



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO GENE *IFNL3* (rs12979860) NAS  
RESPOSTAS IMUNOLÓGICA E VIROLÓGICA DE PESSOAS VIVENDO COM  
HIV-1 E SUA RELAÇÃO COM ATIVAÇÃO DE CÉLULAS NK**

**RECIFE/PE**

**2014**

**VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO GENE *IFNL3*(rs12979860) NAS  
RESPOSTAS IMUNOLÓGICA E VIROLÓGICA DE PESSOAS VIVENDO COM  
HIV-1 E SUA RELAÇÃO COM ATIVAÇÃO DE CÉLULAS NK**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Tropical do Centro de Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de Pernambuco,  
como parte dos requisitos para a obtenção do título  
de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

**RECIFE/PE**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

F383i      Ferreira, Valéria Oliveira de Melo Ferreira.  
              Influência do polimorfismo do gene *IFNL3* (rs12979860) nas respostas  
              imunológica e virológica de pessoas vivendo com HIV-1 e sua relação com  
              ativação de células NK / Valéria Oliveira de Melo Ferreira. – Recife: O autor,  
              2014.  
              132 f.: il.; tab.; 30 cm.

              Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.  
              Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
              Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.  
              Inclui referências, apêndices e anexos.

              1. Polimorfismo. 2. Interferon. 3. Células NK. 4. HIV. 5. Tratamento. I.  
              Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883              CDD (23.ed.)                      UFPE (CCS2015-078)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP)

## RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA

No dia 28 de agosto de 2014, às 08h30, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE -, os Membros Doutores: a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Vera Magalhães da Silveira](#) (Presidente da Banca - UFPE), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Valdênia Maria Oliveira de Souza](#) (UFPE), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Ana Maria Salustiano Cavalcanti \(SES/PE\)](#), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Aletheia Soares Sampaio](#) (CPqAM/FIOCRUZ) e o Prof. Dr. [Luiz Cláudio Arraes de Alencar](#) (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda VALÉRIA DE MELO FERREIRA sobre a sua Tese intitulada “**Influência do polimorfismo do gene *IFN $\lambda$ 3* (rs12979860) nas respostas imunológica e virológica de pessoas vivendo com HIV e sua relação com a ativação de células NK**”, a qual foi orientada pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho](#) (UFPE) e co-orientada pela Prof<sup>ª</sup>. [Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura](#) (UPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Magalhães da Silveira

Aprovada

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Aprovada

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Salustiano Cavalcanti

Aprovada

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aletheia Soares Sampaio

Aprovada

Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar

APROVADA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Vera Magalhães da Silveira](#)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Valdênia Maria Oliveira de Souza](#)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Ana Maria Salustiano Cavalcanti](#)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. [Aletheia Soares Sampaio](#)

---

Prof. Dr. [Luiz Cláudio Arraes de Alencar](#)

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães da Silveira

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Catarina de Souza Lopes	Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Ana Lúcia Coutinho Domingues	Marli Tenório Cordeiro
Célia Maria Machado Barbosa de Castro	Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto	Valdênia Maria Oliveira de Souza
Fábio André dos Santos Brayner	Vláudia Maria Assis Costa
Heloísa Ramos Lacerda de Melo	Vera Magalhães de Silveira
Maria Amélia Vieira Maciel	

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

*À minha mãe, referência intelectual; que com enorme tristeza vi a doença leva-la antes do término desta jornada; no entanto, foi sua energia de mulher guerreira que fortaleceu minha alma para não desistir no meio do caminho.*

*Ao meu pai, que há dez anos não está fisicamente entre nós, mesmo assim, continua participando das minhas conquistas. Seu legado de amor, determinação e honestidade está presente em todos os dias da minha vida.*

*Aos meus irmãos Liége, Germânia e Alexandre pelo amor que nos une.*

*Aos Meus filhos Luiz Augusto e Pedro, que pelo amor incondicional existente entre nós, tornam a vida bela, leve e Iluminada.*

*Ao meu esposo Augusto, companheiro de uma vida ou de muitas vidas; meu grande amor.*

## AGRADECIMENTOS

---

---

Durante esta jornada ocorreram muitas tempestades; sua concretização só foi possível pelo apoio da minha família e dos muitos amigos que trilharam comigo o caminho, me apoiando em todos os momentos. Meus especiais agradecimentos:

A DEUS por me carregar nos braços nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Rosângela Coêlho, pelo apoio e compreensão nos momentos que pensei em desistir, sempre acreditando que concluiríamos esta jornada.

