

Rita Neves Correia

**QUAL O PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NA
INFEÇÃO POR VIH – SIDA**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Rita Neves Correia

**QUAL O PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NA
INFEÇÃO POR VIH – SIDA**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

QUAL O PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NA INFEÇÃO POR VIH – SIDA

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa

como parte dos requisitos para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

(Rita Neves Correia)

Resumo

Nos últimos anos, têm-se prestado especial atenção ao papel do sistema imune inato no combate à infecção do VIH, com o intuito de compreender melhor qual a importância da resposta das células NK no impedimento da progressão da doença e no combate à infecção. Durante a resposta imune inata, várias alterações ocorrem sobre as células NK provocadas pelo VIH, como alterações na distribuição dos seus subconjuntos e da expressão de recetores NK, que prejudicam a atividade destas. Contudo, existem casos onde estas alterações não ocorrem protegendo os indivíduos da infecção ou da progressão da doença. Este trabalho visa a apresentação pormenorizada das alterações que ocorrem nas células NK antes, durante e após a infecção por VIH, assim como a apresentação de dois casos de sucesso contra a progressão do VIH.

Abstract

Recently, many authors have investigated the role of the innate immune system in the fight of HIV infection, in order to better understand the importance of the response of NK cells in preventing disease progression and fighting infection. During the innate immune response, several changes occur on NK cells caused by HIV, such as changes in the distribution of its subsets and expression of NK receptors that impair the activity of these. However, it was observed cases where these changes don't occur, protecting individuals from infection or disease progression. This work aims at presenting details of the changes that occur in NK cells before, during and after HIV infection, as well as the presentation of two cases of success against the progression of HIV.

"A melhor maneira de superar as dificuldades é atacar com um grande sorriso."

Robert Baden Powell

Agradecimentos

No final desta etapa, começo por agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na minha formação académica. Obrigado pela compreensão e paciência. Por me terem ajudado a crescer tanto a nível pessoal como profissional.

Gostaria de agradecer, de uma forma especial à Dra. Cristina Almeida por toda a dedicação e atenção ao longo destes últimos meses, principalmente na elaboração desta dissertação. Por toda a disponibilidade, orientação, apoio assistidos desde o primeiro ao último dia.

Um obrigada muito especial à minha família, pais e irmãos, por terem sempre acreditado em mim, por toda a paciência, apoio e incentivo que me deram e pela grande ajuda para superar momentos mais complicados.

A todos os docentes, que ao longo do curso me transmitiram diversos conhecimentos, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, igualmente um muito obrigado.

Aos meus amigos, com quem partilhei dúvidas, ideias e as minhas incertezas, em especial: José Jorge Gonçalves, Anita Santos, Joana Santos, Joana Lopes, Cátia Soares, Tânia Soares, Isabel Rebelo, Ana Moreno, Joana Remoaldo e Diana Sousa.

O meu trabalho não foi mais do que o reflexo do vosso apoio.

À mui nobre Universidade Fernando Pessoa.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- CÉLULAS NATURAL KILLER.....	3
1. Aspectos Gerais.....	3
2. Morfologia.....	3
3. Classificação e Forma de Atuação.....	4
4. Recetores.....	5
5. Transmissão de sinais intracelulares nos recetores NK.....	13
6. Ativação e Função das células NK.....	13
III- VÍRUS DA IMUNODEFECIÊNCIA HUMANA.....	15
1. Aspectos Gerais.....	16
2. Classificação.....	16
3. Morfologia e Estrutura do vírus.....	17
4. Ciclo de Replicação.....	19
5. Infecção e Progressão Clínica.....	22
6. Mecanismos de Resistência e Estratégia Farmacológica.....	25
IV- ALTERAÇÕES NA CÉLULAS NK PROVCADAS PELO VIH.....	26
1. Efeitos provocados nas células NK durante a infecção por VIH.....	26
i. Efeitos sobre o número total de células NK ativadas na infecção aguda.....	27
ii. Função das células NK diminui durante a infecção primária por VIH.....	28
iii. A frequência de células NK que expressam marcadores <i>homing</i> para os tecidos linfoides encontrou-se aumentada na infecção primária por VIH.....	29
iv. Alterações das proporções dos subconjuntos das células NK na infecção por VIH.....	29
v. Alterações das frequências dos recetores KIR expressos.....	32
vi. Expressão de recetores KIR em indivíduos HESN.....	33
vii. Frequência de expressão de recetores KIR na ausência de HLA-C1, em indivíduos HESN.....	33
viii. Combinações KIR/HLA em casais VIH-concordantes e discordantes.....	34
ix. Avaliação das combinações KIR/HLA.....	34

x. Estudo da capacidade de células NK lisarem células T CD4 ⁺ por combinação de KIR/HLA.....	35
xi. Alteração da expressão de CD94 das células NK durante o curso da infecção por VIH-1.....	36
2. Casos-estudo de indivíduos resistentes à infecção pelo VIH.....	37
i. Caso Estudo I.....	37
A) População em Estudo.....	38
B) Células alvo utilizadas.....	39
C) Ensaio de Citotóxicidade das células NK.....	39
D) ADCC.....	40
E) Métodos de Análise da produção de citocinas e Análise estatística.....	40
F) Conclusões observadas.....	40
ii. Caso Estudo II.....	46
A) População em Estudo.....	46
B) Conclusões observadas.....	47
V- CONCLUSÃO.....	52
VI- BIBLIOGRAFIA.....	54
VII-ANEXOS.....	72
Anexo A.....	72
Anexo B.....	73
Anexo C.....	76
Anexo D.....	77

Índice de Figuras

Figura.1- Esquema da árvore genealógica das células sanguíneas.....	3
Figura.2- Recetores ativadores e inibitórios de superfície das células NK.....	5
Figura.3- Interação de uma molécula de HLA classe I com um recetor NK – KIR.....	9
Figura.4- Virião.....	15
Figura.5- Ciclo de replicação do VIH numa célula hospedeira.....	19
Figura.6- Fases evolutivas da infeção pelo VIH.....	23
Figura.7- Caso estudo I.....	38
Figura.8- Comparação da atividade citolítica das células NK em PBMC.....	43
Figura.9- Produção de citocinas e β quimiocinas pelas células NK, na ausência/presença de estímulos extrínsecos.....	45
Figura.10- Caso estudo II.....	46
Figura.11- Determinação da função hepática através de ensaios às enzimas do fígado	47
Figura.12- Números absolutos de células T CD4 ⁺ e daa carga viral ao longo do tempo.....	48
Figura.13- Percentagens das células NK e seus subconjuntos. Potencial lítico das células NK.....	50

Índice de Tabelas

Tabela.1- Relação entre as regiões codificadas para os recetores KIR com exões dos genes do cromossoma 19.....	7
Tabela.2- Interação de uma molécula de HLA classe I com um recetor NK – KIR.....	12
Tabela.3- Diferenças funcionais e fenótipos dos linfócitos NK CD56.....	16
Tabela.4- Classificação de retrovírus.....	18
Tabela.5- Caraterização dos diferentes tipos de retrovírus consoante a morfologia do núcleo e da cápside.....	39
Tabela.6- Características da população em estudo.....	41
Tabela.7- Resultados da atividade citolítica das células NK.....	42
Tabela.8- Atividade das células NK sobre as células PBMC, como células efetoras e alogénicas das células CD4 ⁺ infetadas ou não infetadas como células alvo.....	42

Lista de Abreviaturas

- ADCC - Atividade citotóxica mediante de anticorpos
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- ALT - L-alanina aminotransferase
- ARN - Ácido ribonucleico
- AST - L-aspartato aminotransferase
- BCR - Recetor da célula B
- CCR - Recetor de quimiocinas
- CD - *cluster* de diferenciação
- Célula NK - Célula *Natural Killer*
- CTL - do inglês *Cytotoxic T Lymphocytes*
- DAP-10 - do inglês *DNAX Activating Protein of 10kDa*
- DAP-12 - do inglês *DNAX Activating Protein of 12kDa*
- DC-SING - do inglês *Dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-grabbing nontegrin*
- Fc - Fragmento constante da imunoglobulina ou anticorpo
- HAART - do inglês *Highly Active Anti-retroviral Therapy*
- VHC - Vírus da Hepatite C
- HESN - Indivíduos soronegativos expostos ao VIH
- HTLV - vírus humano linfotrópico
- IFN - Interferão
- Ig - Imunoglobulina ou anticorpo
- IL - Interleucina
- IP -Inibidor das proteases virais
- IPT - Interrupção programada do tratamento
- ITIAM - Inibidor da transcriptase reversa nucleosídico
- ITINN - Inibidor da transcriptase reversa não nucleosídico
- KIR - do inglês *Killer Cell Immunoglobulin-like receptor*
- LAIR - do ingles *Leukocyte-Associated Inhibitor receptor*
- LAK - do inglês *Lymphokine Activated Killer*
- LILR - do ingles *Leukocyte Immunoglobuline-like receptor*
- LRC - Complexo de genes dos recetores de leucócitos
- LTR - Sequência terminal longa de repetição

MHC - Complexo major de histocompatibilidade
NCR - do inglês *Natural Cytotoxicity receptor*
NKC - Complexo dos genes das células NK
NKT - do inglês *Cells T Natural Killers*
PBMC - do inglês *Peripheral blood mononuclear cell*
PHA - Fito-hemaglutinina
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TAP - Transportador associado ao processamento de antigénio
Tc - Linfócitos T citotóxicos
TCR - Recetor da célula T
TGF- β - Fator de transformação do crescimento β
Th - linfócitos T auxiliares
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
TNF- β - Fator de necrose tumoral β ou linfotóxina (LT)
Ts - Linfócitos T supressores
VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana
UDI EU - Usuários de drogas intravasculares soronegativos altamente expostos

I – INTRODUÇÃO

A SIDA foi diagnosticada pela primeira vez nos Estados Unidos da América, num grupo de indivíduos homossexuais. Estima-se que o VIH tenha derivado do vírus da imunodeficiência símia, de fato. A infecção em humanos iniciou-se por volta dos anos 30 em África, tendo-se espalhado desde então pelas áreas rurais (Murray *et al.*, 2005). A partir dos anos 60, com o aumento da migração para as áreas urbanas, o vírus espalhou-se pelas grandes cidades, onde os trabalhadores do sexo foram os principais responsáveis pela sua disseminação. Após a aquisição, o VIH liga-se à molécula CD4 nos linfócitos T e monócitos, usando os recetores de quimiocinas como co-recetores, levando a uma destruição da arquitetura dos tecidos linfóides (Arosa *et al.*, 2007). A demência associada à SIDA resulta de múltiplas infeções oportunistas ou pela infecção do VIH em células da microglia e neurónios (Murray *et al.*, 2005). Testes para a deteção do VIH, normalmente, são efetuados tanto para identificar indivíduos infetados, para que possam iniciar a terapia anti-retroviral, como indivíduos portadores que possam transmitir a doença (ex: doação de sangue/ órgãos, mulheres grávidas, parceiros sexuais), ou para vigiar do decurso da infecção e para confirmar o diagnóstico de SIDA. A natureza da infecção crónica do VIH como a deteção e quantificação genómica podem ser efetuadas por PCR e outros testes sorológicos (ex: ELISA), no entanto, ainda não é possível identificar a infecção do vírus logo após a aquisição (Murray *et al.*, 2005).

A resposta imune do hospedeiro contra o vírus destina-se a bloquear a infecção e a eliminar as células infetadas, porem, o vírus dispõe de mecanismos de escape a essa resposta. Deste modo, o resultado depende do balanço entre a eficácia dos mecanismos de defesa do hospedeiro e os mecanismos de evasão do mesmo. Quando o vírus entra no organismo é reconhecido pelas células do sistema imune inato e pelas células epiteliais desencadeando uma resposta inflamatória. Contudo, a inibição da carga viral por interferões do tipo I (ex: IFN- α , IFN- β) e a lise das células infetadas pelas células NK são mecanismos mais imediatos desencadeados pelo hospedeiro. As células NK são ainda capazes de produzir e secretar citocinas e quimiocinas exercendo a sua ação citolítica sobre as células alvo, que podem reconhecer quando à superfície destas ocorre a diminuição da expressão de antígenos de MHC de classe I. Assim, as células NK são

um importante mecanismo antiviral em estádios precoces da infecção, antes do desenvolvimento de respostas mediadas por linfócitos T e B (Arosa *et al.*, 2007).

Este trabalho de revisão foi realizado no âmbito da unidade curricular de Projeto de Pós Graduação/Dissertação, um dos requisitos necessários à conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, e visa a apresentação pormenorizada das alterações que ocorrem nas células NK antes, durante e depois da infecção pelo VIH, assim como a apresentação de dois casos de sucesso contra a progressão do VIH, segundo publicações científicas recentes.

A motivação para realizar este trabalho baseou-se no interesse em aprofundar conhecimentos na área da Imunologia, nomeadamente em relação à importância da resposta inata no combate à infecção por VIH.

II – CÉLULAS NATURAL KILLER

1. Aspectos Gerais

As células *natural killer* (NK) têm origem na linhagem linfóide do sistema imunológico, não ostentando à sua superfície nem recetores dos linfócitos B, nem recetores dos linfócitos T; são, assim, caracterizadas como “células nulas” e, por isso, pertencentes ao terceiro grupo de linfócitos. Constituem uma população heterogénia de linfócitos citotóxicos e produtores de citocinas com origem na medula óssea e representam cerca de 5 a 25% do total de células mononucleares na circulação sanguínea em condições normais (Caligiuri, 2008; Vivier *et al.*, 2011; Arosa *et al.*, 2007) que, após ativação, podem migrar para uma variedade de tecidos e órgãos. Fazem parte do sistema imune inato, sendo a sua função fundamental a de proporcionar uma resposta defensiva de primeira linha, funcionando como sentinelas com capacidade de detectar e lisar células tumorais ou infectadas por vírus sem que seja necessária uma sensibilização prévia (Caligiuri, 2008; Vivier *et al.*, 2011).

Desta forma, é preciso uma boa regulação destas respostas para que a distinção entre as células doentes e os tecidos vizinhos saudáveis seja adequada. Assim, a ativação das células NK é modelada a partir de células germinativas que induzem a inibição ou a ativação da expressão ao nível dos seus recetores de superfície. A incorporação dos sinais dos recetores de superfície da célula é feita pela dinâmica estrutural entre a interface formada no contacto entre as células NK e as células alvo – sinapse imune (Davis *et al.*, 1999).

2. Morfologia

As células NK, morfologicamente, são maiores quando comparados com os linfócitos T e B e, à semelhança dos linfócitos T citotóxicos (Tc) ativados, contém numerosos

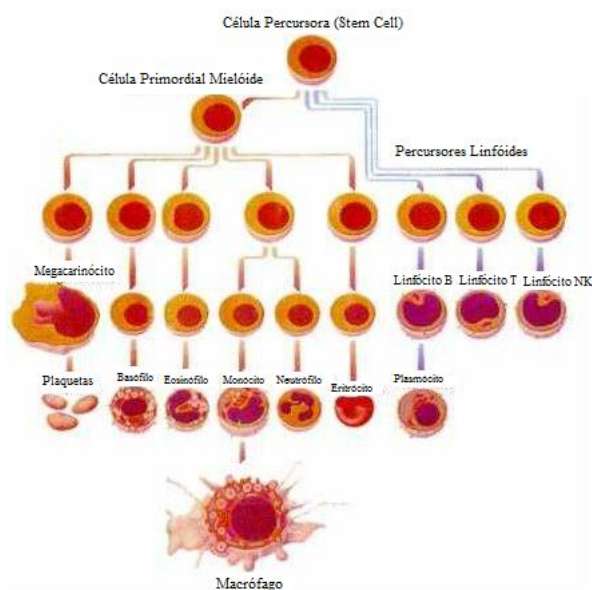


Figura.1- Esquema da árvore genealógica das células sanguíneas.

grânulos citolíticos pré-formados, também designados de “grandes linfócitos granulares”. O núcleo é geralmente redondo; no entanto, pode sofrer uma pequena reentrância de um dos lados (Figura.1). À superfície expõem múltiplos recetores – *recetores NK* – que abrangem uma grande variedade de moléculas (por exemplo os recetores KIR, LILR e LAIR) e exibem ainda uma forte expressão para o interferão - γ (IFN- γ) e para outras citocinas que levam à ativação de outros tipos de células imunológicas (Lee *et al.*, 2007; Smyth *et al.*, 2002; Arosa *et al.*, 2007).

3. Classificação e Forma de Atuação

A imunidade pode ser definida como um somatório de múltiplos mecanismos que resultam na defesa do nosso organismo contra agressões externas como são, entre outras, as doenças infecciosas. Ela atua por duas vias: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata caracteriza-se por uma resposta imediata a um estímulo agressor, apresentando mecanismos de largo espectro; e a imunidade adaptativa distingue-se por uma resposta mais tardia (entre 2 a 5 dias) que exige a replicação clonal de células efetoras como os linfócitos B e os linfócitos T, usando mecanismos de reconhecimento mais específicos e restritos, ou seja, reconhecendo apenas antígenos particulares (Janeway *et al.*, 2004). Sugerindo que as células NK poderão ser responsáveis por uma ação citotóxica em células tumorais e autólogas infetadas por vírus sendo geralmente dependentes de anticorpos, isto porque apresentam recetores de membrana para o fragmento Fc das imunoglobulinas IgG podendo, assim, interagir com as células alvo revestidas de anticorpos, ligando-se a elas. Este mecanismo citotóxico resulta de um balanço complexo entre sinais inibidores e ativadores que interatuam com os recetores NK através da presença ou da ausência de moléculas do complexo major de histocompatibilidade de classe I (MHC classe I) presentes nas células alvo (Prodinger *et al.*, 2003). Após a ligação às células alvo, as células NK originam vários poros na membrana celular resultando na sua lise celular. As perforinas são as moléculas responsáveis pela formação destes. A lise das células alvo pode ser ainda potenciada pela libertação de enzimas e citocinas (por exemplo: IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β) que provocam um efeito sinérgico da ação citotóxica. No entanto, as células NK não são as únicas com capacidade de produzir citocinas como o IL-2 e o IFN- γ que podem também ser produzidos pelos macrófagos, linfócitos B e linfócitos T diferenciados (ex: TCR $\alpha\beta$

CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$), levando a um aumento significativo do efeito citotóxico (Abbas *et al.*, 2005; Roitt *et al.*, 2001). Existe ainda um grupo de Células NK que são inertes ou pouco ativas, podendo ser induzidas por citocinas a converter-se em células citotóxicas ativas. Normalmente são designadas de LAK (do inglês *lymphokine activated killer*). Atuam da mesma forma que as células anteriormente descritas, com a diferença que o potencial citotóxico e o espectro de células alvo são substancialmente superiores quando ativadas. Assim sendo, a especificidade distinta das funções efetoras das células NK (produção de citocinas e ação citotóxica) associada a uma rápida resposta e a ausência de memória caracteriza-as como pertencentes ao sistema imune inato e não adaptativo (Arosa *et al.*, 2007).

4. Recetores

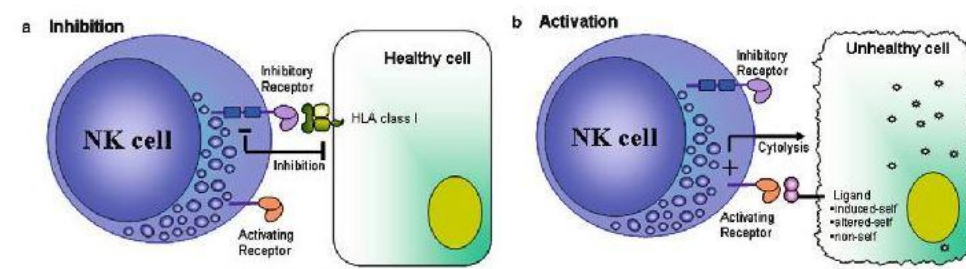


Figura.2- As células NK apresentam simultaneamente à sua superfície recetores ativadores e inibidores que vão influenciar o tipo de resposta destas células. Assim, pode ocorrer uma inibição da resposta a) levando as células NK a não reagir, ou uma ativação da resposta levando estas a desenvolver uma resposta b) (Adaptado de Rajalingam, 2012).

Os leucócitos são as células do sistema imunitário responsáveis pela resposta contra os agentes agressores e incluem os leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) e as células mononucleares (linfócitos e monócitos). Os linfócitos são a linhagem com mais relevância na resposta imunológica uma vez que conferem respostas mais específicas. A linhagem linfóide divide-se em quatro famílias (os linfócitos B; os Linfócitos T; os linfócitos NK e as Células dendríticas) (Figura.1). Os linfócitos B possuem na membrana plasmática um recetor, que é expresso apenas neste tipo de células, chamado de BCR ou recetor das células B. Os linfócitos T são as células principais da imunidade celular e apresentam três subtipos: os linfócitos T auxiliares/ helper (Th), os linfócitos T

citotóxicos (Tc) e os linfócitos supressores (Ts). Todos os linfócitos T expressam na membrana plasmática recetores específicos para um antígeno (TCR – recetor das células T) (Arosa *et al.*, 2007). As células NK ou linfócitos NK caracterizam-se pela ausência de recetores específicos para um antígeno como referido anteriormente. No entanto, expressam à sua superfície múltiplos recetores – *recetores NK* – que devido à sua diversidade molecular foram classificados dentro dos seguintes critérios (Arosa *et al.*, 2007):

- i. O tipo de sinal que transmitem (ativação/ inibição) (Figura.2);
- ii. O tipo de proteína expressa à superfície (lectina ou imunoglobulina);
- iii. O tipo de ligando, ou seja, se reconhece ou não moléculas do MHC classe I;
- iv. O complexo genómico onde são localizados.

De forma a simplificar esta classificação os recetores NK foram organizados em dois grandes grupos:

- A. LRC (complexo de genes dos recetores de leucócitos);
- B. NKC (complexo dos genes das células NK).

O primeiro grupo, LRC, localiza-se no cromossoma 19 e contém mais de 50 genes que codificam os recetores NK da família das imunoglobulinas (ex: KIR, LIL e LAIR) assim como os genes para o recetor Fc α , o recetor NKp46 e os adaptadores DAP12 e DAP10 (Wende *et al.*, 1999).

Os **recetores KIR** (do inglês *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor*) são estruturalmente representados por uma extensão entre 4 a 16 Kb podendo conter entre quatro exões a nove (forma mais comum) (Uhrberg *et al.*, 1997) (Tabela.1).

Tabela.1- Relação entre as regiões codificadas para os recetores KIR com os exões a partir dos genes do cromossoma 19.

