receptores de HIV-1 e, conseqüentemente, para a infecção produtiva de células T CD8+, pois ocorre maior produção de HIV-1 do tipo X4 em células CD8+CD28+ que CD8+CD28-, que apresentam maior expressão de CD4 e de co-receptor CXCR4 após interação com células dendríticas alogeneicas ou autólogas. Pela primeira vez, mostramos produção viral por linfócitos T CD8+ em contato com células dendríticas autólogas previamente pulsadas com HIV-1, sugerindo que células CD8+ também poderiam ser trans-infectadas como ocorre com linfócitos CD4+ (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). Infecção dessas células CD8+ pode ser explicada pela co-expressão de CD4 e CXCR4, provavelmente com o suporte da interação CD28/B7, uma vez que as células CD8+CD28+ apresentaram níveis mais altos de co-receptores e produtividade de HIV-1 do que as células CD8+CD28-.

Qual seria o papel de IL-15 na modulação da replicação viral quando linfócitos T CD4+ e CD8+ interagem com células dendríticas?

IL-15 promove a produção viral, bem como a atividade antiviral de células T CD8+, em co-culturas de células dendríticas com linfócitos T autólogos. O uso de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-15 diminuiu a atividade RT em co-culturas DC/CD4+, indicando que a **IL-15 endógena promove produção viral em células CD4+ em contato com células dendríticas autólogas.** Por outro lado, nós só detectamos produção viral em co-culturas autólogas DC/CD8 na presença de IL-15 exógena. Entretanto, a adição de IL-15 promoveu uma menor produção viral em co-culturas DC/CD4/CD8 do que em co-culturas DC/CD4, sugerindo que **a adição de IL-15 promove simultaneamente a atividade antiviral e a produtividade de HIV-1 em células T CD8+ quando em contato com linfócitos T CD4+ e células dendríticas autólogas.** Portanto, muito embora a IL-15 promova produção viral por células CD4+ ou CD8+, essa citocina γc parece ser um estímulo importante para a atividade antiviral CD8+, merecendo pesquisa mais aprofundada como potencial imunoterapêutica.

Ainda corroborando nossos dados do Estudo 3, observamos que **em presença da citocina IL-15, a subpopulação CD28+ de linfócitos T CD8+ apresenta melhor atividade antiviral que a subpopulação CD28-, embora sejam mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1 quando em contato com células dendríticas “pulsadas” com o vírus.**

Por fim, discutiremos:

Como entendemos a participação de células T CD8+ na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 à luz de nossos resultados e da literatura?

Para melhor compreender a interrelação entre HIV-1 e células T CD8+, esquematizamos a seguir (figura D.1) os vários aspectos fenotípicos e funcionais dos linfócitos CD8+ abordados nesta tese e os discutimos abaixo:

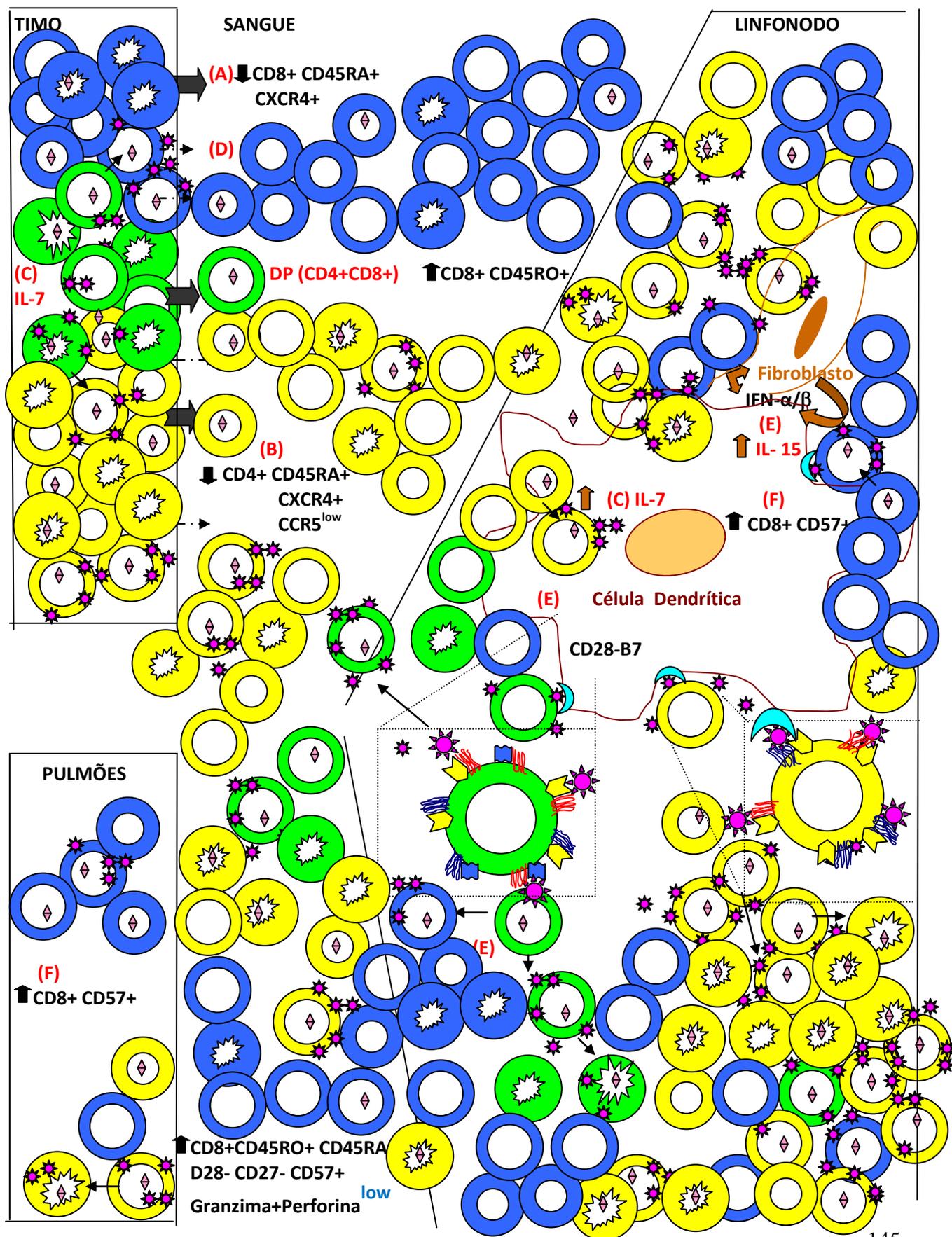
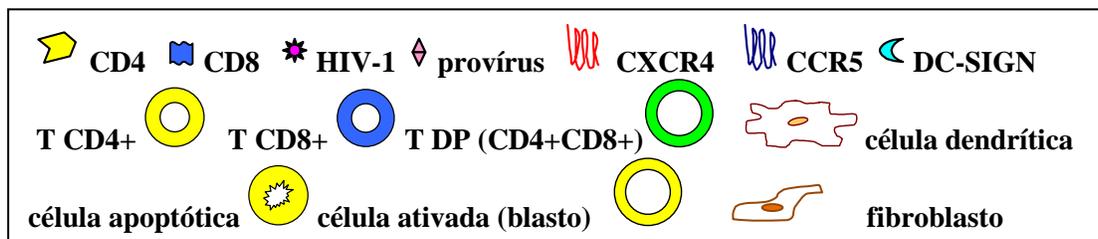


Figura D. 1. Modelo de imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 que considera a infecção de células T CD8+ (CD4-CD8+ ou CD4+CD8+). Legenda:



(A) A **diminuição de células *naive* CD8+ CD45RA+** observado em nossas culturas (fig. 1.1), em especial durante infecção por vírus X4, parece ser um paralelo ao que ocorre *in vivo*, provavelmente porque linfócitos *naive* são preferencialmente infectados via CXCR4 pela sua alta expressão deste co-receptor em comparação a CCR5 (Bleul *et al.*, 1997).

(B) Considerando que linfócitos T de cordão umbilical são representativos de emigrantes tímicos recentes, a **maior queda de contagem CD4+ de neonatos** que de adultos observada em nossas culturas poderia ser explicada pelo fato de timócitos CD4+ simples-positivos (SP), ou duplo-positivos (DP), apresentarem expressão maior de CXCR4 que CD8+ SP (Taylor *et al.*, 2001). A frequência de células CD4+CD45RA+ infectadas por vírus X4 *in vivo* foi correlacionada à taxa de depleção de linfócitos T CD4+ (Blaak *et al.*, 2000), sugerindo que a infecção de células *naive* por HIV-1 X4 deve interferir na produção de células CD4+.

(C) Os níveis da **citocina γ IL-7** são inversamente relacionados à contagem CD4. Altos níveis de IL-7 podem ser gerados em condições linfopênicas, ressaltando sua importância como regulador endógeno da homeostasia T. Na infecção pelo HIV, IL-7 é produzida por células dendríticas em tecidos linfóides periféricos com depleção de células T, e níveis plasmáticos altos foram associados a uma carga viral aumentada (Napolitano *et al.*, 2001).

É possível que IL-7 contribua para a produção preferencial de variantes X4, e consequentemente para a progressão da doença, pois induz a expressão de CXCR4 em PBMC (Llano *et al.*, 2001) ou células T de memória CD4+CCR7+ (Jourdan *et al.*, 2000). Em nosso estudo, observamos que células CD8+ purificadas de PBMC e mantidas em presença de IL-7 apresentam altos níveis de expressão de CXCR4, além de aumentarem sua expressão de CCR5

(fig. 3.4). Ainda assim, IL-7 promoveu pouca produção do variante X4 HIV-1_{RF} em células T CD8+ ativadas (fig. 3.1) em contraposição à produção viral de células CD4+, CD8dPBMC ou PBMC em presença desta citocina (fig.3. 5).

Não podemos afirmar se a menor produção de HIV-1 em culturas de células CD8+ purificadas seria devido aos efeitos de IL-7 ao induzir a atividade citotóxica de células T CD8+ (Hickman *et al*, 1990), inclusive HIV-específica (Carini & Essex, 1994; Ferrari *et al.*, 1995). Por outro lado, mostramos atividade supressora de replicação viral não citolítica em presença de IL-7 (figura 3.7), corroborando trabalho anterior de Smithgall *et al.* (1996). Mesmo durante a supressão da replicação viral, IL-7 parece manter as células CD4+ e CD4-CD8- como principais células produtoras de HIV-1 (figura 3.8B).

Observamos uma maior tendência à produção de HIV-1 do tipo X4 por células CD4+ de neonatos (consideradas *naive*) sem estímulo prévio por mitógeno em presença de IL-7 que IL-2 ou IL-15 (fig.3.6), o que poderia ser explicado pelo fato desta citocina estimular melhor a proliferação de células *naive* que IL-2 ou IL-15 (Soares *et al.*, 1998). Entretanto, outros trabalhos mostraram que IL-7 pode tornar células T CD4+ suscetíveis à infecção por HIV-1 independente da estimulação de sua proliferação (Unutmaz *et al.*, 1999; Dardalhon *et al.*, 2001). Mais recentemente, demonstrou-se que a IL-7 estimula a produção de vírus por células T CD4+ latentemente infectadas (Scripture-Adams *et al.*, 2002). Ainda se considerarmos que linfócitos T CD4+ de cordão umbilical seriam representativos de linfócitos CD4+ recentemente emigrados do timo, IL-7, junto com TNF- α , é importante para a replicação de HIV-1 em timócitos maduros CD4+CD8-CD3+ que interagem com células epiteliais tímicas (Chene *et al.*, 1999) e favorece a persistência de vírus nestes timócitos maduros CD4+ através de continuada indução de Bcl-2 (Guillemard *et al.*, 2001). De fato, apesar de retardar a depleção de timócitos imaturos, IL-7 aumenta a carga viral (Uittenbogaart *et al.*, 2000). Em nossas culturas, também observamos uma proporção mais elevada de células CD4+ em presença de IL-7 (dados não mostrados).

Por outro lado, a administração de IL-7 em camundongos aumentou a proliferação basal de células T CD4+ e T CD8+ em 4 e 14X respectivamente, provocando um aumento desproporcional de células T CD8+ e alteração da relação CD4/CD8 (Geiselhart *et al.*, 2001). A possibilidade de IL-7 contribuir para a expansão de células CD8+ e inversão da relação CD4/CD8 observadas na infecção pelo HIV-1 deve ser ainda estudada, pois foi detectada menor expressão de IL-7R α em células T CD8+ de pacientes infectados (Vingerhoets *et al.*, 1998).

(D) As **alterações fenotípicas mais significativas em células de neonatos** que de adultos (Estudo 1) poderiam ser devidas à própria **infecção de linfócitos T CD8+ *naive***. De fato, observamos que células CD8+ *naive* de neonatos são passíveis de infecção produtiva por variante X4 de HIV-1, embora em níveis bem menores que linfócitos CD8+ de adultos (figuras 3.5 e 3.6).

A menor capacidade de replicação de HIV-1 em células *naive* provavelmente ocorre pelo seu estado menos ativado (Chun *et al.*, 1998, Roederer *et al.*, 1997; Spina *et al.*, 1997). Também em neonatos as células CD4+CD45RO+ seriam as predominantemente infectadas (Sleasman *et al.*, 1996). Por outro lado, Blaak *et al.* (2000) encontraram variantes R5 principalmente em células CD45RO+ e X4 igualmente distribuídos em células CD4+ CD45RO+ e CD45RA+. (B).

Em relação às células CD8+ neonatais, enquanto Yang *et al.* (1998) mostraram que podem ser produtivamente infectadas com variantes R5 de HIV-1, mas não X4, Kitchen *et al.* (1998) detectaram maior co-expressão de CD4 nestas células CD8+ *naive* e suscetibilidade à infecção por vírus X4.

A indução preferencial da expressão de CD4 em células CD8+CD45RA+ e posterior susceptibilidade à infecção *in vitro* (Yang *et al.*, 1997) refletiria a predominância *in vivo* de acúmulo proviral em linfócitos T CD8+ CD45RA+ em vez de em células CD45RO+ em alguns indivíduos infectados (McBreen *et al.*, 1998). Provírus de HIV-1 (X4 e R5) foram detectados em timócitos CD8+CD4- de camundongos SCID-hu e em modelos *in vitro* de infecção (Kitchen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Stanley *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1995; Uittenbogaart *et al.*, 2000). No entanto, timócitos maduros CD3^{high}CD4-CD8+ não parecem ser diretamente sensíveis a infecção por HIV-1, mesmo em co-cultura com timócitos CD4+ infectados (Lee *et al.*, 1997), sugerindo que essas células podem ter sido infectadas numa fase anterior em seu desenvolvimento. Na verdade, as células T CD8+ expressam CD4 naturalmente durante a maturação intratímica. Kitchen *et al.* (1997) demonstraram que tais células DP são suscetíveis à infecção produtiva por HIV-1 e que algumas destas continuam sua diferenciação em timócitos maduros CD3^{high}CD8+. Curiosamente, embora o HIV-1 seja encontrado predominantemente em timócitos CD4+, um isolado de HIV-1 foi associado a uma maior carga viral nos timócitos CD8+ do que CD4+, porém seu provírus não foi detectado nos esplenócitos CD8+, sugerindo que tais timócitos CD8+ não emigraram para órgãos periféricos e muito provavelmente foram eliminados antes de deixarem o timo (Lee *et al.*, 1997). Assim, a infecção por HIV-1 de timócitos CD8+ e sua eliminação subsequente pode contribuir para o declínio generalizado de células T CD8+ *naive*

observado nos indivíduos infectados com HIV-1 (Rabin *et al.*, 1995; Roederer *et al.*, 1995). Por outro lado, a diferenciação bem-sucedida destas células pode contribuir para níveis aumentados de células T CD8+CD45RA+ infectadas por HIV-1 na circulação periférica (McBreen *et al.*, 1998). As observações de que regiões V3 de HIV-1 em células CD8+ eram parcialmente ou completamente diferentes daqueles recuperados de células CD4+ (seqüências V3 foram geralmente não diferenciadas entre as populações CD4+ CD45RA+ ou CD45RO+) levaram a sugestão de que a infecção por HIV-1 de células T CD8+ ocorre preferencialmente durante a maturação intratímica (Kitchen *et al.*, 1998). A ativação antigênica conduziria à distribuição destas seqüências únicas entre populações CD8+ efectoras e de memória. De acordo com esta hipótese observou-se que a infecção por HIV-1 de células CD8+CD45RA+ parecia estar inativa e freqüências de células CD8+ infectadas foram estáveis durante terapia anti-retroviral. Na verdade, células CD45RA+ infectadas podem ser exportadas do timo em um estado latente, e o vírus permanecer em latência até estímulo do receptor de células T (TCR) (Brooks *et al.*, 2001).

Contrário a este argumento é a observação de que células de memória CD45RO+ podem reverter para um fenótipo CD45RA+ (Hamann *et al.*, 1997, Hamann *et al.*, 1999a) e linfócitos T CD8+ efetores podem apresentar um fenótipo CD27-CD45RA+CCR7- (Campbell *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999). Assim, ambas a infecção intratímica e a periférica de células T CD8+ poderiam dar origem à detecção preferencial da infecção por HIV-1 dentro das células T CD8+CD45RA+. No entanto, seria esperado que a estimulação periférica de células CD8+ na infecção por HIV-1 mantivesse a co-expressão de CD45RO e CD4 (Imlach *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2001). Na verdade, um segundo estudo pelo mesmo grupo demonstrou que co-expressão de CD4 foi encontrada principalmente em células CD8+ com fenótipo ativado (CD69+, CD71+) expressando CD45RO ou CD45RO e CD45RA em sua superfície. Estas células CD4+CD8+CD45RO+ apresentaram elevada freqüência de infecção por HIV-1 *in vivo* (Imlach *et al.*, 2001). Dados discrepantes entre esses dois estudos podem ser reflexo de métodos diferentes de isolamento de linfócitos CD8+. Em ambos os estudos, linfócitos CD8+ foram isolados pela tecnologia imunomagnética. No primeiro estudo (McBreen *et al.*, 2001) linfócitos CD8+ foram isolados primeiro removendo todas as células expressando CD4, demonstrando a infecção de HIV-1 de linfócitos CD8+ CD4-linfócitos. No segundo estudo, o enriquecimento foi usado para isolar linfócitos SP e DP CD8+. Verificou-se que linfócitos CD8+ co-expressando CD4

apresentaram a infecção em 5/8 indivíduos, ao mesmo tempo que linfócitos CD8+CD4- só foram infectados em 2/8 indivíduos e em uma menor frequência (Imlach *et al.*, 2001).

Estes dados sugerem que **células T CD8+ infectadas com HIV-1 são geradas por meio de infecção de células T CD8+ ativadas**, em vez de exportação de precursores infectados no timo. O peso das evidências *in vitro* indica que essa infecção por HIV-1 de linfócitos CD8+ depende muito provavelmente de CD4, possivelmente induzida na periferia por ativação de células T CD8+ (Flamand *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997).

(E) Células dendríticas contribuem para a ativação e infecção de células T CD4+ e CD8+ provavelmente por um conjunto de interações, tais como partículas de HIV-1 aderidas à molécula DC-SIGN, apresentação de antígenos específicos de HIV-1, ligação CD28-B7, e produção de citocinas estimulatórias.

A co-expressão de CD4 pode ser induzida em células T CD8 + por contato com células dendríticas alogeneicas ou ligação cruzada de CD3 e CD28 (Yang, *et al.*, 1997; Kitchen *et al.*, 1998). Células CD8+ estimuladas dessa maneira expressam CXCR4 e CCR5 e são sensíveis à infecção por HIV-1. Segundo Jourdan *et al.* (2000), o aumento de expressão de CXCR4 pela interação com células dendríticas autólogas seria dependente das interações CD40-CD154 e CD134-CD134L, talvez facilitada quando as células CD8+ são CD28+. É interessante notar que se durante a interação com células dendríticas autólogas houvesse ativação de CD3, prevenia-se a indução de expressão de CXCR4 neste estudo (Jourdan *et al.*, 2000), o que pode ser interpretado como um fenômeno similar aos nossos resultados de menor expressão de CXCR4 por células CD8+CD28+ quando em contato com células dendríticas alogeneicas Além da maior expressão de CD4 e CXCR4, outro fator que explicaria a maior produtividade da subpopulação CD8+CD28+ seria o fato de, reconhecidamente, os linfócitos T CD8+CD28+ serem mais capazes de proliferar que os linfócitos CD8+CD28- (Efros *et al.* 1996), o que facilitaria a replicação viral na subpopulação CD28+.

Células T CD8+ poderiam ainda ser infectadas por um mecanismo semelhante ao que ocorre para células T CD4+ ao entrar em contato com células dendríticas, em *trans* via DC-SIGN. Células dendríticas podem reter vírus infecciosos em sua superfície por longos períodos de tempo (Weissman *et al.*, 1995). Este fenômeno parece envolver a molécula DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*, ou CD209), a qual permite que células T CD4+ sejam

infectadas em *trans* (Geijtenbeek *et al.*, 2000a, 2000b). O vírus HIV-1 adere-se firmemente às células dendríticas imaturas pela ligação de gp120 à molécula DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000a, 2002). Esta interação não resulta em infecção produtiva das DCs pelo HIV-1, e sim permite que o vírus seja carregado aos linfonodos regionais, onde estas células interagem e ativam os linfócitos T CD4+, facilitando sua infecção em *trans*. De fato, as células T CD4+ não são infectadas por baixos títulos virais sem a ajuda de DC-SIGN *in trans* (Geijtenbeek *et al.*, 2000a).

Células T CD8+CD4- isoladas também são suscetíveis a HIV-1 se co-cultivadas com células T CD4+ anteriormente infectadas (De Maria *et al.*, 1991). Estudos recentes relatam que a infecção por HIV-1 de células CD4- mediada por *trans*-receptor requer contato direto entre células CD4- expressando co-receptor e células CD4+ (Speck *et al.*, 1999). Tal infecção por HIV-1 é dependente de moléculas de CD4 e CCR5 ou CXCR4 expressas em células vizinhas que colaboram em *trans* para permitir a fusão célula/vírus. Isso pode representar um processo em potencial de entrada do HIV-1 em células CD8+ durante a infecção pelo HIV-1. Em outro estudo, células T CD8+CD4- específicas para HIV-1 *nef* tornaram-se infectadas na interação com células alvo B linfoblastóides HIV-1+, sugerindo que células T CD8+ tornam-se infectadas, pelo menos *in vitro*, durante a eliminação dos alvos HIV-1+ (De Maria *et al.* 1994). A extensão na qual isto ocorre *in vivo* é difícil de ser medida.

A expressão *de novo* de CD4 em células CD8+ é uma resposta comum à ativação. É provável que tenha profundas conseqüências na infecção por HIV-1, em que um aumento de células CD8 + T ativadas, associado à progressão da doença, pode ampliar o número de alvos potenciais. De fato, enquanto uma pequena percentagem de células DP T pode ser detectada em indivíduos normais (Blue, *et al.*, 1985), vários estudos têm relatado o aumento da capacidade desta subpopulação de DP em pacientes infectados por HIV-1 (Imlach *et al.*, 2001; Radkowski *et al.*, 1996; Ribrag *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1998). A percentagem mais elevada de DP em símios (Currier *et al.*, 1991; Dean *et al.*, 1996) pode explicar por que a infecção por SIV é freqüentemente observada em células T CD8 + de macacos (Dean *et al.*, 1996).

As citocinas produzidas durante as respostas imunes contra antígenos de HIV-1 e outros podem contribuir para aumentar o *status* de ativação de células produtoras de vírus, incluindo os linfócitos T CD8+. Neste sentido, nós encontramos que a **IL-2** e a **IL-15** dão suporte à produção de HIV-1_{RF} por células CD8+ ativadas, bem como à sua atividade antiviral, sugerindo que estes

linfócitos T CD8+ exercem um papel dual na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, como alvos e supressores da replicação viral. Para células CD8+ não-ativadas, **IL-7** e **IL-15** parecem contribuir mais para seu papel na inibição da produção viral.