À Patrícia Moura minha co-orientadora e amiga de longas datas, a minha eterna gratidão por não me deixar desistir dos sonhos, mesmo nos períodos de grandes dificuldades das nossas vidas, compartilhando conhecimentos com generosidade e simplicidade o que a faz uma pessoa tão especial.

À Carla Mola, um dos anjos que encontrei nessa caminhada, sempre tão solícita; sua colaboração na realização das técnicas moleculares foi essencial para realização deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer.

À Valéria Pereira, pela generosidade e grandiosa colaboração.

À Carolina Acioly, seus conhecimentos de citometria de fluxo, junto ao seu otimismo foram de importância incalculável para finalização deste trabalho. Obrigada Carol!!

À Daniela Salustiano que se desdobrou na captação de pessoas para formar o nosso grupo controle, mais um anjo que encontrei nessa caminhada.

À minha amiga Magda Maruza e ao grupo de funcionários do Hospital Correia Picanyol: Adriana, Perla, Beth, Angiane, Telma e Jorge, pela ajuda na captação de pacientes e na aquisição dos dados secundários.

A Ulisses Montarroyos, pela colaboração com informações do seu banco de dados e esclarecimentos estatísticos.

Aqueles amigos que fazem o Setor de Imunologia do LACEN-PE, pela colaboração, apoio e incentivo durante todo o período de desenvolvimento desta tese.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, especialmente ao Prof. Ricardo Ximenes pelas orientações e grandes ensinamentos repassados durante o decorrer do curso.

A Walter Leite, funcionário do Programa, sempre tão solícito em ajudar.

Aos meus irmãos Liége, Germânia e Alexandre, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

Aos meus sobrinhos, que trazem alegria para minha casa sempre que estamos juntos, minimizando as tensões do cotidiano.

Aos meus tios Vinicius e Antônio Campos de Melo que fazem eu me sentir um ser humano melhor.

Ao meu filho Luiz Augusto “Guga”, que mesmo no silêncio do seu mundo virtual, demonstra sua cumplicidade no olhar, sempre disponível para ajudar.

Ao meu filho Pedro “Pedrinho”, meu companheiro de desafios vestibular e doutorado, sempre tão espirituoso e sereno. Sou fã do seu sorriso largo.

A Augusto, companheiro de todas as horas, por mais uma vez ter sido meu porto seguro nesta jornada extremamente difícil; seu amor, compreensão e apoio foram essenciais para concretizá-la.

Por fim, agradeço a todos aqueles pacientes que têm esperanças nas pesquisas científicas e aceitaram participar deste estudo.

Que eu lembre sempre que todos nós  
fazemos parte dessa maravilhosa teia chamada vida,  
criada por alguém bem superior a todos nós!  
E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos  
de alguns e sim, nas pequenas parcelas cotidianas  
de todos nós!

*Chico Xavier*

## RESUMO

---

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) compromete progressivamente o sistema imunológico, levando a depleção das células T CD4<sup>+</sup> e suas funções, caracterizando a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A resposta inata é determinante para estabelecer um estado antiviral, que mantém o equilíbrio entre o vírus e o hospedeiro. Os interferons tipo III também chamados de interferons lambda (IFN- $\lambda$ 1 ou IL-29; IFN- $\lambda$ 2 ou IL-28a; IFN- $\lambda$ 3 ou IL-28b), assim como, as Células *Natural Killer* (NK), são componentes da imunidade inata que desenvolvem papéis importantes no controle da replicação viral. O polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) no gene *IFNL3* que codifica o IFN- $\lambda$ 3 mostrou uma forte associação com cura espontânea e sucesso na resposta ao tratamento na infecção pelo HCV. Entretanto, a influência do polimorfismo no *IFNL3* na resposta ao tratamento para HIV é controversa. Visando investigar associação entre SNP no *IFNL3* com a resposta ao tratamento para HIV, assim como seu efeito nos marcadores de superfície de células NK foram realizados respectivamente dois estudos resultando em dois artigos intitulados: **“Genótipos CC/CT do *IFNL3* rs12979860 como marcadores genéticos na resposta imunológica e virológica à TARV em pacientes brasileiros infectados com HIV”**, realizado em uma amostra constituída por 266 pessoas vivendo com HIV/AIDS, submetidas à TARV por 12 meses e atendidas no Hospital Correia Picanço (HCP), sendo 30 não respondedores a TARV, e 236 respondedores imunológico e/ou virológico apresentando aumento de T CD4<sup>+</sup> e carga viral indetectável. Em um modelo de regressão logística multivariada os genótipos CC/CT rs12979860 do *IFNL3* ( $p= 0,027$  OR 2,52 IC 1,02-6,21) e níveis baixos de T CD4<sup>+</sup> ( $p= 0,002$  OR 0,997 IC 0,995-0,999, respectivamente) antes da terapia foram independentemente associados à resposta virológica e imunológica a TARV. Dessa maneira, a presença dos genótipos CC/CT rs12979860 no *IFNL3* foram associados a um efeito positivo para a resposta imunológica e virológica a TARV, o que pode ser explorado como um possível marcador genético de resposta considerando o período de 12 meses. No segundo artigo, **Associação do polimorfismo do gene do *IFNL3* e aumento da expressão de CD69 em células NK de pessoas vivendo com HIV sem TARV**, foi explorada a hipótese de que os genótipos CC/CT estariam relacionados com uma maior ativação das células NK. Desta forma, o estudo foi constituído por 25 pessoas vivendo com HIV (PVHA) sem TARV, atendidas no HCP, e por 25 indivíduos sem HIV (controle), atendidas no Centro