Exão	Zona Codificada	Observações
1	Codificam para a sequência final	
2		
3	Codificam para os domínios Ig extracelulares designados de D0, D1 e D2	Os recetores KIR podem dividir-se em KIR2D e KIR3D , dependendo de existirem dois ou três domínios de Ig extracelulares (Colonna <i>et al.</i> , 1995; D'Andrea <i>et al.</i> , 1995).
4		
5		
6	Codifica para o espaçador	
7	Codifica para a região transmembranar	
8	Codificam para o domínio citoplasmático	De acordo com o comprimento da cauda citoplasmática, os recetores KIR podem-se subdividir em S (curto) ou L (longo). Os recetores KIRDS apresentam um a.a. de lisina na região transmembranar que é responsável pela associação com proteínas adaptadoras com o DAPI2 responsável pela <u>transmissão de sinais intracelulares ativadores</u> . Os recetores KIRDL determinam-se pela presença de sequências ITIM na cauda citoplasmática responsáveis pela <u>transmissão de sinais intercelulares inibidores</u> (Colonna <i>et al.</i> , 1995; D'Andrea <i>et al.</i> , 1995).
9		

Normalmente os recetores KIR ativadores e inibitórios são codificados por genes diferentes e não por *splicing* alternativo. No entanto, para o gene do recetor KIR3D alguns alelos podem codificar recetores inibitórios (ex: KIR3DL1) e outros alelos podem codificar recetores ativadores (ex: KIR3DS1) (Winter *et al.*, 1998). Os processos de metilação dos respetivos genes e a reorganização da cromatina são os mecanismos responsáveis por regular a expressão dos recetores KIR que são polimórficos e,

geralmente, apresentam uma grande variedade genómica entre indivíduos, sendo o mais comum de cinco a sete genes, podendo atingir os dez genes. Os genes comuns a todos indivíduos são os KIR3DL3, KIR2DL4 e KIR3DL2 (Maxwell *et al.*, 2002; Pando *et al.*, 2003). Uma vez que o gene KIR é expresso na forma de recetor à superfície de linfócitos NK, linfócitos T (TCR $\gamma\delta$ e TCR $\alpha\beta$ de memória) e na maioria dos linfócitos NKT CD8⁺, a sua expressão mantém-se estável na sua descendência (Phillips *et al.*, 1995; Ferrini *et al.*, 1994). Entre os vários recetores KIR destaca-se o **KIR2DL4**, uma vez que este é expresso de forma constitutiva na superfície de uma subpopulação de linfócitos NK com níveis de expressão de CD56 elevados (CD56^{brigh}) (Goodridge *et al.*, 2003; Kikuchi-Maki *et al.*, 2004). Esta subpopulação de linfócitos NK destingue-se por apresentar atividade citotóxica baixa, e elevada capacidade de secreção de citocinas e de quimiocinas reguladoras em comparação com os linfócitos NK com níveis de expressão de CD56 baixos (CD56^{dim}). O KIR2DL4 caracteriza-se ainda por ser o único que expressa os domínios D0 e D2, por possuir um resíduo de arginina na região transmembranar que lhe permite a associação com o Fc ϵ R1 γ , em vez do adaptador DAP12 (Kikuchi-Maki *et al.*, 2004; Yusa *et al.*, 2002) e pela presença de uma sequência de ITIM na cauda citoplasmática (Faure *et al.*, 2002; Yusa *et al.*, 2002). A sua agregação com linfócitos NK não ativos permite a indução de IFN- γ , enquanto que nos linfócitos NK ativos induz a secreção de IFN- γ e de citotoxicidade (Rajagopalan *et al.*, 2001). Recentemente acredita-se que o recetor KIR2DL4 liga-se aos linfócitos NK através da molécula não-clássica HLA-G (Rajagopalan *et al.*, 1999; Ponte *et al.*, 1999). Os recetores KIR inibitórios singularizam-se por reconhecerem apenas moléculas de HLA classe I na sua forma nativa. São compostos pela cadeia pesada, a β 2m e o péptido onde a interação não envolve a região de ligação ao péptido, mas a porção lateral do domínio α 1. Sendo assim, dependente da presença do péptido apesar de o recetor KIR não conseguir distinguir entre péptidos próprios e péptidos não próprios (Figura.3). Desta forma, a ligação resulta na inibição da atividade citotóxica e na inibição da secreção de citocinas reguladoras, aonde o processo inibitório se relaciona com a presença de sequências ITIM na cauda plasmática (Fare *et al.*, 2002). Por outro lado, os recetores KIR ativadores salientam-se por apresentarem uma fraca ou mesmo ausente afinidade de ligação para as moléculas de HLA de classe I nativas, onde a ligação resulta na fosforilação de sequências ITAM presentes em proteínas adaptadoras associadas com os KIR ativadores como o DAP12 (Lanier *et al.*, 1998; Olcese *et al.*, 1997); no entanto ainda muito pouco se sabe sobre este mecanismo. Estudos recentes,

associam o envolvimento dos recetores KIR em certas doenças auto-imunes como a artrite psoriática, escleroderma, *psoriasis vulgaris*, etc (Suzuki *et al.*, 2004). Por exemplo, um indivíduo infetado com o VIH, sendo homozigótico para o alelo HLA-Bw4, desenvolve muito mais lentamente a doença, vivendo por um período de tempo mais longo do que um indivíduo com outro apótipo para o HLA classe I (Flores-Villanueva *et al.*, 2001). Diversos estudos subsequentes evidenciaram que o efeito “protetor” é mais evidente em indivíduos que possuam o aminoácido (a.a.) isoleucina na posição 80 no domínio $\alpha 1$ da cadeia pesada do alelo HLA-Bw4 combinado com a presença do gene para o recetor KIR3DS1 (Flores-Villanueva *et al.*, 2001; Parham *et al.*, 2003).

Os **recetores LILR** (do inglês *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor*) são igualmente reconhecidos como LIR, ILT e CD85 (Cosman *et al.*, 1997; Colonna *et al.*, 1997). Expõem uma grande variedade da família de genes LILR, mas com pouca variedade entre indivíduos, não sendo tão polimórficos quando comparados com os da família KIR. Dos 13 genes que codificam os recetores LILR, apenas o **LILRB1** (ILT2/LIR1) é que é expresso nos linfócitos NK e que codifica juntamente com o **LILRB2** (ILT4/LIR2) um recetor inibidor (Cosman *et al.*, 1997; Colonna *et al.*, 1997).

Os **recetores LAIR** (do inglês *Leukocyte-Associated Inhibitor Receptor*) representam uma porção adjuvante aos recetores LILR (Arosa *et al.*, 2007). Existem dois tipos de recetores LAIR: os LAIR-1 e os LAIR-2. Os LAIR-1 expressam-se à superfície celular operando como recetores inibitórios e apresentam uma estrutura idêntica à dos recetores KIR, mas com duas sequências de ITIM. Quanto aos LAIR-2, o seu mecanismo ainda é desconhecido.

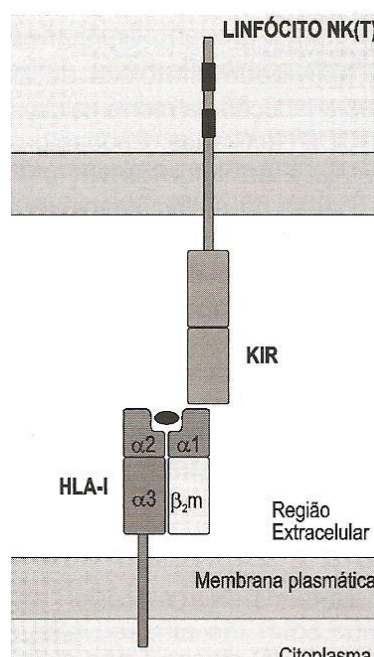


Figura.3- Interação de uma molécula de HLA classe I com um recetor NK – KIR (Adaptado de Arosa *et al.*, 2007).

Os **recetores NCR** (do inglês *Natural Cytotoxicity Receptor*) contêm três membros de recetores: o **NKp46**, o **NKp30** e o **NKp44**. O **NKp44** e o **NKp46** têm a capacidade de identificar proteínas virais na superfície de células infetadas (ex: hemaglutina do vírus da gripe). Os recetores **NKp30** e **NKp46** são expressos por linfócitos NK ativados e não ativados emitindo sinais intracelulares ativadores pela associação com a cadeia CD3 ζ ou com a cadeia γ do recetor Fc ϵ RI (Arosa *et al.*, 2007). Enquanto, que o recetor **NKp44** só é expresso por linfócitos NK ativados emitindo sinais intracelulares ativadores entre a associação com o adaptador DAP12 (Arosa *et al.*, 2007). Desta forma, estes recetores, em junção com o NKG2D, são vistos como os responsáveis pela atividade citotóxica espontânea de linfócitos NK humanos contra várias patologias (ex: melanomas, carcinomas, e por linfócitos B infetados pelo vírus de Epstein-Barr).

Os **adaptadores DAP10** e **DAP12** não são recetores NK, porém constituem uma parte integrante dos recetores NK ativadores (Arosa *et al.*, 2007). O **DAP10** (do inglês *DNAX Activating Protein of 10kDa*) é uma glicoproteína transmembranar homodimérica que é expressa em células hematopoiéticas. Na região celular apresenta uma cisteína, a região transmembranar encontra-se carregada negativamente o que permite a associação com recetores NK ativadores (ex: o NKG2D) (Arosa *et al.*, 2007). Na cauda citoplasmática contém uma sequência de tirosina YXXM que, se fosforilada contém a capacidade de reunir as cinases PI3K e Grb2. O **DAP12** (do inglês *DNAX Activating Protein of 12kDa*) é igualmente uma glicoproteína transmembranar homodimérica que abrange uma região extracelular pequena tendo uma cisteína envolvida no desenvolvimento de pontes de dissulfureto. Uma região transmembranar, com a presença de um ácido aspártico, que lhe concede uma carga negativa. Permitindo ao DAP12, associar-se a recetores cuja região transmembranar contenha a.a. básicos carregados positivamente (ex: recetores KIR ativadores com o recetor NKG2D) (Arosa *et al.*, 2007). Por fim, contém uma sequência de ITAM na cauda citoplasmática.

O segundo grupo, NKC, localiza-se no cromossoma 12 e contém os genes para a codificação dos recetores dos linfócitos NK da família aparentada às lectinas do tipo C incluindo os recetores CD94/NKG2, NKG2D, NKRP1-A e o CD69 (Vance *et al.*, 1999; Lazetic *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 1997).

O **recetor CD94** é, normalmente, expresso à superfície celular da maioria dos linfócitos NK, dos TCR $\alpha\beta$ CD8⁺ de memória e dos linfócitos TCR $\gamma\delta$ (Aramburu *et al.*, 1990; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2001). Este pode ser expresso como um homodímero (CD94/CD94), não tendo qualquer envolvido na transmissão de sinais, ou como um heterodímero junto com membros da família **NKG2** (ex: CD94/NKG2A) (Houchings *et al.*, 1991). Os recetores **CD94/NKG2** são modulados através de sinais extracelulares induzidos por citocinas (ex: IL-15; IL-12 e TGF- β) e por ligandos do complexo TCR/CD3. Os recetores **CD94/NKG2A**, **CD94/NKG2C** e **CD94/NKG2E** são capazes de reconhecer células de HLA-E presentes nas células alvo, uma vez que o HLA-E tem a particularidade de se ligar a péptidos originados pela degradação de moléculas de MHC classe I clássicas, mais especificamente da sequência sinal. Em contraste, o resultado desta interação é diferente para cada tipo de recetor. Desta forma, o recetor **CD94/NKG2A** contém uma sequência ITIM na cauda citoplasmática originando um heterodímero que atua como um recetor NK inibidor (Houchins *et al.*, 1997; Carretero *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 1999). Já os recetores **CD94/NKG2C** e **CD94/NKG2E** contêm na região transmembranar um aminoácido de lisina que lhes permite associarem-se com o ácido aspártico, presente na mesma região transmembranar do adaptador DAP12, resultando em heterodímeros que atuam como recetores NK ativadores.

Os recetores CD56 são responsáveis pela expressão de citocinas e de quimiocinas. Consoante o nível de expressão destes recetores os linfócitos NK podem dividir-se em duas subpopulações: os **linfócitos CD56^{bright}** e os **linfócitos CD56^{dim}** (Lanier *et al.*, 1986). Os linfócitos **CD56^{bright}** definem-se por possuírem uma capacidade elevada de produção de citocinas e quimiocinas reguladoras exibindo simultaneamente uma baixa citotóxicidade e baixa expressão de CD16 (Lanier *et al.*, 1986; Andre *et al.*, 2000; Colonna *et al.*, 1997). Nos humanos, a maior percentagem em circulação corresponde aos linfócitos **CD56^{dim}** num valor de aproximadamente 90% (Lanier *et al.*, 2000; Moretta *et al.*, 2001). Estes definem-se por manifestarem uma baixa capacidade de produção citocinas e quimiocinas juntamente com uma alta citotóxicidade e ainda por expressarem níveis mais elevados de CD16 do que os **CD56^{bright}** (Tabela.2). Os linfócitos NK têm ainda a capacidade de expressar cadeias do recetor CD56 para a IL-2 desempenhando um papel importante para a sua homeostase. Desta forma, os linfócitos **CD56^{bright}** expressam as cadeias α (CD25) e β (CD122) em conjunto com a cadeia γ_c

(CD132) que é comum com os retores para a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, formando para a IL-2 um recetor de alta afinidade, ou seja, permite que os linfócitos CD56^{bright} proliferem na presença de concentrações baixas de IL-2 (Caligiuri *et al.*, 1990; Nagler *et al.*, 1990; Caligiuri *et al.*, 1993; Baume *et al.*, 1992). No caso dos linfócitos CD56^{dim}, estes apenas expressam as cadeias $\beta\gamma_c$ afigurando recetores de baixa afinidade para a IL-2 e prolifera pouco na sua presença (Caligiuri *et al.*, 1990; Baume *et al.*, 1992). As citocinas IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-18 são expressas de forma substancial por vários recetores dos linfócitos NK mas também por monócitos e células apresentadoras de antígeno (Cooper *et al.*, 2001; Kunikata *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 1995). Destaca-se ainda a cadeia α do recetor para a IL-15, uma vez que este em conjunto com as cadeias $\beta\gamma_c$ representa um recetor de alta afinidade para esta citocina. Estudos recentes revelam a importância desta citocina, uma vez que acredita-se que a IL-15 desempenha um papel fulcral na manutenção da homeostase (Fehniger *et al.*, 2001; Lanier *et al.*, 2000).

Tabela.2- Diferenças funcionais e fenotípicas dos linfócitos NK CD56. * Níveis baixos; *** níveis elevados (Adaptado de Megan *et al.*, 2001).

Caraterística	Linfócito NK	
	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
CD56	***	*
CD16	**	***
Citocinas	*** TNF- α TNF- β IFN- γ IL-10	*
Citotóxicidade dependente de anticorpos	*	***
Citotóxicidade “natural”	*	***
Grânulos	*	***
CD94/NKG2A	***	*
Recetores KIR	*	***
Recetores para citocinas	IL-2R α IL-2R β IL-15R β	IL-2R β IL-15R β

	γ_c	γ_c
Recetores para quimiocinas	CCR7	CXCR1 CX ₃ CR1
Moléculas de adesão	L-selectina	PEN5-PSGL-1

5. Transmissão de Sinais intracelulares nos recetores NK

A transmissão de sinais intracelulares reverte da ligação dos recetores NK presentes nos linfócitos NK, nas subpopulações de linfócitos T e noutros tipos de células hematopoiéticas, resultando em sinais ativadores com atividades reguladoras e efetoras ou sinais inibitórios (Long, 1999). A transmissão de sinais pode ainda ser denominada de sinapse imune, como referido anteriormente. O fato de uma célula imune ir ao encontro de uma célula alvo e daí não se desencadear uma resposta imune não deve ser considerado como um “não-evento”, uma vez que na interface da estrutura das células NK existe uma assimilação chamada de – *resposta inibitória* – que desencadeia um gatilho inibitório conduzindo a célula a não reagir (Davis et al., 1999). Por outro lado, os recetores NK ativadores são ativados pelos membros da família Src por fosforilação de sequências contendo tirosinas nas caudas citoplasmáticas de três tipos de proteínas adaptadoras dotadas com a capacidade de se associarem através da região transmembranar dos referidos recetores - à cadeia γ do recetor Fc ϵ RI γ , à cadeia CD3 ζ e aos adaptadores DAP10 e DAP12 (Colucci *et al.*, 2002; Zompi *et al.*, 2003). A fosforilação das tirosinas permite ainda a ancoragem e posterior ativação de duas cinases de tirosina existentes nos linfócitos NK e T, a ativação de Syk e de ZAP-70 aos adaptadores e o desencadeamento de eventos intracelulares que resultam no aumento do cálcio intracelular e na ativação da transcrição de genes para citocinas e quimiocinas, bem como à desgranulação de grânulos citotóxicos.

6. Ativação e Função das Células NK

Após vários anos de estudos intensivos sobre os recetores NK, sabe-se hoje que os mecanismos moleculares de supressão de células stressadas e/ou defeituosas, de células

tumorais e de células infetadas por vírus encontram-se muito bem caracterizados, em que a atividade citotóxica das células NK é o resultado de um equilíbrio entre sinais positivos e negativos proferidos pelos recetores NK ativadores ou inibitórios respetivamente, e, à semelhança do que acontece nos linfócitos T, envolve a ativação de múltiplas proteínas sinalizadoras e adaptadoras intracelulares (Arosa *et al.*, 2007). Desta forma, os linfócitos NK encontram-se sujeitos a controlos muito apertados de ativação das funções efetoras por sinais intracelulares provenientes dos recetores NK ativadores e inibidores após agregação induzida pelos seus ligandos (ex: as moléculas de MHC classe I). O contacto celular com outras células (ex. como as células dendríticas), outros tipos de linfócitos e com células alvo é um dos mecanismos normais de ativação dos linfócitos NK (Cooper *et al.*, 2001). Outro mecanismo normal de ativação é através de citocinas existentes no microambiente circundante aos linfócitos NK, incluindo o IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15. Assim, contrariamente aos linfócitos T *naive*, os linfócitos NK que não se encontram ativados podem proliferar como resposta a sinais transmitidos através de recetores de citocinas e quimiocinas de forma constitutiva. As citocinas que utilizam a cadeia γ_c , como IL-2 e IL-15, desempenham um papel determinante na transmissão de sinais intracelulares que induzem a proliferação dos linfócitos NK, cooperando para a sua homeostase, como já referido anteriormente (Zompi *et al.*, 2003; Carlyte *et al.*, 2004). Todavia, é importante realçar que as atividades efetoras dos linfócitos NK não são, forçosamente, associadas a um processo de proliferação, uma vez que a sua função mais importante se encontra relacionada com a produção de citocinas com atividades antivirais e antitumorais (ex: IFN- γ , TNF- β), pela ativação de macrófagos (Lanier *et al.*, 2000). Durante a fase inicial da resposta imune são os linfócitos NK os maiores produtores de citocinas. Citocinas estas que também têm a capacidade de modular respostas adaptativas mediadas por linfócitos T, nomeadamente os linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Desta forma, o IFN- γ produzido por linfócitos NK ativados é o responsável por um aumento da expressão de moléculas de MHC classe I e classe II em células apresentadoras, conduzindo a um aumento do porte de antígenos aos linfócitos T e da sua ativação. Contudo, este pode também induzir a formação de linfócitos Th1 envolvidos na comutação do tipo de imunoglobulina pelos linfócitos B. Assim, as citocinas produzidas pelos linfócitos NK, como o IFN- γ e produzidas ao longo das fases iniciais de uma resposta imunológica têm, por exemplo, a capacidade de influenciar o tipo de resposta (Cooper *et al.*, 2001). Outra função importante dos linfócitos NK é a atividade citotóxica que pode ser de origem natural ou mediada por anticorpos, como

anteriormente mencionado. A subpopulação de linfócitos NK não ativados que apresenta maior atividade citotóxica natural são os CD56^{dim}; contudo após ativação com o IL-2 tanto a subpopulação CD56^{dim} como a subpopulação CD56^{bright} exibem atividades citotóxicas semelhantes. Na atividade citotóxica mediante de anticorpos (ADCC) é necessário a ativação do recetor CD16 através das células alvo revestidas de imunoglobulinas. Os linfócitos CD56^{dim} são os que apresentam níveis de expressão de CD16 mais elevados, ou seja, são a subpopulação que exhibe maior atividade citotóxica ADCC (Cooper *et al.*, 2001). Independentemente da origem da atividade citotóxica, esta atua da mesma forma, ou seja leva à eliminação das células alvo a partir de mecanismos semelhantes aos usados pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, isto é, a partir da produção de grânulos citotóxicos que contém perforinas e granzimas que irão por sua vez destruir a célula alvo. Por fim, é relevante mencionar que os sinais negativos transmitidos pelos recetores NK inibitórios, são um mecanismo de proteção que impede as respostas descontroladas por parte dos linfócitos NK contras as próprias células, tecidos ou órgãos (Lanier *et al.*, 2000). Assim, os sinais transmitidos pelos recetores NK inibidores permanecem sempre ativos. Enquanto os sinais transmitidos pelos recetores NK ativadores, apenas operam após a interação com células alvo específicas. Ou seja, células que exibam níveis elevados dos seus ligandos respetivos na superfície e níveis baixos dos ligandos dos recetores NK inibidores. Uma vez, que alguns dos ligandos dos recetores NK ativadores (ex: NKG2D) são apenas expressos por células tumorais, infetadas por vírus ou que se encontrem sob algum tipo de stresse (ex: MICA, MICB); e que ao mesmo tempo expressem níveis baixos de moléculas de MHC classe I, resultando numa célula que se encontra a transmitir sinais positivos em maior quantidade que os sinais negativos e por conseguinte a ativar os linfócitos NK (Lanier *et al.*, 2000).

III- VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

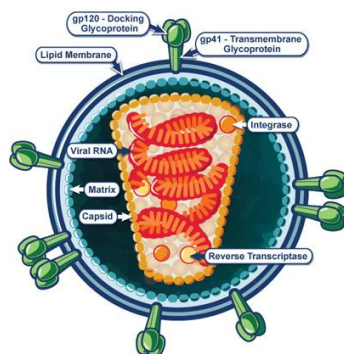


Figura.4- Viriões (Adaptado de: Nacional Institute of allergy and infectious Diseases, 2013).

1. Aspetos Gerais

A SIDA ou síndrome da imunodeficiência adquirida é causada por um vírus linfotrópico com afinidade preferencial para os linfócitos T CD4⁺, que participam ativamente no controlo do sistema imunológico. Sendo este, o vírus da imunodeficiência humana ou mais vulgarmente conhecido como VIH (Anderson *et al.*, 2010). O VIH pertence à subfamília dos lentivírus, dos retrovírus. O seu genoma viral é constituído por duas moléculas de ARN simples ligadas entre si, originando uma fita dupla, permitindo uma taxa de recombinação genómica muito maior. A principal característica dos retrovírus é a produção de uma enzima, a transcriptase reversa, que produz ADN a partir de uma molécula de ARN (Weiss, 2001). Este tipo de vírus sofre constantes mutações devido aos erros causados pela transcriptase reversa, tornando-os em vírus difíceis de combater. O VIH replica-se dentro das células hospedeiras e apresenta dois tipos: o VIH-1 e o VIH-2, sendo o primeiro tipo o mais virulento (Weiss, 2001).

2. Classificação

Os retrovírus são classificados pelo tipo de doenças que causam, tropismo tecidual e espectro de hospedeiros que abrangem, morfologia e complexidade genética (Tabela.3). Os **lentivírus** ou vírus lentos, caracterizam-se por apresentarem um longo período tempo entre a infeção inicial e o princípio dos sintomas mais graves, e, normalmente estão associados a doenças neurológicas e/ou associados a imunossupressão (Murray *et al.*, 2005).

Tabela.3- Classificação de retrovírus (Adaptado de Murray *et al.*, 2005).

Subfamília	Características	Exemplos
Oncovírus	Associados ao cancro e a desordens neurológicas.	-
Lentivirinae	Manifestam desenvolvimento da doença lento: causa distúrbios neurológicos e imunossupressão, são vírus do tipo – D.	Vírus da imunodeficiência humana (VIH-1, VIH-2), vírus visna (ovelha), vírus da artrite/ encefalite caprina
Spumavirinae	Não causam doença clínica mas caracterizam-se por causar “espuma”	Vírus “espumoso” humano

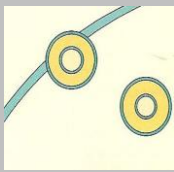

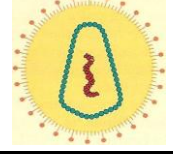
	vacuolizada citopatológica.	
Vírus Endógenos	Contém sequências de retrovírus que integram no genoma humano.	Vírus da placenta humana.

Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), após a infecção, o VIH pode esconder-se no citoplasma ou integrar-se no material genético (cromossomas) das células alvo, permanecendo, desta forma, protegido contra o sistema imune podendo permanecer assim durante meses ou mesmo anos, sem desencadear qualquer tipo de sintomatologia ao hospedeiro. Assim, devido ao tipo de mecanismo de atuação, morfologia e distúrbio clínico causado (imunossupressão) que o VIH é classificado como um lentivírus pertencente à família dos retrovírus.

3. Morfologia e Estrutura do vírus

O VIH possui uma forma esférica com um diâmetro de 1/10 000 mm (Figura.4). O **envelope viral** é composto por uma dupla camada lipídica, que é adquirida pela partícula viral (virião) a partir da célula hospedeira depois de este passar o citoplasma da célula hospedeira (Tabela.4). Ao longo do envelope, encontram-se incorporadas proteínas da célula hospedeira e cerca de 72 cópias de um complexo de proteínas pertencentes ao vírus designadas de **env** apresentando-se sob a forma de um espigão e visível à superfície. Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), o env ou gp160 é um complexo proteico que sofre divisão aquando a sua formação, sendo separado por uma enzima em duas regiões. Assim, o env é constituído por um tampão feito a partir de três moléculas chamadas de glicoproteína 120 (gp120) e numa haste composta por outras três moléculas designadas de glicoproteína 41 (gp41), que ancoram a estrutura ao envelope viral (Imagem.4). No interior do envelope viral encontra-se a **cápside** que ostenta uma forma cilíndrica (Murray *et al.*, 2005) (tabela 2) composta por 2000 cópias da proteína viral p24. A cápside envolve o material genético do vírus num núcleo de eletrões denso (Murray *et al.*, 2005), ou seja, incorpora **duas cadeias simples de ARN**, ligadas entre si que formam uma fita, das quais cada uma tem uma cópia completa dos genes do vírus.