O *status* de ativação é tido como uma condição *sine qua non* para a replicação do vírus HIV-1 (Zack *et al.*, 1990; Bukrinsky *et al.*, 1991), de tal forma que as co-infecções levam ao aumento da carga viral em pacientes (revisito por Lawn *et al.*, 2001). Parece-nos que **o status de ativação de células T CD8+ pode determinar uma delicada interação entre sua susceptibilidade à infecção produtiva por HIV-1 e sua atividade antiviral.** O *status* de ativação, influenciado pelas citocinas do ambiente, podem afetar ambos os papéis das células CD8+ como alvos e supressores de replicação viral. Com efeito, células CD4+CD8+ ativadas apresentam ampliado produção de β -quimiocinas (MIP-1 α/β , RANTES) *in vitro* (Zloza *et al.*, 2003). Tal produção de β -quimiocinas induzida por ativação pode de alguma forma explicar a replicação preferencial de cepas X4 de HIV-1 em células T CD8+ ativadas que co-expressam CD4, bem como CXCR4 e CCR5 (Zloza *et al.*, 2003).

Co-infecções podem também contribuir como um mecanismo alternativo para infecção de linfócitos CD8+ independente de CD4 quando ocorre a produção de pseudotipos virais. Lusso *et al.* (1990) observaram que células T humanas co-infectadas com HIV-1 e HTLV-II ou HTLV-I geraram progênie de partículas virais de fenótipo misto, permitindo a penetração de partículas virais em células humanas CD4-, incluindo linfócitos T maduros CD8+. Foi demonstrado que essa infecção era independente de CD4, pois anticorpos monoclonais anti-CD4 neutralizantes não conseguiram bloquear a entrada do HIV-1, e ao mesmo tempo, a neutralização do soro anti-HTLV-I humano aboliu a infecção. Embora a infecção de células CD8+ verdadeiramente independente de CD4 possa ocorrer em culturas co-infectadas, não existem provas suficientes para sugerir que tais mecanismos possam ser responsáveis pela infecção significativa de células T CD8+ *vivo*. Na verdade, a incidência de co-infecção por HTLV-1 é demasiadamente baixa para ser responsável pela infecção por HIV-1 de células T CD8+ na maioria dos indivíduos infectados por HIV-1 (Fields, *et al.*, 2001). No entanto, a infecção por HTLV-1 está aumentando em todo o mundo, especialmente entre usuários de drogas intravenosas (UDI), de forma que pode ser de até 15-30 % em algumas populações de UDI infectadas por HIV-1, como visto no Brasil (Brites *et al.*, 1997; De Araujo *et al.*, 1994; Guimaraes, *et al.*, 2001), merecendo mais investigações.

Produção do pseudotipo viral poderia explicar manifestações precoces da susceptibilidade à infecção por HIV-1 dos clones de células CD8+ transformados por HTLV-I (De Rossi *et al.*, 1986) e linhagens CD8+CD4- derivadas de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-I (Shoji *et al.*, 1991). No entanto, Macchi *et al.* (1993) demonstraram que essa infecção por HTLV-1 do PBMC de adultos humanos ou de linfócitos CD8 + purificados deram origem a células ativadas CD45RO+ CD4+CD8+. Estes dados sugeriram que neste caso a infecção de células CD8+ pode ser dependente da expressão de CD4. Curiosamente, a infecção por HHV-6 também induz expressão *de novo* de RNA mensageiro para CD4 em células CD8 + T maduras, tornando-as sensíveis a infecção por HIV-1 (Lusso *et al.*, 1990). Apesar da alta soroprevalência de HHV6 mundo afora, e do fato de que HHV-6 tem sido frequentemente isolado dos doentes com AIDS (Lusso & Gallo, 1995), tal mecanismo não é capaz de se responsabilizar pela infecção de HIV-1 dos linfócitos CD8+ em todas as situações. Na verdade, células CD8+ infectadas por HIV-1 nos pulmões descritas por Semenzato *et al.* (1994) não eram co-infectadas pelo HHV-6. No entanto, é possível que pacientes co-infectados por HIV-1 e HTLV-I ou HHV-6 possam apresentar uma frequência mais alta de CD8+ células abrigando HIV-1, talvez contribuindo para sua disfunção ou esgotamento. Neste sentido, pacientes co-infectados com HTLV-1 muitas vezes apresentam nível mais avançado de progressão da doença (Brites *et al.*, 1997; Schechter, *et al.*, 1994), carga viral superior (Brites *et al.*, 1998) ou sobrevivência por período mais curto (Brites *et al.*, 2001; Pedral-Sampaio, *et al.*, 1997) que os infectados pelo HIV-1 por si só.

HIV-1 proviral foi encontrado em células CD8+CD4- pulmonares durante inflamação crônica das vias respiratórias inferiores (Semenzato, *et al.*, 1995) caracterizada por um afluxo maciço de CTL específicas para HIV-1, sugerindo que o *status* de ativação destas células promove a infecção. Embora a expressão de CD4 não tivesse sido detectada em sua superfície, foi demonstrado que essas células CD8+ expressam RNA para CD4.

(F) A expansão de células CD8+CD57+ parece correlacionada à menor atividade antiviral.

Outra marca registrada da infecção por HIV-1 é a expansão de células T CD8+CD28-, (Borthwick *et al.*, 1994; Choremi-Papadopoulou *et al.*, 1994; Mugnaini *et al.*, 1999; Roos *et al.*, 2000; Vingerhoets *et al.*, 1995; Zaunders *et al.*, 1995). A infecção preferencial e a subsequente deleção de células CD8+CD28+, talvez devido ao aumento da co-expressão de CD4 em resposta à ativação de CD3/CD28 ou ao contato com células dendríticas, pode contribuir para a disfunção

observada dessas células (Borthwick *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1994; Mugnaini *et al.*, 1999; Trimble *et al.*, 2000; Vingerhoets *et al.*, 1995) e aparente maior expansão de células CD8+CD28- (Trimble *et al.*, 2000), provavelmente CD57+. Vingerhoets *et al.* (1997) observaram que células T CD8+, e não células T CD4+, apresentaram hiporesponsividade à ativação mediada por CD28 ou CD40L em indivíduos infectados por HIV-1, com menor proliferação e menor produção de citocinas, o que pode ocorrer pela queda da subpopulação CD8+CD28+ nestes pacientes.

Recentemente, descobrimos que mesmo que células CD8+CD28+ sejam mais suscetíveis à infecção produtiva por variante X4 HIV-1_{RF} que CD8+CD28- após contato com células dendríticas, estes linfócitos também exercem forte supressão da replicação viral, corroborando a noção que o *status* de ativação é essencial para o duplo papel de células T CD8+ como alvos de HIV-1 e efetores. Nossos dados estão em conformidade com os resultados anteriores mostrando este fenótipo como fonte de atividade de CAF" (Barker *et al.*, 1997; Landay *et al.*, 1993; Levy *et al.*, 1996). É importante observar que a expressão de CD28 em células CD8+ declina durante progressão da infecção por HIV-1 (Choremi-Papadopoulou *et al.*, 1994; Mugnaini *et al.*, 1999; Trimble *et al.*, 2000; Vingerhoets *et al.*, 1995), bem como a atividade CAF" (Barker *et al.*, 1996; Landay *et al.*, 1993; Mackewicz & Levy, 1992). Resta ainda determinar se a infecção de células T do CD8+CD28+ pelo HIV-1 contribui para o esgotamento desta subpopulação (Giorgi *et al.*, 1999; Margolick *et al.*, 1995; Roederer, 1998).

O aumento da subpopulação CD8+CD57+ (ou CD28-) também poderia ser uma causa da inibição da atividade citotóxica de CTL em infecção por HIV-1. Já foi demonstrado que esta subpopulação é capaz de inibir atividade citolítica (Autran *et al.*, 1991; Sadat-Sowti *et al.*, 1991, 1994a; Mollet *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994), inclusive HIV-específica (Autran *et al.*, 1991; Joly *et al.*, 1989; Sadat-Sowti *et al.*, 1994a, 1994b). Em pacientes com AIDS, a eficiência lítica de CTL anti macrófagos alveolares e células expressando antígenos HIV pode ser inibida por um fator supressor produzido por células CD8+CD57+ alveolares. O declínio de atividade CTL alveolar anti-HIV ocorre em paralelo com o aumento local de células CD8+CD57+ (Autran *et al.*, 1991; Joly *et al.*, 1989).

A subpopulação CD8+CD57+ de indivíduos infectados com HIV-1, bem como de pacientes de mieloma múltiplo (MM) ou receptores de transplante de medula óssea, inibe a resposta proliferativa induzida por PWM através de fator solúvel (revisado por Wang & Borosysiewicz, 1995, Frassanito *et al.*, 1998). Curiosamente, células CD8+CD57+ de pacientes

MM também inibem a proliferação espontânea (Frassanito *et al.*, 1998), e células CD8+CD57+ de pessoas saudáveis suprimem a proliferação de células T induzida por antígenos (Landay *et al.*, 1983). Se essa mesma atividade fosse detectada na subpopulação CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1, nós poderíamos supor que sua expansão durante a progressão da doença pudesse contribuir para a manutenção de reservatórios de HIV-1 em células quiescentes. A esse respeito, é importante notar que aumentos percentuais de CD8+CD57+ parecem estar associados a uma menor razão CD4/CD8 em pacientes apresentando MM (Frassanito *et al.*, 1998) ou imunodeficiência comum variável (Jaffe *et al.*, 1993a, 1993b). Em pacientes infectados com HIV-1, foi encontrada uma correlação inversa entre os números de células CD8+CD57+ e células T CD4+ ou a razão CD4/CD8 (Piras *et al.*, 1990) ou nenhuma correlação com a depleção de CD4 (Mollet *et al.*, 1998).

A capacidade de células CD8+CD57+ suprimir a produção de HIV-1 em associação à inibição da proliferação celular está em concordância com o conceito de que a ativação celular favorece a replicação do HIV-1 (revisito por Lawn *et al.*, 2001). Esses resultados indicam a possibilidade de que células CD8+CD57+ de pacientes infectados com HIV-1 possam exercer atividade antiviral através da inibição da resposta proliferativa de células infectadas. Entretanto, ainda é necessário abordar essa questão em experimentos *ex vivo*, já que as atividades supressoras desta subpopulação diferem dependendo da fonte dessas células.

Portanto, o efeito direto da infecção por HIV-1 de linfócitos T CD8+ na progressão da doença continua a ser difícil de quantificar. O prejuízo à população de células CD8+ é multifatorial (revisões por Lieberman *et al.*, 2001; McMichael, 2000; McMichael & Rowland-Jones, *et al.*, 2001); a importância da infecção direta destas células para as alterações fenotípicas e funcionais observadas, ou até mesmo a depleção, exige mais investigação.

Os relatos conflitam sobre a associação relativa entre a frequência de células CD8+ infectadas, o estado da doença e a contagem de CD4 (Imlach *et al.*, 2001; Livingstone, *et al.*, 1996; Marodon *et al.*, 1999; McBreen *et al.*, 2001). Assim permanece indefinido se há uma associação entre a restrição de células alvo devido à depleção dos linfócitos CD4+ e a replicação do HIV-1 em células T CD8+ durante a progressão da doença, tal como sugerido por Livingstone *et al.* (1996). Além disso, a distribuição relativa de provírus em células CD8+ ativadas (Imlach *et*

al, 2001), que poderia contribuir para a carga viral, e linfócitos CD8+ CD45RA+ com infecção latente (Imlach *et al*, 2001; McBreen *et al*, 2001), continua a ser controversa.

Em alguns pacientes, linfócitos CD8+ infectados contribuem para uma maior proporção da carga proviral global que células CD4+CD8- (Imlach *et al*, 2001; Livingstone, *et al*, 1996; Marodon *et al*, 1999; McBreen *et al*, 2001). A elucidação dos mecanismos que regem a frequência relativa das células CD8+ infectadas e a sua contribuição para o total de carga viral exigem mais esforços e será crucial para a compreensão de seu papel na patogênese da infecção por HIV.

No entanto, o papel crítico de células T CD8+ no controle da replicação viral fortemente sugere que o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que ajam sobre estes linfócitos serão essenciais para a futura erradicação da infecção.

Como nossos resultados podem contribuir para melhor planejar imunoterapias ou vacinas direcionadas para HIV-1?

É hoje geralmente aceito que a resposta vírus-específica de célula T CD8+ desempenha um papel importante no controle de HIV replicação *in vivo* e, a manutenção desta população é necessária para o controle contínuo. Mesmo com o sucesso da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), respostas fortes de célula T CD8+ anti-HIV-1 são muitas vezes não aparentes na infecção crônica, tornando improvável a erradicação viral bem sucedida. O tratamento precoce pode ser particularmente importante para a preservação das respostas de células CD8+. Assim, há uma necessidade premente de desenvolver opções adicionais de tratamento como um complemento à HAART, que poderiam restaurar respostas específicas de células T CD8+ ao HIV-1. O uso terapêutico de imunização e citocinas poderia fornecer modalidades adicionais para manter ou induzir respostas específicas de célula T CD8+ adequadas em infecção crônica. Entretanto, a capacidade de vacinas terapêutica para expandir significativamente os números de células T CD8+ HIV-1-específicas foi decepcionante. As implicações de custo e mão-de-obra de tal abordagem significa que é pouco provável ser aplicável em grande escala. No entanto, estes dados sugerem que as respostas de célula T CD8+ específicas para o HIV-1 podem ser expandidas em indivíduos infectados (Imami *et al*, 2003).

Abordagens alternativas para manutenção ou expansão de células T CD8+ em indivíduos infectados consideram a utilização de citocinas como imunoterapia em conjunto com HAART. Muito desse conceito foi baseado em observações de que células CD8+ podem ser expandidas *ex vivo* de pacientes infectados com HIV-1 através de adição de citocinas exógenas às culturas. Com base na observação de que a expansão de células T CD8 é dependente de ajuda de células T CD4 + (Lieberman *et al.*, 2001), estudos iniciais focaram na adição de IL-2. Estudos *ex-vivo* mais recentes avaliaram o potencial de IL-7 e IL-15 (Alves *et al* 2003) sozinho ou em combinação com IL-2, na expansão de células T CD8+. Estes estudos produziram resultados mistos, com alguns grupos mostrando aumento de expansão e outros mostrando pouco ou nenhum efeito.

Assim, na era de terapias antiretrovirais altamente ativas, a co-administração de IL-2 é uma tentativa de atuar em reservatórios de HIV-1 e restaurar a função imune, embora com sucesso limitado (Chun *et al.* 1999a, Davey *et al.*, 2000, Imami & Gotch, 2002, Pau & Tavel, 2002). Novos estudos apontam para a possibilidade de se usar IL-15 (Ahmad *et al.*, 2003, Mueller *et al.*, 2003a), como imunoterapia em potencial para pacientes infectados com HIV-1.

As citocinas IL-2 e IL-15, vistas como imunoterapias potenciais anti-HIV, pertencem à família de citocinas γ c, compartilhando a cadeia comum γ do receptor também com IL-4 e IL-7 (Waldmann *et al.*, 1998). Um aspecto importante é que os níveis dessas citocinas γ c IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 são alterados durante a infecção por HIV-1. Enquanto os níveis de IL-2 (Clerici *et al.*, 1989a, 1989b; Clerici & Shearer, 1993, 1994; Sieg *et al.*, 2001) e IL-15 (d’Ettorre *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, 2003) são reduzidos durante a infecção por HIV-1, produção de IL-4 (Clerici & Shearer, 1993, 1994; Sousa *et al.*, 1999) e IL-7 (Kacani *et al.*, 1997; Llano *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2001) estão aumentadas nessa infecção. Os níveis de IL-15 parecem estar relacionados ao curso da infecção por HIV-1 e à terapia anti-retroviral efetiva (d’Ettorre *et al.*, 2002, Amicosante *et al* 2003). Por outro lado, o efeito da IL-7 na progressão do HIV-1 é controversa. Foi demonstrada uma relação inversa entre os níveis séricos de IL-7 e a contagem de CD4 (Napolitano *et al.*, 2001). Entretanto, a administração de IL-7 a símios infectados com SIV estimulou a renovação de linfócitos T sem aumento da replicação viral (Nugeyre *et al.* 2003).

Essas citocinas γ c IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 podem afetar a diferenciação de células CD8+, a sua proliferação e sobrevivência, bem como aspectos funcionais, como a expressão de perforina, granzimas e a secreção de fatores antivirais, como IFN- γ e quimiocinas, e conseqüentemente o controle não citolítico e citotóxico de HIV-1 (Lucey *et al* 1997, Mueller *et al*

2003a). A diferenciação e capacidade funcional de células CD8⁺ podem ser afetadas como consequência da falta de ajuda de células T CD4⁺, principais alvos da infecção (Douek *et al.*, 2002). A diminuição de IL-2, e IL-15, parece ser um importante fator nesta disfunção (Clerici *et al.*, 1989a, 1989b; Sieg *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 1998; Chitnis *et al.*, 2003; d’Ettorre *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, 2003).

Até o presente, apenas **IL-2** foi testada em estudos clínicos. A maioria deles sugerem que, enquanto a imunoterapia com IL-2 pode provocar aumento significativo de células T CD4⁺, alterações transitórias, ou nenhuma, foram vistas na contagens de células T CD8⁺ (Kovacs *et al.* 2001; Pido-Lopez *et al.* 2003). Demonstrou-se que a imunoterapia com IL-2 conjuntamente com a terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) aumenta respostas de células T CD8⁺ contra HIV-1 em indivíduos infectados (Chun *et al.*, 1999a; Davey *et al.*, 2000; Imami & Gotch, 2002; Pau & Tavel, 2002). Isso sugere que a IL-2 possa influenciar positivamente a qualidade da resposta anti-HIV-1 CD8⁺ sem influenciar o número total de células CD8⁺ ou sua resposta proliferativa (Imami *et al.*, 2001).

Vantagens de **IL-15** sobre IL-2 para a imunoterapia contra HIV-1 incluem a ausência de um efeito significativo na expressão viral em PBMC de pacientes infectados ou menor produção viral na presença de IL-15 do que de IL-2. (Patki *et al.* 1996, Chehimi *et al.* 1997, Lucey *et al.* 1997, d’Ettorre *et al.*, 2002). Uma avaliação comparativa da capacidade de IL-2, IL-7 e IL-15 para expandir células T CD8⁺ de pacientes pediátricos *ex vivo* revelou que a IL-15 era a citocina mais potente em aumentar resposta imune específicas para HIV-gag (Chitnis *et al.* 2003). Enquanto a IL-2 promove a morte induzida por ativação (AICD) (Lenardo *et al.*, 1999), a IL-15 inibe a morte induzida por ativação promovida pela IL-2, de uma tal forma que a IL-15 mantém células CD8⁺ de memória, e a IL-2 inibe sua persistência *in vivo* (Waldmann, 2001; Waldmann *et al.*, 1998, 2001; Zhang *et al.* 1998, Ku *et al.*, 2000). De fato, a IL-15 não apenas aumenta as funções efetoras (produção de IFN- γ e citotoxicidade) de células T CD8⁺ HIV-1-específicas (Mueller *et al.*, 2003a), mas também sua sobrevivência, provavelmente através do aumento da expressão de Bcl-2 (Naora & Gougeon, 1999b; Mueller *et al.*, 2003b).

Observamos papel estimulador de IL-2 e IL-15 sobre a atividade antiviral de células CD8⁺, apesar destas citocinas também promoverem a replicação nas mesmas células CD8⁺ pré-ativadas. Como poucas células CD8⁺ apresentam as condições necessárias à sua infecção, *i. e.*, co-expressão de moléculas CD4, e como a produção viral destas células parece ser mais lenta, o

papel protetor destas citocinas parece ser mais importante. O fato de IL-15 promover a atividade antiviral de células CD8+, não previamente estimuladas, em contato com células dendríticas, indica que ela possa ter efeitos talvez mais benéficos que IL-2 (Barker *et al.*, 1996) em vacinas imunoterapêuticas para pacientes infectados pelo HIV-1.

As citocinas **IL-4** e **IL-7** apresentam-se aumentadas na infecção pelo HIV-1 (Clerici & Shearer, 1993, 1994; Sousa *et al.*, 1999; Kacani *et al.*, 1997; Llano *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2001). Alguns achados indicam um papel deletério destas citocinas sobre a progressão da infecção, como, p. ex., a maior expressão de CXCR4 induzida por IL-4 e IL-7, o que provavelmente favoreceria a infecção por vírus X4, ou ainda a indução de expressão de DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000a), enquanto níveis maiores de IL-7 vem sendo associado a menor contagem CD4 e também à possível emergência de vírus X4 (Llano *et al.*, 2001). Em nossos estudos, geralmente estas citocinas aumentam a produção viral de várias subpopulações celulares, inclusive de células *naive*, porém IL-7 pode exercer algum estímulo de atividade antiviral.

Enquanto a expansão *ex vivo* das células CD8+ efectoras como uma abordagem terapêutica prática para a infecção crônica seria pouco provável, estes estudos sugerem que o uso de citocinas como imunoterapia poderia ter um papel a desempenhar para a manutenção ou a indução de células T CD8+ de memória efectoras *in vivo*.

Será importante no futuro avaliarmos os efeitos destas várias citocinas sobre a replicação viral de células CD8+ derivadas de pacientes infectados, bem como sobre as interações celulares entre os linfócitos CD8+, CD4+ e células dendríticas. Nossos ensaios realizados em diferentes modelos de cultura e co-culturas mostraram-se úteis para a avaliação de parâmetros fenotípicos e funcionais de células T CD8+ e acreditamos sejam de valor para o aprofundamento não só destes estudos, mas também de outros que visem a análise de mutações virais ou fatores de restrição e latência em diferentes tipos celulares, bem como de drogas ou imunoterapias.

Em conjunto, nossos resultados apontam para uma perda progressiva da função antiviral CD8+, e paralelamente, uma transformação dessas células em um importante reservatório viral, o qual poderia se tornar produtivo uma vez que o contato com células dendríticas poderia romper a latência da infecção. O desenho de novas terapias anti-HIV-1 deve levar em consideração esse papel dual das células CD8+ na infecção.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. As alterações fenotípicas observadas *in vitro* parecem ser mais evidentes em presença de variantes X4 que R5, sugerindo que as mudanças que ocorrem em células T CD8+ ao longo da progressão da infecção *in vivo* estariam relacionadas às variações virais.
2. A diminuição do fenótipo *naive* CD27+ e o aumento de expressão de CD57 em células CD8+ de neonatos indicam que o vírus HIV-1 exacerba o processo de senescência do sistema imunitário.
3. Células T CD8+CD57+ acumuladas após extensa ativação imunológica modulam a replicação de HIV-1.
4. As subpopulações CD57+ e CD57- (CD28+) de linfócitos CD8+ inibem a produção de variante X4 de HIV-1 através de mecanismos diferentes. Enquanto células CD8+CD57+ suprimem a produção viral ao inibirem a proliferação celular, a atividade supressora de células CD8+CD57- (CD28+) sobre a replicação viral ocorre em presença de proliferação celular (mecanismo descrito para CAF).
5. A perda de expressão de CD28 e a expansão de células CD8+CD57+ são alterações fenotípicas de linfócitos T CD8+ que podemos relacionar à queda de atividade antiviral não citolítica.
6. A capacidade de células CD8+CD57+ suprimirem a produção de HIV-1 em associação à inibição da proliferação celular está em concordância com o conceito de que a ativação celular favorece a replicação do HIV-1.
7. A ativação de células CD8+ promove seu papel supressor sobre a replicação do vírus HIV-1, porém torna estas células mais suscetíveis à própria infecção produtiva pelo vírus. Células T CD8+ infectadas com HIV-1 são geradas por meio de infecção de células T CD8+ ativadas.

8. A infecção de células CD8⁺ pelo HIV-1 é dependente da molécula CD4, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes monoclonais anti-CD4 bloqueia completamente a produção de HIV-1. Porém, a infecção produtiva de células CD8⁺ é dependente não apenas da expressão de CD4 e co-receptor, mas também do estímulo e das citocinas presentes no ambiente.
9. As citocinas γ c IL-2 e IL-15 (+PHA) aumentam a atividade supressora de células CD8⁺, bem como sua susceptibilidade à infecção pelo HIV-1, de forma paralela, indicando que IL-2 e IL-15 promovem o papel dual de células T CD8⁺ como alvos e supressores da replicação do HIV.
10. A capacidade supressora de células T CD8⁺ aumenta em culturas expostas por maior tempo à citocina IL-2 antes da infecção, especialmente as de fenótipo CD57⁻/CD28⁺.
11. A supressão viral ocorre de modo mais eficiente com células CD8⁺ da subpopulação CD28⁺ do que CD28⁻/CD57⁺. Em paralelo, a infecção produtiva de células CD8⁺ parece mais acentuada na subpopulação CD8⁺CD28⁺ que CD8⁺CD28⁻.
12. A cinética mais lenta de replicação do HIV-1 em linfócitos T CD8⁺ explica porque a atividade supressora de células T CD8⁺ prevalece sobre sua própria infecção produtiva em pontos iniciais da cinética de co-culturas de células CD4⁺ e CD8⁺.
13. Apesar de células T CD8⁺ poderem se tornar reservatórios de HIV-1, as células CD4⁺ permanecem como principal fonte do vírus.
14. Também os linfócitos T CD4⁺ parecem exercer supressão da replicação viral em células T CD8⁺ nas co-culturas de células CD4⁺ e CD8⁺.
15. As citocinas γ c IL-4 e IL-7 (+PHA) são capazes de elevar a carga viral de células T CD4⁺.