de Testagem e Aconselhamento (CTA), localizado na cidade do Cabo, PE, onde foi comparada a diferença do número da população de células NK e marcadores de ativação entre esses grupos. Os resultados mostraram um aumento da subpopulação NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e diminuição de NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ), assim como aumento dos marcadores HLA-DR e CD38 em ambas subpopulações em PVHA quando comparados com o controle. Quanto ao polimorfismo do *IFNL3* e a ativação de NK, foi observada uma relação entre a expressão de CD69 e os genótipos CC/CT, porém os marcadores HLA-DR e CD38 não mostraram diferenças de expressão em relação a essa SNP. Em conclusão, o presente estudo mostra evidências que apoiam a influência do polimorfismo do *IFNL3* na resposta ao tratamento do HIV e na ativação de células NK em PVHA.

Palavras-chave: Polimorfismo. Interferon. Células NK. HIV. Tratamento.

## ABSTRACT

---

---

The human immunodeficiency virus (HIV) infection compromises the human immune system progressively, leading to depletion of CD4<sup>+</sup> T cells and their functions, characterizing the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The innate response is crucial to establish an antiviral state, maintaining the virus and the host balance. Type III interferons also called lambda interferon (IFN- $\lambda$ 1 or IL-29, IFN- $\lambda$ 2,  $\lambda$ 3 or IL-28b) as well as NK cells, develop an important control of viral replication. The single nucleotide polymorphism (SNP) in *IFNL3* gene, which encodes IFN- $\lambda$ 3, showed a strong association with spontaneous clearance and successful therapy in HCV infection. However, the influence of *IFNL3* polymorphism on the treatment response to HIV is controversial. Therefore, this study aimed to investigate the association between the SNP in *IFNL3* with response to treatment for HIV, as well as its effect on surface markers of NK cells, which resulted in two articles. In the first one, entitled ***IFNL3* CC/CT genotypes at rs12979860 as genetic marker for the immunological and virological response to HAART in HIV Brazilian infected patients**, we investigated the effect of *IFNL3* polymorphism in the immunologic and/or virologic response to HAART, employing a sample of 266 people living with HIV/AIDS undergoing HAART for 12 months, which 30 were non-responders and 236 responders regarding the immunological and/or virological increase of CD4<sup>+</sup> T cell and/or no detectable HIV viral load. In a multivariate logistic regression model, low number of CD4<sup>+</sup> T cell before HAART ( $p=0.002$  OR 0.997 CI 0.995 to 0.999) and the CC/CT rs12979860 *IFNL3* were independently associated with immunological and/or virological response to HAART ( $p=0.027$  OR 2.52 CI 1.02 to 6.21). This finding supports the importance of the *IFNL3* CC/CT as genetic marker of response to HAART in the period 12 months. Enabling, in the second study, entitled **Association of *IFNL3* gene polymorphism and increased expression of CD69 on NK cells subsets in ART-naïve HIV infected individuals**, we explored the hypothesis that the CC/CT genotypes were also associated with greater activation of NK cells. Thus, we conducted a study with 25 people living with HIV/AIDS ART-naïve and 25 individuals HIV negative, comparing the difference in numbers of NK cells population and activation markers among these groups. The results showed an increase in NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and decreased in NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p<0.001$ ), as well as increased expression on activation markers HLA-DR and CD38 on both subpopulations in HIV/AIDS ART-naïve group compared to control. Regarding

the polymorphism of *IFNL3* and activation of NK cells, we observed association between the expression of CD69 and genotypes CC/CT but no differences regarding HLA-DR and CD38 expression and this SNP. In conclusion, the present study provides evidence supporting the IFNLuence of polymorphism *IFNL3* in response to HIV treatment and activation of NK cells in people living with HIV/AIDS.