Tabela.4- Caracterização dos diferentes tipos de retrovírus consoante a morfologia do núcleo e da cápside (Murray *et al.*, 2005).

Tipo de Retrovírus	Características	Exemplos	Imagem
A	Partículas imaturas quando presentes sob a forma intracelular, que após atravessarem a membrana plasmática tornam-se viriões maduros (tipo-B, tipo-C e tipo-D).		
B	Possuem núcleo com Nucleocápside em posição excêntrica no virião maduro.		Vírus provoca tumor mamário em ratos.
C	Possuem núcleo com Nucleocápside em posição central no virião maduro.	Vírus Humano T-linfotrópico (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-5), vírus do sarcoma de Rous (galinhas).	
D	Possuem núcleo com Nucleocápside com forma cilíndrica.	Vírus de macaco Mason-Pfizer.	

O VIH, sendo um retrovírus, apenas possui três genes estruturais – **gag**, **pol** e **env** – que contêm as informações necessárias para produzir as proteínas estruturais para a formação de novos viriões (Murray *et al.*, 2005). Nas extremidades de cada cadeia de ARN do vírus, existe uma sequência denominada de terminal longo de repetição (LTR). Estas sequências contêm promotores, intensificadores e outras sequências de genes usadas para ligar diferentes fatores da transcrição celular (Murray *et al.*, 2005) e podem ser desencadeadas tanto pelas proteínas virais, como pelas proteínas da célula hospedeira. Segundo o National Institute of allergy and infectious Diseases (2013), na cápside existe ainda uma **proteína p7** (proteína da nucleocápside), 10 a 50 cópias da enzima **transcriptase reversa** e da enzima **integrase**, dois ARN de transferência celular (tARNs) (Murray *et al.*, 2005) e a enzima **protease**.

4. Ciclo de Replicação

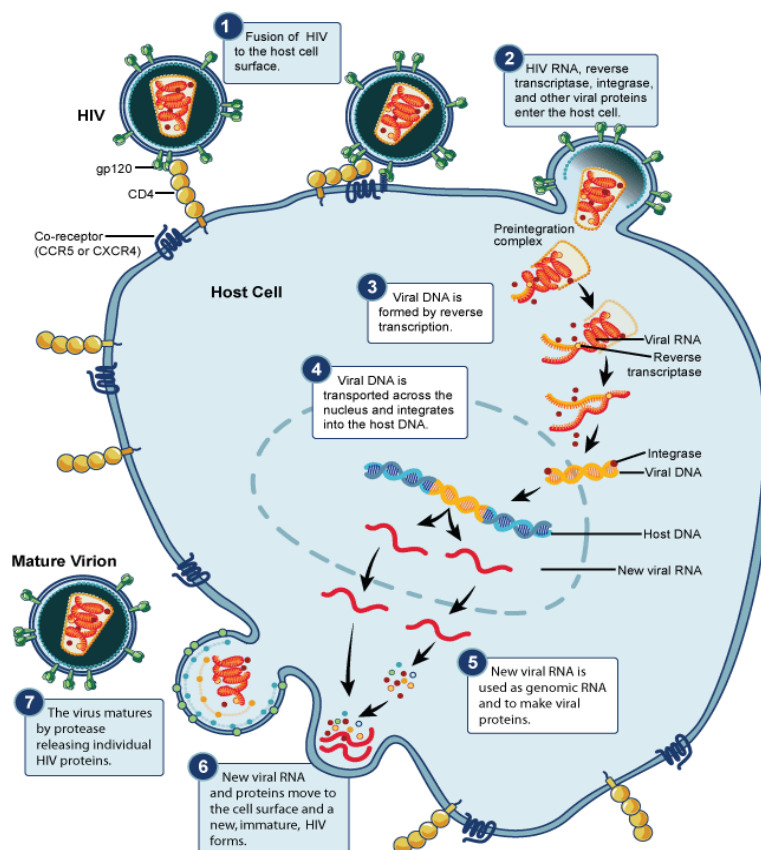


Figura.5-Ilustração do ciclo de replicação do VIH numa célula hospedeira (Adapato de: Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013).

Após a transmissão/infecção, o vírus invade as células hospedeiras o mais breve possível a fim de se replicar. Inicialmente dá-se a fusão do virião com a membrana superficial da célula hospedeira. A fusão ocorre por ligação dos espigões glicoproteicos do vírus com os recetores CD4 presentes à superfície das células hospedeiras M-trópicas (ex.: macrófagos, células dendríticas). Primeiro dá-se a ligação da porção gp120 do vírus com a molécula CD4 da célula hospedeira, e, de seguida, a porção gp120 liga-se ao CCR5 (do inglês *7-Transmembrane G-Protein-Coupled Chemokine Receptor*), um recetor secundário presente nos macrófagos e linfócitos T ativados (Figura.5, passo 1;2) (Isaacman-Beck *et al.*, 2009; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2010). Normalmente, com o desenvolvimento da infecção o vírus sofre mutações passando a ligar-se a outro recetor secundário, o CXCR4 presente nas células hospedeiras T-trópicas como os linfócitos T *naive* e linfócitos T helper (Th) (Murray *et al.*, 2005;

Wilen *et al.*, 2011). Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), a ligação ao recetor secundário permite a aproximação do envelope viral à membrana plasmática promovendo a integração da porção gp41 resultando na fusão das duas membranas. Curiosamente existe uma pequena percentagem da população que manifesta deficiências genéticas ao nível da expressão destes recetores secundários tornando-os resistentes à infecção do VIH (Murray *et al.*, 2005). A primeira fase da replicação começa no citoplasma com a ajuda da transcriptase reversa (sintetizada a partir do gene pol), que usa o tARN do virião como *primer* para sintetizar a banda negativa de ADN complementar (cADN). Esta funciona também como Ribonuclease II degradando o ARN a fim de sintetizar a banda positiva do cADN (Arts *et al.*, 1996) (Figura.5, passo 3). Durante a síntese do provírus (ADN do virião), são duplicadas para cada genoma sequências terminais (U3 e U5) anexando-lhes, em ambas as extremidades, as LTRs. Criam-se assim, as sequências necessárias para integrar, intensificar e promover as sequências de LTR para a regulação da transcrição. No final é obtido uma cópia de ADN do genoma viral maior do que a cópia original de ARN (Murray *et al.*, 2005). É durante a primeira fase, que o vírus sofre muitas mutações sendo a transcriptase reversa o principal responsável, uma vez que é geneticamente muito instável (ex: a margem de incerteza do VIH é de 5 erros em 9000 par de bases); é por esta razão que novas gerações do vírus são produzidas, e também a razão de o vírus conseguir alterar a sua patogenicidade e escapar ao sistema imune (Arts *et al.*, 1996). A segunda fase da replicação começa com o transporte do cADN para o núcleo e sua consequente aglutinação ao cromossoma do hospedeiro. A integrase (enzima sintetizada a partir do gene pol), é responsável pelo transporte do cADN até ao núcleo (Figura.5, passo 4). Para que haja integração é preciso que a célula hospedeira se encontre em crescimento. Uma particularidade do cADN do VIH e também de outros lentivírus, é que têm a capacidade de permanecer no citoplasma e/ou no núcleo sob a forma não integrada, até que a célula entre em crescimento celular e que o ADN circular da célula seja ativado (Murray *et al.*, 2005). Com o ADN viral incorporado no ADN celular, a última fase da replicação começa com a transcrição a partir da ação da polimerase II da célula hospedeira. Uma extensão completa de ARN é originada e usada para incorporar no novo virião e também para produzir vários mARN com sequências de genes estruturais (gag, gag-pol ou env). Estes, posteriormente, são sintetizados e glicosilados no reticulo endoplasmático e no complexo de golgi dando origem a glicoproteínas (Figura.5, passo 5). Estas são incorporadas em membranas, que também envolvem as

unidades extracelulares das proteínas virais secundárias, migrando assim, até à membrana plasmática (Hehlmann *et al.*, 1991). Depois de sofrerem acetilação, ligam-se à membrana na zona onde se encontra a glicoproteína do envelope viral. O novo virião forma-se por associação de duas cópias do genoma e duas moléculas de tARN (Figura.5, passo 6). Por fim sofre maturação com a ajuda da protease. Esta separa o virião imaturo da membrana celular por clivagem das glicoproteínas (gag e gag-pol), a transcriptase reversa é libertada e o núcleo é formado (Figura.5, passo 7). A protease tem um papel essencial na replicação pois permite que sejam formados novos viriões infantantes. A maturação do virião ocorre ao nível da superfície celular (Murray *et al.*, 2005).

Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), durante a replicação, o VIH age como se fosse parte integrante das células hospedeiras, estando assim, dependente do seu ciclo celular. No entanto, o vírus consegue interferir com o ciclo normal das células, como anteriormente mencionado. Para além dos três genes estruturais, o VIH possui seis genes regulatórios (*tat*, *ver*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*), que contém informações importantes para produzir proteínas controladoras, como anteriormente mencionado. Desta forma, as proteínas regulatórias participam ativamente nas diferentes fases da replicação garantindo ao máximo a sua integridade, sendo **tat** o responsável pela ativação da transcrição dos genes virais e os genes da célula hospedeira. O **rev** promove e regula o transporte do mARN viral para o citoplasma. O **nef** reduz a expressão de CD4 e das moléculas de MHC classe I na superfície das células, altera as vias de sinalização dos linfócitos T, regula a citotoxicidade do vírus e está encarregado de manter os níveis da carga viral elevados. O **nef** é o principal responsável pela evolução da infecção para estádios de doença mais graves, como o desenvolvimento para sida. O **vif** assimila e promove a maturação, liga-se à transcriptase reversa evitando hipermutações do genoma e ajuda o vírus a replicar-se em células mieloides. Estudos recentes demonstraram que o **vif** codifica uma proteína que interage com uma proteína (APOBEC3G) de defesa antiviral das células hospedeiras, inativando o seu efeito antiviral e permitindo que o vírus se replique normalmente. O **vpu** ajuda a reduzir a expressão superficial de CD4 promovendo a libertação do vírus. E o **vpr** (*vpx* no VIH-2) desempenha um papel importante no transporte do cADN até ao núcleo, na replicação do vírus em células que não estejam

em crescimento (ex: macrófagos) e prende as células na fase G2 do ciclo celular otimizando a sua replicação.

5. Infecção e Progressão Clínica

Durante o ato sexual, o VIH infeta as células de Langerhans e as células dendríticas do epitélio local, fixando-se à superfície, destas, por ligação com DC-SING, uma molécula de lectina, permitindo, assim, ao vírus viajar até aos nódulos linfáticos e infetar as células T CD4 (Pantaleo *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1991). No decorrer da infecção os macrófagos são constantemente infetados pelo vírus sendo, provavelmente, o seu maior reservatório e meio de distribuição. A mutação da região gp120 do gene *env*, permite ao vírus alterar o seu tropismo dos macrófagos para os linfócitos T CD4.

A replicação do vírus ocorre principalmente ao nível dos nódulos linfáticos que libertam constantemente o vírus e os linfócitos T infetados para a corrente sanguínea. Ao longo da infecção os níveis de linfócitos T CD4 vão diminuindo devido à indução da citólise provocada pelo vírus. Esta diminuição, pode também ser provocada pela ativação da citólise através dos linfócitos T citotóxicos como forma de resposta ao antigénio do VIH, que representa um grande desafio para os linfócitos T, resultando na sua diferenciação terminal e morte rápida. Pode ainda, ser provocada devido a uma grande acumulação das cópias do cADN não integradas que diminuem a permeabilidade do citoplasma conduzindo à formação de sincícios e, por fim, na apoptose celular. A habilidade do vírus para provocar a lise nas células alvo encontra-se diretamente relacionada com a quantidade de recetores CD4 expressos à superfície destas; sendo uma das razões, pela qual os macrófagos não são tão afetados por estes fenómenos citolíticos, uma vez que apresentam menor expressão dos recetores CD4 do que os linfócitos T. A constante diminuição do número de linfócitos T CD4 e o constante aumento do vírus no sangue que levam ao desenvolvimento dos sintomas da sida (Murray *et al.*, 2005).

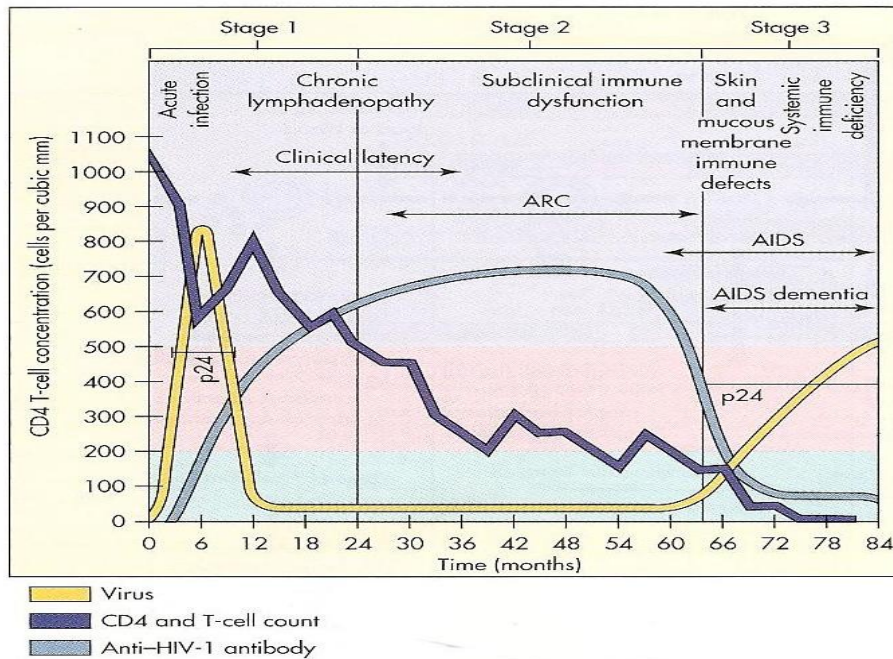


Figura.6- Fases evolutivas da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana ao longo do tempo (Murray *et al.*, 2005). Fase 1: infecção aguda; fase 2: infecção crônica assintomática; fase 3: fase assintomática e terminal ou SIDA.

Os defeitos moleculares, celulares e funcionais provocados pelo VIH durante a infecção levam progressivamente à destruição do sistema imune até à fase terminal da doença, a sida. Passadas duas a quatro semanas após o primeiro contato com o vírus surge a **primo-infecção** que se caracteriza pelo aparecimento de um quadro febril com faringite, linfadenopatias e eritema generalizado, etc (Daar *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1991; Safrit *et al.*, 1994). Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), normalmente cerca de 70% da população sofre estes sintomas. Durante esta fase, a viremia é elevada, ou seja, existe no sangue um número elevado de cópias do VIH (carga viral) que rapidamente se espalha por todo o organismo (Figura.6). O sistema imune responde a esta disseminação através dos linfócitos T CD4⁺ ativados por libertação de citocinas pelos macrófagos, células *natural killer* e outras células T e B (Murray *et al.*, 2005), terminando com a resposta específica e intensa por linfócitos T CD8⁺ citolíticos ou CTL (do inglês *Cytotoxic T Lymphocytes*) (Arosa *et al.*, 2007). A ação destes é muito importante no controlo da evolução da infecção do VIH, uma vez que têm capacidade de matar diretamente as células infetadas pelo vírus através da libertação de quimiocinas e por bloqueio das zonas de ligação dos recetores do vírus, diminuindo a viremia. No entanto, não existe a erradicação do vírus (Fauci *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1991; Daar *et al.*, 1991; Safrit *et al.*, 1994). Contudo, os linfócitos T CD8⁺ necessitam de ser ativados pelos linfócitos T CD4⁺, pelo que quando há redução dos

seus níveis, os níveis dos linfócitos T CD8⁺ também diminuem. Poucas semanas depois do início da infecção aguda, aparece a resposta detetável por anticorpos com fraca ação neutralizante específica sob a porção gp120 e gp41 do vírus (alvo dos testes de diagnóstico serológico da infecção) (Arosa *et al.*, 2007). Segundo o Nacional Institute of allergy and infectious Diadeases (2013), de forma a escapar ao sistema imunológico, o vírus instala-se em vários órgãos, particularmente nos órgãos linfáticos (ex: timo, baço e nódulos linfáticos) integrando-se dentro do material genético das células alvo. Protegido do sistema imunológico, o vírus permanece assim durante longos períodos de tempo - **infecção crónica assintomática** (Imagem.6). Normalmente, cerca de dois a cinco anos apresentando menor viremia do que na fase inicial, e com diminuição lenta e constante dos linfócitos T. Em especial, a subpopulação T CD4⁺ no sangue periférico e replicação ativa do vírus (Wei *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1995), preferencialmente no tecido linfoide, como mencionado anteriormente. Apesar da presença de anticorpos e de CTL específicos, que resultam em linfadenopatias generalizadas progressivamente persistentes até estados de doença mais avançados, sendo a fraqueza e perda de peso alguns dos sintomas (Daar *et al.*, 1991; Koup *et al.*, 1994). Em adição à imunodepressão, o VIH pode também causar anomalias neurológicas. As células da glia, são células neurológicas predominantemente infetadas pelo VIH, no entanto os neurónios também podem ser infetados. Os monócitos e células da microglia infetados podem libertar substâncias neurotóxicas ou fatores quimiotáticos que promovem respostas inflamatórias no cérebro. Também é possível ocorrerem efeitos citopáticos do vírus diretamente sobre os neurónios (Murray *et al.*, 2005). A **infecção sintomática terminal** dá-se quando os linfócitos T CD4⁺ deixam de ser funcionais, ou seja, quando os números existentes de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico são inferiores a 500/ μ L com conseqüente aumento da viremia, as respostas de antigénios específicos e dos linfócitos T CD8⁺ tornaram-se disfuncionais, desregulando todas as respostas humorais. Com a diminuição dos níveis dos linfócitos T CD4 e simultânea destruição da estrutura dos órgãos linfáticos (Arosa *et al.*, 2007) agravam-se os sintomas gerais, surgindo neoplasias atípicas e infeções graves sendo, na maioria, provocadas por agentes oportunistas (ex: infeções fúngicas, bacterianas, provocadas por protozoários, vírus Herpes, etc.); cuja presença retrata define clinicamente a **sida**. A evolução da fase crónica assintomática para a fase terminal de sida é muito variável entre indivíduos. Vários estudos comprovaram que esta evolução depende da eficácia da resposta imune na fase aguda, ou seja, o desenvolvimento da infecção evolui para estados mais graves

conforme a eficácia da ação dos CTL, relacionando-se, assim, inversamente com o nível de viremia no fim da primo-infecção (Koup *et al.*, 1994; Pantaleo *et al.*, 1994).

6. Mecanismos de Resistência e Estratégia Farmacológica

Vários estudos demonstraram a existência de indivíduos capazes de combater naturalmente o VIH não chegando a desenvolver doença (VIH-resistentes) e de indivíduos que mesmo infetados retardam a sua progressão por períodos de tempo mais longos (não-progressores). Como já referido anteriormente, a mutação genética dos recetores de quimiocina é um dos meios de resistência à infecção por VIH. Estudos comprovaram que indivíduos que sejam homozigóticos para uma deleção no gene CCR5, com produção de uma proteína deficiente, não são infetados pelo VIH, enquanto que indivíduos que apresentem esta mutação e que sejam heterozigóticos, ou que tenham polimorfismos nos genes de outros recetores de quimiocinas apenas demonstraram uma progressão da doença mais lenta (Arosa *et al.*, 2007). Outro exemplo de resistência à infecção foi encontrada em indivíduos que infetados com mutantes naturais de *nef* (o principal responsável pela viremia do VIH) e/ou primatas infetados com mutantes do vírus da imunodeficiência símia, que carece de *nef*, viveram por períodos de tempo maiores que os esperados (Murray *et al.*, 2005).

Inicialmente, na terapêutica contra o VIH usava-se a azidotimidina, um análogo nucleosídico inibidor da transcriptase reversa, que, demonstrou ter eficácia limitada (6 a 18 meses) devido a uma rápida resistência das estirpes mutantes de VIH. De forma a reduzir o aparecimento destas resistências à terapêutica, foram produzidos novos fármacos como, por exemplo, os inibidores da transcriptase reversa como o ITIAM (inibidor da transcriptase reversa nucleosídico), o ITINN (inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídico) e o IP (inibidor das proteases virais). Mais tarde impulsionou-se a combinação de dois ou três fármacos, com mecanismos de atuação diferentes, dentro da mesma terapêutica. Os resultados obtidos foram muito encorajadores evidenciando-se com as alterações provocadas no ciclo “natural” da infecção do vírus junto com uma notável redução da mortalidade e morbidade (ex: infeções oportunistas) e conseqüente retardação da infecção. Esta estratégia foi então denominada de terapêutica anti-retroviral altamente ativa ou HAART (do inglês *Highly Active Anti-*

Retroviral Therapy) (Murphy *et al.*, 2001). No entanto, as limitações terapêuticas existentes (ex: efeitos colaterais indesejáveis dos fármacos como a toxicidade) existentes obrigam a um uso prudente face à progressão da doença num determinado instante e exigindo, muitas vezes, a suspensão da terapêutica com redução do efeito terapêutico. A partir do HAART conseguiu-se obter um maior controlo da proliferação e da redução da carga viral tanto no sangue periférico como nos nódulos linfáticos até um limite de deteção de 20-50 cópias de genoma viral/ μL (valores detetados por marcadores bioquímicos usados no prognóstico de doentes com risco elevado de evolução da infecção) e um aumento do número de linfócitos T CD4^+ (Arosa *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2001). A recuperação do sistema imune é tanto maior quanto mais cedo se iniciar o tratamento. De forma a contornar as limitações desta terapêutica, o desenvolvimento de fármacos mais seguros e com novos mecanismos de ação (evitando resistências cruzadas) encontra-se em estudo ou em avaliação clínica. Outra estratégia terapêutica é a criação de regimes de interrupção programada de tratamento (IPT) que potenciem o papel do sistema imune no controlo da proliferação viral. Nesta estratégia o fármaco utilizado é suspenso por um período de tempo adequado e estipulado como suficiente para a obtenção de uma ativação eficaz do sistema imune e da indução da reversão para estirpes virais mais sensíveis ao tratamento. No entanto, este demonstrou-se pouco eficaz uma vez que os resultados obtidos não foram significativamente diferentes dos resultados obtidos nos casos controlo (sem interrupção da terapêutica) (Arosa *et al.*, 2007). Em suma, a grande dificuldade de encontrar um tratamento eficaz na infecção por VIH passa por definir epítomos significativos, dada a heterogeneidade do vírus *in vivo* e da composição genética do MHC das células do hospedeiro, que condicionam fortemente a sua resposta.

IV- ALTERAÇÕES NAS CÉLULAS NK PROVOCADAS PELO VIH

1. Efeitos provocados nas células NK durante a infecção por VIH

As células NK são cruciais para a primeira linha de defesa do sistema imunitário contra infecções víricas (Cooper *et al.*, 2001). Os três subconjuntos das células NK podem ser definidos pela sua expressão diferencial de CD56 e CD16. O maior subconjunto

compreende as células citolíticas $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos1}$ (Jacobs *et al.*, 2001). O segundo subconjunto inclui as células imunorreguladoras $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ capazes de segregar grandes quantidades de citocinas e quimiocinas (Coopere *et al.*, 2001). Finalmente, o último subconjunto consiste nas células $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$ recém-descritas (Mavilio *et al.*, 2003; Mavilio *et al.*, 2005). Durante a infeção crónica de VIH-1 a citotóxicidade das células NK assim como a sua produção de citocinas são diminuídas, no entanto, estas deficiências poderão ter início em estados da doença mais precoces (Brunetta *et al.*, 2010). Esta perda da atividade pode estar associada com o aumento “anérgico” dos subconjuntos das células NK que expressam níveis de CD56 relativamente baixos ($CD56^{neg}CD16^{pos}$). Alguns autores propuseram que este subconjunto pode influenciar a população total das células NK (Mavilio *et al.*, 2005). Modelos *in vitro* sugerem que a viremia do vírus pode contribuir para esta deficiência (Kottlilil *et al.*, 2003). Desta forma, a desgranulação das células NK *in vivo* poderá ter início, provavelmente, durante a infeção primária (Alter *et al.*, 2004). Assim, vários autores procuraram avaliar detalhadamente algumas alterações sobre as células NK antes, durante e após a infeção por VIH-1.

i. Efeitos sobre o número total de células NK ativadas na infeção aguda por VIH-1

A infeção pelo VIH tem mostrado provocar alterações levando a uma perda do número das células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ (Mavilio *et al.*, 2003; Azzoni *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 1995; Alter *et al.*, 2004). Recentemente a acumulação das células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ tem sido descrita na fase crónica (Mavilio *et al.*, 2005). Alter e colegas avaliaram as alterações do comportamento das células NK durante as diferentes fases da infeção e no controle de indivíduos não infetados (Alter *et al.*, 2005). Não tendo sido observadas diferenças no total de células NK, incluindo todos os subconjuntos ($CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$; $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$; $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$) onde as células NK foram observadas (grupos de indivíduos com infeção crónica ou em grupos de indivíduos sem infeção – controlos) (Anexo D.1-A). Em contraste, a percentagem total de células NK observada nos pacientes com infeção aguda demonstrou estar significativamente aumentada ($p=0,05$) (Anexo D.1-A).