16. Células T CD8⁺ apresentam menor atividade antiviral em presença de células dendríticas alogeneicas, o que mostramos estar associada à infecção produtiva destes linfócitos T CD8⁺ pelo HIV-1.
17. O contato de células CD8⁺CD28⁺ (mas não CD28⁻) com DC alogeneicas (ou menos acentuadamente, autólogas) expostas ao vírus X4 HIV_{RF} leva à sua infecção, efeito incrementado por IL-15.
18. A IL-15 tem um papel importante no controle da produção viral. A adição de IL-15 promove simultaneamente a atividade antiviral e a produtividade de HIV-1 em células T CD8⁺ (em especial da subpopulação CD28⁺) quando em contato com linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas autólogas. Já a IL-15 endógena promove produção viral em co-culturas de células T CD4⁺ (não ativadas) em contato com células dendríticas autólogas expostas a HIV-1.
19. Nossos modelos de cultura e co-culturas mostraram-se úteis para a avaliação de parâmetros fenotípicos e funcionais de células T CD8⁺ e podem ser utilizados para o aprofundamento destes estudos.
20. O desenho de novas terapias anti-HIV-1 deve levar em consideração o papel dual das células CD8⁺ na infecção pelo HIV-1, como alvos e supressores da replicação viral.

Perspectivas Futuras

PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos ensaios realizados em diferentes modelos de cultura e co-culturas mostraram-se úteis para a avaliação de parâmetros fenotípicos e funcionais de células T CD8+ e acreditamos sejam de valor para o aprofundamento não só destes estudos, mas também de outros que visem a análise de mutações virais ou fatores de restrição e latência em diferentes tipos celulares, bem como de drogas ou imunoterapias.

Como continuidade deste trabalho, será importante no futuro obtermos dos pacientes infectados pelo HIV-1, em diferentes fases clínicas, as subpopulações de células CD8+, CD28+CD57- ou CD28-CD57+, para estudos funcionais sob efeito das várias citocinas γ c aqui testadas, incluindo a análise da infecção destas células pelo HIV-1, para assim darmos mais um passo frente ao possível uso destas citocinas como imunoterapias.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abo T, Cooper MD, Balch CM. Characterization of HNK-1+ (Leu-7) lymphocytes. I . Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capabilities. *J. Immunol.* 1982; 129:1752-1758.
- Adachi Y, Oyaizu N, Than S, McCloskey TW, Pahwa S. IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *J Immunol.* 1996; 157(9):4184-93.
- Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, “et al”. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol.* 2003; 77(3):2081-92.
- Agostini C, Siviero M, Facco M, Carollo D, Binotto G, Tosoni A, “et al”. Antiapoptotic effects of IL-15 on pulmonary Tc1 cells of patients with human immunodeficiency virus infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 484-9.
- Agostini C, Trentin L, Sancetta R, Facco M, Tassinari C, Cerutti A, “et al”. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1997; 90: 1115-23.
- Agostini C, Zambello R, Facco M, Perin A, Piazza F, Siviero M, “et al”.. CD8 T-cell infiltration in extravascular tissues of patients with human immunodeficiencyvirus infection. Interleukin-15 upmodulates costimulatory pathways involved in the antigen-presenting cells-T-cell interaction. *Blood.* 1999; 93: 1277-86.
- Ahmad R, Sindhu ST, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Studies on the production of IL-15 in HIV-infected/AIDS patients. *J Clin Immunol.* 2003; 23(2):81-90.
- Ahmed RK, Nilsson C, Biberfeld G, Thorstensson R. Role of CD8+ cell-produced anti-viral factors in protective immunity in HIV-2-exposed but seronegative macaques resistant to intrarectal SIVsm challenge. *Scand J Immunol.* 2001; 53(3):245-53.
- Akbar A, Terry L, Timms A, Beverley PCL, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.* 1988; 140: 2171-8.
- Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayoitidis P, Pilling D, Bofill M,”et al”. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol.* 1996; 26(2):294-9.

- Akridge RE, Oyafuso LK, Reed SG. IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages. *J Immunol* 1994; 153:5782–5789.
- Alfano M, Poli G. Cytokine and chemokine based control of HIV infection and replication. *Curr Pharm Des.* 2001; 7(11):993-1013
- Al-Harhi L, Roebuck KA, Landay A. Induction of HIV-1 replication by type 1-like cytokines, interleukin (IL)-12 and IL-15: effect on viral transcriptional activation, cellular proliferation, and endogenous cytokine production. *J. Clin. Immunol.* 1998; 18: 124-131.
- Al-Harhi L, Siegel J, Spritzler J, Pottage J, Agnoli M, Landay A. Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS* 2000. 14: 761-70.
- Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol* 1996;70:5487–5494.
- Allen TM, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothe BR, Vogel TU, “et al”. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature.* 2000;407(6802):386-90.
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 1996; 274(5284):94-6.
- Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, van Lier RA. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood.* 2003; 1;102(7):2541-6.
- Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P. “et al”. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha- dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997; 186, 139-146.
- Amicosante, M, Poccia F, Gioia C, Montesano C, Topino S, Martini F, “et al”. Levels of interleukin-15 in plasma may predict a favorable outcome of structured treatment interruption in patients with chronic human immunodeficiency virus infection. *J. Inf. Dis.* 2003; 188: 661-5.
- Andersson J, Behbahani H, Lieberman J, Connick E, Landay A, Patterson B, “et al”. Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection. *AIDS.* 1999;13(11):1295-303.

- Angel JB, Saget BM, Wang MZ, Wang A, Dinarello CA, Skolnik PR. Interleukin-10 enhances human immunodeficiency virus type 1 expression in a chronically infected promonocytic cell line (U1) by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15:575–584.
- Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GMA, Dong T, King A, “et al”. HIV-specific CD8+ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 63-75.
- Appay V, Rowland-Jones SL. Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends Immunol.* 2002; 23(12): 580-5.
- Appay, V. & Rowland-Jones, S.L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 22: 83-87.
- Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Thomas D, Virelizier JL. B-Chemokine MDC and HIV-1 Infection. *Science* 1998; 281, 487-487
- Armitage RJ, Namen AE, Sassenfeld HM, Grabstein KH. Regulation of human T cell proliferation by IL-7. *J Immunol.* 1990;144(3):938-41.
- Atedzoe BN, Ahmad A, Menezes J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J Immunol.* 1997;159(10):4966-72.
- Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, “et al”. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; 277: 112-6.
- Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L. A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 1991; 77: 2237-41.
- Azimi N, Shiramizu KM, Tagaya Y, Mariner J, Waldmann TA. Viral activation of interleukin-15 (IL-15): characterization of a virus-inducible element in the IL-15 promoter region. *J Virol.* 2000; 74(16):7338-48.
- Azuma M, Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. Requirements for CD28-dependent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1993a; 150: 2091-2101.
- Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH, Lanier LL. CD28 interaction with B7 co-stimulates primary allogeneic responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 353-360.
- Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28- T lymphocytes: antigenic and functional properties. *J. Immunol.* 1993b; 150: 1147-59.

- Baars PA, do Couto LMR, Leusen JHW, Hooibrink B, Kuijpers TW, Lens SMA, "et al". Cytolytic mechanisms and expression of activation-regulating receptors on effector-type CD8+CD45RA+CD27- human T cells. *J. Immunol.* 2000; 165: 1910-17.
- Bachmann MF, Oxenius A, Mak TW, Zinkernagel RM. T cell development in CD8^{-/-} mice. Thymic positive selection is biased toward the helper phenotype. *J Immunol.* 1995;155(8):3727-33.
- Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon- γ . *Science* 2000; 290: 1254-1357.
- Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995; 378:563.
- Bakri Y, Schiffer C, Zennou V, Charneau P, Kahn E, Benjouad A,"et al". The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J. Immunol.* 2001; 166: 3780-8.
- Bandrés E, Merino J, Vázquez B, Inogés S, Moreno C, Subirá ML."et al". The increase of IFN- γ production through aging correlates with the expanded CD8⁺high CD28⁻ CD57⁺ subpopulation. *Clin Immunol.* 2000; 96: 230-5.
- Bandres JC, Wang QF, O'Leary J, Baleaux F, Amara A, Hoxie JA, Zolla-Pazner S, Gorny MK. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J Virol.* 1998;72(3):2500-4.
- Barker E, Bossart K, Fujimura S, Levy J. CD28 costimulation increases CD8 cell suppression of HIV replication. *J. Immunol.* 1997; 159: 1407-18.
- Barker E, Bossart KN, Levy JA. Primary CD8⁺ cells from HIV-infected individuals can suppress productive infection of macrophages independent of beta-chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1725-29.
- Barker E, Mackewicz CE, Levy JA. Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8⁺ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 11135-9.
- Barker E. CD8⁺ cell-derived anti-human immunodeficiency virus inhibitory factor. *J Infect Dis.* 1999; 179 Suppl 3:S485-8.
- Barker TD, Weissman D, Daucher JA, Roche KM, Fauci AS. Identification of multiple and distinct CD8⁺ T cell suppressor activities. Dichotomy between infected and uninfected individuals, evolution with progression of disease, and sensitivity to gamma irradiation. *J.Immunol.* 1996; 156: 4476-83.

- Batliwalla F, Monteiro J, Serrano D, Gregersen PK. Oligoclonality of CD8+ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation? *Hum. Immunol.* 1996; 48: 68-76.
- Bayard-McNeeley M, Doo H, He S., Hafner A, Johnson,WD Jr, Ho JL. Differential effects of interleukin-12, interleukin-15, and interleukin-2 on human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3: 547-553.
- Bell EB & Sparshott SM. Interconversion of CD45R subsets of CD4+ T cells in vivo. *Nature* 1990; 348: 163-6.
- Bender J, Mitchell T, Kappler J, Marrack P. CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med.* 1999;190(3):367-74.
- Bennet SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller, JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature* 1998; 393: 478-480.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, "et al". A new classification for HIV-1. *Nature.* 1998;391(6664):240.
- Berger EA, Murphy PM & Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu.Rev.Immunol.* 1999; 17: 657-700.
- Bertone S, Schiavetti F, Bellomo R, "et al". Transforming growth factor- β -induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 23-9.
- Berzins SP, Godfrey DI, Miller JF, Boyd RL. A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(17):9787-91.
- Bisset LR, Cone RW, Huber W, Battegay M, Vernazza PL, Weber R, "et al" and the Swiss HIV Cohort Study. Highly active antiretroviral therapy during early HIV infection reverses T-cell activation and maturation abnormalities. *AIDS* 1998; 12: 2115-23.
- Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, "et al". Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype.. *J Virol.* 1997;71(10):7478-87.
- Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(3): 1269-74.

- Blackbourn DJ, Mackewicz CE, Barker E, Hunt TK, Herndier B, Haase AT, "et al". Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13125-30.
- Blauvelt A, Asada H, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Lucey DR, Katz SI. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106: 1047-52.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382, 829-833.
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(5):1925-30.
- Blue M-L, Daley JF, Levine H, Schlossman SF. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* 1985 134: 2281-2286.
- Boise L, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *PNAS* 1995; 92: 5491-5.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 1994; 68: 6103-6110.
- Borsetti A, Parolin C, Ridolfi B, Sernicola L, Geraci A, Ensoli B, Titti F. CD4-independent infection of two CD4(-)/CCR5(-)/CXCR4(+) pre-T-cell lines by human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol.* 2000;74(14):6689-94.
- Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, Akbar AN, Medina E, Sagawa K "et al". Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II functional defects of CD28- T cells. *AIDS* 1994; 8: 431-41.
- Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN. Loss of CD28 expression on CD8+ T cells is induced by IL-2 receptor γ chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int. Immunol.* 2000; 12: 1005-13.
- Boursalian TE, Bottomly K. Stability of naive and memory phenotypes on resting CD4 T cells in vivo. *J Immunol.* 1999a;162(1):9-16.

- Boursalian TE, Bottomly K. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol.* 1999b;162(7):3795-801.
- Bowman MR, Crimmins AV, Yetz-Aldape J, Kriz R, Kelleher K, Herrman S. The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *J. Immunol.* 1994; 152: 1756-61.
- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003;101(7):2711-20.
- Brinchmann JE, Gaudernack G, Vartdal F. CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J. Immunol.* 1990; 144: 2961-6.
- Brinchmann JE, Gaudernack G, Vartdal F. In vitro replication of HIV-1 in naturally infected CD4+ T cells is inhibited by rIFN alpha 2 and by a soluble factor secreted by activated CD8+ T cells, but not by rIFN beta, rIFN gamma, or recombinant tumor necrosis factor-alpha. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4: 480-8.
- Brites,C, Alencar,R, Gusmao,R *et al*: Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS* 2001; 15: 2053-2055.
- Brites,C, Harrington,W, JR., Pedrosa,C, Martins,NE, and Badaro,R: Epidemiological Characteristics of HTLV-I and II Co-Infection in Brazilian Subjects Infected by HIV-1. *Braz.J.Infect.Dis.* 1997; 1: 42-47.
- Brites,C, Pedrosa,C, Netto,E *et al*: Co-Infection by HTLV-I/II is Associated With Increased Viral Load in PBMC of HIV-1 Infected Patients in Bahia, Brazil. *Braz.J.Infect.Dis.* 1998; 2: 70-77.
- Broder CC, Berger EA. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4- T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9004-9008.
- Brooks,DG, Kitchen,SG, Kitchen,CM, Scripture-Adams,DD, and Zack,JA: Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat.Med.* 2001; 7: 459-464.
- Brown GR, Meek K, Nishioka Y, Thiele DL. CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1995;154(8):3686-95.
- Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science.* 1991. 18;254(5030):423-7.

- Bunce C. & Bell EB. CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J.Exp. Med.* 1997; 185: 767-76.
- Buseyne F, Fevrier M, Garcia S, Gougeon ML, Riviere Y. Dual function of a human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte clone: inhibition of HIV replication by noncytolytic mechanisms and lysis of HIV-infected CD4+ cells. *Virology* 1996; 225: 248-53.
- Callan MFC, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JDK, O'Callaghan CA "et al". Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein Barr Virus in vivo. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1395-402.
- Camerini D, Walz G, Loenen WAM, Borst J, Seed B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J. Immunol.* 1991; 147: 3165-9.
- Cameron P, Pope M. Granelli-Piperno A, Steinman RM. Dendritic cells and replication of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59: 158-71.
- Cameron PU, Forsum U, Tepler H, Granelli-Piperno A, Steinman RM. During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:226–236.
- Cameron PU, Lowe MG, Crowe SM., O'Doherty U, Pope M, Gezelter S, Steinman RM. Susceptibility of dendritic cells to HIV-1 infection in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 56: 257:65.
- Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, "et al". CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J. Immunol.* 2001; 166: 877-84.
- Campbell JJ, Pan J, Butcher EC. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol.* 1999;163(5):2353-7.
- Carini C, Essex M. Interleukin 2-independent interleukin 7 activity enhances cytotoxic immune response of HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10(2):121-30.
- Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 1993; 177:249–256.
- Caruso A, Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, Ricotta D, Imberti L, Signorini S, Armenta-Solis A, Garrafa E, Balsari A, Turano A. Expansion of rare CD8+ CD28- CD11b- T

- cells with impaired effector functions in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;24(5):465-74.
- Caufour P, Le Grand R, Cheret A, Neildez O, Thiebot H, Theodoro F, “ et al”. Longitudinal analysis of CD8(+) T-cell phenotype and IL-7, IL-15 and IL-16 mRNA expression in different tissues during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 2001; 3: 181-91.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois C, Kooten CV, Durrand I, “et al”. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1263-72.
- Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9(3):396-404.
- Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, “et al”. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001; 410: 106-11.
- Chamuleau MED, ten Berge IJM, Schellekens PTA, Wilmink JM, Hintzen RQ, van Lier RAW. Serum levels of soluble CD27 in renal transplant recipients. *Transplantation* 1992; 54: 932-36.
- Charbonneau H, Tonks N K , Walsh K A, Fischer E H. The leukocyte common antigen CD45: a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85:7182-9.
- Cehimi J, Marshall JD, Salvucci O, Frank I, Cehimi S, Kawecki S, “et al”. IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *J. Immunol.* 1997; 158: 5978-87.
- Chen CH, Weinhold KJ, Bartlett JA, Bolognesi DP, Greenberg ML. CD8+ T lymphocyte-mediated inhibition of HIV-1 long terminal repeat transcription: a novel antiviral mechanism. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993; 9:1079–1086.
- Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L, “et al”. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001; 98: 156-64.
- Chene L, Nugeyre MT, Guillemard E, Moulian N, Barre-Sinoussi F, Israel N. Thymocyte-thymic epithelial cell interaction leads to high-level replication of human immunodeficiency virus exclusively in mature CD4(+) CD8(-) CD3(+) thymocytes: a critical role for tumor necrosis factor and interleukin-7. *J Virol.* 1999;73(9):7533-42.
- Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science.* 1988;240(4848):80-2.

- Chitnis V, Pahwa R, and Pahwa S. Determinants of HIV-specific CD8 T-cell responses in HIV-infected pediatric patients and enhancement of HIV-gag-specific responses with exogenous IL-15. *Clin.Immunol.* 2003; 107: 36-45.
- Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 549-56.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85:1135–1138.
- Choi IS, Hokanson R, Collisson EW. Anti-feline immunodeficiency virus (FIV) soluble factor(s) produced from antigen-stimulated feline CD8(+) T lymphocytes suppresses FIV replication. *J. Virol.* 2000. 74: 676-83.
- Chun T-W, Davey Jr RT, Engel D, Lane HC, Fauci AS. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* 1999b; 401: 874-5.
- Chun T-W, Engel D, Mizell SB, Hallahan CW, Fischette M, Park S, “et al”. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* 1999a; 5: 651-5.
- Chun T-W., Engel, D., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Fauci, A.S. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 83-91.
- Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:954–960.
- Clerici M, Balotta C, Meroni L, et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term non-progression in HIV infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996; 12:1053–1061.
- Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, Shearer GM. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest.* 1993; 91(3):759-65.
- Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993; 14(3):107-11.
- Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today.* 1994; 15(12):575-81
- Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients

- independent of CD4+ cell numbers and clinical settings. *J Clin Invest* 1989a; 84: 1892–1899.
- Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, et al. Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 1989b;339:383–385.
- Clouse KA, Powell D, Washington I, et al. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* 1989; 142:431–438.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, P. Lusso RC. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270: 1811-5.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 1996; 2:1244–1247.
- Cohen O, Kinter A, Fauci A. Host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Immunol. Rev.* 1997; 159: 31–48.
- Collaborative Group on AIDS Incubation and HIV Survival* including the CASCADE EU Concerted Action, 2000). Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. *Lancet* 2000; 355: 1131–37.
- Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol.* 1996;60(1):147-52.
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1–infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185:621–628.
- Copeland KF, Leith JG, McKay PJ, Kelleher L, Smaill FM, Rosenthal KL. CD8+ T cell-mediated suppression of HIV long terminal repeat-driven gene expression is not associated with improved clinical status. *AIDS* 1997a; 11: 581-6.
- Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 1321-6.
- Copeland KF. CD8+ T cell suppressor factors and the control of infection, replication and transcription of human immunodeficiency virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001; 49(1):13-8.

- Costa P, Rusconi S, Mavilio D, Fogli M, Murdaca G, Pende D, "et al". Differential disappearance of inhibitory natural killer cell receptors during HAART and possible impairment of HIV-1-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes. *AIDS* 2001; 15: 965-74.
- Cotter RL, Zheng J, Che M, Niemann D, Liu Y, He J, "et al". Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection, β -chemokine production, and CCR5 expression in CD40L-stimulated macrophages: immune control of viral entry. *J. Virol.* 2001; 75: 4308-20.
- Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore AC, Kornfeld H. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):5109-13.
- Currier, J.R., Stevenson, K.S., Kehn, P.J., Zheng, K., Hirsch, V.M., Robinson, M.A.. Contributions of CD4+, CD8+, and CD4+CD8+ T cells to skewing within the peripheral T cell receptor beta chain repertoire of healthy macaques. *Hum.Immunol.* 1999; 60: 209-222.
- Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:961-964.
- Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Goujard C, Deveau C, Meyer L "et al". Weak anti-HIV CD8+ T cell effector activity in HIV primary infection. *J.Clin.Invest.*1999; 104: 1431-9.
- Dalod M, Fiorentino S, Delamare C, Rouzioux C, Sicard D, Guillet J-G, Gomard E. Delayed virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity in an HIV- infected individual with high CD4+ cell counts: correlations with various parameters of disease progression. *AIDS* 12: 1996; 497-506.
- Dardalhon V, Jaleco S, Kinet S, Herpers B, Steinberg M, Ferrand C, "et al". IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *PNAS* 2001; 98: 9277-82.
- Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, "et al". HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(26):15109-14.
- Davey RT Jr, Murphy RL, Graziano FM, Boswell SL, Pavia AT, Cancio M, "et al". Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2000;284(2):183-9.

- Davey RTJr, Chaitt DG, Piscitelli SC, Wells M, Kovacs JA, Walker RE, "et al". Subcutaneous administration of interleukin-2 in human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *J. Inf. Dis.* 1997; 175: 781-9.
- De Araujo,AC, Casseb,JS, Neitzert,E *et al*: HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in Sao Paulo, Brazil. *Eur.J.Epidemiol.* 1994; 10: 165-171.
- de Jong R, Brouwer M, Miedema F, van Lier RAW. Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ cells with different requirements for activation and differentiation. *J. Immunol.* 1991a; 146: 2088-94.
- de Jong R, Loenen WAM, Brouwer M, van Emmerik L, De Vries EFR, Borst J, "et al". Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J. Immunol.* 1991b; 146: 2488-94.
- De Maria A & Moretta L. HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection. *Hum. Immunol.* 2000; 61: 74-81.
- De Maria A, Colombini S, Schnittman SM, Moretta L. CD8+ cytolytic T lymphocytes become infected in vitro in the process of killing HIV-1-infected target cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24(3):531-6.
- De Maria A, Ferraris A, Guastella M, Pilia S, Cantoni C, Polero L, Mingari MC, Bassetti D, Fauci AS, Moretta L. Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(19):10285-8.
- De Maria A, Mavilio D, Costa P, Dignetti P, Fogli M, Mingari MC. Multiple HLA- class I-specific inhibitory NK receptor expression and IL-4/IL-5 production by CD8+ T-cell clones in HIV-1 infection. *Hum. Immunol.* 2000; 72: 179-82.
- De Maria A, Pantaleo G, Schnittman SM, Greenhouse JJ, Baseler M, Orenstein JM, "et al". Infection of CD8+ T lymphocytes with HIV. Requirement for interaction with infected CD4+ cells and induction of infectious virus from chronically infected CD8+ cells. *J Immunol.* 1991;146(7):2220-6.
- De Rossi A, Franchini G, Aldovini A, Del Mistro A, Chieco-Bianchi L, Gallo RC, "et al". Differential response to the cytopathic effects of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) superinfection in T4+ (helper) and T8+ (suppressor)T-cell clones transformed by HTLV-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(12):4297-301.
- de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, "et al". The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol.* 1998;160(4):1666-76.