Keywords: Polymorphism. Interferon. NK cells. HIV. Treatment.

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 1 - Características clinico-epidemiológicas de PVHA com falha na resposta a TARV e com resposta virológica e/ou imunológica .....	44
Tabela 2 - Associação entre alelos e genótipos do IFNL3(rs 1297860) com não resposta (NR) e resposta imunológica e/ou virológica (RIV) em PVHA submetidas a TARV ...	45
Tabela 3 - Polimorfismo do IFNL3 (rs12979860) e sua associação com as variáveis dependentes CD4 + CV em pessoas submetidas a TARV .....	45

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Exemplo de gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária.....	57
Figura 2 - Estratégia para análise de células NK e seus marcadores na citometria de fluxo.....	57
Figura 3 - Estratégia para análise de células CD56 e CD16.....	58
Figura 4 - Análise por citometria de fluxo mostrando Contour Plot representativo que definem as células NK CD3-CD56+ e suas subpopulações.....	59
Figura 5 - Resultados da citometria de fluxo da subpopulação NK CD56+CD16-e expressão de marcadores de ativação HLA-DR, CD38 e CD69 .....	61
Figura 6 - Resultados da citometria de fluxo da subpopulação NK CD56+CD16+ e expressão de marcadores de ativação HLA-DR, CD38 e CD69 .....	62
Figura 7 - Associação do polimorfismo <i>IFNL3</i> com os marcadores de ativação de subpopulações das células NK .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
APC – Allophycocyanin  
BD- Becton Dickinson  
CD4 – Linfócitos T CD4  
CD8 – Linfócitos T CD8  
CD3 – Linfócitos T  
CD38 – Molécula indutora de ativação  
CD69 – Molécula indutora de ativação  
CTA – Centro de Testagem e Aconselhamento  
CV – Carga viral  
CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ELISA – Ensaio imunoenzimático  
FITC - Isocianato de fluorescêina  
HAART – Terapia Antirretroviral de Alta Atividade.  
HBV – Vírus da hepatite B  
HCV – Vírus da hepatite C  
HCP – Hospital Correia Picanço  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA - Antígeno Leucocitário Humano  
IC95% – Intervalo de confiança de 95%  
IL – Interleucina  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IFN- $\alpha$  – Interferon alfa  
IFN- $\lambda$  – Interferon lambda  
IN –Imunidade inata  
ISRE – Elementos de respostas estimulados por INF  
RIV – Respostas imunológica e/ou virológica  
KIR - Receptores de imunoglobulinas assassinas  
LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MIP 1 $\alpha$ - Proteína inflamatória de macrófago 1 $\alpha$

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

NCR - Receptores de citotoxicidade naturais

NK – Células Natural Killer

NR - Não respondedor

PE – Ficoeretrina

Pecy7- Allophycocyanin-Cy7

PerCP- Peridina-clorofila

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pDC –Células dendríticas plasmocitóides

PVHA – Pessoas Vivendo com HIV/AIDS

RNA – Ácido ribonucleico

RANTES- Quimiocina expressa e secretada por célula T normal e regulada por ativação

SLT – Tecido linfóide secundário

SIV – Vírus da imunodeficiência símia

SVR – Resposta virológica sustentada

TARV – Terapia antirretroviral

TGF- $\beta$ 1 – Fator de crescimento transformante-beta 1

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TCLE – Termo de Compromisso Livre Esclarecido

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UPE – Universidade de Pernambuco