¹ As células NK foram definidas como células expressoras de $CD3^{neg}CD7$, método adaptado por Milush e colegas (Milush *et al.*, 2009).

Em conjunto, estes dados sugeriram que a população de células NK é em geral expandida durante a infecção aguda, retornando a níveis semelhantes aos observados em indivíduos não infetados e em indivíduos com infecção crónica. Alter e colegas, apontaram ainda que as respostas das células T ocorriam depois das respostas NK e que estas eram inversamente correlacionadas com a magnitude da atividade das células NK durante a infecção primária (Alter *et al.*, 2007). Naranbhai e colegas verificaram, que as proporções das células NK ativadas durante a infecção primária aumentavam significativamente ($p=0,03$) (Anexo C.1-B). Confirmando, que existe uma correlação positiva ($r = 0,68$; $p=0,0001$) (Anexo C.1-C) entre as proporções de células NK ativadas e as células T durante a aquisição de VIH-1, enquanto que no decorrer da infecção estas diminuía progressivamente. Todavia, as proporções ativadas das células NK correlacionaram-se de forma independente da carga viral ($r = 0,35$; $p = 0,02$) (Anexo C.1-F), mas não com as contagens das células T CD4⁺ (Anexo C.1-H). A diferença observada, na frequência dos níveis de células NK durante a infecção primária entre os indivíduos soropositivos, soronegativos e sorodiscordantes não revelou ser significativa, apesar do surgimento de uma fraca tendência numa maior frequência para os indivíduos soronegativos. A variação das frequências dos subconjuntos das células NK não deferiu entre a pré-infecção e a pós-infecção. Em contrapartida, a proporção de células T CD8⁺ aumentou após a infecção por VIH-1 (Naranbhai *et al.*, 2013).

ii. Função das células NK diminui durante a infecção primaria por VIH-1

Para quantificar os efeitos do vírus sobre as células NK, vários estudos foram realizados de forma a avaliar o grau de desgranulação destas e o grau de secreção do IFN- γ em amostras de sangue coletadas antes e depois da infecção, durante as fases iniciais da infecção primária. Para tal, Naranbhai e colegas, submeteram as células NK a três meios de cultura com diferentes estimulações. Assim, após a estimulação, *ex vivo*, no meio contendo IL-2 isolada a proporção de células NK desgranuladas foi elevada durante a infecção primária quando comparada com as proporções anteriores à aquisição da infecção ($p=0,006$) (Anexo C.3-A). Em contraste, a desgranulação como resposta das células NK no meio contendo células 721 (Karre, 2008) foi significativamente reduzida durante a infecção primária ($p=0,002$) (Anexo C.3-A). Do mesmo modo, a estimulação no meio contendo PMA/Ionicina apresentaram a mesma tendência mas sem

importância estatística ($p=0,06$) (Anexo C.3-A). Não houve diferença na proporção de células NK secretoras de IFN- γ no meio *ex vivo* contendo IL-2 isoladamente (Anexo C.3-B). Após estimulação com as células 721, estas apresentaram uma maior tendência de secretarem IFN- γ ($p=0,09$) (Anexo C.3-B). Da mesma forma, a proporção de IFN- γ produzido após estimulação com o meio PMA/Ionicina foi significativamente menor após a infecção ($p=0,03$) (Anexo C.3-B).

iii. A frequência de células NK que expressam marcadores *homing* para os tecidos linfóides encontrou-se aumentada na infecção primária VIH-1

Outro parâmetro de avaliação de Naranbhai e colegas, foi a medição do impacto da aquisição do vírus no tráfico de células NK (Naranbhai *et al.*, 2013). A frequência de células NK que expressam ambos CCR7, que permitem o transporte do vírus para o tecido linfóide (Robertson, 2002), ou integrinas a4 e b7, que permitem o *homing* para o intestino (Rivera-Nieves *et al.*, 2005) foram quantificadas. Demonstrou-se que a frequência de células expressoras de CCR7⁺, após a infecção, aumentou significativamente ($p=0,0001$) (Anexo C.4-A). Para estados mais avançados da infecção aguda, observou-se uma diminuição dos mesmos, não retornando para os valores iniciais. Em contrapartida, a proporção de células NK que expressam tanto as subunidades de integrina a4 e b7 permaneceram inalteradas (Anexo C.4-B).

iv. Alterações nas proporções dos subconjuntos das células NK na infecção por VIH

De modo a caracterizar as cinéticas através das redistribuições que ocorrem no interior do compartimento das células NK, estudos (Alter *et al.*, 2005) tiveram como base indivíduos identificados durante a infecção aguda. Tendo sido observada um aumento de CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos} em indivíduos na fase aguda (Anexo D.1-B), em comparação com os controlos negativos ($p=0,01$). Em contraste, o CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg} foram significativamente menores na infecção aguda em oposição aos controlos negativos. Embora tenha ocorrido um aumento ligeiro da proporção das células CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos} na infecção aguda, esta diferença não foi significativamente menor do que em indivíduos com infecção crónica sem tratamento ($p=0,005$), indicando uma acumulação deste com a exposição prolongada à viremia. O efeito da replicação

viral persistente sobre a composição dos compartimentos das células NK também foi alvo de estudo. Tendo-se verificado uma supressão da replicação de infeções virais abaixo dos níveis de deteção em indivíduos na infeção aguda, que iniciaram o HAART como linha de base. A proporção de $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$, permaneceu reduzida em indivíduos com replicação viral persistente ($p=0,01$) (Anexo D.1-C), tendo aumentado significativamente em indivíduos tratados durante a infeção aguda (Anexo D.1-C). Em contrapartida, a proporção de $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$ aumentou significativamente na infeção aguda nos sujeitos não tratados, não havendo alterações relevantes nos que receberam tratamento. Em conjunto, estes dados demonstraram que a deleção das $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ inicia-se durante a infeção aguda, seguida de uma perda secundária retardada de $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ e de uma acumulação de $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$ persistente no ambiente viral. Em contraste, o início da HAART durante a infeção aguda, demonstrou-se vantajosa resultando numa parcial normalização no interior das células NK (Alter *et al.*, 2005). Para elucidar melhor as propriedades funcionais destes subconjuntos, diferentes capacidades de reconhecer o MHC em células alvo (Anexo D.2-A,B) e responder à estimulação mitogénica na infeção crónica (Anexo D.2-C,D), medindo intracelularmente a produção do IFN- γ e a expressão de CD107a foram avaliadas por Alter e seus colegas (Alter *et al.*, 2004; Alter *et al.*, 2004). Após a estimulação das células com MHC desprovidas de células K562, a expressão e secreção de citocinas CD107a foram apenas reguladas pelos recetores KIR que as células $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ expressam, mas não nas células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ (Anexo D.2-A,B). Em contraste, quando se estimulou as células com PMA/Ionomicina (Anexo D.2-C,D) tanto as células $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ como as células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ responderam à estimulação. Interessantemente, as células $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$ não foram capazes de secretar citocinas ou de expressar CD107a após a estimulação com as células alvo desprovidas de MHC, respondendo apenas a um estímulo muito limitado com PMA/Ionomicina (Anexo D.2-C,D). A comparação dos diferentes grupos demonstrara, que a expressão de CD107a e a secreção de citocinas pelas células $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ após a estimulação com células K562, foram significativamente elevados nos indivíduos infetados com progressão da replicação viral, em comparação com sujeitos infetados com cargas virais indetetáveis, com infeção não progressiva ou nos grupos controlo ($p=0,05$ para todas as comparações) (Anexo D.2-A,B). Assim, foi associado um aumento da expressão de moléculas KIR nas células NK nos indivíduos

com virémia, em comparação com indivíduos que não apresentam virémia (63% versus 34%; $p=0,001$) (Mavilio *et al.*, 2003). Em contraste, a capacidade das células NK responderem ao PMA/Ionomicina foi severamente prejudicada nos indivíduos com infecção crónica progressiva, ao passo que a capacidade de responder a esse estímulo permaneceu intacta nos não progressores ($p=0,001$). Assim, os resultados demonstraram um efeito diferencial persistente da viremia na resposta das células NK, resultando num aumento da capacidade de resposta à estimulação com as células K562 associadas a um aumento da expressão de KIR, mas reduzida capacidade de resposta global pela estimulação com mitogénicos. Desta forma, as alterações na distribuição das células NK tiveram um efeito importante sobre a desgranulação e a atividade funcional destas em diferentes estados da doença. Os indivíduos com doença crónica não progressiva que mantiveram as distribuições dos subconjuntos das células NK normais, também manifestaram respostas funcionais das células NK adequadas à estimulação com PMA/Ionomicina ou com as células K562.

As células NK são reguladas por vários recetores de ativação e de inibição (Pegram *et al.*, 2011). Uma família importante de recetores NK são os recetores KIR (Middleton *et al.*, 2010; Biassoni *et al.*, 2009). Vários KIR inibidores interagem especificamente com o HLA classe I, expresso nas potenciais células alvo (Biassoni *et al.*, 2009). KIR2DL1 reconhece apótipos de HLA-C, com uma lisina na posição 80 (denominado de HLA-C2), KIR2DL2/L3 reconhecem apótipos HLA-C com aspargina na posição 80 (HLA-C1) e KIR3DL1 reconhece apótipos HLA-B contendo o epitopo Bw4 (HLA-Bw4). A interação dos KIR inibitórios com HLA garante tolerância normal das células NK para as células autólogas, e os gatilhos de citotóxicidade das células NK em relação às células de HLA comprometidos (ex: infetadas por vírus) ou com HLA incompatível (ex: por transplante) (Hoglund *et al.*, 2010). Além disso, as interações entre KIR inibitórios/HLA são necessárias para que as células NK amadureçam e ganhem competência funcional ao ser acionado através dos seus recetores de ativação, um processo conhecido como licenciamento ou maturação (Hoglund *et al.*, 2010). Ambos os KIR e o HLA *loci* mostram extrema diversidade entre a população e de evolução rápida, o que sugere que elas estão sob seleção mediada por patógeno e que influenciam o nível de evolução da doença do indivíduo (Parham *et al.*, 2005). De fato, diversos estudos epidemiológicos têm associado genótipos KIR/HLA compostos com a suscetibilidade a doenças infecciosas, condições autoimunes, inflamatórias e cancro (Kulkarni *et al.*,

2008). A genética do hospedeiro pode ter um impacto importante na aquisição do VIH-1 como polimorfismos em CCR5 e HLA (Kaslow *et al.*, 2005). Notavelmente, a discordância do nível do alelo de HLA de classe I entre pares na transmissão pode-se correlacionar com uma diminuição do risco de transmissão sexual ou perianal (MacDonald *et al.*, 1998; Lockett *et al.*, 2001; Polycarpou *et al.*, 2002; Dorak *et al.*, 2004; Mackelprang *et al.*, 2008). As combinações KIR/HLA podem influenciar a taxa de progressão da doença (Martin *et al.*, 2002; Gaudieri *et al.*, 2005; Lopez-Vazquez *et al.*, 2005; Barbour *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007; Jennes *et al.*, 2011; Pelak *et al.*, 2011). Estudos em indivíduos soronegativos expostos ao VIH (HESN) também mostraram um efeito de variação genética de KIR/HLA em suscetibilidade à aquisição de VIH-1 (Jennes *et al.*, 2008; Ravet *et al.*, 2007; Boulet *et al.*, 2008; Guerini *et al.*, 2011; Paximadis *et al.*, 2011; Merino *et al.*, 2011), e vários desses relatórios com KIR/HLA combinados com um perfil de ativação das células NK ser característica de indivíduos HESN (Jennes *et al.*, 2008; Ravet *et al.*, 2007; Boulet *et al.*, 2008; Guerini *et al.*, 2011). Desta forma, os recetores KIR foram também alvos de estudo de diversos autores:

v. Alterações das frequências dos recetores KIR expressos

Após a infecção pelo VIH-1, a expansão da proporção de KIR ativados (KIR⁺) foi significativa, evidente e aparentemente mais elevada em indivíduos soronegativos (não significativo). Antes da infecção, a proporção de células NK KIR⁺ que foram ativadas foi significativamente mais baixa do que as células NK inibidoras (KIR⁻) entre os indivíduos discordantes e soropositivos. Nos soronegativos não atingiu significância estatística (Naranbhai *et al.*, 2013). Foi também analisado, a distribuição de recetores KIR nas células NK durante o curso da infecção por VIH-1 (Pascale *et al.*, 1999). Assim, considerou-se que nos indivíduos normais a expressão em células NK era de, preferencialmente, 20-38% das células expressas com pelo menos uma molécula KIR (Anexo B.1 e B.3). A combinação de KIR expresso nas células NK varia entre indivíduos. No entanto, estes dados foram consistentes com a heterogeneidade dos apótipos KIR que predominantemente resultaram da presença de um ou vários genes KIR ativadores entre indivíduos (Uhrberg *et al.*, 1997; Valiante *et al.*, 1997). Não ocorreram alterações significativas nas percentagens de KIR⁺ em indivíduos infetados.

Em contraste, o número de KIR seguido de um complexo padrão variado, acabou numa diminuição de KIR⁺ no que diz respeito ao *status* clínico. A expressão de KIR em células NK são, portanto, diferencialmente afetadas como consequência direta ou indireta da infecção pelo VIH-1. O número total de células NK diminuiu durante a progressão da infecção e o total número de células NK KIR⁺ correlacionou-se com esta diminuição. De acordo com estes dados, o percentual de células NK KIR⁺ não se alterou significativamente em indivíduos soropositivos.

vi. Expressão de recetores KIR específicos em indivíduos HESN

Estudos anteriores observaram em indivíduos HESN perfis de KIR específicos (Jennes *et al.*, 2008; Boulet *et al.*, 2008; Guerini *et al.*, 2011). Afim confirmar estes resultados, foram comparadas frequências de genes KIR e genótipos KIR entre parceiros HESN. Exibindo significativamente, maiores frequências de KIR2DL2 e KIR2DS2 e uma frequência significativamente menor de KIR2DL3 nos controlos infetados (Anexo B.1-A,B). KIR2DL2 e KIR2DL3, alelos do mesmo *locus* do gene, foram característicos do grupo B centromérico e grupo A de apótipos, respetivamente (Yawata *et al.*, 2002; Cooley *et al.*, 2010). Nos indivíduos HESN, foram mais frequentes os homozigóticos KIR2DL2 e menos frequentes os homozigóticos KIR2DL3, em comparação com os controlos infetados, e consistentemente com maior frequência de KIR com centromérica BB e frequências mais baixas dos genótipos KIR AA entre os sujeitos HESN do que nos controlos infetados (Anexo B.1-C).

vii. Frequência de expressão de recetores KIR na ausência de HLA-C1, em indivíduos HESN

KIR2DL2 e o KIR2DL3 regulam a função das células NK de uma forma dependente de HLA-C. Por isso, Jennes e colegas investigaram se as diferenças observadas nas frequências de KIR2DL2/KIR2DL3 entre os grupos de indivíduos eram influenciadas pelo transporte simultâneo de cognato de alelos HLA-C. Por conta própria, não houve diferenças nas frequências alelicas de C1 e C2 entre os grupos em estudo (dados não mostrados). A maior frequência do homozigótico KIR2DL3 entre os controlos não infetados ocorreram preferencialmente com o conjunto C1 ou C2 (dados não

mostrados). No entanto, a maior frequência de homozigóticos KIR2DL2 entre sujeitos HESN pareceu ser estatisticamente significativa apenas na ausência de C1. Não foram encontradas diferenças nas frequências de Bw4-80I ou Bw4-80T, isoladamente ou em combinação com KIR2DS1 ou KIR3DL1, entre os três grupos (dados não mostrados) (Jennes *et al.*, 2013).

viii. Combinações KIR/HLA em casais VIH-1 discordantes e concordantes

A transmissão ocorre, em parte, através da entrada do VIH nas células infetadas (vírus associado às células) presentes nas secreções genitais (Anderson *et al.*, 2010; Salle *et al.*, 2010), que podem ser eficientemente orientadas por respostas dos alogénicos das células NK. Assim, Jennes e colegas, apresentaram a hipótese, de que tais respostas são dependentes do nível de incompatibilidade dos alogénicos KIR/HLA entre parceiros sexuais, semelhante ao que é observado em apótipos hematopoiéticos idênticos no transplante de células estaminais, com auto-falta de HLA ou de KIR combinado, ou de combinações de HLA que determinam se as células NK são ativadas ou não (Moretta *et al.*, 2011). Para testar esta hipótese, Jennes e colegas, compararam as frequências das auto-faltas e das combinações de KIR/HLA entre parceiros discordantes e concordantes (Anexo B.2). Tendo-se descoberto que os pares discordantes foram caracterizados por um parceiro destinatário KIR2DL1/HLA-C2 com índice de parceiro HLA-C1/ C1 combinado, permitindo o escape à lise pelas células NK licenciadas com auto-índice através de KIR2DL1. Os casais concordantes, por outro lado, foram caracterizados por KIR2DL3 junto com o parceiro destinatário homozigótico com HLA-C1/C2 combinado, entre parceiros, resultando numa combinação KIR/HLA que inibiu a lise pelas células NK através KIR2DL3 (e KIR2DL1 que estava presente na maioria dos indivíduos da população em estudo). A maior frequência de homozigóticos KIR2DL2, entre parceiros HESN destinatários dos casais não discordantes, foi significativa e correlacionou-se com o índice do genótipo específico HLA-C do parceiro. Não foram encontradas diferenças nas combinações alogénicas de KIR3DS1 ou KIR3DL1 com HLA-Bw4 entre os casais VIH-discordantes e concordantes (dados não mostrados).

ix. Avaliação das combinações KIR/HLA

Jennes e colegas, investigaram ainda se as combinações KIR/HLA identificadas independentemente se correlacionavam com o *status* dos casais concordantes e discordantes, por utilização de regressão multivariada (Anexo B.3) (Jennes *et al.*, 2013). Todos os modelos, foram controlados para o índice do parceiro sexual, que foi significativamente diferente entre casais concordantes e discordantes. A auto-falta do KIR2DL1/HLA-C2 com a combinação HLA-C1/C1 e os homozigóticos combinados KIR2DL3 com HLA-C1/C2 combinados de forma independente previu o estado casal, a sua junção resultou num modelo melhor (Anexo B.3-Modelo 3). Destinatário homozigótico KIR2DL3 e em grande medida também o homozigótico com o recetor KIR2DL2 não independente contribuiu, também, para estados pares (Anexo B.3-Modelo 1,2). Sugerindo, que no contexto de uma relação heterossexual estável, o genótipo KIR recetor não influencia de forma independente a aquisição do VIH-1, mas depende do índice do genótipo de HLA do parceiro.

x. Estudo da capacidade de células NK lisarem células T CD4⁺ por combinação de KIR/HLA

Finalmente, diversos autores estudaram se as combinações de KIR/HLA observadas se correlacionavam, *in vitro*, com a lise das células T CD4⁺ pelas células NK (Jennes *et al.*, 2013). As células NK derivadas do sangue saudável foram cultivadas num meio contendo IL-2 e posteriormente co-cultivadas com células T CD4⁺ derivadas de indivíduos com VIH-1 (Anexo B.4, B.5). Os níveis de morte das células T CD4⁺ foram avaliados por citometria de fluxo. Onde todos os dadores de sangue apresentavam altos níveis de lise das células K562 pelas células NK, que foram adicionadas como controlo positivo (dados não mostrados). Os níveis de lise das células T CD4⁺ variaram amplamente entre os pares dador/paciente, mas não se correlacionaram com a carga viral ou com o estado da terapia (Anexo B.4). Dos 12 pares de dador/pacientes testados, 7 foram caracterizados com uma auto-falta na combinação de KIR/HLA licenciados (um dos quais tinha o dador exato com KIR2DL1/HLA-C2 e o paciente com uma combinação de HLA-C1/C1 que é característica dos casais discordantes); apresentando maiores níveis de células T CD4⁺ que sofreram lise (Anexo B.4, B.5). Cinco pares de dadores/pacientes apresentaram uma auto-falta de combinações KIR/HLA (3 dos quais tinha KIR2DL3 homozigóticos com HLA-C1/C2 combinação que é característica dos

casais concordantes) e apresentaram menores níveis de lise das células T CD4⁺ (Anexo B.4, B.5). A combinação KIR3DS1/HLA-Bw4, anteriormente associada à proteção contra o VIH-1 e contra a progressão da doença por inibição *in vitro* da replicação do vírus (Martin *et al.*, 2002; Pelak *et al.*, 2011; Alter *et al.*, 2007), foi contrariada por Jennes e colegas, uma vez que manifestou níveis elevados de células T CD4⁺ que sofreram lise (Anexo B.4, B.5). A posse de um genótipo KIR BB centromérico (isto é, homozigótico KIR2DL2) não se associou com os níveis aumentados da lise celular mediada pelas células NK.

Os recetores NK humanos para moléculas do MHC classe I pertencem a famílias multigénicas e multialélicas de moléculas *Ig-like* (ex: KIR) e de lectinas tipo C (ex: heterodímero CD94/NKG2) (Moretta *et al.*, 1997; Lanier, 1998; Long *et al.*, 1997). Desta forma, Pascale e colegas investigaram alterações sobre a expressão de um tipo de recetores de lectinas tipo C em comparação com os recetores KIR (Pascale *et al.*, 1999):

xi. Alteração da expressão de CD94 nas células NK durante o curso da infecção por VIH-1

Semelhante a KIR, os dímeros CD94/NKG2 foram considerados preferencialmente expressos em linfócitos NK. Nos indivíduos não infetados, aproximadamente 79% e 41% das células NK expressa CD94 e NKG2 respetivamente (Anexo A). Em contraste com as células NK KIR⁺, o percentual de células NK CD94⁺ e as percentagens das células NK NKG2⁺ aumentaram com a progressão dos sinais da infecção (Anexo A.2). Pascale e colegas observaram, ainda, que as células isoladas a partir de indivíduos com deficiência em HLA classe I (em indivíduos negativos para o transportador associado com a apresentação de antígeno – TAP), apresentavam um repertório diversificado de KIR normal, mas complexos de CD94/NKG2A super-expressos (Zimmer *et al.*, 1998). Apontando que, em contraste com a KIR, o nível de expressão de recetores *lectina-like* de MHC classe I se adaptavam ao ambiente do HLA classe I. Do mesmo modo, a expressão de KIR foi regulada geneticamente, sendo estável em indivíduos normais (Gumperz *et al.*, 1996). Por outro lado, a exportação intracitoplasmática superficial de heterodímeros CD94/NKG2 foi induzida por citocinas no desenvolvimento e maturidade das células linfóides, e após curto prazo na cultura *in vitro* na presença de

IL-15 (Mingari *et al.*, 1998). Revelou-se também, que a distribuição de KIR em células NK não foram afetadas pela infecção, enquanto a percentagem de células NK CD94⁺ e de células NK NKG2A⁺ aumentaram com a progressão da infecção. Confirmando, como já referido anteriormente, que as expressões de KIR e de NKG de lectina C são regulados através de vias distintas.

2. Casos-estudo de indivíduos resistentes à infecção por VIH

Para avaliar o papel das células NK na resistência contra o VIH-1, foram citados dois casos estudo de sucesso. No primeiro caso, os autores estudaram a função das células NK num grupo de usuários de drogas intravasculares soronegativos altamente expostos (UDI EU), no Ho Chi Minh City, Vietname (Follezou *et al.*, 1999). A escolha deste grupo de estudo pelos autores, baseou-se em diversos fatores, tais como, injeções de agulhas compartilhadas e várias infecções virais encontradas nos vietnamitas UDI EU (Follezou *et al.*, 1999); que favoreceram a ativação do sistema imune podendo resultar em melhorias das defesas inatas, incluindo as respostas das células NK, que por sua vez, podem interferir com a transmissão do VIH. Encontrou-se citotóxicidade das células NK e as atividades secretoras em UDI EU, em doadores de sangue não expostos e UDI EU que eventualmente sofreram soroconversão. No segundo caso, os autores relataram o caso peculiar de um paciente hemofílico co-infetado por VIH-1 e vírus da hepatite C (HCV), que por sua vez, desenvolveu respostas imunológicas incomuns.

i. CASO DE ESTUDO I

O primeiro caso de estudo baseia-se numa interpretação de um estudo coorte efetuado por Scott-Algara e colegas, que investigaram as alterações da atividade das células NK numa população vietnamita de especial interesse. Uma vez que, os indivíduos selecionados pertenciam a um grupo de usuários de droga por via intracelular, altamente expostos ao VIH (Figura.7).