- Dean GA, Reubel GH, Pedersen NC. Simian immunodeficiency virus infection of CD8+ lymphocytes in vivo. *J. Virol.* 70 1996; 5646-5650.
- Deans JP, Boyd AW, Pilarski LM. Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *J. Immunol.* 1989; 143:1233-8.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661–666.
- Désiré N, Dehée A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, Rozenbaum W, Nicolas JC. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(4):1303-10.
- d'Ettorre G, Forcina G, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Massetti AP, "et al". Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naïve and -treated patients. *AIDS.* 2002; 25;16(2):181-8.
- Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol.* 1996;156(2):735-41.
- Doranz B, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the b-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-1158.
- Douek DC, Brenchley, JM, Betts, MR *et al*: HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002; 417: 95-98.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, "et al". Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396 (6712): 690-5.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, "et al". HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-73.
- Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:5974–5978
- Dumonceaux J, Nisole S, Chanel C, Quivet L, Amara A, Baleux F, Briand P, Hazan U. Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol.* 1998;72(1):512-9.

- Dupuy d'Angeac A, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Rème T, Salmon M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 1503-1511
- Dybul M, Mercier G, Belson M, Hallahan CW, Liu S, Perry C, "et al". CD40 ligand trimer and IL-2 enhance peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cell proliferation and production of IFN- γ in response to p24 antigen in HIV-infected individuals: potential contribution of anergy to HIV-specific unresponsiveness. *J. Immunol.* 2000; 165: 1685-91.
- Edinger AL, Amedee A, Miller K, et al. Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:4005–4010.
- Effros RB & Pawelec G. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today* 1997; 18: 450-4.
- Effros RB, Allsopp R, Chiu C-P, Hausner MA, Hirji K, Wang L, "et al". Shortened telomeres in the expanded CD28- CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 1996; 10: 17-22.
- Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362: 359-62.
- Emerman M & Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280: 1880-4.
- Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 1996; 87:745–756.
- Ennen J, Findelee H, Dittmar MT, Norley S, Ernst M, Kurth R. CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7207-11.
- Ernst B, Lee DS, Chang JM, Sprent J, Surh CD. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity.* 1999;11(2):173-81.
- Evans TG, Kallas EG, Luque AE, Menegus M, McNair C, Looney RJ. Expansion of the CD57 subset of CD8 T cells in HIV-1 infection is related to CMV serostatus. *AIDS* 1999; 13: 1139-1141.

- Eylar EH, Lefranc C, Baez I, Colon-Martinez SL, Yamamura Y, Rodriguez N, Yano N, Breithaupt TB. Enhanced interferon-gamma by CD8+ CD28- lymphocytes from HIV+ patients. *J Clin Immunol* 2001; 21:135-144.
- Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; 384: 529-534.
- Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262: 1011-8.
- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97: 14-32.
- Fenyo EM, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 1989; 3(suppl 1):5-12.
- Fenyo EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, "et al". Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol.*1988; 62(11):4414-9.
- Ferbas J, Kaplan AH, Hausner MA, Hultin LE, Matud JL, Liu DL, "et al". Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* 1995; 172: 329-39.
- Ferrari G, King K, Rathbun K, Placa CA, Packard MV, "et al". IL-7 enhancement of antigen-driven activation/expansion of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp). *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 101: 239-48.
- Fields BN, Knipe,DM, Howley,PM *et al*: *Virology*.2001; 4th ed. Fields,BN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001.
- Finke D, Brinckmann UG, ter Meulen V, Liebert UG. Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. *J Virol.* 1995;69(9):5469-74.
- Finnegan A, Roebuck KA, Nakai BE, et al. IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage. *J Immunol* 1996; 156:841-851.
- Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, Castelli F, Caligaris S, Bonafede M, et al. CD11b expression identifies CD8+CD28+ T lymphocytes with phenotype and function of both naive-memory and effector cells. *J Immunol.* 2001; 166: 900-907.

- Fiorentino S, Dalod M, Olive D, Guillet JG, Gomard E. Predominant involvement of CD8+CD28- lymphocytes in human immunodeficiency virus-specific cytotoxic activity. *J Virol.* 1996; 70: 2022-6.
- Flamand L, Crowley RW, Lusso P, Colombini-Hatch S, Margolis DM, Gallo RC. Activation of CD8+ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *PNAS* 1998; 95: 3111-3116.
- Flamand L, Stefanescu I, Menezes J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest.* 1996; 97(6):1373-81.
- Folks TM, Clouse KA, Justement J, et al. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2365–2368.
- Fransen S, Copeland KF, Smieja M, Smaill F, Rosenthal KL. RANTES production by T cells and CD8-mediated inhibition of human immunodeficiency virus gene expression before initiation of potent antiretroviral therapy predict sustained suppression of viral replication. *J Infect Dis* 2000; 181: 505-12.
- Frassanito M, F Silvestris, P Cafforio and F. Dammacco. CD8/CD57 cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1998; 100: 469-477.
- Freitas AA & Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 83-111.
- Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood.* 2001a; 97(6):1525-33.
- Fry TJ, Connick E, Falloon J, Lederman MM, Liewehr DJ, Spritzler J, “et al”. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 2001b; 97(10):2983-90.
- Fukui T, Katamura K, Abe N, Kiyomasu T, Iio J, Ueno H, Mayumi M, Furusho K. IL-7 induces proliferation, variable cytokine-producing ability and IL-2 responsiveness in naive CD4+ T-cells from human cord blood. *Immunol Lett.* 1997;59(1):21-8.
- Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognes, C, Quillent C”et al”. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR- 5 allele. *J Exp Med* 1997; 186: 455-60.
- Gabor MJ, Scollay R, Godfrey DI. Thymic T cell export is not influenced by the peripheral T cell pool. *Eur J Immunol.* 1997;27(11):2986-93.

- Galli G, Annunziato F, Mavilia C, Romagnani P, Cosmi L, Manetti , “et al”. Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN- γ on fusin/CXCR4. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 3280-90.
- Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot A C, Plückthun A, Elliott T , “et al”. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1383-93.
- Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500–503.
- Garzino-Demo A, Moss RB, Margolick JB, Cleghorn F, Sill A, Blattner WA, “et al”. Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta- chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 11986-91.
- Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 2001;194(12):1711-9.
- Geiben-Lynn R, Kursar M, Brown NV, Kerr EL, Luster AD, Walker BD. Noncytolytic inhibition of X4 virus by bulk CD8(+) cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected persons and HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes is not mediated by beta-chemokines. *J Virol* 2001; 75: 8306-16.
- Geijtenbeek TB, Known DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Middel J, DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000a; 100: 587-97.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, “et al”. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000b; 100(5): 575-85.
- Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, “et al”. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem.* 2002; 277(13):11314-20.
- Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003;276:31-54
- Geiselhart LA, Humphries CA, Gregorio TA, Mou S, Subleski J, Komschlies KL. IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation. *Immunol.* 2001;166(5):3019-27.

- Gendelman HE, Orenstein JM, Martin MA, et al. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1–treated monocytes. *J Exp Med* 1988; 167:1428–1441.
- Giorgi JV, Hausner MA, Hultin LE. Detailed immunophenotype of CD8+ memory cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against HIV-1 with respect to expression of CD45RA/RO, CD62L and CD28 antigens. *Immunol Lett.* 1999; 66: 105-10.
- Giri JG, Anderson DM, Kumaki S, Park LS, Grabstein KH, Cosman D. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol.* 1995; 57(5):763-6
- Globerson, A. & Effros, R.B. (2000). Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* 2000; 21: 515-521.
- Glushakova S, Baibakov B, Zimmerberg J, Margolis LB. Experimental HIV infection of human lymphoid tissue: correlation of CD4+ T cell depletion and virus syncytium-inducing/non-syncytium-inducing phenotype in histocultures inoculated with laboratory strains and patient isolates of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997;13(6):461-71.
- Glushakova S, Grivel J-C, Fitzgerald W, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB. Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nature Med.* 1998; 4: 346-349.
- Godfrey WR, Fagnoni FF, Harara MA, Buck D, Engleman EG. Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1994;180(2):757-62.
- Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity.* 1999;11(2):183-90.
- Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 557-64.
- Goletti D, Kinter AL, Hardy EC, Poli G, Fauci AS. Modulation of endogenous IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist results in opposing effects on HIV expression in chronically infected monocytic cells. *J Immunol* 1996;156:3501–3508.
- Gomez AM, Smaill FM, Rosenthal KL. Inhibition of HIV replication by CD8+ T cells correlates with CD4 counts and clinical stage of disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 68-75.
- Goodwin RG, Alderson MR, Smith CA, Armitage RJ, VandenBos T, Jerzy R, “et al”. Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 1993; 73: 447-56.

- Gordon CJ, Muesing MA, Proudfoot AE, Power CA, Moore JP, Trkola A. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J Virol.* 1999; 73:684-694.
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, “et al”. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994; 264(5161):965-8.
- Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophage tropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol.* 1998;72(4):2733-7.
- Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Current Biol.* 1999; 9: 21-9.
- Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine co-receptors. *J Exp Med* 1996; 184:2433–2438.
- Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ, “et al”. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science.* 1994;265(5169):248-52.
- Greenhead P, Hayes P, Watts PS, Laing KG, Griffin GE, Shattock RJ. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J. Virol.* 2000; 74: 5577-5586.
- Grivel JC, Margolis LB. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. *Nat Med.* 1999;5(3):344-6.
- Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175:331–340.
- Gruber MF, Weih KA, Boone EJ, Smith PD, Clouse KA. Endogenous macrophage CSF production is associated with viral replication in HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1995; 154:5528–5535.
- Gruters RA, Terpstra FG, De Goede RE, Mulder JW, De Wolf F, Schellekens PT, “et al”. Immunological and virological markers in individuals progressing from seroconversion to AIDS. *AIDS.* 1991;5(7):837-44.

- Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Shoenberger JM, Rogler CE, Chisari FV. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol.* 1996;70(10):7056-61.
- Guillemard E, Nugeyre M-T, Chêne L, Schmitt N, Jacquemot C, Barré-Sinoussi F, “et al”. Interleukin-7 and infection itself by human immunodeficiency virus 1 favor virus persistence in mature CD4+CD8-CD3+ thymocytes through sustained induction of Bcl-2. *Blood* 2001; 98: 2166-74.
- Guimaraes,ML, Bastos,FI, Telles,PR *et al*: Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J.Clin.Virol.* 2001; 21: 143-151.
- Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, “et al”. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996; 274: 985-9.
- Haase, A.T. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu.Rev.Immunol* 1999; 17: 625-656.
- Hamann D, Baars PA, Martin HGR, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, “et al”. Phenotypic and Functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1407-18.
- Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, et al. Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int. Immunol.* 1999b; 11: 1027-1033.
- Hamann D, Roos MThL, van Lier RAW. Faces and phases of human CD8+ T-cell development. *Immunol. Today.* 1999a; 20: 177-180.
- Harris M, Patenaude P, Cooperberg P, Filipenko D, Thorne A, Raboud J, “et al”. Correlation of virus load in plasma and lymph node tissue in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1997;176(5):1388-92.
- Hassan J, Reen DJ. IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4+ T cells. *Eur J Immunol.*1998;28(10):3057-65.
- Hazan U, Thomas D, Alcami J, et al. Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:7861–7865.
- Hazenber MD, Stuart JWTC, Otto SA, Borleffs JCC, Boucher CAB, Boer RJ, “et al”. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune

activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 2000; 95: 249-55.

Hazzan M, Labalette M, Noel C, Lelievre G, Dessaint JP. Recall response to cytomegalovirus in allograft recipients: mobilization of CD57+, CD28+ cells before expansion of CD57+, CD28- cells within the CD8+ T lymphocyte compartment. *Transplantation*. 1997; 63: 693-698.

He XC, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, "et al". Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 5692-7.

Heath SL, Tew JG, Szakal AK, Burton GF. Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature* 1995; 377:740-744.

Hendriks J, Gravestien LA, Tesselaar K, van Lier RAW, Schumacher TNM, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunol.* 2000; 1: 433-40.

Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, Taub D, Horuk R. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol.* 1997;7(2):112-21.

Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, "et al". Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *Exp Med.* 1993;178(3):1109-14.

Hickman CJ, Crim JA, Mostowski HS, Siegel JP. Regulation of human cytotoxic T lymphocyte development by IL-7. *J Immunol.* 1990;145(8):2415-20.

Hildeman DA, Mitchell T, Teague TK, Henson P, Day BJ, Kappler J, "et al". Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity.* 1999;10(6):735-44.

Hintzen RQ, de Jong R, Lens SMA, Brouwer M, Baars P, van Lier RAW. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J. Immunol.* 1993; 151: 2426-35.

Hintzen RQ, van Lier RAW, Kuijpers KC, Baars P, Schaasberg W, Lucas CJ, "et al". Elevated levels of a soluble form of the T cell activation antigen CD27 in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 1991; 35: 211-7.

Ho DD, Rota TR, Horsch MS. Antibody to lymphadenopathy-associated virus. *N. Engl. J. Med.* 1985;312: 649-50.

Ho HN, Hultin LE, Mitsuyasu RT, Matud JL, Hausner MA, Bockstoe D, et al. Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J Immunol* 1993; 150: 3070-3079.

- Hockett RD, Kilby JM, Derdeyn CA, Saag MS, Sillers M, Squires K, "et al". Constant mean viral copy number per infected cell in tissues regardless of high, low, or undetectable plasma HIV RNA. *Exp Med*. 1999;189(10):1545-54.
- Hoflich C, Docke WD, Busch A, Kern F, Volk HD. CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells. *Int Immunol*. 1998; 10: 1837-1845.
- Hooper M, Kallas EG, Coffin D, Campbell D, Evans TG, Looney RJ. (1999). Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4+CD28- and CD8+CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 1452-1457.
- Hsueh FW, Walker CM, Blackbourn DJ, Levy JA. Suppression of HIV replication by CD8+ cell clones derived from HIV-infected and uninfected individuals. *Cellular Immunology* 1994; 159: 271-9.
- Imami N, Gotch F. Twenty years of HIV-1 research: what the future holds. *Nat Immunol*. 2003; 4 (6): 501
- Imami N, Hardy G. Timing of antiretroviral therapy: an immunological perspective. *J HIV Ther*. 2003; 8 (1): 15-8
- Imami N, Hardy G, Burton C, Pires A, Pido-Lopez J, Moss R, Gazzard B, Gotch F. Immune responses and reconstitution in HIV-1 infected individuals: impact of anti-retroviral therapy, cytokines and therapeutic vaccination. *Immunol Lett*. 2001; 79 (1-2): 63-76.
- Imlach S, McBreen S, Shirafuji T, Leen C, Bell JE, Simmonds P. Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 in vivo and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 2001; 75: 11555-64.
- Inagaki-Ohara K, Nishimura H, Mitani A, Yoshikai Y. Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice. *Eur J Immunol*. 1997;27(11):2885-91.
- Israel N, Hazan U, Alcamí J, et al. Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 1989; 143:3956-3960.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, "et al". The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-43.
- Jacobson EL, Pilaro F, Smith KA. Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10405-10.

- Jaffe JS, Eisenstein E, Sneller MC, Strober W. T-cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *Pediatr Res* 1993a; 33(1 Suppl): S24-27.
- Jaffe JS, Strober W, Sneller M.C. Functional abnormalities of CD8+ T cells define a unique subset of patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1993b; 82: 192-220
- Jeng CR, English RV, Childers T, Tompkins MB, Tompkins WA. Evidence for CD8+ antiviral activity in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1996; 70: 2474-80.
- Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol.* 1991;147(8):2461-6.
- Jin X, Wills M, Sissons JG, Carmichael A. Progressive loss of IL-2-expandable HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during asymptomatic HIV infection. *Eur J Immunol.* 1998;28(11):3564-76.
- Joly P, Guillon JM, Mayaud C, Plata F, Theodorou I, Denis M, Debre P, Autran B. Cell-mediated suppression of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1989 Oct 1;143(7):2193-201.
- Jonuleit H, Wiedemann K, Müller G, Degwert J, Hoppe U, Knop J, “et al”. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells --a role for IL-15 in attraction of T cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 2610-5.
- Jourdan P, Abbal C, Nora N, Hori T, Uchiyama J, Vendrell JP, “et al”. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 in human T cells. *J. Immunol.* 1998; 160: 4153-7.
- Jourdan P, Vendrell JP, Huguet MF, Segondy M, Bousquet J, Pene J, “et al”. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J Immunol.* 2000; 165: 716-24.
- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, “et al”. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(19):7722-6.
- Kacani L, Stoiber H, Dierich MP. Role of IL-15 in HIV-1-associated hypergammaglobulinemia. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:14-18.
- Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, “et al”. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1999. 73: 6715-20.
- Kamin-Lewis R, Abdelwahab SF, Trang C, Baker A, DeVico AL, Gallo RC, “et al”. Perforin-low memory CD8+ cells are the predominant T cells in normal humans synthesize the

- β -chemokine macrophage inflammatory protein-1 β . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 9283-8.
- Kanai T, Thomas EK, Yasutomi Y, Letvin NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. J Immunol. 1996; 157: 3681-7.
- Kannagi M, Chalifoux LV, Lord CI, Letvin NL. Suppression of simian immunodeficiency virus replication in vitro by CD8+ lymphocytes. J Immunol 1988; 140: 2237-42.
- Kannagi M, Masuda, T, Hattori T, Kanoh T, Nasu K, Yamamoto N, "et al". Interference with human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD8+ T cells in peripheral blood leukocytes of asymptomatic HIV carriers in vitro. J Virol 1990; 64: 3399-406.
- Kawamura T, Qualbani M, Thomas EK, Orenstein JM, Blauvelt A. Low levels of productive HIV infection in Langerhans cell-like dendritic cells differentiated in the presence of TGF- β 1 and increased viral replication with CD40 ligand-induced maturation. Eur. J. Immunol. 2001; 31: 360-8.
- Kazazi F, Mathijs JM, Chang J, et al. Recombinant interleukin 4 stimulates human immunodeficiency virus production by infected monocytes and macrophages. J Gen Virol 1992; 73:941-949.
- Keene JA & Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. 1982; 155: 768-82.
- Kern F, Khatamzas E, Surel I, Frömmel C, Reinke P, Waldrop SL, "et al". Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. Eur J Immunol. 1999; 29: 2908-15.
- Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Hoflich C, Reinke P, Volk HD. The enigma of CD57+CD28- T cell expansion-anergy or activation?. Clin. Exp. Immunol. 1996; 104: 180-4.
- Khatri VP, Fehniger TA, Baiocchi RA, Yu F, Shah MH, Schiller DS, "et al". Ultra low dose interleukin-2 therapy promotes a type 1 cytokine profile in vivo in patients with AIDS and AIDS-associated malignancies. Clin Invest. 1998;101(6):1373-8.
- Kimata JT, Kuller L, Anderson DB, Dailey P, Overbaugh J. Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression. Nat Med. 1999;5(5):535-41.
- Kinter A, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. Immunol Rev. 2000; 177:88-98.
- Kinter A, Catanzaro A, Monaco J, Ruiz M, Justement J, Moir S, Arthos J, Oliva A, Ehler L, Mizell S, Jackson R, Ostrowski M, Hoxie J, Offord R, Fauci AS. CC-chemokines

- enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(20):11880-5.
- Kinter A, Fauci AS. Interleukin-2 and human immunodeficiency virus infection: pathogenic mechanisms and potential for immunologic enhancement. *Immunol Res*. 1996a;15(1):1-15.
- Kinter AL, Bende SM, Hardy E.C., Jackson R, Fauci AS.. Interleukin 2 induces CD8+ T cell-mediated suppression of human immunodeficiency virus replication in CD4+ T cells and this effect overrides its ability to stimulate virus expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995a; 92: 10985-9.
- Kinter AL, Ostrowski M, Golleti D, Oliva A, Weissman D, Gantt K, "et al". HIV replication in CD4+ T cells of HIV –infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous β -chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996b; 93: 14076-81.
- Kinter AL, Poli G, Fox L, Hardy E, Fauci AS. HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J. Immunol*. 1995b; 154: 2448-59.
- Kirberg J, Berns A, von Boehmer H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med*. 1997;186(8):1269-75.
- Kishimoto H, Sprent J. Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells. *J Immunol*. 1999;163(4):1817-26.
- Kitchen SG, Korin YD, Roth MD, Landay A, Zack JA. Costimulation of naive CD8+ lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol*. 1998; 72: 9054-60.
- Kitchen SG, Uittenbogaart CH, Zack JA. Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 localization in CD4-negative thymocytes: differentiation from a CD4-positive precursor allows productive infection. *J. Virol*. 1997; 71: 5713-5722.
- Klein MR, Van Baalen CA, Holwerda AM, Garde SRK, Bende RJ, Keet IPM, "et al". Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med*. 1995; 181:1365-72.
- Klenerman P & Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 1998; 394: 482-5.

- Kneitz B, Herrmann T, Yonehara S, Schimpl A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1995;25(9):2572-7.
- Kollmann TR, Pettoello-Mantovani M, Katopodis NF, et al. Inhibition of acute in vivo human immunodeficiency virus infection by human interleukin 10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:3126–3131
- Komanduri KV, Donahoe SM, Moretto WJ, Schmidt DK, Gillespie G, Ogg GS, et al. Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virology* 2001; 279 (2): 459-70.
- Koot M, Keet IPM, Vos AHV, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118:681–688.
- Kootstra NA, Miedema F, Schuitemaker H. Analysis of CD8+ T lymphocyte-mediated nonlytic suppression of autologous and heterologous primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13: 685-93.
- Kootstra NA, van't Wout A, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Interference of interleukin-10 with human immunodeficiency virus type 1 replication in primary monocyte-derived macrophages. *J Virol* 1994; 68:6967–6975.
- Kornbluth RS, Kee K, Richman DD. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5205-10.
- Kostense S, Ogg GS, Manting Eh, Gillespie G, Joling J., Vandenberghe K. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8+ T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur. J. Immunol.* 2001a; 31: 677-86.
- Kostense S, Raaphorst FM, Joling J, Notermans DW, Prins JM, Danner SA, “et al”. T cell expansions in lymph nodes and peripheral blood in HIV-1-infected individuals: effect of antiretroviral therapy. *AIDS* 2001b; 15: 1097-107.
- Koup RA & Ho DD. Shutting down HIV. *Nature* 1994 ; 370: 416.
- Koup RA, Pikora CA, Luzuriaga K, Brettler DB, Day ES, Mazzara GP, “et al”. Limiting dilution analysis of cytotoxic T lymphocytes to human immunodeficiency virus gag antigens in infected persons: in vitro quantitation of effector cell populations with p17 and p24 specificities. *J Exp Med.* 1991;174(6):1593-600.

- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowaky W, "et al". *J. Virol.* 1994. 68: 4650-5.
- Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RTJr, Walker RE, "et al". Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 1996 ; 335: 1350-6.
- Kovacs JA, Vogel S, Metcalf JA, Baseler M, Stevens R, Adelsberger J, "et al". Interleukin-2 induced immune effects in human immunodeficiency virus-infected patients receiving intermittent interleukin-2 immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2001; 81: 1351-60.
- Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen IS. Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 1988; 241:1673-1675.
- Kramer S, Schimpl A, Hunig T. Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene. *J Exp Med.* 1995;182(6):1769-76.
- Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 2000; 288: 675-8.
- Kubo M, Ohashi T, Fujii M, Oka S, Iwamoto A, Harada S, 'et al". Abrogation of in vitro suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication mediated by CD8+ T lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers by staphylococcal enterotoxin B and phorbol esters through induction of tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 1997; 71: 7560-6.
- Labalette, M., Leteurtre, E., Thumerelle, C., Grutzmacher, C., Tourvieille, B., Dessaint, J.-P. Peripheral human CD8+CD28+ T lymphocytes give rise to CD28- progeny, but IL-4 prevents loss of CD28 expression. *Int. Immunol.* 1999; 11: 1327-1335.
- Lacey SF, McDanal CB, Horuk R, Greenberg ML. The CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 is not responsible for CD8+ T cell suppression of syncytia-inducing strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9842-7.
- Lacey SF, Weinhold KJ, Chen CH, McDanal C, Oei C, Greenberg ML. Herpesvirus saimiri transformation of HIV type 1 suppressive CD8+ lymphocytes from an HIV type 1-infected asymptomatic individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 521-31.
- Landay A, Gartland GL, Clement LT. Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2+ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J. Immunol.* 1983;131:2757-2761.
- Landay A, Mackewicz C, Levy J. An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic status. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 106-16.

- Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313: 79–84.
- Lanier LL & Loken MR. Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and Leu-11 cell surface antigen expression. *J. Immunol.* 1984; 132: 151-6.
- Lantz O, Grandjean I, Matzinger P, DiSanto JP. γ chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nature* 2000; 1: 54-8.
- Lawn SD, Butera ST, Folks TM Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4):753-77.
- Lazdins JK, Klimkait T, Alteri E, et al. TGF-beta: upregulator of HIV replication in macrophages. *Res Virol* 1991; 142:239–242.
- Lee B, Rucker J, Doms RW, Tsang M, Hu X, Dietz M, “et al”. B-Chemokine MDC and HIV-1 Infection. *Science* 1998; 281: 487-487
- Lee S, Goldstein H, Baseler M, Adelsberger J, Golding H. Human immunodeficiency virus type 1 infection of mature CD3hiCD8+ thymocytes. *J. Virol.* 1997; 71: 6671-6.
- Leith JG, Copeland KF, McKay PJ, Bienzle D, Richards CD, Rosenthal KL. T cell-derived suppressive activity: evidence of autocrine noncytolytic control of HIV type 1 transcription and replication. *AIDS* 1999; 20: 1553-61.
- Leith JG, Copeland KF, McKay PJ, Richards CD, Rosenthal KL. CD8+ T-cell-mediated suppression of HIV-1 long terminal repeat-driven gene expression is not modulated by the CC chemokines RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *AIDS* 1997; 11: 575-80.
- Lenardo M, Chan FK-M, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis- Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 221-253.
- Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidalo J, Bach B. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 90: 376-382.
- Levy JA, Hsueh F, Blackburn DJ, Wara D, Weintrub PS. CD8 cell noncytotoxic antiviral activity in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected children. *J Infect Dis* 1998; 177: 470-2.

- Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today*. 1996;17(5):217-24.
- Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS*. 1993;7(11):1401-10.
- Lewis DE, Tang DSN, Adu-Oppong A, Schober W, Rodgers JR. Anergy and apoptosis in CD8+T cells from HIV-infected persons. *J. Immunol*. 1994; 153: 412-420.
- Lewis DE, Yang L, Luo W, Wang X, Rodgers JR. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte precursors exist in a CD28-CD8+ T cell subset and increase with loss of CD4 T cells. *AIDS*. 1999; 13: 1029-33.
- Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suci-Foca N. T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *Immunol*. 1999;163(12):6386-92.
- Lieberman J, Shankar P, Manjunath N, Anderson J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* 2001; 98: 1667-77.
- Lieberman J, Trimble LA, Friedman RS, Lisziewicz J, Lori F, Shankar P, Jessen H. Expansion of CD57 and CD62L-CD45RA+CD8 T lymphocytes correlates with reduced viral plasma RNA after primary HIV infection. *AIDS* 1999; 13: 891-899.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol*. 1998;10(6):775-83.
- Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bell JE, Simmonds P, and the Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. *Lancet* 1996; 348: 649-54.
- Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, "et al". Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol*. 2001; 75: 10319-25.
- Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, "et al". IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*. 1998; 9 (5): 669-76.
- Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, "et al". CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):344-5.

- Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, "et al". Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol.* 1999;90(2):213-9.
- Lu Z, Yuan L, Zhou X, Sotomayor E, Levitsky H, Pardoll DM. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 541-50.
- Lucey DR, Pinto LA, Bethke FR, et al. In vitro immunologic and virologic effects of interleukin 15 on peripheral blood mononuclear cells from normal donors and human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4:43-48.
- Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, Baseler M, "et al". Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature.* 1991;349(6309):533-5.
- Lusso P, di Marzo Veronese F, Ensoli B, Franchini G, Jemma C, De Rocco SE,"et al". Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science.* 1990;247(4944):848-52.
- Lusso,P and Gallo,RC: Human herpesvirus 6 in AIDS. *Immunol.Today* 1995; 16: 67-71.
- Lynne JE, Schmid I, Matud JL, Hirji K, Buessow S, Shlian DM, Giorgi JV. (1998). Major expansions of select CD8+ subsets in acute Epstein-Barr virus infection: comparison with chronic human immunodeficiency virus disease. *J Infect Dis* 1998; 177:1083-1087.
- Macchi,B, Graziani,G, Zhang,J, and Mastino,A: Emergence of double-positive CD4/CD8 cells from adult peripheral blood mononuclear cells infected with human T cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Cell Immunol.* 1993; 149: 376-389.
- Mackall C, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 97: 1491-7.
- Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997; 18: 245-51.
- Mackay CR. Immunological Memory. *Advances Immunol* 1993; 53: 217-265.
- Mackewicz C, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992; 8(6):1039-50.
- Mackewicz CE, Barker E, Levy JA. Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication [letter; comment]. *Science*1996; 274: 1393-5.

- Mackewicz CE, Blackbourn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc.Natl. Acad Sci USA*. 1995; 92: 2308-12.
- Mackewicz CE, Ortega H, Levy JA. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell Immunol*. 1994a; 153: 329-33.
- Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* . 1991; 87: 1462-6.
- Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* 1994b; 344:1671–1673.
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel RA. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47:333–348
- Maggi L, Giudizi MG, Biagiotti R, Annunziato F, Manetti R, Piccinni MP, “et al”. Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Exp. Med*. 1994; 180: 489-95.
- Maher P, O’Toole CM, Wreghitt TG, Spiegelhalter DJ, English TA. Cytomegalovirus infection in cardiac transplant recipients associated with chronic T-cell ratio inversion with expansion of a Leu-7+TS-C+ subset. *Clin. Exp. Immunol*. 1985; 62: 515-524.
- Malek TR, Porter BO, He Y-W. Multiple γ c-dependent cytokines regulate T-cell development. *Immunol.Today* 1999; 20: 71-76.
- Manfredi R, Cariani T, Latini F, Chiodo F. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of HIV-related leucopenia. *Acta Paediatr* 1995; 84:943–944.
- Manfredi R, Mastroianni A, Coronado O, Chiodo F. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rHuGM-CSF) in leukopenic patients with advanced HIV disease. *J Chemother* 1996; 8:214–220.
- Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley MA, Hieshima K, “et al”. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest*. 2001; 108: 871-9.
- Mann, D.A. Molecular biology of the human immunodeficiency viruses. *AIDS* 1996; : 01-24.
- Manyonda I, Soltys A, Hay F. A critical evaluation of the magnetic cell sorter and its use in the positive and negative selection of CD45RO+ cells. *J Immunol Meth* 1992; 149: 1-10.

- Marodon G, Warren D, Filomio MC, Posnett DN. Productive infection of double-negative T cells with HIV *in vivo*. PNAS 1999; 96: 11958-11963.
- Marrack P, Bender J, Hilderman D, Jordan M, Mitchell T, Murakami M, "et al". Homeostasis of $\alpha\beta$ TCR+ T cells. Nature Immunol. 2000; 1: 107-11.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type interferons keep activated T cells alive. J.Exp. Med. 1999; 189: 521-9.
- Martin KA, Wyatt R, Farzan M, Choe H, Marcon L, Desjardins E, et al. CD4-independent binding of SIV gp120 to rhesus CCR5. Science. 1997;278(5342):1470-3.
- Masood R, Lunardi-Iskandar Y, Moudgil T, Zhang Y, Law RE, Huang CL, "et al."IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202(1):374-83.
- Mathé G, Morette C, Hallard M, Sala M, Orbach-Arbouys, S. Changes in the level of blood suppressor CD8+C57+ lymphocytes, when HIV1 p24 antigen reappears in the blood. Biomed & Pharmacother 1994; 48: 3-5.
- Mathews, TJ Dilemma of neutralizing resistance of HIV-1 field isolates and vaccine development. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1994; 10: 631-2.
- Matloubian M, Suresh M, Glass A, Galvan M, Chow K, Whitmire JK, "et al"..A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. JVirol. 1999. 73: 2527-36.
- McBreen S, Imlach S, Shirafuji T, Scott GR, Leen C, Bell JE, Simmonds P. Infection of the CD45RA+ (naive) subset of peripheral CD8+ lymphocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1 *in vivo*. J. Virol. 2001; 75:4091-4102
- McDougal J, Kennedy M, Slich J, Cort S, Mawle A, Nicholson J. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. Science 1986; 231:382-385.
- McFarland HI, Nahill SR, Maciaszek JW, Welsh RM. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. Immunol. 1992 Aug 15;149(4):1326-33.
- McMichael A. & Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. Annu.Rev.Immunol 1997; 15: 271-96.
- McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. Nature. 2001; 410 (6831): 980-7.

- McMichael, A. HIV T cell responses to HIV. *Current Opinion Immunol.* 2000; 12: 367-369.
- Meltzer MS, Gendelman HE. Effects of colony stimulating factors on the interaction of monocytes and the human immunodeficiency virus. *Immunol Lett* 1988; 19:193–198.
- Mercure L, Phaneuf D, Wainberg MA. Detection of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA in persistently infected CD8+ cells. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 10):2077-83.
- Merkenschlager M, Terry L, Edwards R, Beverley PCL. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur. J. Immunol.* 1988; 18: 1653-61.
- Merrill JE, Koyanagi Y, Chen ISY. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J Virol* 1989; 63:4404–4408.
- Meyaard L, Otto S, Keet I, vanLier R, Miedema F. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1994;84:4262–4268.
- Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RPM, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257:217–219.
- Miedema F, Meyaard L, Koot M, Klein MR, Roos MT, Groenink M, “et al”. Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev.* 1994; 140: 35-72.
- Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; 82: 1908–1914.
- Mikovits JA, Meyers AM, Ortaldo JR, et al. IL-4 and IL-13 have overlapping but distinct effects on HIV production in monocytes. *J Leukoc Biol* 1994; 56:340–346.
- Mingari MC, Ponte M, Bertone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, “et al”. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *PNAS USA* .1998; 95: 1172-7.
- Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R, Moretta L. Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol.* 2000; 61: 44-50.
- Mitsuyasu RT. The potential role of interleukin-2 in HIV. *AIDS* 2001; 15: s22-s27.

- Mohamadzadeh M, McGuire MJ, Dougherty I, Cruz PD Jr. Interleukin-15 expression by human endothelial cells: up-regulation by ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A treatment. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1996;12(1):17-21.
- Moir S, Lapointe R, Malapisna A, Ostrowski M, Cole CE, Chun T-W, "et al". CD40-mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir. *J.Virol*. 1999; 73: 7972-80.
- Mollet L, Li TS, Samri A, Tournay C, Tubiana R, Calvez V, "et al". Dynamics of HIV-specific CD8+ T lymphocytes with changes in viral load. The RESTIM and COMET Study Groups. *J Immunol*. 2000; 165: 1692-704.
- Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, "et al". CD8^{hi}+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. *Int. Immunol*. 1998; 10: 311-23.
- Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J Gen Virol* 1994;75:3393–3400.
- Montaner,LJ, Ringler,DJ, Wyand,MS *et al*: Study of long-term cultures of simian immunodeficiency virus (SIVmac 251)-infected peripheral blood lymphocytes. *Lab Invest* 1990; 63: 242-247.
- Moran PA, Diegel ML, Sias JC, Ledbetter JA, Zarling JM. Regulation of HIV production by blood mononuclear cells from HIV-infected donors: I. Lack of correlation between HIV-1 production and T cell activation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993; 9(5):455-64
- Moriuchi H, Moriuchi M, Combadiere C, Murphy PM, A.S. Fauci PM. CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 15341-5.
- Morley, J.K., Batliwalla, F.M., Hingorani, R., Gregersen, P.K. Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset. *J. Immunol*. 1995; 154: 6182-6190.
- Mueller YM, Bojczuk PM, Halstead ES, Kim AH, Witek J, Altman JD, Katsikis PD. IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2003a; 1;101(3):1024-9.
- Mueller YM, Makar V, Bojczuk PM, Witek J, Katsikis PD. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol*. 2003b; 15(1):49-58

- Mugnaini EN, Haaheim LL, Sannes M, Brinchmann JE. In vivo expansion coincident with excessive in vitro cell death within the memory subset of CD8⁺ T cells in HIV type 1 infection. *AIDS* 1999; 15: 265-272.
- Murali-Krishna K & Ahmed R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J. Immunol.* 2000 ; 165: 1733-7.
- Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science.*1999; 286(5443):1377-81.
- Musey LK, Krieger JN, Hughes JP, Schacker TW, Corey L, McElrath MJ. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 1999;180(2):278-84.
- Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor γ chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 189-15.
- Naora H & Gougeon ML. Activation, survival and apoptosis of CD45RO⁺ and CD45RO⁻ T cells of human immunodeficiency virus-infected individuals: effects of interleukin-15 and comparison with interleukin-2. *Immunology* 1999a; 97: 181-7.
- Naora H & Gougeon ML. Interleukin-15 is a potent survival factor in the prevention of spontaneous but not CD95-induced apoptosis in CD4 and CD8 T lymphocytes of HIV-infected individuals. Correlation with its ability to increase BCL-2 expression. *Cell Death Differ.* 1999b; 6: 1002-11.
- Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, "et al". Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nature* 2001; 7: 73-79.
- Needham LK & Schnaar RL. The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1993; 90: 1359-63.
- Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56 (NKH1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interactions. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 1757-61.
- Novak RM, Holzer TJ, Kennedy MM, Heynen CA, Dawson G. The effect of interleukin 4 (BSF-1) on infection of peripheral blood monocyte-derived macrophages with HIV-1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1990; 6:973-976.
- Nugeyre MT, Monceaux V, Beq S, Cumont MC, Ho Tsong Fang R, Chêne L, Morre M, Barré-Sinoussi F, Hurtrel B, Israël N. IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral

- replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Immunol.* 2003;171(8):4447-53.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos JL, "et al". The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-35.
- Ogg G S, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PD, Nowak M, Monard S, "et al". Quantitation of HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279: 2103-6.
- Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael A J. Longitudinal phenotypic analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J. Virol.* 1999; 73: 9153-60.
- Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, "et al". Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV) infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest.* 1998; 102: 223-31.
- Ostrowski MA, Justement SJ, Ehler L, Mizell SB, Lui S, Mican J, "et al". The role of CD4+ T cell help and CD40 ligand in the in vitro expansion of HIV-1-specific memory cytotoxic CD8+ T cell responses. *J Immunol.* 2000; 165: 6133-41.
- Paiardini M, Galati D, Cervasi B, Cannavo G, Galluzzi L, Montroni M, et al. Exogenous interleukin-2 administration corrects the cell cycle perturbation of lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Virol.* 2001; 75(22):10843-55.
- Pal R, Garzino-Demo A, Markham PD, Burns J, Brown M, Gallo RC, DeVico AL. Inhibition of HIV-1 infection by the beta-chemokine MDC. *Science* .1997; 278: 695-8.
- Paliard X, Lee AY, Walker CM. RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta are not involved in the inhibition of HIV-1SF33 replication mediated by CD8+ T-cell clones. *Aids.* 1996; 10: 1317-21.
- Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyins H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW "et al". Major expansion of CD8+T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature* .1994; 370: 463-7.
- Pantaleo G, DeMaria A, Koenig S, et al. CD8+ T lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4818-4822.

- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, "et al". Hiv infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993; 362: 355-359.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Butini, L., Pizzo, P., Schnittman, S.M., Ktler, D.P., Fauci, A.S. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 9838–9842.
- Patki AH, Quinones-Mateu ME, Dorazio D, Yen-Lieberman B, Boom WH, Thomas EK. et al. Activation of antigen-induced lymphocyte proliferation by interleukin-15 without the mitogenic effect of interleukin-2 that may induce human immunodeficiency virus-1 expression. *J Clin Invest*. 1996; 98: 616-21.
- Patterson BK, Czerniewski M, Andersson J, Sullivan Y, Su F, Jiyamapa D, et al. Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clin Immunol*. 1999; 91 (3): 254-62.
- Patterson S, Era A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J. Virol*. 2001; 75: 6710-3.
- Pau AK, Tavel JA. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients. *Curr Opin Pharmacol*. 2002; 2(4):433-9.
- Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, "et al". Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med*. 1996; 2: 412-7.
- Paxton WA, Neumann AU, Kang S, Deutch L, Brown RC, Koup RA, "et al". RANTES production from CD4+ lymphocytes correlates with host genotype and rates of human immunodeficiency virus type 1 disease progression. *J Infect Dis*. 2001;183(11):1678-81.
- Pedral-Sampaio, DB, Martins, NE, Pedrosa, C *et al*: Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a brazilian hospital. *Braz.J.Infect.Dis*. 1997; 1: 31-35.
- Penn ML, Grivel JC, Schramm B, Goldsmith MA, Margolis L. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(2):663-8.
- Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol*. 1999; 162: 2606-12.

- Perno CF, Yarchoan R, Cooney DA, et al. Replication of human immunodeficiency virus in monocytes. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) potentiates viral production yet enhances the antiviral effect mediated by 3 ϕ -azido-2 ϕ 3 ϕ -dideoxythymidine (AZT) and other dideoxynucleoside congeners of thymidine. *J Exp Med* 1989; 169:933–951.
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, “et al”. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180(5):1955-60.
- Picchio GR, Gulizia RJ, Wehrly K, Chesebro B, Mosier DE. The cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 determines the kinetics of plasma viremia in SCID mice reconstituted with human peripheral blood leukocytes. *J Virol*. 1998;72(3):2002-9. Erratum in: *J Virol* 1998;72(9):7707.
- Pido-Lopez,J, Burton,C, Hardy,G *et al*: Thymic output during initial highly active antiretroviral therapy (HAART) and during HAART supplementation with interleukin 2 and/or with HIV type 1 immunogen (Remune). *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 2003; 19: 103-109.
- Pierson T, McArthur J, Siciliano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu.Rev.Immunol* 2000; 18: 665-708.
- Piras MA, Lovigu C, Sanna MG, Babudieri S,Caiazza R,Salis MT, Panichi G . HNK-1 peripheral blood lymphocytes in HIV infected patients. *Boll Ist Sieroter Milan*1990; 69: 343-347.
- Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC, Romero P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol*. 2000; 164: 1148-52.
- Plaeger-Marshall S, Hausner MA, Isacescu V, Giorgi JV. CD8 T-cell-mediated inhibition of HIV replication in HIV infected adults and children. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1375-1376.
- Plaeger-Marshall S, Hultin P, Bertolli J, O'Rourke S, Kobayashi R, Kobayashi AL, et al. Activation and differentiation antigens on T cells of healthy, at-risk, and HIV-infected children. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*1993; 6: 984-993.
- Plata F, Autran B, Martins LP, et al. AIDS virus–specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 1987; 328:348–351.
- Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* 1994; 24:221–233.

- Poli G, Orenstein JM, Kinter A, Folks TM, Fauci AS. Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 1989; 244:575–577.
- Poli G, Fauci AS. Cytokine modulation of HIV expression. *Semin Immunol.* 1993;5(3):165-73.
- Poli G, Kinter A, Justement JS, et al. Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:782–785.
- Poli G, Kinter AL, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor beta suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 1991; 173:589–597.
- Pollack H, Zhan MX, Safrit JT, Chen SH, Rochford G, Tao PZ, “et al”. CD8+ T-cell-mediated suppression of HIV replication in the first year of life: association with lower viral load and favorable early survival. *AIDS.* 1997; 11: F9-13.
- Pontesilli O, Klein MR, Kerkhof-Garde SR, Pakker NG, de Wolf F, Schuitemaker H, “et al”. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: a predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* 1998; 178: 1008-18.
- Pope M, Betjes MG, Romani N, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; 78:389–398.
- Posnett DN, Edinger JW, Manavalan JS, Irwin C, Marodon G. Differentiation of human CD8 T cells: Implications for in vivo persistence of CD8+CD28- cytotoxic effector clones. *Int. Immunol.* 1999; 11: 229-241.
- Potempa S, Picard L, Reeves JD, Wilkinson D, Weiss RA, Talbot SJ. CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry. *J Virol.* 1997; 71(6):4419-24.
- Potter SJ, Dwyer DE, Saksena NK. Differential cellular distribution of HIV-1 drug resistance in vivo: evidence for infection of CD8+ T cells during HAART. *Virology.* 2003; 305 (2): 339-52.
- Prince HE, Jensen ER. Three-color cytofluorometric analysis of CD8 cell subsets in HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1991; 4: 1227-1232.
- Quan CP, Watanabe S, Vuillier F, Pires R, Matsuo T, Stanislawski M, Pillot J, Bouvet JP. Purification and partial amino acid sequence of suppressive lymphokine from a CD8+ CD57+ human T hybridoma. *Immunology.* 1993;78(2):205-9.
- Quinn TC. Acute primary HIV infection. *JAMA.* 1997 Jul 2;278(1):58-62.

- Rabin, R.L., Roederer, M., Maldonado, Y., Petru, A., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2054-2060.
- Radkowski, M., Sadowska, M., Kopicz-Kaminska, E., Horban, A., and Slusarczyk, J: [Coexpression of CD4 and CD8 antigens and the appearance of HLA-DR and CD25 receptors on lymphocytes as markers of immune activation in patients with HIV infection]. *Pol.Merkuriusz.Lek.* 1996; 1: 325-326.
- Ramilo O, Bell KD, Uhr JW, Vitetta ES. Role of CD25+ and CD25- T cells in acute HIV infection in vitro. *J Immunol* 1993; 150:5202–5208.
- Rautonen J, Rautonen N, Martin NL, Philip R, Wara DW. Serum interleukin-6 concentrations are elevated and associated with elevated tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G and A concentrations in children with HIV infection. *AIDS* 1991;5: 1319–1325.
- Reeves JD, Hibbitts, S, Simmons, G *et al*: Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J.Virol.* 1999; 73: 7795-7804.
- Reeves JD, McKnight A, Potempa S, Simmons G, Gray PW, Power CA, et al. CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology.* 1997;231(1):130-4.
- Reeves JD, Schulz TF. The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope-mediated fusion. *J Virol.* 1997;71(2):1453-65.
- Reinhart TA, Rogan MJ, Huddleston D, Rausch DM, Eiden LE, Haase AT. Simian immunodeficiency virus burden in tissues and cellular compartments during clinical latency and AIDS. *Infect Dis.* 1997;176(5):1198-208.
- Ribrag, V, Salmon, D, Picard, F *et al*: Increase in double-positive CD4+CD8+ peripheral T-cell subsets in an HIV-infected patient. *AIDS* 1993; 7: 1530
- Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994; 169:968–974.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 1998; 393: 474-8.
- Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol* 1991; 147:2922–2927.

- Robert-Guroff M, Brown M, Gallo RC. HTLV-III neutralising antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* 1985;316: 72-4.
- Roederer M. Getting to the HAART of T cell dynamics. *Nat.Med.* 1998; 4: 145-146.
- Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2061-6.
- Roederer M, Raju PA, Mitra DK, Herzenberg LA. HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated CD3/CD28. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1555-1564.
- Roos MT, van Lier RA, Hamann D, Knol GJ, Verhoofstad I, van Baarle D, “et al”. Changes in the composition of circulating CD8+ T cell subsets during acute Epstein-Barr and Human Immunodeficiency Virus infections in humans. *J. Infect Dis* 2000; 182: 451-8.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, “et al”. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* 1997 ; 278: 1447-50.
- Rosenkranz RA, Majdic O, Baumgartner G, Knapp W. Changes of CD27 expression during lifetime. 8th Int. Congress of immunol., Budapest 1992; 4: 33.
- Rosok B, Voltersvik P, Larsson BM, Albert J, Brinchmann JE, Asjo B. CD8+ T cells from HIV type 1-seronegative individuals suppress virus replication in acutely infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997; 13: 79-85.
- Rouleau M, Bernard A, Lantz O, Vernant JP, Charpentier B, Senik A. Apoptosis of activated CD8+/CD57+ T cells is induced by some combinations of anti-CD2 mAb. *J Immunol.*1993; 151: 3547-3556.
- Rowland-Jones S L. HIV: The deadly passenger in dendritic cell. *Current Biol.* 1999; 9:248-250.
- Rowland-Jones SL. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol.* 2003; 3 (4): 343-8.
- Rubbert A, Weissman D, Combadiere C, Pettrone K, Daucher JA, Murphy PM,et al. Multifactorial nature of noncytolytic CD8+ T cell-mediated suppression of HIV replication: β -chemokine-dependent and –independent effects. *AIDS* 1997; 13: 63-9.
- Ruthlein J, James SP, Strober W. Role of CD2 in activation and cytotoxic function of CD8/Leu-7-positive cells. *J. Immunol.* 1988; 141: 3791-3797.
- Sad S, Kagi D, Mosmann TR. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1543-7.