## SUMÁRIO

---

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 Aspectos imunopatogênicos da infecção pelo HIV .....	21
2.2 Interferon Lambda ( <i>IFNL3</i> ).....	26
2.3 Células Natural Killer (NK) .....	28
3 HIPÓTESES .....	32
4 OBJETIVOS .....	32
4.1 Geral .....	32
4.2 Específicos.....	32
5 METODOLOGIA.....	33
5.1 Desenho do estudo.....	33
5.3 População do estudo .....	34
5.4 Variáveis.....	34
5.4.1 Variáveis independentes .....	34
5.4.2 - Variáveis dependentes.....	35
5.5 Operacionalizações da pesquisa.....	36
5.5.1 Técnicas utilizadas.....	37
5.6 Considerações éticas.....	39
5.7 Análise estatística .....	39
6 RESULTADOS .....	40
6.1 Resultados - Estudo I.....	40
6.2 Resultados - Estudo II .....	52
7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	71
REFERÊNCIAS .....	72
APÊNDICES .....	81
Apêndice A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	81
Apêndice B – FORMULÁRIO DA PESQUISA.....	83
Apêndice C – VERSÃO DO ARTIGO I EM INGLÊS.....	85
Apêndice D – VERSÃO DO ARTIGO II EM INGLÊS .....	98
ANEXOS .....	115
Anexo A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	115

Anexo B – CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN-PE.....	115
Anexo C – CARTA DE ANUÊNCIA DO HCP .....	117
Anexo D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO AIDS Patient Care and STDs .....	118
Anexo E – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO JOURNAL OF VIROLOGY .....	124

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) compromete progressivamente o sistema imunológico em humanos, levando a depleção das células T CD4+ e suas funções, caracterizando a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Ao longo de três décadas de estudos sobre HIV/AIDS, as pesquisas têm avaliado os mecanismos responsáveis pelo comprometimento do sistema imunológico, durante a evolução da infecção, porém ainda restam indagações sobre o fato de alguns pacientes evoluírem rápido para AIDS, enquanto outros evoluem lentamente; como também parceiros com diagnóstico discordantes para a infecção, assim permanecem por longos períodos de tempo (TOMESCU et al., 2011). Acredita-se que a diversidade genética do hospedeiro exerce uma função importante na evolução da infecção causada pelo HIV, assim como, a resposta imunológica e a diversidade viral (MARTIN et al., 2013; CARRINGTON, 2013).

A imunidade inata (IN) é a primeira linha de defesa contra infecções, sendo responsável por conter o avanço inicial dos patógenos e ativar a resposta específica contra os mesmos. Esse primeiro contato pode ser determinante para estabelecer um estado antiviral suficiente para manter uma relação relativamente equilibrada entre vírus e hospedeiro. Na literatura estudos sugerem que a resposta inata desempenha importante papel na evolução da doença tornando de fundamental importância o estudo de células e moléculas que possam ativa-la, fornecendo subsídios para desenhar novas estratégias na conduta clínica e terapêutica dos pacientes (BORROW et al., 2010).

Os interferons tipo I e III, assim como as células NK, são componentes da IN que desenvolvem papéis importantes no controle da replicação viral (BOASSO; SHEARER, 2008).

A descoberta do interferon (IFN) tipo III é relativamente recente (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003). A família de IFNL possui três membros: IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) e IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) que estruturalmente, se assemelham a IL-10, porém são funcionalmente semelhantes à família de interferons tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), devido sua capacidade de ativar os ISRE (elementos de respostas estimulados por IFN) e possuem atividade antiviral (RENALD, 2003).

Estudos recentes em pacientes com hepatite C têm associado à presença do polimorfismo do gene *IFNL3*, genótipo CC, com o controle do vírus (SUPPIAH et al., 2009;

TANAKA et al., 2009; GE et al., 2009; THOMAS et al., 2009; RAUCH et al., 2010). A relação desse polimorfismo com outros vírus está sendo estudada, entre eles o HIV.

Martin et al (2010) realizaram estudo em pacientes americanos com hepatites C, B e com HIV e identificaram associação do polimorfismo apenas com o controle do HCV; Salgado et al (2011) e Sadaji et al (2011) realizaram estudo na população de afro americanos HIV+ e não evidenciaram associação do polimorfismo do *IFNL3* com o controle do HIV.

Em 2013, Machmach et al, publicaram estudo realizado com indivíduos espanhóis brancos que evidenciaram uma associação entre o referido polimorfismo do gene *IFNL3* do SNP rs12979860 com o controle da infecção pelo HIV.

Na população brasileira poucos estudos foram publicados e evidenciaram apenas associação com o controle do HCV (LUNGE et al.,2012; FERREIRA et al.,2012), constatando assim, a necessidade de maiores investigações em relação a associação do polimorfismo do gene *IFNL3* com o controle do HIV em diferentes populações.