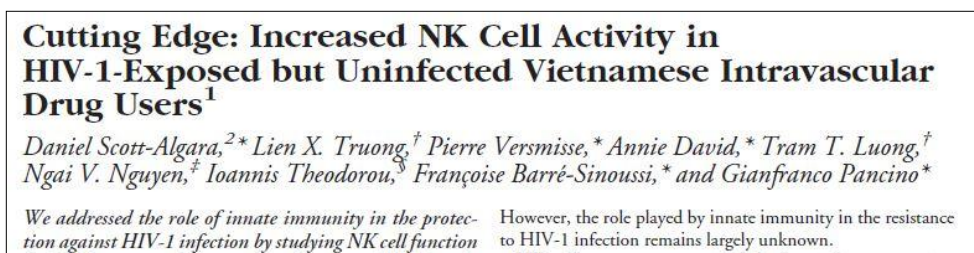


Figura.7-Caso estudo I (Adaptado de Scott-Algara *et al.*, 2003).

A. População em estudo

Foram selecionados 37 indivíduos de alto risco de exposição ao VIH-1, recrutados a partir de uma população identificada como soronegativa entre 1996 e 1998. Entre os UDI EU tratados no Centro de Desintoxicação Trieu Binh, em Ho Chi Minh City (Follezou *et al.*, 1999). Todos os participantes foram acompanhados entre 3 a 5 anos no Hospital Trieu Binh. Durante as visitas de acompanhamento, os indivíduos foram submetidos a um exame clínico (recolha de amostra de sangue), onde os resultados, por ELISA e PCR em ADN de PBMC foram negativos para o VIH-1 (Truong *et al.*, 2003). Cada participante teve ainda direito a consultas de aconselhamento para a redução do risco, bem como consultas de psicologia e assistência médica. Embora a maioria ter parado, eventualmente, a partilha de agulhas ao longo do tempo, outros continuaram com comportamentos de risco, apesar do aconselhamento prestado, como a partilha de agulhas e/ou frequentar locais públicos de usuários de drogas injetáveis (galerias de tiro), durante os primeiros anos após o recrutamento (1 a 3 anos). Dez dos UDI EU submeteram-se, voluntariamente, à soroconversão. As amostras de PBMC destes foram coletadas entre seis a dezoito meses antes da soroconversão. Por fim, foram recrutados 28 indivíduos saudáveis do Banco do Dador de Sangue, em Ho Chi Minh City, como grupo controlo (Tabela.5).

Tabela.5- Características da população em estudo (adaptado de Scott-Algara *et al.*).

Nº	Grupo	Género ^c	Idade (anos) ^a	Uso de drogas (anos) ^b	Injeções/dia (range)	Partilha seringas/Galerias tiro (%)
37	EU IDU	M-34; F-3	46±5,4	24,6 (13-31)	3,3 (1-4)	100
10	Soroconversores ^e	M-8; F-2	47±4,4	25,3 (12-35)	2,9 (1-4)	100
28	Controlos	M-26; F-2	40±7,7	-	-	-

Sorologia						
Nº	Grupo	HBV ^c (%)	HCV ^c (%)	HTLV ^d (%)	Células T CD4/ mm ³ ^a	Células T CD8/ mm ³ ^a
37	IDU EU	89	100	81	720,7±282,8	704,9±240,2
10	Soroconversores ^e	80	100	50	734,5±284,6	937,9±540,2
28	Controlos	0	0	0	ND ^c	ND ^c

^a Média ± Desvio Padrão (SD); ^b Os dados sobre a duração dos UDI estavam disponíveis para 35 UDI UE e 7 soroconversores. Foram calculadas as médias e os intervalos. Para os restantes 2 IDU EU e 3 soroconversores, a duração de mais de 15 anos foi estimada com base na história do indivíduo. ^c Vírus da hepatite B (HBV); vírus da hepatite C (HCV); masculino (M); feminino (F); não feito (ND). ^d Não foram observadas diferenças entre os IDU EU e soroconversores, exceto na soroprevalência ($p= 0,047$) da exposição ao vírus da leucemia T (HTLV). ^e Antes da soroconversão.

B. Células Alvo utilizadas

As células alvo para os ensaios de citotoxicidade utilizadas foram as K562, uma linhagem de células eritroleucemicas, e as células Daudi, uma linhagem de células B derivadas do linfoma de Burkitt. Utilizou-se também, para os ensaios de citotoxicidade e de ADCC, células T CD4⁺ não infetadas ou infetadas pelo VIH-1 alogénico PHA-ativado, isoladas a partir do PBMC de um dador vietnamita.

C. Ensaio de citotoxicidade das células NK

Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos utilizando um método padrão de libertação de ^{51}Cr (Scott-Algara *et al.*, 1992). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A percentagem da citotoxicidade foi calculada através da equação: $^2[(\text{cpm}_{\text{experimental}} - \text{cpm}_{\text{espontâneo}}) / (\text{cpm}_{\text{máximo}} - \text{cpm}_{\text{espontâneo}})] \times 100$. A libertação espontânea do ^{51}Cr foi tomada apenas como radioatividade do sobrenadante das células alvo, considerando que a libertação máxima foi feita como radioatividade após a lise das células alvo com HCl. Foi também calculado o número de células efetoras por milhão de PBMC ou o número de células NK necessárias para atingir 30% da lise do líquido (30 unidades líticas ou UL_{30}), onde a lise líquida é igual a $(\text{cpm}_{\text{experimental}} - \text{cpm}_{\text{espontâneo}})$.

D. ADCC

Os ensaios foram realizados utilizando células T CD4^+ infetas com VIH-1 ou alogénicos de células T CD4^+ não infetadas como células alvo e PBMC como células efetoras na presença de plasma autólogo em duas diluições diferentes (1:10 e 1:100). A lise das células alvo foi medida por um método padronizado de libertação de ^{51}Cr .

E. Método de análise da produção de citocinas e Análise estatística

O método utilizado foi a análise de citometria de fluxo da produção de citocinas pelas células NK.

As análises estatísticas foram realizadas através do *Student's t test*, *Fisher's exact test* e o não paramétrico *Mann-Whitney U test*. O nível de significância de cada teste foi ajustado para o teste múltiplo utilizando a correção de *Bonferroni*. O limiar de significância foi de $p < 0,017$, uma vez que o estudo apenas dispôs de três comparações para cada teste.

F. Conclusões observadas no estudo realizado por Scott-Algara e colegas

² Contagens por minuto (cpm).

Atividade citotóxica das células NK foi maior em IDU EU do que nos controlos ou nos soroconversores

A investigação de Scott-Algara e colegas demonstrou que a atividade citolítica das células NK é maior nos UDI EU do que nos indivíduos saudáveis não expostos (controlos) ou nos UDI EU que, eventualmente, se soroconverteram.

Tabela.6- Resultados da atividade citolítica das células NK.

Grupo	Percentagem de células NK entre PBMC (%)		Células NK vs K562 (razão E:T) ¹	Células NK vs Daudi (razão E:T) ¹
UDI EU	17,5±8,4		50:1 ($p<0,001$)	50:1 ($p<0,01$)
Soroconversores	Antes da soroconversão	Depois da soroconversão		
	18,2±10,8	14,8±9,4		
Controlos	23,5±5,6		25:1 ($p<0,01$)	

¹ Razão entre células efectoras (E) e células alvo (T).

A percentagem de células NK entre PBMC não diferiu entre UDI EU e os controlos ($p=0,2$) (Tabela.6). A percentagem das células NK foram também semelhantes entre os UDI EU e os soroconversores tanto antes como depois da soroconversão (Tabela.6). A atividade lítica das células NK contra a linha de células K562 foi significativamente superior nos UDI EU do que nos grupos controlo (Tabela.7 e Figura.8). A atividade citolítica das células NK expressa em unidades líticas por PBMC ou por células NK foi confirmada com a diferença entre os UDI EU e os grupos controlo (Tabela.8). A atividade lítica das células NK foi também maior nos UDI EU do que nos grupos controlo, quando as células resistentes de Daudi foram utilizadas como alvo (Tabela.6, Figura.8). Na atividade das células NK contra as células T CD4⁺ alogénicas infetadas com VIH-1, que foram detetadas em células PBMC dos UDI EU ou dos controlos não atingiram significância estatística (resultados não mostrados). No entanto, não se pode excluir o papel citotóxico das células NK desempenhado *in vivo*.

Tabela.7 Atividade citolítica das células NK contra as células K562.

Atividade Citolítica		
Unidades líticas vs PBMC	11,21 vs 1,45 UL ₃₀	p<0,001/PBMC
Unidades líticas vs células NK	69,77 vs 6,93 UL ₃₀	p<0,001/ células NK

Tabela.8- Atividade citolítica das células NK sobre as células PBMC, como células efetoras e alogénicos das células CD4⁺ infetadas ou não infetadas como células alvo.

% De células lisadas num plasma com diluição de 1:10	
Célula efetora (PBMC) vs célula alvo (T CD4⁺ infetas)	2,89±3,46%
Célula efetora (PBMC) vs célula alvo (T CD4⁺ não infetas)	1,35±2,96%

Se as células NK desempenham um papel importante na resistência natural contra o VIH nos UDI EU, então indivíduos que se submetam à soroconversão podem não exibir atividades elevadas das células NK semelhantes à infecção. Para testar esta hipótese, Scott-Algara e colegas, estudaram 10 UDI EU que se submeteram a soroconversão durante o estudo. Antes da soroconversão, a atividade citotóxica das células NK contra as células K562 foi comparável à observada nos controlos e menor do que em UDI EU ($p < 0,001$ com razão E:T de 50:1 – Figura.8). Depois da soroconversão, os níveis de atividade citolítica das células NK foram ainda menores (Figura.8). Tanto antes como depois, os soroconversores, demonstraram pouca ou nenhuma atividade citolítica contra a linhagem de células Daudi, em semelhança aos controlos (Figura.8). Para analisar ADCC na população em estudo, foi testada a capacidade de PBMC em UDI EU (n=27) e nos controlos (n=15) para lisar os alogénicos das células T CD4⁺ infetadas ou não com VIH na presença de plasma autólogo. Nenhum ADCC foi observado quando PBMC dos controlos foi usado como células efetoras (Tabela.8) Contudo, o ADCC contra alogénicos das células T CD4⁺ foi observado em 3 dos 27 UDI EU testados. Percentagens similares dos alogénicos das células T CD4⁺ infetadas e não infetadas sofreram lise pelas PBMC em 2 dos 3 indivíduos (13,5% e 13,6% nas não infetadas e 11,2% e 14,7% das infetadas, respetivamente). Esta atividade pode dever-se à presença de aloanticorpos provocada por estimulação alogénica nestes indivíduos. Por último, as

células infetadas foram lisadas, mas não as células não infetadas (2,7% nos não infetados e 7,9% nos infetados foram lisados numa diluição de 1:10 do plasma, respetivamente). Ou seja, foi observada ADCC específica para o VIH em UDI EU, contudo os anticorpos específicos para o VIH-1 não foram detetados por ELISA, testes realizados a cada ano durante um período de quatro anos seguidos (resultados não mostrados). Assim, não foi claro, se o ADCC nestes indivíduos foi devido aos anticorpos com reatividade cruzada para o VIH-1 que não foram detetados por ELISA ou se deveu-se a anticorpos dirigidos contra epítomos expressos nas células infetadas. Embora tenha sido difícil avaliar a relevância do ADCC na proteção contra o VIH-1 sobre os dados observados, a sua presença em alguns UDI EU foi interessante, apontando para a necessidade de estudos mais profundos.

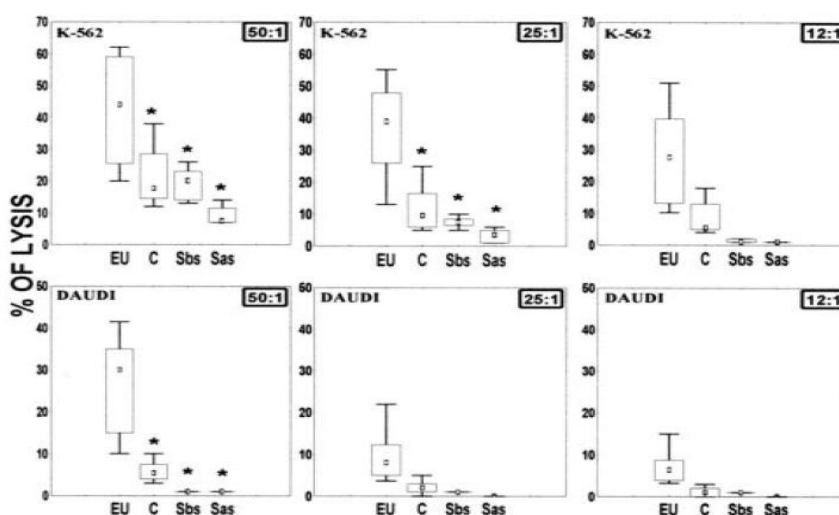


Imagem.8- Comparação da atividade citolítica das células NK em PBMC nos Controlos (C), UDI EU (EU) e soroconversores (Sbs – antes da soroconversão; Sas – depois da soroconversão), que foram incubadas em meios com linhas celulares de K562 (em cima) ou Daudi (em baixo), indicando as razões E:T das células. Cada caixa do diagrama de bigodes mostra a mediana e os percentis de distribuição das percentagens de lise específica. *Diferenças significativas entre UDI EU e cada um dos outros grupos ($p < 0,0017$) (adaptado de Scott-Algara *et al.*, 2003).

A secreção pelas células NK de citocinas e quimiocinas foi superior nos UDI EU

Tanto o IFN- γ como o TNF- α modulam a infecção pelo VIH-1, *in vitro*, podendo suprimir a replicação viral em certas condições (Koyanagi *et al.*, 1988). As β quimiocinas inibem a infecção por VIH-1, por competição e/ou por redução da expressão de co-recetores de superfície como o CCR5 (Cocchi *et al.*, 1995). Desta forma, foi

avaliada a produção de IFN- γ , TNF- α e β quimiocinas (CCL3, CCL4, CCL5) por coloração intracelular das células NK, *in vitro*. Os resultados de cada citocina e quimiocina estudadas foram expressas como percentagem de citocina de cada célula manchada por total de células NK (Figura.9). Na ausência da estimulação de células K562, as proporções de células NK manchadas tanto nos controlos como antes e depois da soroconversão foram baixas ou em níveis de fundo para todas as citocinas e quimiocinas (Figura.9, esquerda). Em contraste, maiores proporções das células NK coradas nos UDI EU foram positivas para todas as citocinas e quimiocinas (Figura.9, esquerda). Após estimulação das células K562, mais citocinas/quimiocinas expressas pelas células NK foram positivas em UDI EU do que nos controlos. A significância estatística ($p < 0,007$) foi somente atingida para CCL3 e CCL5, devido à dispersão dos valores (Figura.9, direita). Em comparação com soroconversão (tanto antes como após a soroconversão), UDI EU obtiveram mais células NK significativamente manchadas por todas as citocinas e β quimiocinas após a estimulação com as células K562 (Figura.9, direita). Amostras de sangue de UDI EU, foram obtidas quando os participantes ainda praticavam comportamentos de alto risco, com exceção de oito indivíduos que relataram mudanças comportamentais, reduzindo o risco no momento da colheita de sangue. As atividades líticas e/ou secretoras das células NK não diferiram tanto entre estes oito indivíduos como nos outros UDI EU testados (dados não mostrados). Notavelmente, tanto a atividade citolítica das células NK contra as células resistentes de Daudi e a atividade secretora das células NK na ausência da ativação, *in vitro*, também foram superiores nos UDI EU do que nos controlos e soroconversores (dados não mostrados). Sugerindo, que a atividade das células NK *in vivo* também pode ser aumentada nos UDI EU. O aumento da produção de citocinas e quimiocinas pelas células NK ativadas em UDI EU poderá desempenhar um papel no processo de defesa contra o VIH-1. Finalmente, avaliou-se os anticorpos HTLV, uma vez que foram detetados mais frequentemente nos UDI EU do que nos soroconvertidos (Tabela.7). As atividades citotóxicas e secretoras das células NK foram estratificadas de acordo com o *status* do HTLV, não tendo se observado nenhuma associação em qualquer variável (dados não mostrados).

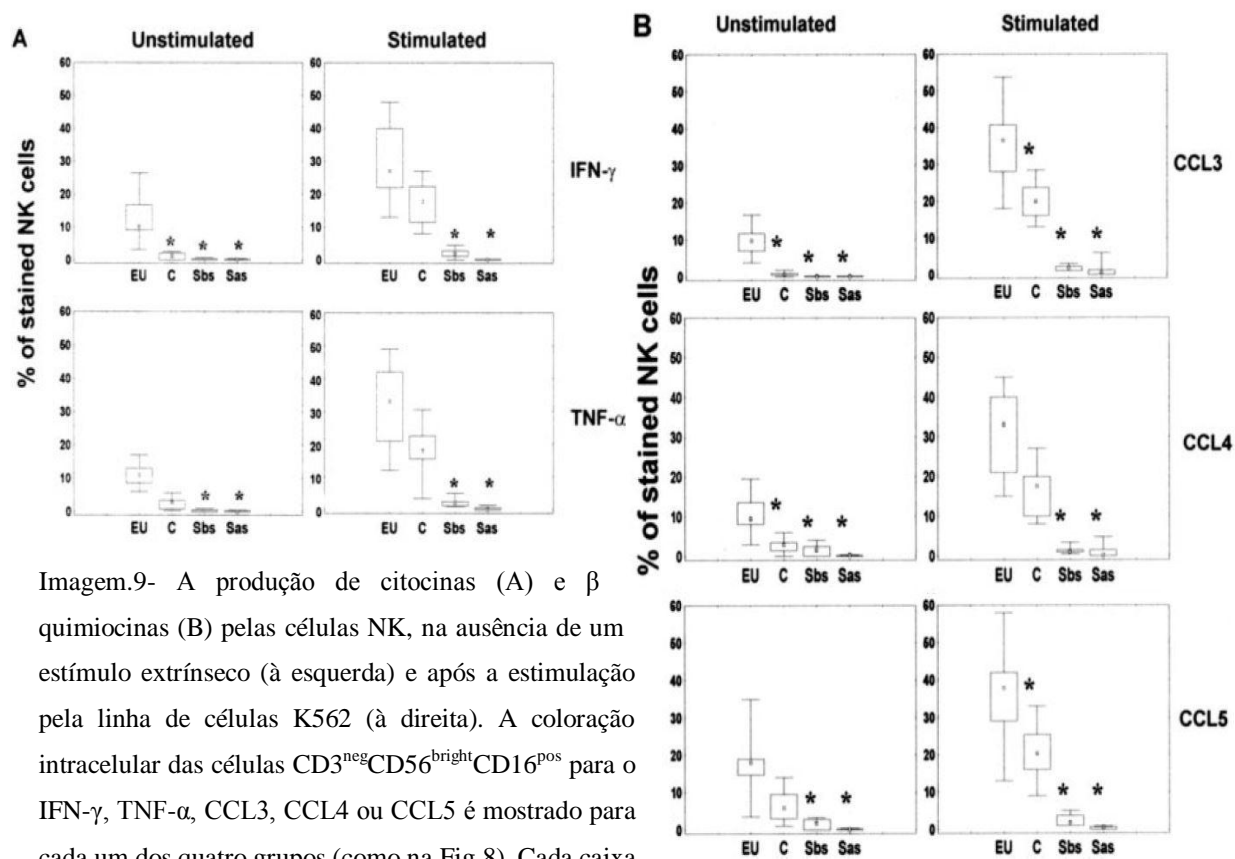


Imagem.9- A produção de citocinas (A) e β quimiocinas (B) pelas células NK, na ausência de um estímulo extrínseco (à esquerda) e após a estimulação pela linha de células K562 (à direita). A coloração intracelular das células CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{pos} para o IFN- γ , TNF- α , CCL3, CCL4 ou CCL5 é mostrado para cada um dos quatro grupos (como na Fig.8). Cada caixa do diagrama de bigodes mostra a distribuição mediana e os percentis das células NK que expressam citocinas detetáveis. *Diferenças significativas entre UDI EU e cada um dos outros grupos ($p < 0,0017$) (adaptado de Scott-Algara et al., 2003).

Em suma, os resultados da investigação de Scott-Algara e seus colegas sugeriram que o aumento da atividade das células NK pode contribuir para a resistência contra a infecção por VIH-1 em vietnamitas UDI EU. O número e a proporção de células NK foram semelhantes em todos os grupos do estudo, apontando que as diferenças nas atividades das células NK estavam relacionadas a uma atividade funcional que se encontrava aumentada nos UDI EU, quando comparada tanto com os controlos como com os soroconversores, em vez de se verificar uma ampliação da atividade das células NK. Assim, em vietnamitas UDI EU, o sistema imunológico pode ser ativado devido às múltiplas infeções que acontecem nessa população (Follezou *et al.*, 1999). A exposição ao vírus estimula a atividade das células NK *in vivo* e em *in vitro* (Dokun *et al.*, 2001). Além disso, a estimulação alogénica após a injeção de alogénicos de células durante a partilha de agulhas também pode ativar as células NK. É possível que a estimulação alogénica forneça alguma proteção contra a infecção por VIH-1, possivelmente por induzir a produção de fatores inibitórios específicos para o VIH-1 (Wang *et al.*, 1999). No entanto, embora os UDI EU e soroconversores apresentem semelhantes hábitos na

forma como usavam as drogas, os soroconversores exibiram menor atividade citolítica das células NK e de secreção antes da soroconversão do que os consumidores UDI EU que injetam a droga. Portanto, os resultados relevaram uma associação entre as células NK e a resistência à infecção. Em UDI EU, a atividade NK pode ser afetada de diferentes parâmetros ambientais. Uma diminuição da atividade das células NK tem sido associada com a utilização parentérica de heroína (Novick *et al.*, 1989). UDI EU podem apresentar um fundo genético que favorece a ativação das células NK através da expressão de um determinado padrão de células NK ativadoras ou de recetores inibitórios dos seus ligandos (Moretta *et al.*, 2002).

ii. CASO DE ESTUDO II

Recentemente, tem-se prestado especial atenção sobre os indivíduos hemofílicos, uma vez que estes têm vindo a apresentar um maior risco de infeções transmitidas por vírus através do sangue. Medidas drásticas, têm sido tomadas para controlar as transfusões em hemoderivados. Fregni e colegas acompanharam, a longo prazo, um caso peculiar de um paciente hemofílico assintomático co-infetado tanto por VIH-1 como pelo vírus da hepatite C (VHC), desde a infância, que desenvolveu respostas imunes incomuns (Figura.10). Aproximadamente 15 a 30% dos indivíduos infetados com VIH-1 apresentam co-infeção pelo VCH, sendo este a causa mais comum de doença hepática crónica e a principal causa de morte em hemofílicos (Rangi *et al.*, 2011).



Imagem.10- Adaptado de Fregni *et al.*, 2013.

A. População em estudo

Hemofílico moderado do sexo masculino com 38 anos de idade, diagnosticado com co-infeção por VIH (subtipo B, CCR5⁺), em 1988, e HCV (subtipo 4), em 1998. Ambas as infeções foram transmitidas por uma transfusão de sangue recebida, em 1982, durante

uma cirurgia de quadril para uma fratura. A partir de 1989, recebeu diferentes linhas de tratamento anti-retroviral (ART), e, em seguida, de HAART com reduzida adesão à terapia, interrompendo voluntariamente até 2008 e desde então retornado a terapia cumprindo-a corretamente. Foi conseqüentemente identificada uma mutação 215S na transcriptase reversa do VIH, que induziu resistência à Azidotimidina. A infecção por VHC nunca foi tratada. Além disso, a sua avaliação hepática como observada com a L-aspartato aminotransferase (AST), a L-alanina aminotransferase (ALT) e marcadores gama-glutamil (γ GT) não foi muito perturbada (Figura.11).