- Sadat-Sowti B, Debre P, Idziorek T, Guillon JM, Hadida F, Okzenhendler E, "et al". A lectin-binding soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from AIDS patients inhibits T cell cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 737-41.
- Sadat-Sowti B, Debré P, Mollet L, Quint L, Hadida F, Leblond V, "et al". An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients. *Eur. J. Immunol* 1994a; 24: 2882-8.
- Sadat-Sowti B, Parrot A, Quint L, Mayaud C, Debre P, Autran B. Alveolar CD8+CD57+ lymphocytes in human immunodeficiency virus infection produce an inhibitor of cytotoxic functions. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994b; 149 : 972-80.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell.* 1993;75(2):253-61.
- Saha K, Bentsman G, Chess L, Volsky DJ. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol.*1998;72:876-81.
- Saha K, Zhang J, Gupta A, Dave R, Yimen M, Zerhouni B. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nature* . 2001a; 7: 65-72.
- Saha K, Zhang J, Zerhouni B. Evidence of productively infected CD8+ T cells in patients with AIDS: implications for HIV-1 pathogenesis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001b; 26: 199-207.
- Salgame P, Guan MX, Agahtehrani A, Henderson EE. Infection of T cell subsets by HIV-1 and the effects of interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18(7):521-8.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-12.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, "et al". Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1998;28(9):2760-9.
- Sandberg JK, Fast NM, Nixon DF. Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 2001; 167: 181-7.
- Sanders ME, Makgoba MW, Sharrow SO, Stephany D, Springer TA, Young HA, "et al". Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCLH-1, CDw29 and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J. Immunol.* 1988; 140: 1401-7.

- Saville MW, Taga K, Foli A, Broder S, Tosato G, Yarchoan R. Interleukin-10 suppresses human immunodeficiency virus-1 replication in vitro in cells of the monocyte/macrophage lineage. *Blood* 1994; 83:3591–3599.
- Scala E, D'Offizi G, Rosso R, Turriziani O, Ferrara R, Mazzone AM, “et al”. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J Immunol.* 1997; 158: 4485-92 .
- Schechter,M, Harrison,LH, Halsey,NA *et al*: Coinfection with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV in Brazil. Impact on markers of HIV disease progression. *JAMA* 1994; 271: 353-357.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2000; 1(5):426-32.
- Schmitt N, Chêne L, Boutolleau D, Nugeyre MT, Guillemard E, Versmisse P, “et al “,Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol.* 2003; 77(10): 5784-93
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, “et al”. 1999; Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999; 283: 857-60.
- Schoenberger SP, Toes REM, van de Voort EIH, Offringa R, Melief CJM. T cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interaction. *Nature* .1998; 393: 480-3.
- Shoji,H, Nakanaga,K, and Yoshihara,N: [HIV infection of CD4-CD8+ T-cell line derived from patients with HAM]. *Rinsho Byori* 1991; 39: 949-953.
- Schuitmaker H, Kootstra NA, Koppelman MHGM, et al. Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89:1154–1160.
- Scripture-Adams DD, Brooks DG, Korin YD, Zack JA Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *J Virol.* 2002; 76(24):13077-82.
- Seder RA, Grabstein KH, Berzofsky JA, McDyer JF. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J Exp Med.* 1995; 182: 1067-77.

- Semenzato G, Agostini C, Ometto L, Zambello R, Trentin L, Chieco-Bianchi L, "et al". CD8+ T lymphocytes in the lung of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1. *Blood*. 1995; 85(9):2308-14.
- Severino ME, Sipsas NV, Nguyen PT, Kalams SA, Walker BD, Johnson RP, "et al". Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary CD4+ T lymphocytes, monocytes, and dendritic cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74: 6695-9.
- Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000; 96 (9): 3094-101.
- Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol* 1992; 66:1321–1328.
- Shirazi Y, Pitha PM. Interferon alpha-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 provirus synthesis in T-cells. *Virology* 1993; 193:303–312.
- Sieg S, Smoth DI, Yildirim Z, Kaplan D. Fas ligand deficiency in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 5860-5.
- Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. Differential Expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J. Virol*. 2001; 75: 9983-9985.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF . Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003; 9(6):727-8.
- Silvestris F, Camarda G, Del Prete A, Tucci M, Dammacco F. Nef protein induces differential effects in CD8+ cells from HIV-1-infected patients. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29: 980-91.
- Sleasman JW, Aleixo LF, Morton A, Skoda-Smith S, Goodenow MM. CD4+ memory T cells are the predominant population of HIV-1-infected lymphocytes in neonates and children. *AIDS*. 1996; 10(13):1477-84.
- Smith K A. Low-dose daily interleukin-2 immunotherapy: accelerating immune restoration and expanding HIV-specific T-cell immunity without toxicity. *AIDS* 2001; 15: s28-s35.
- Smithgall MD, Wong JGP, Critchett KE, Haffar OK. IL-7 up-regulates HIV-1 replication in naturally infected peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol*. 1996; 156: 2324-30.

- Soares MVD, Borthwick NJ., Maini MK, Janossy G, Salmon M, Akbar AN. IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA⁺ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J. Immunol.* 1998; 161: 5909-17.
- Solana R. & Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine.* 2000; 18: 1613-20.
- Sousa AE, Chaves AF, Doroana M, Antunes F, Victorino RM. Kinetics of the changes of lymphocyte subsets defined by cytokine production at single cell level during highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol.* 1999a; 162: 3718-26.
- Sparshott SM & Bell EB. Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic in vivo. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 2573-8.
- Spaulding C, et al. Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp. Gerontol.* 1999; 34: 633-644.
- Speck RF, Esser U, Penn ML, Eckstein DA, Pulliam L, Chan SY, et al. A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1. *Current Biol.* 1999; 9: 547-550.
- Speiser DE, Valmori D, Rimoldi D, Pittet MJ, Lienard D, Cerundolo V, "et al". CD28- cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 1990-9.
- Spiegel HM, Ogg GS, DeFalcon E, Sheehy ME, Monard S, Haslett PA, "et al". Human immunodeficiency virus type 1- and cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can persist at high frequency for prolonged periods in the absence of circulating peripheral CD4(+) T cells. *J Virol.* 2000; 74 (2): 1018-22.
- Spina CA, Prince HE, Richman DD. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest.* 1997; 99(7):1774-85.
- Spira AI, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; 183:215–225.
- Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H, Justement JS, Sullivan M, Boone E, "et al". Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Exp Med.* 1993;178(4):1151-63.
- Stellbrink HJ, van Lunzen J, Westby M, O'Sullivan E, Schneider C, Adam A, "et al". Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral

- DNA (COSMIC trial). *AIDS*. 2002 ;26;16(11):1479-87. Erratum in: *AIDS* 2002; 16(15): 2103.
- Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, “et al”. Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 1030-5.
- Su L, Kaneshima M, Bonyhadi M, Salimi S, Kraft D, Rabin L, McCune JM. HIV-1 induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathicity and infection of progenitor cells in vivo. *Immunity* 1995; 2: 25-36.
- Sullivan, YB, Landay, AL, Zack, JA, Kitchen, SG, and Al Harthi, L: Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology* 2001; 103: 270-280.
- Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa N, Maeda N, “et al”. Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine-induced CD4(+) T-helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J Virol*. 1999;73(1):316-24.
- Swain SL, Hu H, Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science*. 1999; 286 (5443): 1381-3.
- Sytwu HK, Liblau RS, McDevitt HO. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity*. 1996;5(1):17-30.
- Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinber, “et al”. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *PNAS* 2001; 98: 8732-7.
- Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science*. 1997;276(5321):2057-62.
- Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, “et al”. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev*. 2000; 121: 77-88.
- Taylor JR Jr, Kimbrell KC, Scoggins R, Delaney M, Wu L, Camerini D. Expression and function of chemokine receptors on human thymocytes: implications for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001; 75(18):8752-60.
- Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol*. 1997;158(12):5791-6.

- Teague TK, Schaefer BC, Hildeman D, Bender J, Mitchell T, Kappler JW, "et al". Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *Exp Med*. 2000;191(6):915-26.
- Terry LA, Brown H, Beverley PCL. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180.000 MW component of the man leukocyte-common antigen, CD45. *Immunology* 1988; 64: 331-6.
- Tersmette M, Gruters RA, DeWolf F, et al. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989a; 63:2118–2125.
- Tersmette M, Lange JMA, DeGoede REY, et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989b; 1:983–985.
- Thomas ML, LeFrançois L. Differential expression of the leukocyte-common antigen family. *Immunol. Today* 1988; 9: 320-6.
- Tomaras GD, Greenberg ML. CD8+ T cell mediated noncytolytic inhibition of human immunodeficiency virus type I. *Front Biosci*. 2001;6:D575-98.
- Tomaras GD, Lacey SF, McDanal CB, Ferrari G, Weinhold KJ, Greenberg ML. CD8+ T cell-mediated suppressive activity inhibits HIV-1 after virus entry with kinetics indicating effects on virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3503-8.
- Tomiya H, Oka S, Ogg GS, Ida S, McMichael AJ, Takiguchi M. Expansion of HIV-1-specific CD28- CD45RA- CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected individuals. *AIDS* 2000; 14:2049-51.
- Toso JF, Chen CH, Mohr JR, Piglia L, Oei C, Ferrari G, "et al". Oligoclonal CD8 lymphocytes from persons with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection inhibit HIV-1 replication. *J. Infec Dis*. 1995; 172: 964-73.
- Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, Lieberman J. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *J Virol*. 2000; 74: 7320-30.
- Trkola A, Paxton WA, Monard SP, Hoxie JA, Siani MA, Thompson DA, "et al". Mackay. Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by CC and CXC chemokines. *J Virol*. 1998;72(1):396-404.

- Tsubota H, Lord CI, Watkins DI, Morimoto C, Letvin NL. A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 1989a;169(4):1421-34.
- Tsubota H, Ringler DJ, Kannagi M, King NW, Solomon KR, MacKey JJ, "et al". CD8+CD4- lymphocyte lines can harbor the AIDS virus in vitro. *Immunol.* 1989b;143(3):858-63.
- Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol.* 2000;30(7):1823-9.
- Uittenbogaart CH, Boscardin WJ, Anisman-Posner DJ, Koka PS, Bristol G, Zack JA. Effect of cytokines on HIV-induced depletion of thymocytes in vivo. *AIDS.* 2000;14(10):1317-25.
- Unutmaz D, KewalRamani VN, Marmon S, Littman DR. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1999; 189: 1735-46.
- Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albet J, Karlsson A, "et al". Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Pro.Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 8886-91.
- Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Boogaerts MA, Ceuppens JL. CD57+/CD28- T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. *Leukemia* 1998; 12: 1573-1582.
- van Meerwijk JP, Marguerat S, MacDonald HR. Homeostasis limits the development of mature CD8+ but not CD4+ thymocytes. *J Immunol.* 1998;160(6):2730-4.
- van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* 1996;4(3):321-8.
- Vanham G, Penne L, Devalck J, Kestens L, Colebunders R, Bosmans E, "et al". Decreased CD40 ligand induction in CD4 T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 117: 335-42.
- Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med.* 1997;186(2):325-30.
- Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *PNAS.* 1998; 95: 3810-5.

- Verani A, Scarlatti G, Comar M, Tresoldi E, Polo S, Giacca M, "et al". C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med.* 1997; 185: 805-16.
- Villacres MC & Bergmann CC. Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4-deficient mice. *J. Immunol.* 1999; 162: 2663-70.
- Vingerhoets J, Bisalinkumi E, Penne G, Colebunders R, Bosmans E, Kestens L,"et al". Altered receptor expression and decreased sensitivity of T-cells to the stimulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-12 in HIV infection. *Immunol Lett.* 1998; 61(1):53-61.
- Vingerhoets JH, Kestens L, Penne G, De Vuyst H, Vandenbruaene M, Pelgrom Y,"et al". CD8+ cells and not CD4+ T cells are hyporesponsive to CD28- and CD40L-mediated activation in HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 107: 440-7.
- Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL, Penne GG, Colebunders RL, Vandenbruaene MJ, "et al". Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 100: 425-33.
- Vivien L, Benoist C, Mathis D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int. Immunol.* 2001; 13: 763-8.
- von Sydow M, Sonnerborg A, Gaines H, Strannegard O. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1991; 7:375-380.
- Vyakarnam A, Matear P, Martin S, Wagstaff M. Th1 cells specific for HIV-1 gag p24 are less efficient than Th0 cells in supporting HIV replication, and inhibit virus replication in Th0 cells. *Immunology* 1995; 86:85-96.
- Vyakarnam A, McKeating J, Meager A, Beverley PC. Tumour necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. *AIDS* 1990; 4:21-27.
- Waldmann TA & Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 19-49.
- Waldmann, T.A. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J. Clin. Immunol.* 2001; 22: 51-56.
- Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001; 14: 105-110.

- Waldmann TA, Tagaya Y & Bamford R N. Interleukin-2, interleukin 15, and their receptors. *Int. Rev. Immunol.* 1998; 16: 205-226.
- Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987; 328:345–348.
- Walker C & Levy J. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 1989; 66: 628-30.
- Walker C, Erickson A, Hsueh F, Levy, J. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol.* 1991; 65: 5921-7.
- Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986; 234: 1563-6.
- Wang E, Taylor-Wiedeman J, Perera P, Fisher J, Borysiewicz L. Subsets of CD8,CD57 cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 297-305.
- Wang EC & Borysiewicz LK. The role of CD8+, CD57+ cells in human cytomegalovirus and other viral infections. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995; 99: 69-77.
- Wang EC, Lehner PJ, Graham S, Borysiewicz LK. CD8high (CD57+) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 2903-9.
- Wang EC, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK. CD8highCD57+ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol.* 1995; 155: 5046-56.
- Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, “et al”. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 64: 642-9.
- Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, “et al”. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *Clin Invest.* 1995; 95(6):2945-53.
- Watanabe N, Tomizawa-Kawana A, Goto M, Ajisawa A, Nakamura T, Iwamoto A. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS* 2001; 15: 711-715.
- Webb LM, Foxwell BM, Feldmann M. Putative role for interleukin-7 in the maintenance of the recirculating naïve CD4+ T-cell pool. *Immunology.* 1999; 98 (3): 400-5.

- Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JGP. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J. Immunol.* 1999a; 162: 7569-7577.
- Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Hicks R, Sissons JG, Carmichael AJ. Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57+ CD28- CD8+ T-cell population. *Immunology.* 1999b; 98(3):443-9.
- Weiss RA, Clapham PR, Cheingsong-Popov R, Dalgleish AG, Carne CA, Weller IV, "et al". Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature.* 1985;316(6023):69-72.
- Weiss,L, Roux,A, Garcia,S *et al*: Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J.Infect.Dis.* 1998; 178: 1158-1162.
- Weissman D & Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Reviews* 1997; 10: 358-367
- Weissman D, Daucher JA, Barker T, Adelsberger J, Baseler M, Fauci AS. Cytokine regulation of HIV replication induced by dendritic cell-CD4-positive T cell interactions. *AIDS* 1996; 12: 759-67.
- Weissman D, Li Y, Orenstein JM, Fauci AS. Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. However, only the mature population that expresses CD80 can pass infection to unstimulated CD4+ T cells. *J. Immunology* 1995; 155: 4111-7.
- Weissman D, Poli G, Fauci AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; 10:1199–1206.
- Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, Armitage R, Cooper MD. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J. Immunol.*1989; 143: 3562-7.
- Wilkinson J, Zaunders JJ, Carr A, Guillemin G, Cooper DA. Characterization of the phenotypic and lymphokine profile associated with strong CD8+ anti-HIV-1 suppressor activity (CASA). *Clin. Exp. Immunol* 2002; 127(1):145-150.
- Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, "et al". In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol.* 1988; 62(1):139-47
- Wills MR, Carmichael AJ, Weekes MP, Mynard K, Okecha G, Hicks R, "et al". Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45RO high to CD45RA high in vivo:

- CD45RA high CD8+ T cells comprise both naive and memory cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 7080-7.
- Wilson JD, Imami N, Watkins A, Gill J, Hay P, Gazzard B, et al. Loss of CD4+ T cell proliferative ability but not loss of human immunodeficiency virus type 1 specificity equates with progression to disease. *J Infect Dis.* 2000;182(3):792-8.
- Wrenshall LE & Platt JL. Regulation of T cell homeostasis by heparan sulfate-bound IL-2. *J. Immunol.* 1999; 163: 3793-800.
- Wu TS, Lee JM, Lai YG, Hsu JC, Tsai CY, Lee YH, Liao NS. Reduced expression of Bcl-2 in CD8+ T cells deficient in the IL-15 receptor alpha-chain. *J Immunol.* 2002;168(2):705-12.
- Wursch AM, Gratama JW, Middeldorp JM, Nissen C, Gratwohl A, Speck B, et al. The effect of cytomegalovirus infection on T lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 62: 278-287.
- Xiong Y, Luscher MA, Altman JD, Hulseley M, Robinson HL, Ostrowski M, et al. Simian immunodeficiency virus (SIV) infection of a Rhesus Macaque induces SIV-specific CD8+ T cells with a defect in effector function that is reversible on extended interleukin-2 incubation. *J. Virology* 2001; 75: 3028-33.
- Yang LP, Riley JL, Carroll RG, June CH, Hoxie J, Patterson BK, et al. Productive infection of neonatal CD8+ T lymphocytes by HIV-1. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1139-1144.
- Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol.* 1997; 71:3120-8.
- Yang OO, Walker BD. CD8+ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv Immunol.* 1997;66:273-311.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990; 61(2):213-22.
- Zajac A J, Blattman J N, Murali-Krishna K, Sourdive D J D, Suresh M, Altman J D, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 2205-2212.
- Zaunders, J, Carr, A, McNally, L, Penny, R, and Cooper, D A: Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *AIDS* 1995; 9: 561-566.

- Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho D. HIV-1 subtype and second receptor use. *Nature* 1996; 383:768.
- Zhang LQ, Mackenzie P, Cleland A, Holmes EC, Leigh-Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993;67:3345–3356.
- Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells *in vivo* by IL-15. *Immunity* 1998; 8: 591-9.
- Zhu T, Mo H, Wang N, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 1993; 261:1179–1181.
- Zinkernagel RM. Are HIV-specific CTL responses salutary or pathogenic? *Curr Opin Immunol.* 1995;7(4):462-70.
- Zloza A, Sullivan YB, Connick E, Landay AL, Al-Harhi L. CD8⁺ T cells that express CD4 on their surface (CD4^{dim}CD8^{bright}T cells) recognize an antigen-specific target, are detected *in vivo*, and can be productively infected by T-tropic HIV. *Blood* 2003; 102: 2156-2164.
- Zou W, Foussat A, Capitant C, Durand-Gasselien I, Bouchet L, Galanaud P, et al. Acute activation of CD8⁺ T lymphocytes in interleukin-2-treated HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999; 22(1):31-8.

Anexo - Publicação

Expert Opinion

1. Introduction
2. CD8⁺ T cells: targets for HIV-1
3. The role of infected CD8⁺ T cells in the immunopathogenesis of HIV-1 infection
4. CD8⁺ T cells: HIV-1 targets and effectors
5. Augmenting HIV-specific memory and effector CD8⁺ T cells
6. Conclusion
7. Expert opinion

Ashley Publications
www.ashley-pub.com



Cytokines & Chemokines

Therapeutic role of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication

L R Meireles-de-Souza & Robin J Shattock[†]

[†]*St George's Hospital Medical School, Discipline of Infectious Diseases, Department of Infectious Diseases, Cranmer Terrace, Tooting, London, UK*

CD8⁺ T cells are pivotal in controlling viral replication in HIV-1-infected subjects. However, in chronic infection, HIV-1-specific CD8⁺ T cells fail to adequately control infection, presenting incomplete maturation and more severe functional impairment with advanced disease. Accumulating evidence has shown that CD8⁺ T cells can also be productively infected by HIV-1. Whether HIV-1 infection of CD8⁺ T lymphocytes impacts on their antiviral activity remains to be determined. This review explores the potential mechanisms of HIV-1 infection of CD8⁺ T cells, its likely contribution to the immunopathogenesis of HIV-1 infection and potential therapeutic interventions.

Keywords: CD45, CD8, HIV, IL-2, IL-15, immunotherapy, maturation, vaccine

Expert Opin. Biol. Ther. (2005) 5(3):xxx-xxx

1. Introduction

The protective role of CD8⁺ T lymphocytes in HIV-1 infection is extensively linked to two main effector functions: virus-specific cytotoxicity and non-lytic suppression of virus replication [1-4]. However, HIV-1-specific CD8⁺ T cells fail to adequately control infection, presenting incomplete maturation [5-7] and more severe functional impairment with advanced disease [2,8]. Progression of HIV-1 infection is also characterised by CD8⁺ T cell decline [9], especially of the CD45RA⁺ phenotype [10,11]. Accumulating evidence has shown that CD8⁺ T cells can be productively infected by HIV-1. Whether HIV-1 infection of CD8⁺ T lymphocytes impacts on their antiviral activity and/or depletion remains to be determined. Understanding the multiple factors that contribute to impair the functions of CD8⁺ T cells during progression of HIV-1 infection may be crucial for the development and design of effective therapeutic vaccines and immunotherapies. This review explores the potential mechanisms of HIV-1 infection of CD8⁺ T cells, its likely contribution to the immunopathogenesis of HIV-1 infection and potential therapeutic interventions.

2. CD8⁺ T cells: targets for HIV-1

2.1 HIV-1-infected CD8⁺ T cells

Two studies in the 1980s opened the research on HIV-1 infection of CD8⁺ T cells and stimulated investigation into the mechanism of HIV-1 entry into CD8⁺ cells and its dependence on CD4 receptor expression. The first study [12] reported that human T cell lymphotropic virus (HTLV)-I transformed CD8⁺ T cell clones were susceptible to productive infection by HIV-1, suggesting that coinfection *in vivo* may increase the virus tropism. The second study [13] described that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from HIV-1-infected individuals, activated by Concanavalin A, presented a late second peak of virus production when < 1% of the cells were CD4⁺ and > 80% were CD8⁺. Although in this study it was observed that 5% of cells

coexpress CD4 and CD8 after lectin activation *in vitro*, the mechanism of virus entry into CD8+ cells was not defined.

In the 1990s, the detection of HIV-1 DNA in CD8+ T cells of infected patients supported the notion that infection of such cells occurs *in vivo* and provided some clues about their participation in the immunopathogenesis of HIV-1 infection. Proviral HIV-1 was found within pulmonary CD8+CD4+ T cells during chronic lower respiratory tract inflammation [14], characterised by a massive influx of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes, suggesting that the activation status of these cells promotes infection. Although CD4 expression was not detected on their surface, it was shown that such CD8+ cells expressed CD4 RNA. Furthermore, both the frequency of CD8+ infected cells in peripheral blood and their contribution to total proviral load in mononuclear cells were found to increase with disease progression. In individuals with CD4+ cell counts < 200/ μ l, the majority of infected cells in PBMC were dendritic cells or CD8+ lymphocytes, and in some AIDS patients, infection of CD8+ cells contributed to 66 – 97% of total proviral load [15].

2.2 CD4-independent HIV-1 infection of CD8+ lymphocytes

HIV-1 entry is initiated by the binding of the gp120 subunit of the viral envelope (Env) to cell surface CD4 molecules on target cells. This induces a conformational change in gp120, exposing determinants that interact with secondary co-receptors: principally CXCR4 or CCR5, members of the seven-transmembrane chemokine receptor family, important in subsequent steps of viral fusion and entry [16]. Although this CD4-dependent model is thought to be the dominant mechanism of HIV infection *in vivo*, Env/co-receptor interactions can occur *in vitro* in the absence of CD4 expression. This phenomenon has been observed with HIV-2 [17-19], simian immunodeficiency virus (SIV) [18,20,21] and HIV-1 [22-24]. However, while the efficiency of CD4-independent infection by HIV-2 is comparable to SIV, both are markedly higher than that of HIV-1 [25]. Indeed, the efficiency of CD4-independent Env-co-receptor interaction for most HIV-1 isolates is too low for it to play a major role in the infection of CD8+ T cells *in vivo*.