O comportamento das células NK também tem sido objeto de estudo, uma vez que ativam o sistema imune, estando diretamente associadas com o controle das células tumorais e infectadas por vírus. O comprometimento da funcionalidade das células NK pode contribuir com a progressão da infecção pelo HIV (HENACH et al., 2010).

Considerando a hipótese de moléculas da IN interferirem na evolução da infecção pelo HIV, neste estudo, investigamos se a presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene *IFNL3* (rs12979860) estaria relacionada com as respostas imunológica e virológica em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) submetidas a terapia antirretroviral (TARV) e ativação das células NK, em PVHA sem TARV. Resultando em dois artigos apresentados nesta tese: **Artigo I** (Apêndice C) : **Genótipos CC/CT do *IFNL3* rs12979860 como marcadores genéticos na resposta imunológica e virológica à TARV em pacientes brasileiros infectados com HIV** foi analisada a associação do polimorfismo do gene *IFNL3* (rs12979860) com as respostas imunológica e virológica em PVHA submetidas à TARV; e o **Artigo II** (Apêndice D): **Associação do polimorfismo do gene do *IFNL3* e aumento da expressão de CD69 em células NK de pessoas vivendo com HIV sem TARV** foi verificada a associação do polimorfismo do gene *IFNL3* (rs12979860) e ativação das células NK em PVHA sem TARV.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir estão relacionados três tópicos que constituirão a revisão da literatura do estudo realizado.

### 2.1 Aspectos imunopatogênicos da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV atinge cerca de 35,3 milhões de pessoas no mundo sendo o vírus do tipo 1 (HIV-1) o responsável majoritário por essa pandemia. (UNAIDS, 2013).

No Brasil, estima-se que do início da epidemia da AIDS até junho de 2014, foram registradas aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS. A taxa de detecção da AIDS no Brasil tem apresentado estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,5 casos para cada 100 mil habitantes, porém as regiões Norte (N), Nordeste (NE) e Centro-Oeste (CO) apresentam uma tendência linear de crescimento significativo; em 2004, a taxa registrada foi de 15,0 (N) 11,0(NE) e 18,7 (CO) casos para cada 100 mil habitantes, enquanto que em 2013 a taxa foi de 26,1 (N), 16,0 (NE) e 20,3 (CO) (BRASIL, 2014). De acordo com o relatório das Nações Unidas publicado em 2014 houve um crescimento de 11% na estimativa de pessoas vivendo com HIV e AIDS no Brasil de 2005 a 2014. A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde justificou que a epidemia no Brasil é concentrada, isso significa que, apesar de apresentar uma prevalência do HIV baixa na população em geral (0,4%), a relação entre o número de pessoas infectadas e a população geral, em alguns grupos prioritários - homens que fazem sexo com homem, profissionais do sexo, travestis, usuários de drogas, pode ser maior que 10%. (BRASIL, 2013).

Em Pernambuco, de acordo com a coordenação estadual do programa DST/AIDS, o número de novos casos cresceu em torno de 4%. Em números absolutos, cerca de 20.394 pessoas vivendo com HIV/AIDS, sendo 13.259 do sexo masculino e 7.135 do sexo feminino, desde o início da epidemia em 1983 até julho de 2014 e a faixa etária mais atingida são os adultos jovens de 20 a 49 anos (Boletim epidemiológico-PE, 2013)

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel central no desenvolvimento da resposta imune específica contra o vírus, e a perda progressiva no número dessas células favorece o estabelecimento do quadro de imunodeficiência grave observada nos pacientes HIV+ (PANTALEO et al., 1995). Dessa forma, a contagem das células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico

é o principal parâmetro imunológico utilizado no acompanhamento da infecção pelo HIV-1, contribuindo para a avaliação da progressão da doença, início de profilaxias para as doenças oportunistas e início da terapia antiretroviral (TARV) ou HAART do inglês “highly active antiretroviral therapy”, além de ser utilizada na avaliação da reconstituição imune pós-tratamento (MILLER et al., 1999). Em adição à perda quantitativa, o prejuízo qualitativo da função das células T CD4<sup>+</sup> também tem implicações importantes para a falência imunológica observada na AIDS (DOUEK et al., 2002).