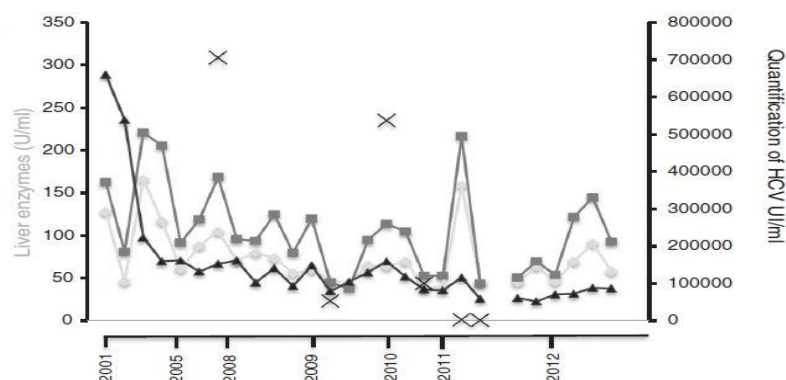


Imagem.11- Determinação da função hepática através de ensaios a enzimas do fígado ao longo do tempo [AST (U/L) - círculos cinza; ALAT (U/L) – quadrados cinza; γ GT (U/L) – triângulos pretos] e a carga viral de VHC ao longo do tempo (número VHC UI/mL) - cruces pretas (Adaptado de Fregni *et al.*, 2013).

Em 1996, o paciente recebeu uma prótese para o olho esquerdo, após um acidente de paintball e em 2011 um quadril de substituição para a osteonecrose conhecida desde 1982. Nenhuma das cirurgias revelou efeitos colaterais infecciosos.

B. Conclusões observadas por Fregni e colegas

Avaliação da contagem de células T CD4⁺ e carga viral

Ao longo dos 30 anos de acompanhamento, o paciente não manifestou infecções oportunistas ou cancro relacionados com o VIH ou com o VHC, apesar dos números dos linfócitos T terem-se mantido extremamente baixos. Em 1989, realizaram-se as primeiras contagens de células T CD4⁺ com 196/mm³. A partir de 1995, as contagens

permaneceram entre 5 e 59/mm³ (Figura.12). As cargas virais do VIH foram praticamente indetetáveis (abaixo de 40cópias/ml) ou muito baixas (correspondente com as interrupções deliberadas de HAART) desde 2008 (Figura.12).

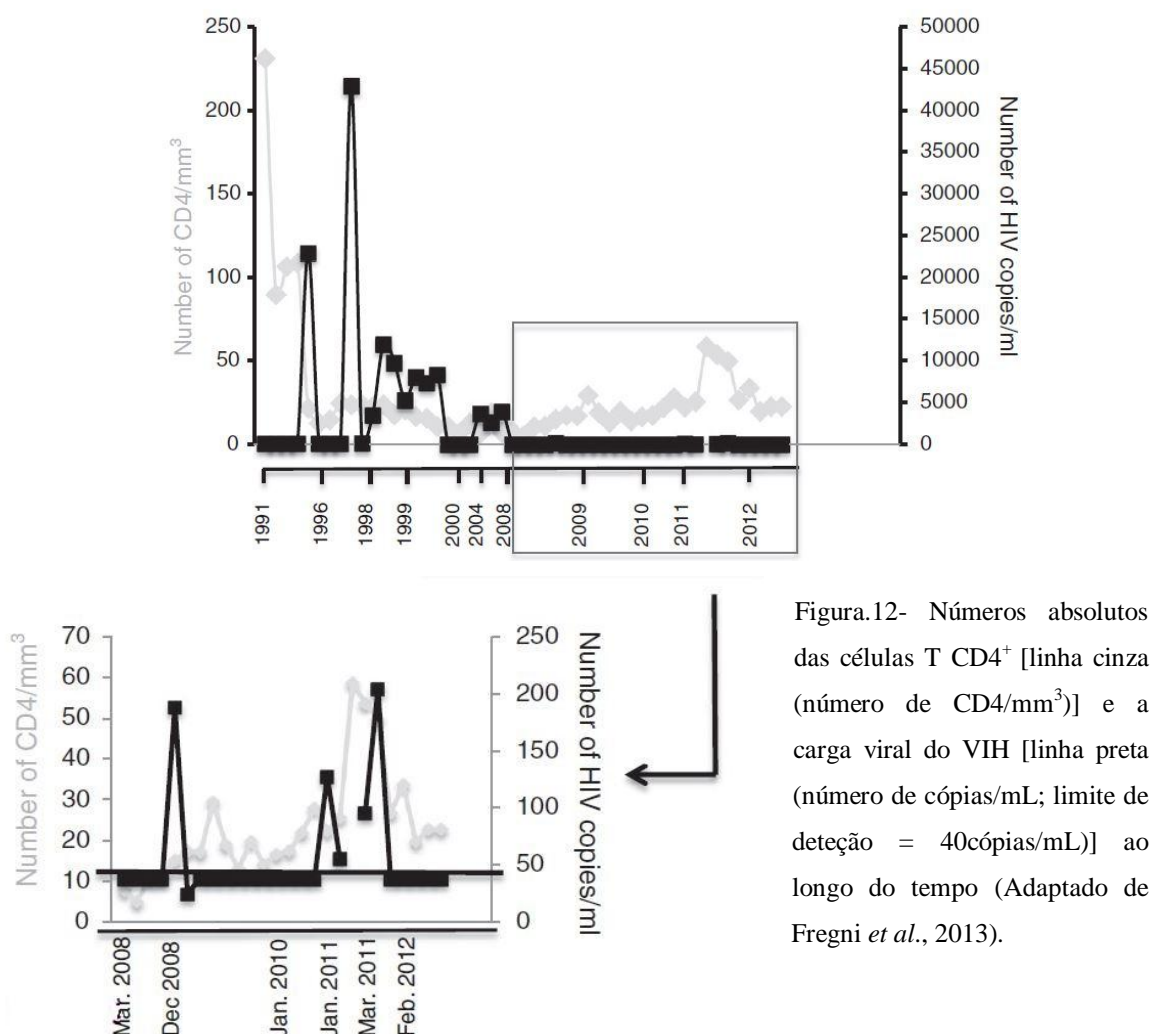


Figura.12- Números absolutos das células T CD4⁺ [linha cinza (número de CD4/mm³)] e a carga viral do VIH [linha preta (número de cópias/mL; limite de deteção = 40cópias/mL)] ao longo do tempo (Adaptado de Fregni *et al.*, 2013).

Avaliação das proporções dos subconjuntos das células NK e da expressão de recetores citotóxicos naturais

A alteração das proporções dos subconjuntos CD3^{neg}CD56^{bright}/ CD3^{neg}CD56^{dim} acompanhada com níveis de carga viral praticamente indetetáveis, na infecção por VIH assintomática ou com baixa contagem de células T CD4⁺, têm vindo a ser relatadas por vários autores (Alter *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2005). Ironson e colegas, descreveram um grupo raro de indivíduos assintomáticos infetados por VIH que apresentavam níveis muito baixos de células T CD4⁺ (Ironson *et al.*, 2001). Estes pacientes expunham de

maiores números de células NK com maior poder citotóxico, em comparação com os indivíduos que apresentavam contagens superiores de células T CD4⁺ e dos níveis de carga viral (Ironson *et al.*, 2001). Assim, durante os últimos dois anos do estudo, foram explorados por citometria de fluxo multi-parâmetro o estado imunofenotípico e funcional (Alter *et al.*, 2004) das células CD3^{neg}CD56^{bright} (Figura.13, A;B;C;D). Admiravelmente, foi observada uma percentagem anormalmente elevada de células NK, representando aproximadamente 40% dos linfócitos da periferia, tendo sido caracterizadas por uma expansão do subconjunto das células CD3^{neg}CD56^{bright} (aproximadamente 30-50% das células NK) (Figura.13, A;B). A percentagem de células CD3^{neg}CD56^{bright} pareceu aumentar quando os números das células T CD4⁺ diminuam. Para além disso, a carga viral do VIH encontrava-se inferior a 40cópias/ml (Figura.13, B). Estas células manifestaram altos níveis de expressão de recetores com citotoxicidade natural: NCR1 (NKp46), NCR3 (NKp30) e NKG2D em comparação com as células CD3^{neg}CD56^{dim}. A expressão de NCR2 (NKp44), geralmente é induzida em células NK ativadas e tem-se mostrado super-expressa em pacientes infetados por VIH com níveis baixos de células T CD4⁺ (Vieillard *et al.*, 2005), podendo também estar envolvido na sua lise celular (Freud *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2001). No entanto, Fregni e colegas, observaram baixa expressão do NKp44, assim como de CD69, sem marcação para CD57 ou CD25 (dados não mostrados). O recetor inibitório CD94/NKG2A foi expresso em todas as células CD3^{neg}CD56^{bright} e também na maioria das células CD3^{neg}CD56^{dim}. A expressão elevada de NKG2A, que foi observada, tem vindo a ser relacionada, inversamente, com a fuga das células T CD4⁺ infetadas por VIH da lise das células NK (Zhang *et al.*, 2007). No entanto, não se pode excluir a lise das células T CD4⁺ pelas células NK, uma vez que as células CD3^{neg}CD56^{bright} foram ativadas eficientemente pela linhagem celular K562 (Alter *et al.*, 2004; Aktas *et al.*, 2009). Em contrapartida, houve uma baixa expressão de CD158b nas células CD3^{neg}CD56^{dim} e nas células CD3^{neg}CD56^{bright}, assim como, uma fraca marcação com CD158a (Figura.13, C).

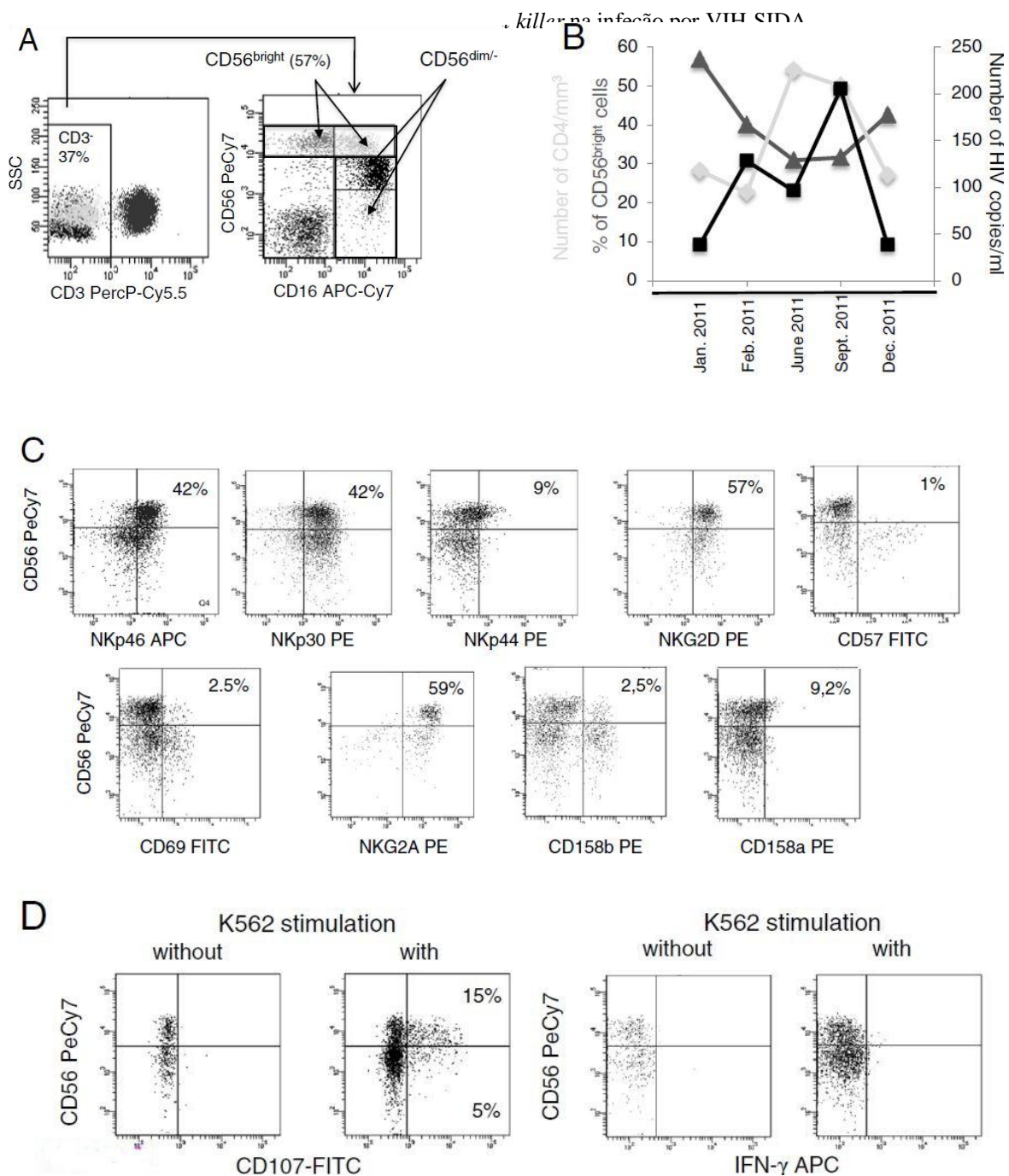


Imagem.13- Percentagens das células NK e seus subconjuntos. Potencial lítico das células NK. **A**- gráfico de pontos representando as células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$, $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{pos}$, $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ e $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$. Análise da dispersão para a frente e para a lateral. **B**- números absolutos de células T $CD4^{+}$ [linha cinza claro ($n^{\circ} CD4/mm^3$)], percentagem total de células $CD3^{neg}CD56^{bright}$ [linha cinza escuro (% $CD3^{neg}CD56^{bright}$)] e carga viral do VIH [linha preta (n° cópias/mL)] durante um ano. **C**- gráfico de pontos representado a expressão de recetores ativadores e inibitórios das células NK entre as células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ e $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{pos}$. **D**- gráfico de pontos representando a desgranulação de CD107a e secreção de IFN- γ em células $CD3^{neg}CD56^{bright}$ e $CD3^{neg}CD56^{dim}$, por ativação de PBMC pelas células K562 (Adaptado de Fregni *et al.*, 2013).

Avaliação do potencial de desgranulação das células NK e da expressão de citocinas Th1 e Th2

O potencial de desgranulação das células NK (% de CD107a), que se correlaciona com a citólise direcionada (Alter *et al.*, 2004; Aktas *et al.*, 2009), geralmente exercida pelas células CD3^{neg}CD56^{dim} (Nagler *et al.*, 1989), foi realizado principalmente pelas células CD3^{neg}CD56^{bright}. Inesperadamente, estas não produziram IFN- γ após a ativação pelas células K562 (Figura.13, D). O microambiente de citocinas pode também alterar a imunofenotipagem das células NK. Desde a IL-15 e/ou a IL-21 (Meier *et al.*, 2005; Parrish-Novak *et al.*, 2000) que regulam a homeostase assim como as funções efetoras das células NK, a ausência de IL-15 pode favorecer a produção de células CD3^{neg}CD56^{bright} induzindo uma mudança nas proporções de CD3^{neg}CD56^{bright}/CD3^{neg}CD56^{dim}. De fato, as citocinas Th1 e Th2 (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10) não foram detetadas no soro do paciente (dados não mostrados).

Em suma, Fregni e colegas observaram que ao contrario do que normalmente se verifica, uma substituição das células CD3^{neg}CD56^{bright} pelas células CD3^{neg}CD56^{dim}, funcionalmente defeituosas, que é um dos mecanismos subjacentes da resposta das células NK prejudicadas vulgarmente observada em indivíduos infetados por VIH/VHC (Mavilio *et al.*, 2003; Mavilio *et al.*, 2005). O individuo em estudo, hemofílico co-infetado com VIH/VHC, não foram observadas estas alterações, uma vez que este apresentou números baixos das células CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos} em relação às células CD3^{neg}CD56^{bright} funcionais, sugerindo um cenário incomum que envolve a infecção por VIH e também, possivelmente, a infecção por VHC (Krämer *et al.*, 2012). É de interesse notar que as respostas observadas poderão também estar envolvidas na proteção deste paciente para o desenvolvimento de complicações secundárias ligadas às infeções por VIH/VHC. Por ultimo, o estudo deste individuo lançou uma nova luz sobre os possíveis mecanismos de adaptação imunológicos que poderão controlar a infecção pelo VIH. Um papel das células NK contra a não progressão de ambas as infeções foi provavelmente relacionada com a incomum proporção dos subconjuntos das células NK observadas (Krämer *et al.*, 2012).

V – CONCLUSÃO

Vários autores acreditam que a imunidade inata pode estar envolvida na resistência à infeção por VIH e que pode desempenhar um papel determinante no primeiro encontro com o vírus, assim como auxiliar a expansão da resposta imune adaptativa. Desta forma, vários autores procuraram responder a esta questão estudando as alterações que ocorreram sobre as células NK durante a infeção pelo VIH. Concluindo, que na infeção aguda existe um aumento significativo do número total de células NK ativadas, que retornaram para valores inferiores durante a infeção crónica. Durante a infeção aguda, observou-se ainda um aumento da expressão dos recetores *homing* para os tecidos linfóides contribuído com o aumento da carga viral, que retornaram para valores iniciais na infeção crónica. Após a infeção, verificou-se um aumento da desgranulação das células NK, como resposta ao estímulo *ex vivo* com IL-2, no entanto, a resposta para a secreção de IFN- γ foi muito reduzida. Demonstrou-se alterações nos subconjuntos das células NK, onde inicialmente se evidenciou um aumento do subconjunto das células CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos} com grande atividade citolítica. Com o decorrer da infeção, demonstrou-se que existe, primeiramente, o declínio do subconjunto imunorregulador CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}, seguido de uma perda secundária retardada do subconjunto CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos} e simultânea acumulação do subconjunto CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}, que não demonstrou capacidade de resposta (ex: produção e secreção de citocinas). Estudos sobre os recetores NK KIR, revelaram uma maior ativação dos recetores NK KIR⁺ em relação aos recetores NK KIR⁻, na infeção primária. Esta proporção correlacionou-se com o aumento do número total de células NK ativadas, que diminuiu, posteriormente, com a progressão da doença. Verificou-se ainda, que nos casais VIH-discordantes, as células NK apresentaram maior capacidade citolítica sobre as células T CD4⁺ infetadas do que nos casais VIH-concordantes. Sugerindo que, no contexto de uma relação heterossexual estável, o genótipo KIR do recetor não influencia de forma independente a aquisição do VIH, mas que depende do índice do genótipo de HLA do parceiro. A expressão de recetores *lectina-like*, nomeadamente o CD94/NKG2 apresentam altos níveis de expressão, na infeção primária, que aumentam com a progressão da infeção. Apesar do VIH apresentar mecanismos de escape à ação das células NK, conduzindo à progressão da infeção, existem casos de indivíduos, cujo o sistema imune inato, consegue contrariar estes mecanismos de escape do vírus impedido a progressão da infeção. Como pode ser

observado tanto no caso estudo I, onde o sistema imune inato da população em estudo se encontrava bastante ativo, conferindo proteção contra a infecção pelo VIH. Como no segundo caso, em que o indivíduo em estudo manifestou alterações nas distribuições dos subconjuntos das células NK que lhe conferiram proteção. Desta forma, é necessário efetuar-se mais estudos detalhados sobre as alterações das células NK e da forma como estas respondem aos diferentes estímulos para que se possa ter uma noção mais clara do papel que estas desempenham na infecção por VIH-SIDA.

VI – BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. k., Lichtman, A. H. (2005). Cellular and Molecular Immunology, 6th edition. Saunders.

Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G., Deniz, G. (2009). Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*, 254, pp 149–154.

Alexander, M., Lynch, R., Mulenga, I., et al. (2010). Donor and recipient envs from heterosexual human immunodeficiency virus subtype C transmission pairs require high receptor levels for entry. *J. Virol*, 84, pp 4100-4104.

Alter, G., Malenfant, J. M., Delabre, R. M., et al. (2004). Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J.I.*, 173, pp 5305-5311.

Alter, G., Malenfant, J. M., Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J.I.M.*, 294, pp 15-22.

Alter, G., Teigen, N., Davis, B. T., Addo, M. M., Suscovich, T. J., et al. (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*, 106, pp 3366–3369.

Alter, G., Teigen, N., Ahern, R., Streeck, H., Meier, A., et al. (2007). Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*, 195, pp 1452–1460.

Alter, G., Martin, M. P., Teigen, N., Carr, W. H., Suscovich, T. J., et al. (2007). Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J.E.M.*, 204, pp 3027–3036.

Andre, P., et al. (2000). Modification of P-selectin glycoprotein ligand 1 with a natural-killer-cellrestricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *P.N.A. U.S.A.*, 97, pp 3400–340.

Anderson, D. J., Politch, J. A., Nadolski, A. M., *et al.* (2010). Targeting Trojan horse leukocytes for HIV prevention. *AIDS*, 24, pp 163-187.

Andrade J., Tomás N., Lourenço S. (2003). *VIH: Pespéctiva Imunológica*. [Em Linha]. Disponível em http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_HIV.htm#_Toc47160101 > .[Consultado em 15/12/2012].

Aramburu, J., Balboa, M. A., *et al.* (1990). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ +T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol*, 144, pp 3238–47.

Arosa, F. A., Cardoso, E. M., *et al.* (2007). *Fundamentos de Imunologia, Lidel*.

Arts, E. J., Wainberg, M. A. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *A. V. R.*, 46, pp 99-166.

Azzoni, L., Pappasavas, E., Chehimi, J., *et al.* (2002). Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J.I.*, 168, pp 5764-5770.

Barbour, J. D., Sriram, U., Caillier, S. J., *et al.* (2007). Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA Class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression. *PLoS Pathog*, 3, pp 43.

Baume, D. M., *et al.* (1992). Differential responses to interleukin-2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *E.J.I.*, 22, pp 1–6.

Biassoni, R., Ugolotti, E., De, M. A. (2009). NK cell receptors and their interactions with MHC. *C.P.D.*, 15, pp 3301-3310.

Boulet, S., Sharafi, S., Simic, N., *et al.* (2008). Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS*, 22, pp 595- 599.

Brunetta, E., Hudspeth, K. L., Mavilio, D. (2010). Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *Journal of leukocyte biology*, 88, pp 1119–1130.

Brooks, A. G., Posch, P. E., *et al.* (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory NK cell receptor. *J.E.M.*, 185, pp 795–800.

Caligiuri, M. A., *et al.* (1990). Functional consequences of interleukin-2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural-killer-cell subset with high-affinity receptors. *J.E.M.*, 171, pp 1509–1526.

Caligiuri, M. A., *et al.* (1993). Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2. *J.C.I.*, 91, pp 123–132.

Caligiuri M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112, pp 461–469.

Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., *et al.* (2004). Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *PNAS. U.S.A*, 101, pp 3527–32.

Carson, W. E., *et al.* (1995). The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*, 85, pp 3577–3585.

Carretero, M., Cantoni, C., *et al.* (1997). The CD94 and NKG2-ACtype lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *E.J. Immunol*, 27, pp 563–75.

Clark, S. J., Saag, M. S., *et al.* (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. E. J. N. M.*, 324, pp 954-60.

Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., *et al.* (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8 $^{+}$ T cells. *Science*, 270, pp 1811.

Colonna, M., Samaridis, J. (1995). Cloning of Ig-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human NK cells. *Science*, 268, pp 405–8.

Colonna, M., Navarro, F., Bellon, *et al.* (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J.E.M.*, 186, pp 1809–18.

Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., *et al.* (2002). Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *N. Immunol*, 3, pp 288–94.

Cooley, S., Weisdorf, D. J., Guethlein, L. A., *et al.* (2010). Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116, pp 2411-2419.

Cooper, M. A., *et al.* (2001). Interleukin-1 β costimulates interferon- γ production by human natural killer cells. *E.J. Immunol*, 31, pp 792–801.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 22, pp 633-640.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., *et al.* (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97, pp 3146-3151.

Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., *et al.* (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 7, pp 273–82.

Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D., Ho, D. D. (1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. E. J. M.*, 324, pp 961-4.

D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., *et al.* (1995). Cutting edge: molecular cloning of NKB1: a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J. Immunol*, 155, pp 2306–10.

Davis, D. M. Chiu, I., *et al.* (1999). The human natural killer cell immune synapse. *PNAS. U.S.A.* 96, pp 15062–15067.

Dorak, M. T., Tang, J., Penman-Aguilar, A., *et al.* (2004). Transmission of HIV-1 and HLA-B allele-sharing within serodiscordant heterosexual Zambian couples. *Lancet*, 363, pp. 2137-2139.

Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., *et al.* (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *N.I.*, 2, pp 951.

Fauci, A. S. (1993). Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease implications for therapy. *Science*, 262, pp 1011-8.

Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001). Interleukin-15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97, pp 14–32.

Faure, M., Long, E. O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J. Immunol*, 168, pp 6208–14.

Ferrini, S., Cambiaggi, A., Meazza, R., *et al.* (1994). T cell clones expressing the natural killer cell related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. *E. J. Immunol*, 24, pp 2294–98.

Follezou, J. Y., Lan, N. Y., Lien, T. X., *et al.* (1999). Clinical and biological characteristics of human immunodeficiency virus-infected and uninfected intravascular drug users in Ho Chi Minh City, Vietnam. *A.J.T.M.H.*, 61, pp 420.

Flores-Villanueva, P. O., Yunis, E. J., Delgado, J. C., *et al.* (2001). Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *P.N.A.S. U.S.A.*, 98, pp 5140–45.

Fox, C. H., Tenner-Racz, K., *et al.* (1991). Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. I. D.*, 164, pp 1051-7.

Fregni, G., Maresca, A. F., Jalbert, V., *et al.* (2013). High number of CD56bright NK cells and persistently low CD4+ T-cells in hemophiliac HIV/HCV co-infected patient without opportunistic infections. *Virology Journal*, 10, pp 1186-1743.

Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., *et al.* (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*, 22, pp 295–304.

Gaudieri, S., DeSantis, D., McKinnon, E., *et al.* (2005). Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *G.I.*, 6, pp 683-690.

Goodridge, J. P., Witt, C. S., Christiansen, F. T., Warren, H. S. (2003). KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J. Immunol*, 171, pp 1768–74.

Guerini, F. R., Lo, C. S., Gori, A., *et al.* (2011). Under representation of the inhibitory KIR3DL1 molecule and the KIR3DL1_/BW4_ complex in HIV exposed seronegative individuals. *J.I.D.*, 203, pp 1235-1239.

Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., *et al.* (1996) Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 Natural Killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J.E.M.*, 183, pp 1817–1827.

Hehlmann, R., Erfle, V. (1991). Introduction to retrovirus: Human retroviruses. In: Belshe, R. B. (Ed.). *Textbook of human virology*. 2th edition, St Louis, *Mosby*.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., *et al.* (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373, pp 123-6.

Hoglund, P., Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *N.R.I.*, 10, pp 724-734.

Houchins, J. P., Lanier, L. L., *et al.* (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J. Immunol*, 158, pp 3603–9.

Ironson, G., Balbin, E., Solomon, G., Fahey, J., Klimas, N., Schneiderman, N., *et al.* (2001). Relative preservation of natural killer cell cytotoxicity and number in healthy AIDS patients with low CD4 cell counts. *AIDS*, 15, pp 2065–2073.

Isaacman-Beck, J., *et al.* (2009). Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: Macrophage tropism, alternative coreceptor use, and the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Virol*, 83, pp 8208-8220.

Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., *et al.* (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *E .J. I.*, 31, pp 3121-3127.

Jennes, W., Verheyden, S., Demanet, C., *et al.* (2006). Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J.I.*, 177, pp 6588-6592

Jennes, W., Verheyden, S., Demanet, C., *et al.* (2011). Low CD4_ T cell counts among African HIV-1 infected subjects with group B KIR haplotypes in the absence of specific inhibitory KIR ligands. *PLoS One*, 6, pp 17043.

Jennes, W., Verheyden, S., Mertens, J. W., *et al.* (2013). Inhibitory KIR/HLA incompatibility between sexual partners confers protections against HIV-1 transmission. *Blood*, 121, pp 1157-1164.

Janeway, C.A., Travers, P., *et al.* (2004). Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, *Garland Publishing*, New York, chapter 2.

Krämer, B., Körner, C., Kebschull, M., *et al.* (2012). NKp46(High) expression defines a NK cell subset that is potentially involved in control of HCV replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology*, 56, pp 1201–213.

Karre, K. (2008). Natural killer cell recognition of missing self. *Nature immunology*, 9, pp 477–480.

Kaslow, R. A., Dorak, T., Tang, J. J. (2005). Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J.I.D.*, 191, pp S68-S77.

Kikuchi-Maki, A., Catina, T. L., Campbell, K. S. (2004). Structure-function analysis of KIR2DL4: an activating NK cell receptor exhibiting limited expression in humans. 20th edition, *I.N.K.C.W.*

Kottlilil, S., Chun, T. W., Moir, S., Liu, S., McLaughlin, M., *et al.* (2003). Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *The Journal of infectious diseases*, 187, pp 1038–1045.

Koup, R. A., *et al.* (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.*, 68, pp 4650-5.

Koyanagi, Y., O'Brien, W. A., Zhao, J. Q., Golde, D. W., Gasson, J. C., Chen, I. S. (1988). Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science*, 241, pp 1673.

Kulkarni, S., Martin, M. P., Carrington, M. (2008). The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *S.I.*, 20, pp 343-352.

Kunikata, T., *et al.* (1998). Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral-blood-cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *C.I.*, 189, pp 135–143.

Lanier, L. L., *et al.* (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol*, 136, pp 4480–4486.

Lanier, L. L. (1998). NK Cell Receptors. *A.R.I.*, 16, pp 359–393.

Lanier, L. L., Corliss, B. C., *et al.* (1998). Immuno receptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 391, pp 703–7.

Lanier, L. L. (2000). Turning on natural killer cells. *J.E.M.*, 191, pp 1259–1262.

Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., *et al.* (1996). Cutting edge: human NK cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol*, 157, pp 4741–45.

Lee S.H. *et al.* (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol*, 28, pp252–259.

Lockett, S. F., Robertson, J. R., Brettle, R. P., *et al.* (2001). Mismatched human leukocyte antigen alleles protect against heterosexual HIV transmission. *J.A.I.D.S.*, 27, pp 277-280.

Long, E. O., Wagtmann, N. (1997). Natural killer cell receptors. *C.O.I.*, 9, pp 344–350.

Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Ann Rev Immunol*, 17, pp 875–904.

Lopez-Vazquez, A., Mina-Blanco, A., Martinez-Borra, J., *et al.* (2005). Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *H.I.*, 66, pp 285-289.

MacDonald, K. S., Embree, J., Njenga, S., *et al.* (1998). Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J.I.D.*, 177, pp 551-556.

Mackelprang, R. D., John-Stewart, G., Carrington, M., *et al.* (2008). Maternal HLA homozygosity and motherchild HLA concordance increase the risk of vertical transmission of VIH-1. *J.I.D.*, 197, pp 1156-1161.

Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., *et al.* (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *N.G.*, 31, pp 429-434.

Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X., *et al.* (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *N.G.*, 39, pp 733-740.

Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., *et al.* (2003). Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *P.N.A.S. U.S.A.*, 100, pp 15011-15016.

Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., *et al.* (2005). Characterization of CD56_{low}/CD16_{high} natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *P.N.A.S. U.S.A.*, 102, pp 2886-2891.

Maxwell, L. D., Wallace, A., Middleton, D., *et al.* (2002). A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens*, 60, pp 254–58.

Meier, U. C., Owen, R. E., Taylor, E., Worth, A., Naoumov, N., Willberg, C., *et al.* (2005)- Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J.V.*, 79, pp 12365–12374.

Megan, A., Cooper, T. A., *et al.* (2001). The biology of human natural Killer-cell subsets. *Elsevier Science Ltd*, 22, pp 633-640.

Merino, A., Malhotra, R., Morton, M., *et al.* (2011). Impact of a functional KIR2DS4 allele on heterosexual HIV-1 transmission among discordant Zambian couples. *J.I.I.D.*, 203, pp 487-495.

Middleton, D., Gonzelez, F. (2010). The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*, 129, pp 8-19.

Mingari, M. C., Ponte, M., Bertone, S., *et al.* (1998). HLA-class I specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukine 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *P.N.A.S. U.S.A.*, 95, pp 1172–1177.

Moretta, A., Moretta, L. (1997). HLA class I specific inhibitory receptors. *C.O.I.*, 9, pp 694–701.

Moretta, A., *et al.* (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural-killer-cell mediated cytolysis. *A.R.I.*, 19, pp 197–223.

Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., *et al.* (2002). Human NK cells and their receptors. *M. I.*, 4, pp 1539.

Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., *et al.* (2011). Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 117, pp 764-771.

Murphy, E. L., Collier, A. C., Kalish, L.A., *et al.*, (2001). Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *A. I. M.*, 135, pp 17-25.

Murray, P.R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2007). *Medical Microbiology*. 5th edition, Elsevier Mosby, 65, pp 657-673.

National Institute of allergy and infectious Diseases. [Em linha]. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/hiv aids/Pages/Default.aspx>> [Consultado em 10/08/2013].

Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., Phillips, J. H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J.I.*, 143, pp 3183–3191.

Nagler, A., *et al.* (1990). Constitutive expression of high-affinity interleukin-2 receptors on human CD16⁺ natural killer cells in vivo. *J.E.M.*, 171, pp 1527–1533.

Naranbhai, V., Altfeld, M., Karim, S. S. A., *et al.* (2013). Changes in natural killer cell activation and function during primary HIV-1-infection. *PLoS One*, 8, pp 1-8.

Novick, D., Ochshorn, M., Ghali, V., *et al.* (1989). Natural killer cell activity and lymphocyte subsets in parenteral heroin abusers and long-term methadone maintenance patients. *J.P.E.T.*, 250, pp 606.

Olcese, L., Cambiaggi, A., *et al.* (1997). Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by Natural Killer cells. *J. Immunol*, 158, pp 5083–86.

Orange, J. S., Harris, K. E., Andzelm, M. M., Valter, M. M., Geha, R. S., and Strominger, J. L., (2003). The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *PNAS. U.S.A*, 100, pp 14151–14156.

Palmieri, G., Tullio, V., *et al.* (1999). CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered syk and extra cellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells. *J. Immunol*, 162, pp 7181–88.

Pando, M. J., Gardiner, C. M., *et al.* (2003). The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J. Immunol*, 171, pp 6640–49.

Pantaleo, G., Graziosi, C., *et al.* (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, 362, pp 355-8.

Pantaleo, G., *et al.* (1994). Major expansion of CD8⁺ T cell with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature*, 370, pp 463-7.

Parham, P., McQueen, K. L. (2003). Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *N.R.I.*, 3, pp 108–22.

Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *N.R.I.*, 5, pp 201-214.

Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., *et al.* (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 408, pp 57–63.

Pascale, A., Burnet, C., Guia, S., *et al.* (1999). Diferencial regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimmers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *E.J.I.*, 29, pp 1076-1085.

Paximadis, M., Minevich, G., Winchester, R., *et al.* (2011). KIR-HLA and maternal-infant HIV-1 transmission in sub-Saharan Africa. *PLoS One*, 6, pp 16541.

Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *I.C.B.*, 89, pp 216-224.

Pelak, K., Need, A. C., Fellay, J., *et al.* (2011). Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *P.B.*, 9, pp 1001208.

Phillips, J. H., Gumperz, J. E., Parham, P., Lanier, L. L. (1995). Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science*, 268, pp 403–5.

Polycarpou, A., Ntais, C., Korber, B. T., *et al.* (2002). Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. *A.R.H.R.*, 18, pp 741-746.

Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., *et al.* (1999). Inhibitory receptors sensing HLAG1 molecules in pregnancy: Decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, a novel HLA-G1-specific receptor. *P.N.A.S. U.S.A.*, 96, pp 5674–79.

Prodinger, W. M., Würzner, R., *et al.* (2003). Complemente. in: Paul We Ed. *Fundamental Immunology*, 5th Edition. Philadelphia, *Lippincott Williams & Wilkins*.

Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M. J., *et al.* (2002). A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics*, 79, pp 114–23.

Ragni, M. V., Moore, C. G., Soadwa, K., Nalesnik, M. A., Zajko, A. B., Cortese-Hassett, A., *et al.* (2011). Impact of HIV on liver fibrosis in men with hepatitis C infection and haemophilia. *Haemophilia*, 17, pp 103–111.

Rajagopalan, S., Long, E. O. (1999). An HLAG-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J.E.M.*, 189, pp 1093–110.

Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN- γ production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting cells. *J. Immunol*, 167, pp 1877-81.

Rajalingam, R. (2012). Overview of the killer cell immunoglobuline like receptor system. *PubMed Humana Press*, 2, pp 391-393.

Ravet, S., Scott-Algara, D., Bonnet, E., *et al.* (2007). Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain highlevel constitutive NK-cell activation in VIHExposed uninfected individuals. *Blood*, 109, pp 4296-4305.

Rivera-Nieves, J., Olson, T., Bamias, G., Bruce, A., Solga, M., *et al.* (2005). L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *Journal of immunology*, 174, pp 2343–2352.

Robertson, M. J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of leukocyte biology*, 71, pp 173–183.

Roitt, I., Male, D., *et al.* (2001). Immunology, 6th edition. *Mosby*.

Safrit, J. T., Andrews, C. A., *et al.* (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1- specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J. E. M.*, 179, pp 463-72.

Salazar-Gonzalez, J. F., *et al.*, (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. E. M.*, 206, pp 1273-1289.

Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., *et al.* (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *J.I.D.*, 202, pp 337-344.

Scott-Algara, D., Vuillier, F., Cayota, A., Dighiero, G. (1992). Natural killer (NK) cell activity during HIV infection: a decrease in NK activity is observed at the clonal level and is not restored after in vitro long-term culture of NK cells. *C.E.I.*, 90, pp 181.

Scott-Algara, D., *et al.* (2002). NK cells and HIV infection: lessons from other viruses. *C.M.M.*, 2, pp 757.

Scott-Algara, D., Troung, L. X., Versmisse, P., *et al.* (2003). Cutting Edge: Increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *The Journal of Immunology*, 171, pp 5663-5667.

Smith, B. A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A. S., Stilianakis, N. I., Keele, B. F., *et al.* (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J.I.*, 166, pp 690–696.

Smyth M.J. *et al.* (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, pp 850–861.

Suzuki, Y., Hamamoto, Y., Ogasawara, Y., *et al.* (2004). Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J.I.D.*, 122, pp 1133–36.

Truong, L. X., Luong, T. T., Scott-Algara, D., *et al.* (2003). CD4 cell and CD8 cell-mediated resistance to HIV-1 infection in exposed uninfected intravascular drug users in Vietnam. *AIDS*, 17, pp 1425.

Toyama-Sorimachi, N., Taguchi, Y., Yagita, H., *et al.* (2001). Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. *J. Immunol*, 166, pp 3771–79.

Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., *et al.* (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 7, pp 753–763.

Ullum, H., Gotzsche, P. C., Victor, J., *et al.* (1995). Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J.E.M.*, 182, pp 789.

Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., *et al.* (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, 7, pp 739–751.

Vance, R. E., Jamieson, A. M., Raulet, D. H. (1999). Recognition of the class Ib molecule Qa-1b by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J.E.M.*, 190, pp 1801–12.

Vieillard, V., Strominger, J. L., Debre, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *P.N.A.S U.S.A.*, 102, pp 10981–10986.

Vivier E., *et al.* (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, pp 44–49.

Wang, Y., Tao, L., Mitchell, E., *et al.* (1999). Allo-immunization elicits CD8_T cell-derived chemokines, HIV suppressor factors and resistance to HIV infection in women. *N.M.*, 5, pp 1004.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., *et al.* (1996). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373, pp 117-22.

Weiss R.A. (2001). Gulliver's travels in HIV land. *Nature*, 410, pp 963-967.

Wilen, C. B., Tilton, J. C., *et al.*, (2011). HIV: Cell binding and entry. *C. S. H. P. M.*

Wende, H., Colonna, M., *et al.* (1999). Organization of the leukocyte receptor cluster (LCR) on human chromosome 19q13.4, *Mamm Genome*. 10, pp 154-160.

Winter, C. C., Gumperz, J. E., *et al.* (1998). Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol*, 161, pp 571–77.

Yawata, M., Yawata, N., Abi-Rached, L., Parham, P. (2002). Variation within the human killer cell immunoglobulin immunoglobulinlike receptor (KIR) gene family. *C.R.I.*, 22, pp 463-482.

Yusa, S., Catina, T. L., Campbell, K. S. (2002). SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J. Immunol*, 168, pp 5047–57.

Zhang, R., Xu, J., Hong, K., Yuan, L., Peng, H., Tang, H., *et al.* (2007). Increased NKG2A found in cytotoxic natural killer subset in HIV-1 patients with advanced clinical status. *AIDS*, 21, pp 9–17.

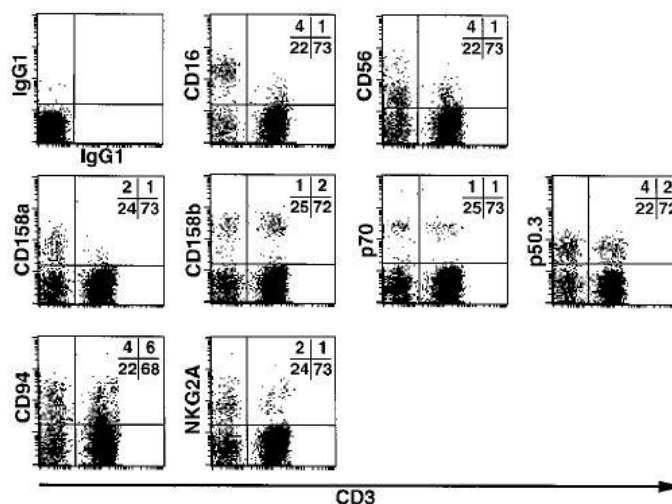
Zimmer, J., Donato, L., Hanau, D., *et al.* (1998). Activity and Phenotype of Natural Killer Cells in Peptide Transporter (TAP)-deficient Patients (Type I Bare Lymphocyte Syndrome). *J.E.M.*, 187, pp 117–122.

Zompi, S., Hamerman, J. A., Ogasawara, K., *et al.* (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *N. Immunol*, 4, pp 565–72.

VII – ANEXOS

ANEXO A

Regulação diferencial de recetores CD94 Ig-like e de dímeros de lectina das células NK e T em indivíduos infetados pelo VIH-1 (Pascale *et al.*, 1999).



A.1 - Fenótipo de superfície celular das células NK e T a partir de Indivíduos seronegativos. Foi utilizado para uma análise detalhada um Gating de dispersão eletrônica onde foram selecionados os linfócitos vivos. Os números indicam a percentagem de células em cada quadrante (imagem adaptada de Pascale *et al.*, 1999).

Study group		% NK lymphocyte ^{a)}					
		CD158a	CD158b	p70	p50.3	CD94	NKG2A
Control		32 ± 3	38 ± 3	20 ± 3	20 ± 4	76 ± 4	40 ± 3
Clinical status	A	27 ± 5	41 ± 5	22 ± 4	15 ± 4	84 ± 5 ^{b)}	49 ± 5 ^{b)}
	B	31 ± 4	33 ± 5	18 ± 3	17 ± 4	78 ± 4	46 ± 5
	C	22 ± 3	37 ± 4	33 ± 9	21 ± 5	94 ± 2	65 ± 5
CD4 ⁺ T cell absolute numbers	1	21 ± 4	40 ± 8	24 ± 5	10 ± 5	76 ± 11	57 ± 7
	2	31 ± 4	51 ± 6	19 ± 3	17 ± 3	86 ± 7	46 ± 5
	3	23 ± 3	37 ± 6	25 ± 8	21 ± 5	89 ± 4	62 ± 4
Viral load	VL1	34 ± 6	39 ± 5	24 ± 5	20 ± 7	84 ± 8	56 ± 7
	VL2	26 ± 3	46 ± 8	32 ± 8	20 ± 5	84 ± 8	46 ± 4
	VL3	22 ± 4	44 ± 7	15 ± 3	12 ± 3	88 ± 7	54 ± 5

a) Mean percentage ± SEM.

b) Statistically significant differences ($p < 0.01$) between values obtained from healthy and HIV-1-infected individuals.

A.2 – Tabela de distribuição dos subconjuntos dos linfócitos NK em amostras de sangue de doadores saudáveis e em pacientes infetados por VIH-1 (adaptado de Pascale *et al.*, 1999).

Study group		% CD3 ⁺ lymphocyte ^{a)}					
		CD158a	CD158b	p70	p50.3	CD94	NKG2A
Control		2 ± 0.4	3.8 ± 0.7	1 ± 0.2	2.5 ± 0.6	11 ± 1.1	5 ± 0.9
Clinical status	A	2.1 ± 0.4	5.7 ± 0.6	2.3 ± 0.5	1.6 ± 0.4	13 ± 1.3 ^{b)}	5 ± 0.8
	B	3.9 ± 1	6.4 ± 1.1	1.5 ± 0.3	1 ± 0.3	14 ± 1.2	5.3 ± 0.7
	C	2.5 ± 0.8	5.7 ± 0.9	2.4 ± 1.2	1.6 ± 0.4	21 ± 2.7	6.4 ± 1
CD4 ⁺ T cell absolute numbers	1	2 ± 0.3	5 ± 0.9	2.3 ± 0.5	0.9 ± 0.4	10 ± 1.4 ^{b)}	3 ± 0.5
	2	3 ± 0.7	5.8 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	14 ± 1	6.3 ± 0.7
	3	2.7 ± 0.6	6 ± 1	2.4 ± 1.2	1.7 ± 0.4	21 ± 2.6	6 ± 0.8
Viral load	VL1	1.9 ± 0.2	6.5 ± 0.7	2.4 ± 1	1.2 ± 0.3	14 ± 2	6 ± 1
	VL2	3.6 ± 1	5 ± 0.7	2.4 ± 0.6	1.6 ± 0.4	14 ± 1	5 ± 0.6
	VL3	3.1 ± 0.8	5.9 ± 1	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.5	17 ± 3	6 ± 0.8

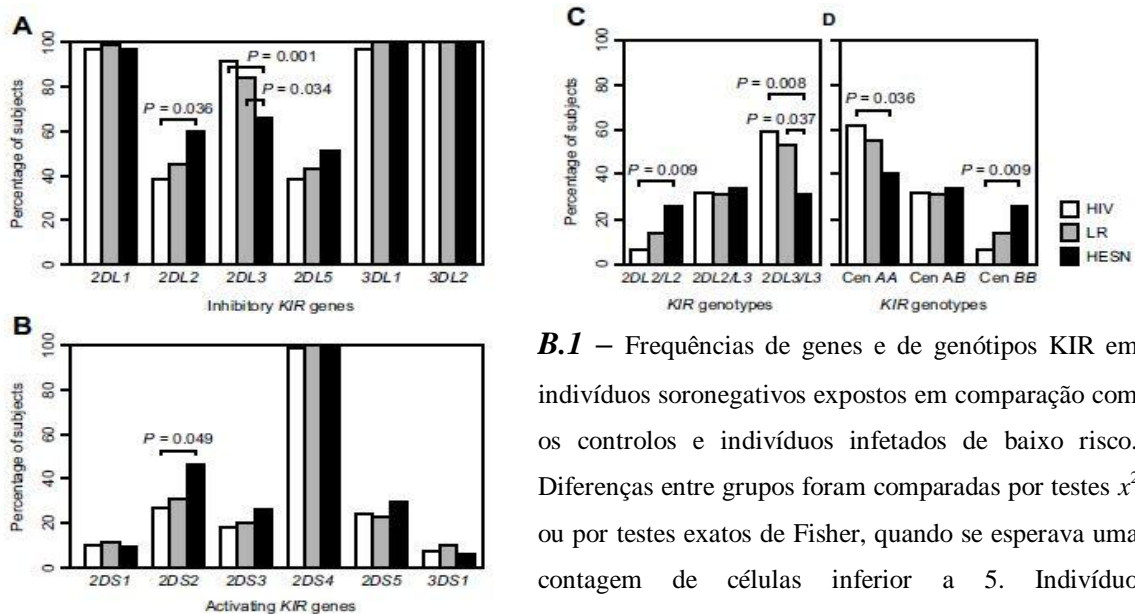
a) Mean percentage ± SEM; percentages are defined by dual-color fluorescence analysis (CD3/NKR).

b) Statistically significant differences ($p < 0.01$) between values obtained from healthy and HIV-1-infected individuals.

A.3 – Tabela de distribuição dos subconjuntos dos linfócitos T expressando vários NKR, em amostras de sangue de dadores saudáveis e em pacientes infetados por VIH-1 (adaptada de Pascale *et al.*, 1999).