Controversially, one recent report has suggested that HIV-1 isolates can directly infect CD8+ T cells using CD8 instead of CD4 as a primary receptor [26]. Two viral isolates derived *ex vivo* from HIV-1-infected CD8+ T cell clones [27] promoted direct CD4-independent infection of CD8+ cells *in vitro* while maintaining the capacity to infect CD4+ T cells [26]. Evidence that these HIV-1 isolates used CD8 as a receptor were:

- CD8 expression was downregulated after infection
- anti-CD8 antibodies blocked viral entry and its replication in CD8+ cells
- resistant cells became susceptible after CD8 expression

Such direct HIV-1 infection of CD8+ T cells has recently been shown to be dependent on CXCR4 utilisation [28]. The

uncommon sequence of *env* genes in these HIV-1 variants, added to the fact that they were isolated from only one AIDS patient, suggests that such isolates may rarely occur *in vivo*. However, recent studies showing that a CD4-independent virus, able to infect CD8+ T cells, could be recovered from viral quasispecies in 7 out of 12 subjects suggest that such isolates may be more common than first thought [29]. Further study is required to properly assess the frequency of such variants in a wider subject population.

2.3 Coinfection leads to production of pseudotype virus: an alternative mechanism for CD4-independent infection of CD8+ lymphocytes

Lusso and colleagues [30] observed that human T cells co-infected with HIV-1 and HTLV-I or HTLV-II generated progeny viral particles of mixed phenotype, allowing the penetration of HIV-1 in CD4- human cells, including mature CD8+ T lymphocytes. This infection was shown to be CD4-independent, as neutralising anti-CD4 monoclonal antibody failed to block HIV-1 entry, while neutralising anti-HTLV-I human serum abolished infection. Whereas truly CD4-independent infection of CD8+ T cells can occur in coinfecting cultures, there is insufficient evidence to suggest that such mechanisms account for significant infection of CD8+ T cells *in vivo*. Indeed, the incidence of HTLV-1 coinfection is too low to account for HIV-1 infection of CD8+ T cells in the majority of HIV-1 infected subjects [31]. However, HTLV-1 infection is increasing worldwide [31], particularly amongst intravenous drug users (IDU), in such a way that can be as high as 15-30% in some HIV-1 infected populations of IDU [32-34], deserving further investigation.

2.4 Coinfection may induce CD4 expression on CD8+ T cells

Production of pseudotype virus could explain early demonstrations of susceptibility to HIV-1 infection of HTLV-I-transformed CD8+ cell clones [12] and CD8+CD4+ cell lines derived from patients with HTLV-I-associated myelopathy [35]. However, Macchi *et al.* [36] demonstrated that HTLV-1 infection of adult human PBMC or purified CD8+ lymphocytes gave rise to activated CD45RO+ CD4+CD8+ cells. These data suggest that HIV-1 infection of HTLV-1-positive CD8+ T cells may be dependent on CD4 expression. Interestingly, human herpes virus (HHV)-6 infection also induces *de novo* expression of CD4 mRNA in mature CD8+ T cells, making them susceptible to HIV-1 infection [37]. Despite the high seroprevalence of HHV-6 worldwide [31], added to the fact that HHV-6 has frequently been isolated from AIDS patients (reviewed in [38]), such a mechanism cannot account for HIV-1 infection of CD8+ lymphocytes in all situations. Indeed, HIV-1-infected pulmonary CD8+ cells described by Semenzato *et al.* [14] were not coinfecting by HHV-6. However, it is possible that HIV-1-infected patients coinfecting by HTLV-I or HHV-6 may present a higher frequency of CD8+ cells harbouring HIV-1, perhaps contributing to their dysfunction or depletion. In this sense,

patients coinfecting with HTLV-I often present with more advanced disease progression [32,39], higher viral load [40] or shorter survival time [41,42] than those infected by HIV-1 alone.

2.5 CD8⁺ T cell activation induces CD4 coexpression and HIV-1 infection

The observation that HTLV-1 or HHV-6 infection induces *de novo* CD4 expression in CD8⁺ T cells suggests that altered gene expression may induce CD4 expression, thus promoting HIV-1 infection. Indeed, activation-dependent coexpression of CD4 on CD8⁺ T cells after lectin stimulation was documented early on [43], and many studies have described HIV-1 or SIV replication in CD8⁺ T cells following *in vitro* infection of lectin-activated PBMC [13,44-46]. Thus, while HIV-1 infection of purified CD8⁺CD4⁻ T cells from activated PBMC failed, unless co-cultured with previously infected autologous CD4⁺CD8⁻ cells [44], activation-induced CD4 expression renders double-positive (DP) CD8⁺ T cells susceptible to HIV-1 infection. This in turn leads to the suppression of surface CD4 expression [47], generating the CD8⁺CD4⁻ phenotype responsible for a second peak production of virus [13,44-46]. The demonstration that infection of CD8⁺ T cells could occur dependent on their CD4 coexpression came from later studies. In PBMC depleted of CD4⁺ cells, transient coexpression of CD4 by CD8⁺ cells could be detected following stimulation with phytohaemagglutinin (PHA) and other T cell activators, including *Staphylococcus* enterotoxin B, anti-CD3 and toxic shock syndrome toxin-1. Such stimulation rendered CD8⁺ lymphocytes susceptible to infection by X4 variant HIV-1_{IIIIB}, which was inhibited by treatment with CD4 monoclonal antibody [48].

2.6 CD8⁺ CD45RA⁺ T cells are susceptible to HIV-1 infection

CD4 coexpression has also been shown to be induced on CD8⁺ T cells by culture with allogeneic dendritic cells or crosslinkage of CD3 and CD28 [4,49]. CD8⁺ T cells stimulated in this fashion expressed CXCR4 and CCR5, and were susceptible to HIV-1 infection. Costimulation by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or by allogeneic dendritic cells induced higher levels of CD4 coexpression on CD4⁻CD45RA⁺ lymphocytes than CD4⁻CD45RO⁺ cells [49]. Furthermore, an increased frequency of CD4 expression was observed on fetal and neonatal CD8⁺ lymphocytes than those from adults. Indeed, it was previously observed that activation of CD8⁺ neonatal T lymphocytes by allogeneic dendritic cells or anti-CD3/B7.1 rapidly induced CD4 mRNA accumulation and surface expression of CD4, CCR5 and CXCR4 [4]. Such preferential induction of CD4 expression on CD45RA⁺ T cells and subsequent susceptibility to infection *in vitro* reflects the *in vivo* predominance of proviral accumulation in CD45RA⁺ versus CD45RO⁺ CD8⁺ T cell subsets in infected subjects [50].

Taken together, these findings suggest that *de novo* CD4 expression on CD8⁺ T cells is a common response to activation.

Recent studies have demonstrated that CD4 expression on CD8⁺ T cells both directly enhanced effector function and susceptibility to HIV-1 infection [47]. This is likely to have profound consequences in HIV-1 infection, where an increase in activated CD8⁺ T cells, associated with disease progression, may broaden the number of potential target cells. Indeed, while a small percentage of DP T cells can be detected in normal individuals [43], several studies have reported augmentation of this DP subpopulation in HIV-1-infected patients [51-55]. More recently, the DP state has been shown to be a marker of differentiated effector memory cells with antiviral function [56]. The higher percentage of DP cells in simians [57,58] may explain why SIV infection is frequently observed in CD8⁺ T cells of macaques [58].

2.7 Trans-mediated HIV-1 infection of CD8⁺ T cells

Isolated CD8⁺CD4⁻ T cells are also susceptible to HIV-1 if co-cultured with previously infected CD4⁺ T cells [44]. More recent studies report that *trans*-receptor-mediated infection of CD4⁻ cells by HIV-1 requires direct contact between co-receptor-bearing CD4⁻ cells and CD4⁺ cells [59]. Such HIV-1 infection is dependent on CD4 and CCR5 or CXCR4 molecules expressed on neighbouring cells cooperating in *trans* to permit virus-cell fusion. This may represent a potential process of entry of HIV-1 into CD8⁺ cells during HIV-1 disease. In another study, CD8⁺CD4⁻ T cells specific to HIV-1 *nef* became infected following interaction with HIV-1⁺ B lymphoblastoid target cells, suggesting that CD8⁺ T cells became infected, at least *in vitro*, during elimination of HIV-1⁺ targets [60]. The extent to which this occurs *in vivo* is difficult to measure.

2.8 The double-positive stage of CD8⁺ T cell intrathymic maturation may facilitate HIV-1 infection

HIV-1 provirus (both the X4 and R5 phenotypes) have been detected in CD8⁺CD4⁻ thymocytes in SCID-hu mice and in *in vitro* models of infection [61-65]. However, mature CD3^{high}CD4⁻CD8⁺ thymocytes do not appear to be directly susceptible to HIV-1 infection, even on co-culture with infected CD4⁺ thymocytes [62], suggesting that such cells may have been infected at an earlier stage in their development. Indeed, CD8⁺ T cells naturally express CD4 during intrathymic maturation. Kitchen *et al.* [61] demonstrated that such DP cells are susceptible to productive HIV-1 infection and that some of these cells continue their differentiation into mature CD3^{high}CD8⁺ thymocytes. Interestingly, even though HIV-1 is found predominantly in CD4⁺ thymocytes, one HIV-1 isolate was associated with a greater viral load in CD8⁺ thymocytes than CD4⁺ thymocytes; however, its provirus was not detected in CD8⁺ splenocytes, suggesting that such infected CD8⁺ thymocytes did not emigrate to peripheral organs and were most likely eliminated before they left the thymus [62]. Thus, HIV-1 infection of CD8⁺ thymocytes and their subsequent elimination may contribute to the generalised decline in naive CD8⁺ T cells observed in HIV-1-infected individuals [10,11]. On the other hand, successful differentiation

of these cells may contribute to levels of HIV-1-infected CD45RA⁺ CD8⁺ T cells in peripheral circulation.

2.9 Relative contribution of intrathymic generated and peripheral activated DP cells to levels of CD8⁺ lymphocyte infection *in vivo*.

The weight of *in vitro* evidence indicates that HIV-1 infection of CD8⁺ lymphocytes is most likely dependent on CD4, expressed during the CD4⁺CD8⁺ precursor stage in the thymus [61,62] or induced in the periphery by T cell activation [4,48,49]. However, few studies have been able to evaluate the relative contribution of either mechanism to HIV-1 infection of CD8⁺ lymphocytes *in vivo*.

In one study, McBreen *et al.* [50] detected HIV-1 infection of CD8⁺ T cells more frequently in the CD45RA⁺ subset than in CD45RO⁺. Observations that V3 regions of HIV-1 infecting CD8⁺ T cells were partially or completely different from those recovered from CD4⁺ T cells (V3 sequences were generally undifferentiated between the CD45RA⁺ or CD45RO⁺ CD4⁺ subsets) led to the suggestion that HIV-1 infection of CD8⁺ T cells occurs preferentially during intrathymic maturation [49]. Antigenic activation would lead to distribution of these unique sequences amongst both effector and memory CD8⁺ populations. In agreement with this hypothesis was the observation that HIV-1 infection of CD8⁺CD45RA⁺ appeared to be quiescent, and frequencies of CD8⁺ infected cells were stable on antiretroviral therapy. Indeed, CD45RA⁺ infected cells can be exported from the thymus in a quiescent status, the virus remaining latent until T cell receptor stimulation [66].

Contrary to this argument is the observation that memory CD45RO⁺ cells can revert to a CD45RA⁺ phenotype [67,68] and effector CD8⁺ T lymphocytes may present a CD27⁺CD45RA⁺CCR7⁻ phenotype [67,69,70]. Thus, both intrathymic and peripheral infection of CD8⁺ T cells could give rise to preferential detection of HIV-1 infection within the CD45RA⁺ CD8⁺ T cells. However, ongoing peripheral stimulation of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection would be expected to maintain CD45RO expression and CD4 coexpression [51,54]. Indeed, a second study by the same group demonstrated that CD4 coexpression was mainly found in CD8⁺ cells with activated phenotype (CD69⁺, CD71⁺), expressing either CD45RO or CD45RO and CD45RA on their surface. These CD4⁺CD8⁺CD45RO⁺ cells presented a high frequency of HIV-1 infection *in vivo* [51]. Discrepant data between these two studies may reflect different CD8⁺ lymphocyte isolation methods. In both studies, CD8 lymphocytes were isolated by immunomagnetic technology. In the first study [50], CD8 lymphocyte populations were isolated by first removing all CD4-expressing cells, demonstrating HIV infection of CD8⁺CD4⁻ lymphocytes. In the second study, positive enrichment was used to isolate both single and DP CD8⁺ lymphocytes. CD8 lymphocytes coexpressing CD4 were found to be infected in 5 of 8 subjects, whereas CD8⁺CD4⁻ lymphocytes were only infected in 2 of 8 subjects and at a lower frequency [51].

More recent studies assessed CD8 populations of known purity (as assessed by FACS) [71,72]. Both showed that CD8⁺CD4⁻ lymphocytes were very rarely infected with HIV, whereas CD8⁺CD4^{dull} [71] or CD8^{bright}CD4^{dim} [72] were frequently infected. Thus, these data suggest that HIV-infected CD8⁺ T cells are generated through infection of activated CD8⁺ T cells rather than export of intrathymically infected precursors.

3. The role of infected CD8⁺ T cells in the immunopathogenesis of HIV-1 infection

3.1 Importance of infection of CD8⁺ T cells to their depletion or dysfunction

The direct effect of HIV-1 infection of CD8⁺ T lymphocytes on disease progression remains hard to quantify. Impairment of CD8⁺ T cells is multifactorial (reviews by [2,8]); the importance of direct infection of these cells to observed phenotypic and functional alterations, or even depletion, requires further investigation.

The reviewed *in vitro* observations suggest that depletion of the CD45RA⁺ phenotype of CD8⁺ T cells early in HIV-1 infection and throughout disease progression [10,11] may be mediated by direct HIV-1 infection of these cells. Deficiency of the CD45RA⁺ subset of CD8⁺ cells could be due to HIV-1 infection of CD8⁺CD4⁻ thymocytes [61-65], although mediated by HIV-1 infection of their CD4⁺CD8⁺ precursors [61,62]. Further studies are required to prove direct cytopathic effects of HIV-1 on infected CD8⁺CD4⁻ thymocytes. Detection of unique variants of HIV-1 in CD8⁺CD45RA⁺ T lymphocytes in the periphery, as well the quiescent characteristics of these cells [50], indicates that HIV-1 infection can become latent.

Impaired thymopoiesis observed during intrathymic infection by HIV-1 [64,73-75] could also contribute to CD8⁺CD45RA⁺ depletion. Alternatively, the greater ability of CD8⁺CD45RA⁺ to express CD4 following costimulation [4,49], and the abundance of them in neonates, may contribute to infection and depletion of these cells. Another hallmark of HIV-1 infection is the expansion of CD28⁺CD8⁺ T cells [76-81]. Preferential infection and subsequent deletion of CD8⁺CD28⁺ T cells, perhaps due to increased CD4 coexpression response to CD3/CD28 activation or dendritic cell contact, may contribute to the observed dysfunction of these cells [76,78,80,82,83] and apparent increased expansion of CD28⁻CD8⁺ T cells [83].

More recently, some studies showed that HIV-1-specific CD8⁺ cells express low levels of perforin and do not revert to the CD45RA⁺ phenotype [5,6,7]. The incomplete maturation to effector stage, or death of these cells before full differentiation, may be explained by activation-induced infection of HIV-1-specific CD8⁺ lymphocytes [84]. However, lack of HIV-1-specific help by CD4⁺ T cells could also contribute to impaired differentiation of CD8⁺ lymphocytes after antigenic activation [85-88]. Further work is needed to clarify these issues.

3.2 Relative contribution of CD8⁺ infected cells to total HIV-1 production

Although many studies have reported HIV-1 DNA in CD8⁺ lymphocytes *in vivo* [13-15,27,50,51,89], only a few have investigated their ability to produce infectious virus [27,89]. Furthermore, reports conflict over the relative association between the frequency of infected CD8⁺ cells, disease status and CD4 count [15,50,51,89]. Thus, it remains to be defined whether there is an association between the restriction of target cells due to depletion of CD4⁺ lymphocytes and HIV-1 replication in CD8⁺ T cells during progression of disease, as suggested by Livingstone *et al.* [15]. In addition, the relative distribution of provirus between activated CD8⁺ T cells [51], which may contribute to viral load, and quiescent CD8⁺CD45RA⁺ lymphocytes [50,51] remains controversial. Nonetheless, in some patients, CD8⁺ infected lymphocytes contributed to a higher proportion of overall proviral load than CD4⁺CD8⁻ cells [15,50,51,89]. Elucidation of the mechanisms governing the relative frequency of infected CD8 T cells and their contribution to total viral load require further investigation and will be crucial to understanding its role in the pathogenesis of HIV infection.

3.3 Slow kinetics of replication in CD8⁺ lymphocytes may make them reservoirs of HIV-1

At late stages of lectin-activated PBMC cultures, CD8⁺CD4⁻ T cells are the main cells containing HIV-1 or SIV proviral DNA [13,44,46]. Peak production of virus by such CD8⁺ T cells occurred around 30 – 40 days postinfection [13,45,46]. Restimulation of these CD8⁺CD4⁻ T cells by anti-CD2 or PHA induces viral replication, demonstrating productive infection [13,44], and can spread virus to CD4⁺ uninfected lymphocytes [44]. Whereas CD4⁺CD8⁻ cells expressing viral antigens diminished over time, in a culture of lectin-activated PBMC infected by HIV-1 or SIV, CD8⁺CD4⁻ cells expressing viral antigens increased [13,46]. Such a decline in CD4⁺ T cells in infected cultures could be a consequence of cell death or downregulation of CD4 expression. However, when CD4⁺ and CD8⁺ cells (purified from PBMC and then stimulated by PHA+IL-2 or PHA+IL-15, prior to HIV-1_{RF} infection) were compared, peak production of HIV-1 by CD4⁺ lymphocytes preceded that derived from CD8⁺ cells, indicating slower kinetics of HIV-1 replication in CD8⁺ lymphocytes. Levels of HIV-1 production by CD8⁺ cells were lower than those observed in CD4⁺ cell cultures, probably due to the low percentage of productively infected CD8⁺ lymphocytes (< 5%, data not shown). Of note, slower kinetics of viral replication in CD8⁺ than CD4⁺ lymphocytes were also demonstrated for CD8-tropic HIV-1 isolates [26].

The observed slow kinetics and low susceptibility to infection of CD8⁺ cells *in vitro* may contribute to the observed compartmentalisation of HIV-1 sequences detected in CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes *in vivo* [15,50,90,91]. Indeed, recent studies have demonstrated that infected CD8⁺ lymphocytes *in vivo* often harbour phylogenetically distinct isolates that

show the lowest degree of genetic diversity when compared with infected CD4⁺ T lymphocyte and monocyte/macrophage populations [90,91]. These data may reflect a smaller infected population, fewer founder viruses and reduced viral turnover. It has been suggested that these sequences may represent archival provirus established in memory CD8⁺ lymphocytes soon after infection [91]. This is consistent with the observation that the frequency of CD8⁺ infected cells is relatively stable on antiretroviral therapy despite a corresponding decline in infected CD4⁺ lymphocytes [50], and that they display markedly fewer drug-resistant mutations [90].

4. CD8⁺ T cells: HIV-1 targets and effectors

CD8⁺ T cells contribute to control of the virus in HIV-1 infection by cytolytic and non-cytolytic mechanisms [2-4,92]. In contrast to antigen-specific release of cytolytic factors, soluble suppressor factors, such as β -chemokines, CD8⁺ T cell antiviral factor (CAF) and IL-16 [3,4,92,93], are released as a consequence of T cell activation *per se*. In this sense, the activation status of CD8⁺ T cells might determine a delicate interplay between their susceptibility to HIV-1 productive infection and their antiviral activity. Indeed, activated CD4⁺CD8⁺ cells presented augmented production of β -chemokines (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) *in vitro* [94]. Such activation-induced β -chemokine production may go some way to explaining the preferential replication of X4 over R5 HIV-1 strains in activated CD8⁺ T cells that coexpress CD4, as well as CXCR4 and CCR5 [94].

Recently, the authors found that even though CD8⁺CD28⁻ cells are more susceptible to productive infection by X4 HIV-1_{RF} than CD8⁺CD28⁺ after contact to dendritic cells, these lymphocytes also provide potent suppression of HIV-1_{RF} replication (data not shown), corroborating the notion that the activation status is essential for the dual role of CD8⁺ T cells as HIV-1 targets and effectors. The authors' data are in accordance with previous results showing this phenotype as the source of CAF activity [93,95,96]. It is important to note that the expression of CD28 on CD8⁺ cells declines during the progression of HIV-1 infection [77,78,80,83], as well as CAF activity [96-98]. It remains to be determined whether HIV-1 infection of CD8⁺CD28⁺ T cells contributes to the depletion of this subset [9,99,100].

Considering the dual role of CD8⁺ T cells as HIV-1 targets and suppressors of HIV-1 replication, the balance between both activities of CD8⁺ lymphocytes might contribute to net viral production. The authors addressed this question *in vitro* and found that at earlier time points of CD4⁺/CD8⁺ co-cultures, the suppressor activity of CD8⁺ T cells prevailed over production. Interestingly, co-cultures presented lower levels of HIV-1_{RF} production than CD4⁺ cultures or CD8⁺ cultures at the same point of the kinetics, suggesting that CD4⁺ lymphocytes also exerted suppression of viral replication in CD8⁺ T cells. In the authors' culture systems, IL-2 and -15 were important cytokines to promote viral production by previously activated and infected CD8⁺ cells, as well as to support antiviral

non-cytolytic suppressor activity against X4 HIV-1_{RF} in co-cultures of CD4⁺/CD8⁺ cells [201]. These results may help to better plan immunomodulatory therapies for HIV-1 infection.

5. Augmenting HIV-specific memory and effector CD8⁺ T cells

It is now widely accepted that the virus-specific CD8⁺ T cell response plays a significant role in the control of HIV replication *in vivo* and maintenance of this population is required for continued control. Despite successful highly active antiretroviral therapy (HAART), strong anti-HIV-1 CD8⁺ T cell responses are often not apparent in chronic infection, making successful viral eradication unlikely. However, a recent study by Hess *et al.* suggests that treatment during acute seroconversion, followed by structured treatment interruptions, may allow the immune system to control HIV-1 for extended periods of time [101]. This control was associated with an expansion of HIV-1-specific CD8⁺ T cells. These studies suggest that maximal virus suppression, induced by HAART, followed by a burst of viraemia during treatment interruption, may allow the CD8⁺ T cell immune response to sufficiently mature to a point where it is capable of controlling HIV replication. Such restriction of viral replication was similar to that observed in long-term non-progressors that have controlled viral replication for up to 20 years in the absence of antiretroviral therapy [102]. In contrast, a lack of viral control for prolonged periods was associated with an accumulation of preterminally differentiated CD8⁺ T cells, in a similar fashion to chronically infected subjects. This may reflect previous observations suggesting that in HIV-1 infection, the emergence of memory CD8⁺ T cells only occurs when antigen levels are low or not detectable [103].

While Hess' study is promising [101], previous studies of structured treatment interruption in chronically infected cells have yielded disappointing results. Early treatment may be particularly important for preserving CD8⁺ immune responses. Thus, there is a pressing need to develop additional treatment options as an adjunct to HAART that may restore HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses. Therapeutic use of immunisation and cytokines may provide additional modalities to maintain or induce appropriate specific CD8⁺ T cell responses in chronic infection [104].

The ability of therapeutic vaccines to significantly expand HIV-1-specific CD8⁺ T cell numbers have for the most part been disappointing. However, a recent study has shown that a therapeutic vaccine made of autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with whole inactivated HIV-1 was able to reduce viral load in untreated patients with stable viral loads. Suppression of viral load was associated with the expansion of both HIV-1-specific CD4⁺ T cells and HIV-1 gag-specific perforin-expressing CD8⁺ effector T cells, suggesting that induction and maintenance of CD8⁺ effector cells may require a robust virus-specific CD4⁺ T cell response. Viral suppression was maintained in 40% of subjects for

≥ 12 months [105]; however, cost and labour implications of such an approach mean that it is unlikely to be applicable on a large scale. Nevertheless, these data suggest that HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses can be expanded in infected subjects. Indeed, therapeutic immunisation with an HIV DNA vaccine in conjunction with HAART led to an expansion of the HIV-1-specific CD8⁺ T cell immune response that was maintained for up to 70 months [106].