O HIV-1 infecta as células que expressam a molécula CD4, como monócitos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas e células microgliais do sistema nervoso central. Utiliza como receptor principal para penetrar nas células a glicoproteína de 120 kD (gp120) do envelope viral. Em adição à molécula CD4, a entrada do HIV-1 na célula também requer moléculas co-receptoras. Os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 foram identificados como principais co-receptores para a entrada de cepas do HIV com tropismo para macrófagos (R5) e linhagem linfocítica (X4), respectivamente, na célula alvo (DENG et al., 1996).

Durante a infecção aguda pelo HIV-1, uma intensa replicação viral é observada, alcançando níveis de 100 milhões de cópias de RNA/ml de plasma, ainda em ausência de uma resposta imune celular específica (HOFFMAN et al., 2005). Neste período, bastante inicial de replicação do vírus, ocorrem processos importantes como a disseminação do vírus para uma grande variedade de tecidos linfóides secundários, que funcionarão como reservatórios virais (PANTALEO et al., 1993). Deste modo, a quantificação do HIV no sangue periférico, ou carga viral (CV) plasmática, é outro importante marcador laboratorial para o acompanhamento da infecção e monitoramento da eficácia da TARV sobre a replicação do vírus (GEA-BANACLOCHE et al., 1999).

Alterações importantes são observadas em células T CD8<sup>+</sup> no período inicial da infecção, ainda na fase aguda, observa-se um aumento das contagens absolutas de células T CD8<sup>+</sup>, que persistem durante a fase assintomática. Este aumento inicial, em parte, é resultado da indução de uma intensa resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1, a qual coincide com a supressão inicial da viremia para na maioria dos pacientes, mas também pode ser pelo processo de ativação generalizada do sistema imune (LAWN et al., 2001).

Evidências apontam possíveis mecanismos envolvidos com a infecção pelo HIV-1 e o início da imunodeficiência, ativação imunológica crônica e a inflamação causada pelo HIV. Paradoxalmente, os níveis de ativação do sistema imune estão diretamente associados com a

progressão da doença podendo estar relacionada as três principais facetas da infecção causada pelo HIV-1: a destruição maciça de células T CD4+, a ativação imunológica paradoxal e o esgotamento da capacidade regenerativa (APPAY; SAUCE, 2008).

Ativação imune na infecção pelo HIV-1 é um processo bastante amplo que abrange uma grande variedade de eventos moleculares e celulares ativos e suas consequências. Indivíduos infectados exibem marcadores elevados de ativação e / ou apoptose em células T CD8<sup>+</sup> e de CD4<sup>+</sup> assim como células B, células NK e monócitos (GROUX et al., 1992; FINKEL et al., 1995). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) no plasma e dos gânglios linfáticos, também são observadas a partir dos estágios iniciais da infecção pelo HIV-1 (WEISS et al., 1989; APPAY; SAUCE, 2008).

A secreção de quimiocinas, tais como a, MIP-1 e RANTES está aumentada nos pacientes infectados pelo HIV-1 (CANQUE et al., 1996; COTTER et al., 2001). Este ambiente de desorganização do sistema imune pode ser reconhecido nos indivíduos infectados por uma variedade de alterações fenotípicas observadas nas células T, nas células B, NK e monócitos, como o aumento da expressão de moléculas de superfície associadas à ativação do sistema imune. Essa expressão, em especial da molécula CD38, está associada à progressão da doença, e a avaliação periódica do fenótipo dessas células pode auxiliar no monitoramento da infecção. Alguns estudos demonstraram que a fração CD38<sup>+</sup> das células T CD8<sup>+</sup> assim como das células NK, aumenta progressivamente com o avanço da doença e que este aumento está associado com o declínio de células T CD4<sup>+</sup> totais e aumento da carga viral plasmática (BENITO et al., 1997; GIORGI et al., 2002; BENITO et al., 2004; KURI-CERVANTES et al., 2014). Tais níveis de células CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> diminuem com a supressão da replicação viral obtida pela TARV que teve início em 1989 com introdução da zidovudina (AZT), seguida das diversas drogas e esquemas terapêuticos implementados desde então.

A TARV combina drogas que atuam em pontos chave da produção do HIV, suprimindo a replicação viral. Com isto, ocorre uma restauração tanto quantitativa quanto qualitativa das células T CD4<sup>+</sup>, levando, conseqüentemente, à recuperação da resposta imune protetora contra uma grande variedade de patógenos (DEAYTON et al., 2002 BENITO et al., 2004;).