ANEXO B

Incompatibilidade de KIR_{inibitório}/HLA em parceiros sexuais, confere proteção contra a transmissão de VIH-1 (Jennes et al., 2012)



B.1 – Frequências de genes e de genótipos KIR em indivíduos soronegativos expostos em comparação com os controlos e indivíduos infetados de baixo risco. Diferenças entre grupos foram comparadas por testes χ^2 ou por testes exatos de Fisher, quando se esperava uma contagem de células inferior a 5. Indivíduo seronegativo exposto ao VIH, n=35 (HESN); baixo risco dos controlos, n=74 (LR); controlos infetados por VIH-1, n=68 (VIH); centromérico (Cen): são mostrados valores de $P < 0,05$. A: genes inibitórios KIR. B: genes ativadores de KIR. C: genótipos KIR2DL2/KIR2DL3. D: genótipos centromérico KIR (Adaptado de Jennes *et al.*, 2012).

Qual o papel das células *natural killer* na infecção por VIH-SIDA

Type*	Recipient		Index	DC (n = 35)	CC (n = 35)	DC vs CC		
	KIR	HLA	HLA			OR	95% CI	P†
Matched	2DL1	Any	C1/C2	32	54	0.40	0.15-1.07	.068
Matched	2DL1	Any	C2/C2	24	23	1.04	0.34-3.18	.947
Missing self	2DL1	C1/C2	C1/C1	23	3	10.1	1.19-85.6	.028
Missing self	2DL1	C2/C2	C1/C1	9	11	0.75	0.16-3.63	1.000
Matched	2DL2/2DL2	Any	C1/C1	6	0	NA	NA	.239
Matched	2DL2/2DL2	Any	C1/C2	18	6	3.54	0.66-18.9	.151
Missing self	2DL2/2DL2	C1/C1	C2/C2	0	0	NA	NA	NA
Missing self	2DL2/2DL2	C1/C2	C2/C2	0	0	NA	NA	NA
Matched	2DL2/2DL3	Any	C1/C1	17	11	1.60	0.41-6.26	.495
Matched	2DL2/2DL3	Any	C1/C2	11	14	0.77	0.19-3.16	1.000
Missing self	2DL2/2DL3	C1/C1	C2/C2	3	0	NA	NA	1.000
Missing self	2DL2/2DL3	C1/C2	C2/C2	0	0	NA	NA	NA
Matched	2DL3/2DL3	Any	C1/C1	14	9	1.78	0.39-8.09	.710
Matched	2DL3/2DL3	Any	C1/C2	3	34	0.06	0.01-0.46	.001
Missing self	2DL3/2DL3	C1/C1	C2/C2	6	9	0.65	0.10-4.13	1.000
Missing self	2DL3/2DL3	C1/C2	C2/C2	9	6	1.55	0.24-9.88	1.000

Data are percentages. *P* values < .05 are in bold.

DC indicates HIV-1 discordant couples; CC, HIV-1 concordant couples; OR, odd's ratio; CI, confidence interval; and NA, not applicable.

*According to models described by Moretta et al.¹¹ "Matched" occurs when the specified inhibitory KIR of the recipient recognizes an HLA-C allotype present in the index (regardless of recipient HLA). "Missing self" occurs when the specified inhibitory KIR of the recipient recognizes an HLA-C allotype present in the recipient that is lacking in the index.

† χ^2 tests or Fisher exact tests when cells have expected counts less than 5.

B.2 – Frequência das combinações ou auto-falta de alógenos KIR/HLA através de destinatários entre parceiros infetados de casais concordantes e discordantes (Adaptado de Jennes *et al.*, 2012).

Predictor variables	OR	95% CI	<i>P</i>	AIC
Model 1				
Index male sex	0.02	0.003-0.19	< .001	63.9
Recipient KIR2DL2/KIR2DL2	3.48	0.39-31.1	.264	
Recipient KIR2DL1/C1/C2 + index C1/C1	17.6	1.80-174	.014	
Recipient KIR2DL3/KIR2DL3	1.21	0.26-5.71	.809	
Recipient KIR2DL3/KIR2DL3 + index C1/C2	0.04	0.002-0.86	.039	
Model 2				
Index male sex	0.02	0.003-0.20	< .001	62.0
Recipient KIR2DL2/KIR2DL2	3.17	0.41-24.5	.269	
Recipient KIR2DL1/C1/C2 + index C1/C1	17.3	1.80-170	.014	
Recipient KIR2DL3/KIR2DL3 + index C1/C2	0.05	0.003-0.82	.036	
Model 3				
Index male sex	0.02	0.003-0.18	< .001	61.2
Recipient KIR2DL1/C1/C2 + index C1/C1	14.5	1.50-138	.020	
Recipient KIR2DL3/KIR2DL3 + index C1/C2	0.04	0.002-0.66	.025	

Data are calculated by binomial logistic regression analysis. *P* values < .05 are in bold. OR values > 1 are predictive of HIV-1-discordant status. OR values < 1 are predictive of HIV-1-concordant status. Models 2 and 3 are obtained from model 1 by backwards stepwise selection based on the AIC. The model with the lowest AIC shows the best fit.

OR indicates odds ratio; CI, confidence interval; and AIC, Akaike Information Criterion.

B.3 – Análise dos efeitos multivariantes de KIR/HLA no *status* dos casais concordantes e discordantes (Adaptado de Jennes *et al.*, 2012).

NK cells	CD4 ⁺ T cells		Donor <i>KIR</i> /HLA			Patient HLA	Donor/patient <i>KIR</i> /HLA		CD4 ⁺ T-cell killing	
	Blood donor	Patient	HIV-1 load*	<i>KIR</i> †	<i>KIR2DL</i>	HLA-C	HLA-C	Missing self‡	<i>3DS1/Bw4</i> ‡	7-AAD (%)
BFC01	ITM01	4.52	AA	2DL1 + 2DL3/3	C2/C2	C1/C1	2DL1	Yes	12.65	3.85
BFC08	ITM21	< 1.30	AA	2DL1 + 2DL3/3	C1/C1	C2/C2	2DL3	Yes	12.17	12.87
BFC01	ITM03	< 1.30	AA	2DL1 + 2DL3/3	C2/C2	C1/C1	2DL1	Yes	11.04	4.87
BFC05	ITM13	5.43	BB	2DL1 + 2DL2/2	C1/C2	C2/C2	2DL2	Yes	5.38	7.05
BFC06	ITM15	< 1.30	BB	2DL1 + 2DL2/2	C1/C2	C1/C1	2DL1	No	5.21	6.41
BFC05	ITM17	< 1.30	BB	2DL1 + 2DL2/2	C1/C2	C2/C2	2DL2	Yes	4.10	4.93
BFC07	ITM19	< 1.30	AB	2DL1 + 2DL2/3	C1/C2	C2/C2	2DL2/3	No	3.73	4.48
BFC06	ITM18	< 1.30	BB	2DL1 + 2DL2/2	C1/C2	C1/C2	None	No	2.52	2.69
BFC03	ITM12	< 1.30	AA	2DL1 + 2DL3/3	C2/C2	C1/C2	None	No	0.53	1.22
BFC03	ITM09	5.53	AA	2DL1 + 2DL3/3	C2/C2	C1/C2	None	No	0.16	0
BFC08	ITM24	4.64	AA	2DL1 + 2DL3/3	C1/C1	C1/C2	None	No	0	0
BFC07	ITM23	4.71	AB	2DL1 + 2DL2/3	C1/C2	C1/C2	None	No	0	0

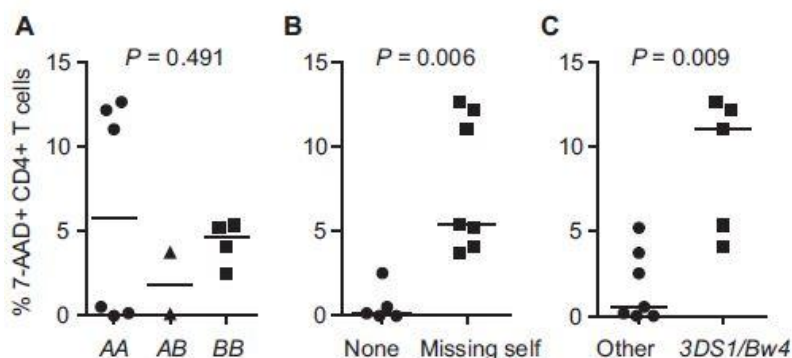
Every healthy blood donor is assessed against 2 different HIV-1 patients. The data are sorted in descending order based on CD4⁺ T cell killing (% 7-AAD). There were no missing self combinations at the level of *KIR3DL1*/HLA-Bw4.

*Data are log₁₀ HIV-1 RNA copies/mL. All patients with undetectable (< 1.30 log₁₀ copies/mL) are under antiretroviral therapy, all patients with detectable (> 1.30 log₁₀ copies/mL) are therapy-naïve.

†Centromeric *KIR* genotypes.

‡Defined as the blood donor inhibitory *KIRs* that recognized an HLA allotype present in the blood donor but that was lacking in the HIV-1 patient.¹¹

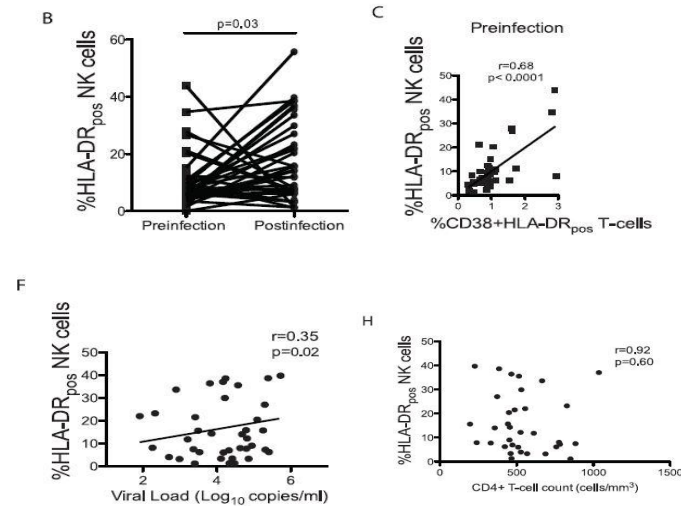
B.4 – Respostas, *in vitro*, dos alogénicos das células NK contra as células T CD4⁺ derivadas de pacientes infetados como função do genótipo *KIR*/HLA (Adaptado de Jennes *et al.*, 2012).



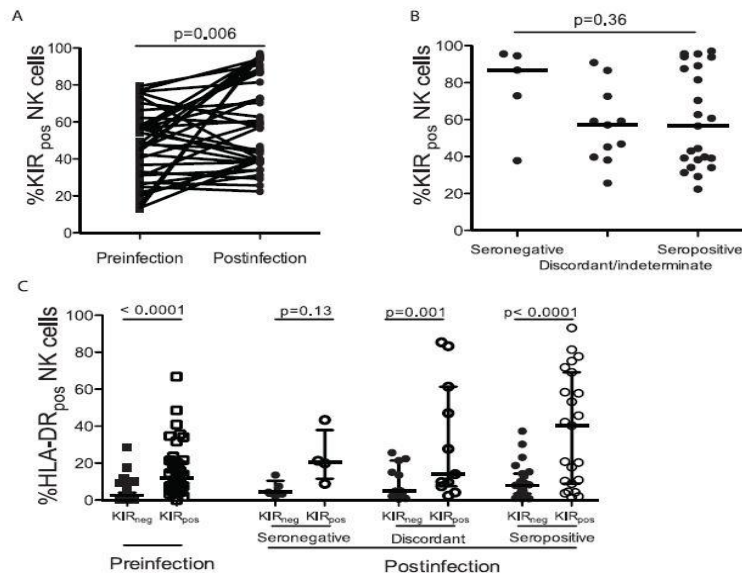
B.5 – Ação lítica das células NK alogénicas, *in vitro*, sobre as células T CD4⁺ derivadas em pacientes infetados por VIH-1 em função do genótipo *KIR*/HLA. Analise as diferenças entre os grupos por meio de testes *U* de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, as linhas horizontais representam os valores medianos. **A:** Efeito dos genótipos *KIR* centroméricos de doadores de células NK. **B:** Efeito da auto-falta em células NK, de dadores infetados por VIH-1, nas combinações *KIR* / HLA do paciente. A falta destas combinações é definida como a doação de células NK *KIR* inibidores, que reconhecem halótipos HLA presentes no doador de células NK, mas que está em falta no paciente infetado por HIV-1 (Moretta *et al.*, 2011). **C:** Efeito de *KIR3DS1* no dador alogénico de células NK em combinação com HLA-Bw4 do paciente infetado por VIH-1. (Adaptado de Jennes *et al.*, 2012)

ANEXO C

Alterações na ativação e função das células NK durante a infecção primária por VIH-1 (Naranbhai et al., 2013)

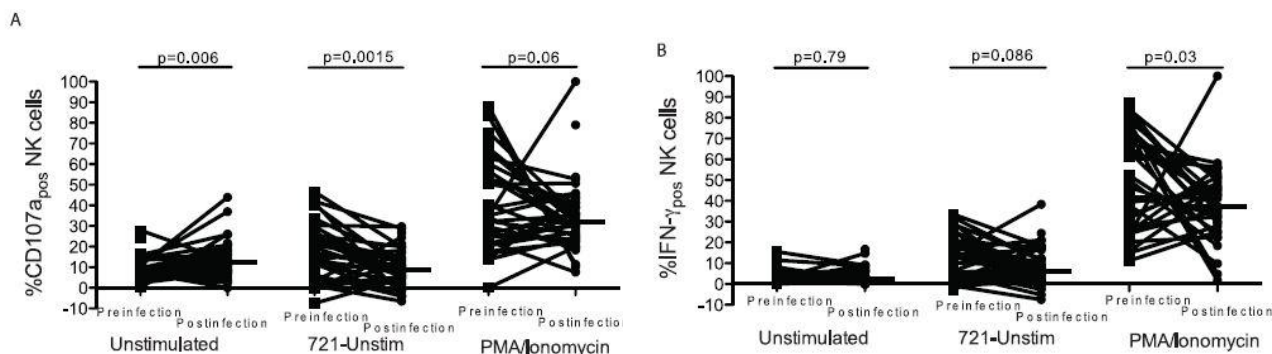


C.1 – A infecção primária do HIV-1, foi associada com a ativação das células NK. As células NK (B) foram ativadas a seguir à infecção do VIH. A proporção de células T ativadas e células NK foram correlacionados significativamente antes (C), mas não na sequência da infecção por VIH-1 (D). Em contraste, durante a infecção primária, a ativação das células NK (F), foi correlacionada positivamente (H) com a carga viral de VIH (log 10 cópias/ mL) (adaptado de Naranbhai *et al.*, 2013)

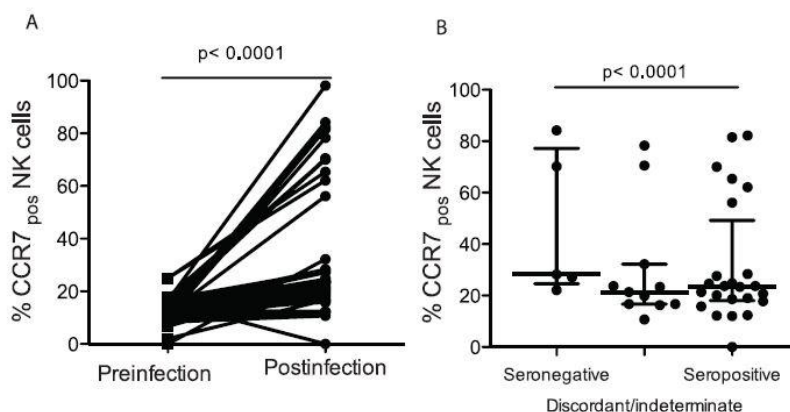


C.2 – Após a infecção, um aumento da proporção de células NK ativadas no sangue expressa recetores KIR. **A:** proporção de células NK KIR^{pos} no sangue aumentou após a infecção por VIH. **B:** A proporção de células NK KIR^{pos} não diferiu entre os estágios de infecção primária pelo VIH (soronegativas,

sorodiscordantes ou soropositivos). C: As células NK KIR^{POS} foram mais ativadas do que as células NK KIR^{neg} (adaptado de Naranbhai *et al.*, 2013).



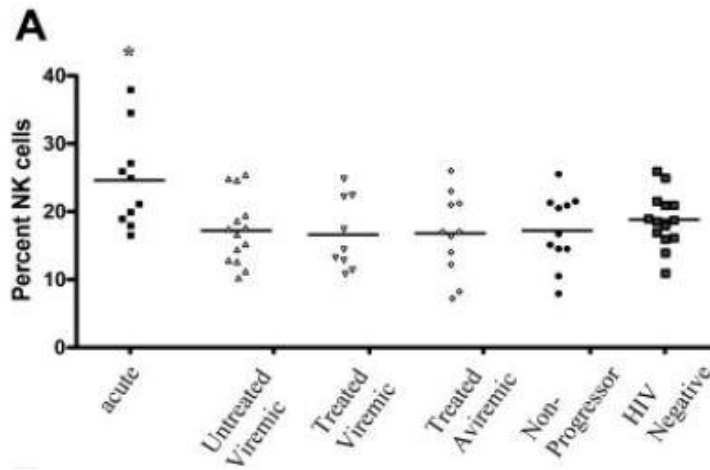
C.3 – Após a infecção pelo VIH as respostas das células NK para estimulação foram diminuídas. Desgranulação das células NK (A) e secreção de IFN-γ (B). A resposta após estimulação com IL-2 isolada ou com IL-2 e de células 721 (ajustado para o fundo), ou com PMA / Ionomicina (adaptado de Naranbhai *et al.*, 2013).



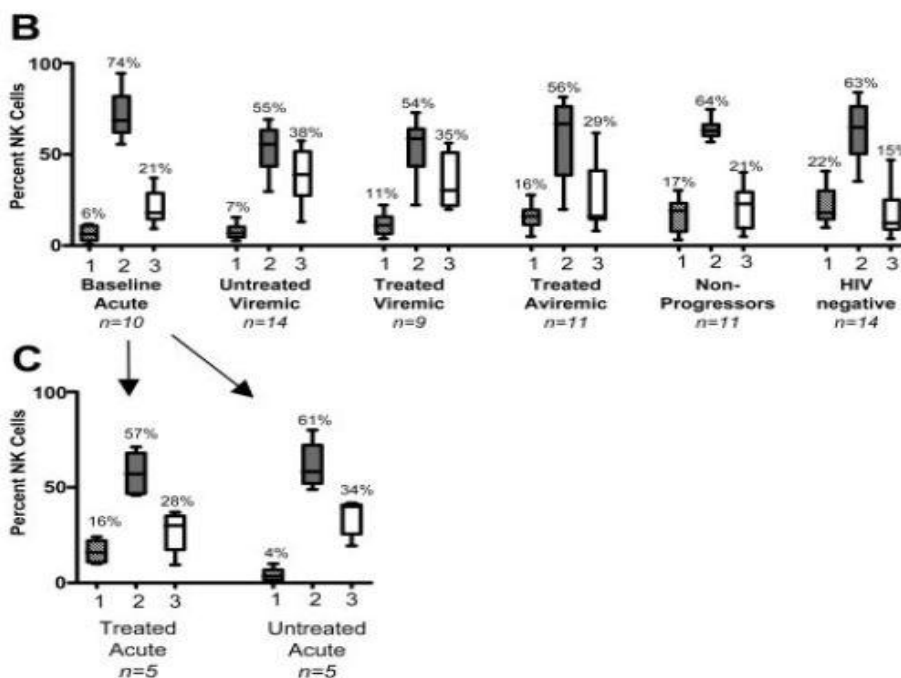
C.4 – Logo após a infecção por VIH, as células NK aumentaram sua expressão de recetores de homing no tecido linfóide, mas não no intestino. A: proporção de células NK que expressam CCR7 foi aumentada a seguir à infecção do VIH. B: A proporção de células NK que expressaram CCR7 foi reduzida durante fases posteriores da infecção primária (adaptado de Naranbhai *et al.*, 2013).

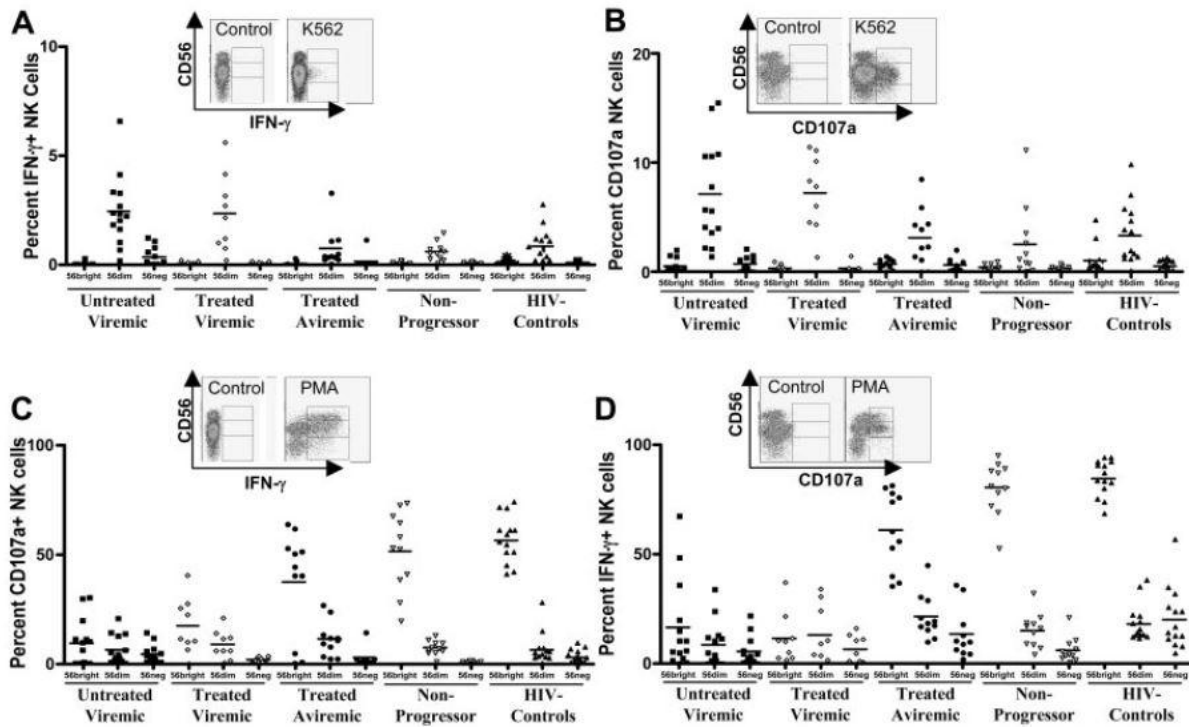
ANEXO D

Desregulação sequencial na distribuição dos subconjuntos das células NK e início da sua função na infecção aguda por HIV-1 (Alter et al., 2005)



D.1 – Distribuição longitudinal e alterações nas subpopulações de células NK. **A:** Um gráfico de pontos, representa a proporção total de células NK (incluindo $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$, $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ e $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$) para indivíduos com infecção aguda, todos os grupos com infecção crônica e indivíduos controle sem infecção por VIH-1. (* A percentagem de células NK foi significativamente [$P < 0,05$ ANOVA] maior em indivíduos com infecção aguda por VIH-1). **B:** As parcelas da caixa bigode representam a proporção de cada subconjunto de células $CD3^{neg}CD56^{bright}CD16^{neg}$ (cinza claro), $CD3^{neg}CD56^{dim}CD16^{pos}$ (cinzento escuro), e $CD3^{neg}CD56^{neg}CD16^{pos}$ (branco) para todos os grupos com doenças crônicas devido à infecção por VIH-1, os indivíduos controle e pacientes com infecção aguda pelo VIH-1. Os números indicam a percentagem mediana. **C:** os diagramas de caixa bigodes descrevem a distribuição da célula NK nos três subconjuntos após 1 ano de acompanhamento de 5 indivíduos que receberam a terapia anti-retroviral na infecção aguda pelo VIH-1 e 5 indivíduos que permaneceram fora da terapia. As barras de erro representam Intervalos de confiança de 95% sobre a média (adaptado de Alter *et al.*, 2005).





D.2 – A capacidade funcional dos subconjuntos das células NK na infecção crónica pelo VIH-1. Fluxo de dados primários e gráficos de pontos representam a secreção padrão de IFN- γ (A) e a expressão de CD107a (B) após a estimulação com MHC-desprovidos de células K562. Da mesma forma, os resultados de citometria de fluxo primário e gráficos de pontos representam o nível de secreção de IFN- γ (C) e de uma sobre-regulação CD107 (D) após a estimulação com PMA/ Ionomicina para os três subgrupos de células NK para a virémia sem tratamento (quadrados), tratamento da virémia (círculos brancos) tratamento de não virémicos (bolas), não progressores (triângulos brancos) e indivíduos não infetados pelo VIH-1 (triângulos escuros) (adaptado de Alter *et al.*, 2005).