Alternative approaches to the maintenance or expansion of CD8⁺ T cells in infected individuals have included the use of cytokine immunotherapy in conjunction with HAART. Much of this work has been based on observations that CD8⁺ cells can be expanded *ex vivo* from HIV-1-infected patients *ex vivo* with the addition of exogenous cytokines. Based on the observation that CD8⁺ T cell expansion is dependent on CD4⁺ T cell help [107], initial studies focused on the addition of IL-2. These studies produced mixed results, with some groups showing increased expansion and others showing little or no effect [108,109]. More recent *ex vivo* studies have evaluated the potential of IL-7 and -15 [110], alone or in combination with IL-2, in the expansion of CD8⁺ T cells. In one study, the combination of IL-15 or -7 with IL-2 provided little additional benefit to IL-2 alone [109]. However, a comparative evaluation of the ability of IL-2, -7 and -15 to expand paediatric CD8⁺ T cells *ex vivo* showed that IL-15 was the most potent cytokine in augmenting HIV-gag-specific immune responses [111]. Although *ex vivo* expansion of CD8⁺ effector cells is unlikely to provide a practical therapeutic approach to chronic infection, these studies do suggest that cytokine immunotherapy may have a role to play in the maintenance or induction of CD8⁺ memory and effector cells *in vivo*. So far, only IL-2 has been tested in clinical studies. Most of these studies suggest that although IL-2 immunotherapy can induce a significant rise in CD4⁺ T cells, transient or no changes were seen in CD8⁺ T cell counts [112-114]. Nevertheless, IL-2 immunotherapy in conjunction with HAART has been shown to increase HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses in infected subjects. This suggests that IL-2 may positively influence the quality of anti-HIV-1 CD8⁺ T cell immune response without influencing total CD8⁺ T cell numbers or proliferative responses [104].

6. Conclusion

It would be premature to suggest that there is conclusive evidence of a role for HIV-1 infection of CD8⁺ T cells in disease progression. Indeed, no correlation of disease status, risk group, antiviral therapy or total CD4 counts with frequencies of HIV-1-infected CD8⁺ cells of CD45RA⁺ [50] has been clearly substantiated. However, a significant correlation has been demonstrated between the level of HIV-1 infection of CD8^{bright} CD4^{dim} lymphocytes and CD4 counts [72], suggesting that memory CD8⁺ T lymphocytes are capable of becoming infected after activation-induced expression of CD4 [71,72]. Selective HIV-1 replication in CD8⁺ cells can be a stochastic event of evolution of CD8-tropic HIV [26] or can be enabled

by specific immunopathogenic situations, such as coinfection by HTLV-I [12,30,35,36] or HHV-6 [30]. Nevertheless, direct HIV-1 infection and subsequent elimination of CD45RA⁺ CD8⁺ T cells is highly likely to impact on accelerated disease progression associated with paediatric infection [115,116], whereas infection of memory CD8⁺ lymphocytes is likely to contribute to the development of AIDS in adults. The extent to which such mechanisms affect HIV-1 immunopathogenesis and their relationship to other disease markers will require further detailed investigation. Nevertheless, the critical role of CD8⁺ T cells in controlling viral replication strongly suggests that the development of novel therapeutic options to maintain and/or protect HIV-1-specific memory and/or effector cells will be essential for the eventual eradication of infection.

7. Expert opinion

The role of CD8⁺ T cells in controlling HIV-1 replication is now widely accepted. Furthermore, there is now a considerable body of evidence demonstrating that infection of CD8⁺ T cells occurs *in vivo*. The impact of such infection on immune function is still not fully understood. However, chronic HIV infection is associated with a loss of HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses and the production of non-cytolytic HIV-1 suppressive factors. Although HAART treatment in chronic infection

has significantly improved the life expectancy of HIV-1-infected individuals, it is unable to restore HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses. Furthermore, the persistence of static levels of HIV-1-infected CD8⁺ lymphocytes in the face of effective HAART, as well as the slow genetic evolution in this population, suggests that this population may be capable of reseeding infection to other cell populations. This may provide an additional barrier to viral eradication. However, recent studies suggest that HAART treatment during acute infection, combined with structured treatment interruption, may be sufficient to induce and maintain CD8⁺ T cell responses able to control infection for significant periods. Identification of early seroconverters and subsequent treatment would be a significant challenge to scale up for mass treatment. Thus, there is an urgent need to develop immunotherapeutic strategies to induce or maintain HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses in chronic infection and prevent early establishment of infection in CD8⁺ memory cells. Although both *in vitro* and *in vivo* studies offer some encouragement, this area of research is in its infancy.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: CAPES-PICDT-UFES (Brazil), CAPES-PDEE-FIOCRUZ-RJ (Brazil) and the Medical Research Council (UK) G9803142.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

- GULZAR N, COPELAND KF: CD8⁺ T-cells: function and response to HIV infection. *Curr. HIV Res.* (2004) 2:23-37.
- MCMICHAEL AJ, ROWLAND-JONES SL: Cellular immune responses to HIV. *Nature* (2001) 410:980-987.
- TOMARAS GD, GREENBERG ML: CD8⁺ T cell mediated noncytolytic inhibition of human immunodeficiency virus type I. *Front. Biosci.* (2001) 6:D575-D598.
- YANG OO, WALKER BD: CD8⁺ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv. Immunol.* (1997) 66:273-311.
- APPAY V, NIXON DF, DONAHOE SM *et al.*: HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* (2000) 192:63-75.
- CHAMPAGNE P, OGG GS, KING AS *et al.*: Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* (2001) 410:106-111.
- CHEN G, SHANKAR P, LANGE C *et al.*: CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* (2001) 98:156-164.
- LIEBERMAN J, SHANKAR P, MANJUNATH N, ANDERSSON J: Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* (2001) 98:1667-1677.
- MARGOLICK JB, MUNOZ A, DONNENBERG AD *et al.*: Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. *Nat. Med.* (1995) 1:674-680.
- RABIN RL, ROEDERER M, MALDONADO Y *et al.*: Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J. Clin. Invest.* (1995) 95:2054-2060.
- ROEDERER M, DUBS JG, ANDERSON MT *et al.*: CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J. Clin. Invest.* (1995) 95:2061-2066.
- DE ROSSI A, FRANCHINI G, ALDOVINI A *et al.*: Differential response to the cytopathic effects of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) superinfection in T4⁺ (helper) and T8⁺ (suppressor) T-cell clones transformed by HTLV-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:4297-4301.
- TSUBOTA H, RINGLER DJ, KANNAGI M *et al.*: CD8⁺CD4⁻ lymphocyte lines can harbor the AIDS virus *in vitro*. *J. Immunol.* (1989) 143:858-863.
- SEMENZATO G, AGOSTINI C, OMETTO L *et al.*: CD8⁺ T lymphocytes in the lung of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1. *Blood* (1995) 85:2308-2314.
- LIVINGSTONE WJ, MOORE M, INNES D, BELL JE, SIMMONDS P: Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* (1996) 348:649-654.
- BERGER EA, MURPHY PM, FARBER JM: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* (1999) 17:657-700.

Therapeutic role of CD8+ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication

17. ENDRES MJ, CLAPHAM PR, MARSH M *et al.*: CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* (1996) 87:745-756.
18. POTEPA S, PICARD L, REEVES JD *et al.*: CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry. *J. Virol.* (1997) 71:4419-4424.
19. REEVES JD, SCHULZ TF: The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope-mediated fusion. *J. Virol.* (1997) 71:1453-1465.
20. EDINGER AL, MANKOWSKI JL, DORANZ BJ *et al.*: CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:14742-14747.
21. MARTIN KA, WYATT R, FARZAN M *et al.*: CD4-independent binding of SIV gp120 to rhesus CCR5. *Science* (1997) 278:1470-1473.
22. BANDRES JC, WANG QF, O'LEARY J *et al.*: Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J. Virol.* (1998) 72:2500-2504.
23. DUMONCEAUX J, NISOLE S, CHANEL C *et al.*: Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J. Virol.* (1998) 72:512-519.
24. HESSELGESSER J, HALKS-MILLER M, DELVECCCHIO V *et al.*: CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr. Biol.* (1997) 7:112-121.
25. REEVES JD, HIBBITTS S, SIMMONS G *et al.*: Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism *in vivo*. *J. Virol.* (1999) 73:7795-7804.
26. SAHA K, ZHANG J, GUPTA A *et al.*: Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat. Med.* (2001) 7:65-72.
27. SAHA K, ZHANG J, ZERHOUNI B: Evidence of productively infected CD8+ T cells in patients with AIDS: implications for HIV-1 pathogenesis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* (2001) 26:199-207.
28. ZERHOUNI B, NELSON JA, SAHA K: CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J. Virol.* (2004) 78:12288-12296.
29. ZERHOUNI B, NELSON JA, SAHA K: Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for CD8+ lymphocytes. *J. Virol.* (2004) 78:1243-1255.
30. LUSSO P, LORI F, GALLO RC: CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 1 after phenotypic mixing with human T-cell leukemia viruses. *J. Virol.* (1990) 64:6341-6344.
31. FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM *et al.*: *Field's Virology 4th ed.* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA (2001).
32. BRITES C, HARRINGTON W JR, PEDROSO C, MARTINS NE, BADARO R: Epidemiological characteristics of HTLV-I and II co-infection in Brazilian subjects infected by HIV-1. *Braz. J. Infect. Dis.* (1997) 1:42-47.
33. DE ARAUJO AC, CASSEB JS, NEITZERT E *et al.*: HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in Sao Paulo, Brazil. *Eur. J. Epidemiol.* (1994) 10:165-171.
34. GUIMARAES ML, BASTOS FI, TELLES PR *et al.*: Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J. Clin. Virol.* (2001) 21:143-151.
35. SHOJI H, NAKANAGA K, YOSHIHARA N: [HIV infection of CD4-CD8+ T-cell line derived from patients with HAM]. *Rinsho Byori* (1991) 39:949-953.
36. MACCHI B, GRAZIANI G, ZHANG J, MASTINO A: Emergence of double-positive CD4/CD8 cells from adult peripheral blood mononuclear cells infected with human T cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Cell. Immunol.* (1993) 149:376-389.
37. LUSSO P, DE MARIA A, MALNATI M *et al.*: Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* (1991) 349:533-535.
38. LUSSO P, GALLO RC: Human herpesvirus 6 in AIDS. *Immunol. Today* (1995) 16:67-71.
39. SCHECHTER M, HARRISON LH, HALSEY NA *et al.*: Coinfection with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV in Brazil. Impact on markers of HIV disease progression. *JAMA* (1994) 271:353-357.
40. BRITES C, PEDROSO C, NETTO E *et al.*: Co-infection by HTLV-I/II is associated with increased viral load in PBMC of HIV-1 infected patients in Bahia, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* (1998) 2:70-77.
41. BRITES C, ALENCAR R, GUSMAO R *et al.*: Co-infection with HTLV-I is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS* (2001) 15:2053-2055.
42. PEDRAL-SAMPAIO DB, MARTINS NE, PEDROSA C *et al.*: Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* (1997) 1:31-35.
43. BLUE ML, DALEY JF, LEVINE H, SCHLOSSMAN SF: Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* (1985) 134:2281-2286.
44. DE MARIA A, PANTALEO G, SCHNITTMAN SM *et al.*: Infection of CD8+ T lymphocytes with HIV. Requirement for interaction with infected CD4+ cells and induction of infectious virus from chronically infected CD8+ cells. *J. Immunol.* (1991) 146:2220-2226.
45. MERCURE L, PHANEUF D, WAINBERG MA: Detection of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA in persistently infected CD8+ cells. *J. Gen. Virol.* (1993) 74(Pt 10):2077-2083.
46. MONTANER LJ, RINGLER DJ, WYAND MS *et al.*: Study of long-term cultures of simian immunodeficiency virus (SIVmac 251)-infected peripheral blood lymphocytes. *Lab. Invest.* (1990) 63:242-247.
47. KITCHEN SG, JONES NR, LAFORGE S *et al.*: CD4 on CD8(+) T cells directly

- enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101:8727-8732.
48. FLAMAND L, CROWLEY RW, LUSO P *et al.*: Activation of CD8⁺ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:3111-3116.
 49. KITCHEN SG, KORIN YD, ROTH MD, LANDAY A, ZACK JA: Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* (1998) 72:9054-9060.
 50. MCBREEN S, IMLACH S, SHIRAFUJI T *et al.*: Infection of the CD45RA⁺ (naive) subset of peripheral CD8⁺ lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *J. Virol.* (2001) 75:4091-4102.
 51. IMLACH S, MCBREEN S, SHIRAFUJI T *et al.*: Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 *in vivo* and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* (2001) 75:11555-11564.
 52. RADKOWSKI M, SADOWSKA M, KOPICZ-KAMINSKA E, HORBAN A, SLUSARCZYK J: [Coexpression of CD4 and CD8 antigens and the appearance of HLA-DR and CD25 receptors on lymphocytes as markers of immune activation in patients with HIV infection]. *Pol. Merkuriusz Lek.* (1996) 1:325-326.
 53. RIBRAG V, SALMON D, PICARD F *et al.*: Increase in double-positive CD4⁺CD8⁺ peripheral T-cell subsets in an HIV-infected patient. *AIDS* (1993) 7:1530.
 54. SULLIVAN YB, LANDAY AL, ZACK JA, KITCHEN SG, AL HARTHI L: Upregulation of CD4 on CD8⁺ T cells: CD4^{dim}CD8^{bright} T cells constitute an activated phenotype of CD8⁺ T cells. *Immunology* (2001) 103:270-280.
 55. WEISS L, ROUX A, GARCIA S *et al.*: Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* (1998) 178:1158-1162.
 56. NASCIBENI M, SHIN EC, CHIRIBOGA L, KLEINER DE, REHERMANN B: Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* (2004) 104:478-486.
 57. CURRIER JR, STEVENSON KS, KEHN PJ *et al.*: Contributions of CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺CD8⁺ T cells to skewing within the peripheral T cell receptor beta chain repertoire of healthy macaques. *Hum. Immunol.* (1999) 60:209-222.
 58. DEAN GA, REUBEL GH, PEDERSEN NC: Simian immunodeficiency virus infection of CD8⁺ lymphocytes *in vivo*. *J. Virol.* (1996) 70:5646-5650.
 59. SPECK RF, ESSER U, PENN ML *et al.*: A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1. *Curr. Biol.* (1999) 9:547-550.
 60. DE MARIA A, COLOMBINI S, SCHNITTMAN SM, MORETTA L: CD8⁺ cytolytic T lymphocytes become infected *in vitro* in the process of killing HIV-1-infected target cells. *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:531-536.
 61. KITCHEN SG, UITTENBOGAART CH, ZACK JA: Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 localization in CD4-negative thymocytes: differentiation from a CD4-positive precursor allows productive infection. *J. Virol.* (1997) 71:5713-5722.
 62. LEE S, GOLDSTEIN H, BASELER M, ADELSBERGER J, GOLDING H: Human immunodeficiency virus type 1 infection of mature CD3hiCD8⁺ thymocytes. *J. Virol.* (1997) 71:6671-6676.
 63. STANLEY SK, MCCUNE JM, KANESHIMA H *et al.*: Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J. Exp. Med.* (1993) 178:1151-1163.
 64. SU L, KANESHIMA H, BONYHADI M *et al.*: HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells *in vivo*. *Immunity* (1995) 2:25-36.
 65. UITTENBOGAART CH, BOSCARDIN WJ, ANISMAN-POSNER DJ *et al.*: Effect of cytokines on HIV-induced depletion of thymocytes *in vivo*. *AIDS* (2000) 14:1317-1325.
 66. BROOKS DG, KITCHEN SG, KITCHEN CM, SCRIPTURE-ADAMS DD, ZACK JA: Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat. Med.* (2001) 7:459-464.
 67. HAMANN D, BAARS PA, REP MH *et al.*: Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* (1997) 186:1407-1418.
 68. HAMANN D, KOSTENSE S, WOLTERS KC *et al.*: Evidence that human CD8⁺CD45RA⁺. *Int. Immunol.* (1999) 11:1027-1033.
 69. CAMPBELL JJ, MURPHY KE, KUNKEL EJ *et al.*: CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J. Immunol.* (2001) 166:877-884.
 70. SALLUSTO F, LENIG D, FORSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* (1999) 401:708-712.
 71. BRECHLEY JM, HILL BJ, AMBROZAK DR *et al.*: T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) *in vivo*: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.* (2004) 78:1160-1168.
 72. COCHRANE A, IMLACH S, LEEN C *et al.*: High levels of human immunodeficiency virus infection of CD8 lymphocytes expressing CD4 *in vivo*. *J. Virol.* (2004) 78:9862-9871.
 73. BOLDT-HOULE DM, JAMIESON BD, ALDROVANDI GM *et al.*: Loss of T cell receptor Vbeta repertoires in HIV type 1-infected SCID-hu mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1997) 13:125-134.
 74. JAMIESON BD, UITTENBOGAART CH, SCHMID I, ZACK JA: High viral burden and rapid CD4⁺ cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected SCID-hu mice suggest direct viral killing of thymocytes *in vivo*. *J. Virol.* (1997) 71:8245-8253.
 75. ROSENZWEIG M, CLARK DP, GAULTON GN: Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection. *AIDS* (1993) 7:1601-1605.
 76. BORTHWICK NJ, BOFILL M, GOMBERT WM *et al.*: Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28⁺ T cells. *AIDS* (1994) 8:431-441.
 77. CHOREMI-PAPADOPOULOU H, VIGLIS V, GARGALIANOS P *et al.*: Downregulation of CD28 surface antigen on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes during

Therapeutic role of CD8+ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication

- HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* (1994) 7:245-253.
78. MUGNAINI EN, HAAHEIM LL, SANNES M, BRINCHMANN JE: *In vivo* expansion coincident with excessive *in vitro* cell death within the memory subset of CD8+ T cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1999) 15:265-272.
 79. ROOS MT, VAN LIER RA, HAMANN D *et al.*: Changes in the composition of circulating CD8+ T cell subsets during acute epstein-barr and human immunodeficiency virus infections in humans. *J. Infect. Dis.* (2000) 182:451-458.
 80. VINGERHOETS JH, VANHAM GL, KESTENS LL *et al.*: Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* (1995) 100:425-433.
 81. ZAUNDERS J, CARR A, MCNALLY L, PENNY R, COOPER DA: Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *AIDS* (1995) 9:561-566.
 82. LEWIS DE, TANG DS, ADU-OPPONG A, SCHOBER W, RODGERS JR: Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons. *J. Immunol.* (1994) 153:412-420.
 83. TRIMBLE LA, KAM LW, FRIEDMAN RS, XU Z, LIEBERMAN J: CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood* (2000) 96:1021-1029.
 84. DOUEK DC, BRECHLEY JM, BETTS MR *et al.*: HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* (2002) 417:95-98.
 85. KOMANDURI KV, DONAHOE SM, MORETTO WJ *et al.*: Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virology* (2001) 279:459-470.
 86. RIDGE JB, DI ROSA F, MATZINGER P: A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* (1998) 393:474-478.
 87. ROSENBERG ES, BILLINGSLEY JM, CALIENDO AM *et al.*: Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* (1997) 278:1447-1450.
 88. ZAJAC AJ, BLATTMAN JN, MURALI-KRISHNA K *et al.*: Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* (1998) 188:2205-2213.
 89. MARODON G, LANDAU NR, POSNETT DN: Altered expression of CD4, CD54, CD62L, and CCR5 in primary lymphocytes productively infected with the human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1999) 15:161-171.
 90. POTTER SJ, DWYER DE, SAKSENA NK: Differential cellular distribution of HIV-1 drug resistance *in vivo*: evidence for infection of CD8+ T cells during HAART. *Virology* (2003) 305:339-352.
 91. POTTER SJ, LEMEY P, ACHAZ G *et al.*: HIV-1 compartmentalization in diverse leukocyte populations during antiretroviral therapy. *J. Leukoc. Biol.* (2004) 76:562-570.
 92. COPELAND KFT: Non-lytic control of human immunodeficiency virus replication and transcription of CD8+ T cells. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* (1999) 2:1-16.
 93. LEVY JA, MACKEWICZ CE, BARKER E: Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol. Today* (1996) 17:217-224.
 94. ZLOZA A, SULLIVAN YB, CONNICK E, LANDAY AL, AL-HARTHI L: CD8+ T cells that express CD4 on their surface (CD4dimCD8bright T cells) recognize an antigen-specific target, are detected *in vivo*, and can be productively infected by T-tropic HIV. *Blood* (2003) 102:2156-2164.
 95. BARKER E, BOSSART KN, FUJIMURA SH, LEVY JA: CD28 costimulation increases CD8+ cell suppression of HIV replication. *J. Immunol.* (1997) 159:5123-5131.
 96. LANDAY AL, MACKEWICZ CE, LEVY JA: An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1993) 69:106-116.
 97. BARKER E, MACKEWICZ CE, LEVY JA: Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:11135-11139.
 98. MACKEWICZ C, LEVY JA: CD8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1992) 8:1039-1050.
 99. GIORGI JV, DETELS R: T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1989) 52:10-18.
 100. ROEDERER M: Getting to the HAART of T cell dynamics. *Nat. Med.* (1998) 4:145-146.
 101. HESS C, ALTFELD M, THOMAS SY *et al.*: HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. *Lancet* (2004) 363:863-866.
 102. JANSEN CA, PIRIOU E, BRONKE C *et al.*: Characterization of virus-specific CD8(+) effector T cells in the course of HIV-1 infection: longitudinal analyses in slow and rapid progressors. *Clin. Immunol.* (2004) 113:299-309.
 103. TUSSEY LG, NAIR US, BACHINSKY M *et al.*: Antigen burden is major determinant of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cell maturation state: potential implications for therapeutic immunization. *J. Infect. Dis.* (2003) 187:364-374.
 104. IMAMI N, GOTCH F: Prospects for immune reconstitution in HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* (2002) 127:402-411.
 105. LU W, ARRAES LC, FERREIRA WT, ANDRIEU JM: Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat. Med.* (2004) 10:1359-1365.
 106. BOSTROM AC, HEJDEMAN B, MATSUDA R *et al.*: Long-term persistence of vaccination and HAART to human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* (2004) 22:1683-1691.
 107. LIEBERMAN J, MANJUNATH N, SHANKAR P: Avoiding the kiss of death: how HIV and other chronic viruses survive. *Curr. Opin. Immunol.* (2002) 14:478-486.
 108. BRECHLEY JM, KARANDIKAR NJ, BETTS MR *et al.*: Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* (2003) 101:2711-2720.
 109. LUBONG R, NG HL, UTTENBOGAART CH, YANG OO: Culturing of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes with interleukin-7 and interleukin-15. *Virology* (2004) 325:175-180.
 110. ALVES NL, HOOIBRINK B, AROSA FA, VAN LIER RA: IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells *in vitro*. *Blood* (2003) 102:2541-2546.

111. CHITNIS V, PAHWA R, PAHWA S: Determinants of HIV-specific CD8 T-cell responses in HIV-infected pediatric patients and enhancement of HIV-gag-specific responses with exogenous IL-15. *Clin. Immunol.* (2003) 107:36-45.
112. MARCHETTI G, MERONI L, MOLTENI C *et al.*: Interleukin-2 immunotherapy exerts a differential effect on CD4 and CD8 T cell dynamics. *AIDS* (2004) 18:211-216.
113. KOVACS JA, VOGEL S, METCALF JA *et al.*: Interleukin-2 induced immune effects in human immunodeficiency virus-infected patients receiving intermittent interleukin-2 immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* (2001) 31:1351-1360.
114. PIDO-LOPEZ J, BURTON C, HARDY G *et al.*: Thymic output during initial highly active antiretroviral therapy (HAART) and during HAART supplementation with interleukin 2 and/or with HIV type 1 immunogen (Remune). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2003) 19:103-109.
115. WILFERT CM, WILSON C, LUZURIAGA K, EPSTEIN L: Pathogenesis of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* (1994) 170:286-292.
116. WIZNIA AA, LAMBERT G, PAVLAKIS S: Pediatric HIV infection. *Med. Clin. North Am.* (1996) 80:1309-1336.

Website

201. <http://www.immuno2004.org/onlineabstracts/allposters/3542.html>
Meireles-de-Souza LR, Shattock RJ: Dual role of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection: targets and suppressors of viral replication. *12th International Congress of Immunology.*

Affiliation

L R Meireles-de-Souza¹ & Robin J Shattock^{2†}

[†]Author for correspondence

¹Departamento de Patologia, Centro Biomédico, UFES, Vitória, ES, Brazil

²St George's Hospital Medical School, Discipline of Infectious Diseases, Department of Infectious Diseases, Cranmer Terrace, Tooting, London, UK

Tel: +44 (0)208 725 5855;

Fax: +44 (0)208 725 3487;

E-mail: Shattock@sghms.ac.uk