Benito et al. (1997) também demonstraram que a molécula do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II, o HLA-DR também está relacionada com a

ativação celular, e cujo aumento também se correlaciona à queda das células T CD4<sup>+</sup> circulantes, assim como o marcador CD69 que está relacionado com ativação de células NK em fase aguda da infecção (BENLAHRECH et al., 2009).

Outra evidência do papel paradoxal da ativação imune na infecção pelo HIV foi trazida por estudos em primatas infectados com vírus da imunodeficiência símia (SIV). Macacos *Rhesus* que, como os humanos infectados por HIV, sofrem progressiva depleção de células CD4<sup>+</sup> e evoluem para AIDS, apresentam forte ativação de células T. Em contraste os macacos mangabeis e macacos verdes africanos, os hospedeiros naturais do SIV, não desenvolvem imunodeficiência e exibem ativação das células T mínima apesar da replicação viral evidente (SILVESTRI et al., 2003). Outra observação interessante vem do estudo da infecção pelo HIV-2 realizado por Leligdowicz et al (2007), o qual relata que a maioria dos indivíduos HIV-2 infectados apresentam uma progressão da doença leve ou lenta, além de baixa carga viral e normalmente exibem ativação imune significativamente menor quando comparados com indivíduos HIV-1 infectados.

Durante a infecção pelo HIV-1, o estabelecimento de ativação imunológica e inflamação envolvem vários mecanismos que estão, quer direta ou indiretamente, relacionadas com a replicação viral. A causa comum de ativação de células T durante uma infecção é a estimulação antigênica com o vírus, que é à base da resposta imunológica adaptativa. Durante a infecção primária, o HIV-1 induz respostas fortes de células T, em particular de células T CD8<sup>+</sup>, que podem persistir durante a fase de infecção crônica devido à replicação contínua do vírus (SODORA ; SILVESTRI.,2008)

Brenchley et al (2006), trouxeram à tona outro mecanismo que pode ser central na patogênese do HIV e envolve a ativação do sistema imune inato. O esgotamento massivo de células T CD4<sup>+</sup> e possivelmente, dos macrófagos e células dendríticas em tecidos linfoides das mucosas pode resultar no comprometimento das funções dos diferentes componentes do sistema imunológico que constituem a barreira imune na mucosa do intestino, esta barreira normalmente impede a translocação da flora que habita o trato intestinal e restringe esses patógenos para a lâmina própria e linfonodos mesentéricos. O comprometimento da integridade da mucosa, por conseguinte, resulta na translocação microbiana a partir do intestino para o sistema imunológico sistêmico. Curiosamente, a infecção por HIV-1 está associada com um aumento significativo dos níveis lipopolissacarídeo (LPS) no plasma, um indicador de translocação microbiana, que é diretamente correlacionado com medidas de

ativação imunológica. A evidência de translocação de produtos bacterianos é altamente provável que resulte em uma profunda ativação da resposta imune inata (BRENCHLEY et al., 2006)

Aumento da ativação de células T e hiperplasia linfóide sugere que a ativação de células T crônica persiste em hospedeiros imunocomprometidos e contribuem para o esgotamento das funções imunológicas sugerindo que a ativação crônica da imunidade inata pode afetar negativamente a resposta adaptativa mediada por células, levando a crer que a exposição constante das células efetoras pode resultar em um hiperativação crônica, com efeitos deletérios sobre as células T. Em particular, as células dendríticas plasmocitóides (pDC), podem ser altamente suscetíveis ao HIV induzidas por ativação, devido à sua interação com o receptor CD4. Subsequente produção de interferon tipo I e indolamina 2,3-dioxigenase podem exercer efeitos supressivos e citotóxicos sobre as células T (BOASSO, 2008).

Entre as moléculas que participam da resposta inata, os interferons (INFs), constituem a primeira linha de defesa contra as infecções virais, incluindo o HIV-1. Os interferons são classificados em três classes distintas: **IFN tipo I** consistem em dois grupos distintos de proteínas IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  que protegem contra infecções virais diretamente através da inibição da replicação do vírus nas células e indiretamente, estimulando a resposta imune inata e adaptativa. O IFN- $\alpha$  está em uso clínico como agente antiviral nas hepatites C e B. O IFN- $\beta$  é usado como terapia para esclerose múltipla, mas o mecanismo do seu efeito benéfico nessa doença não é conhecido (ABBAS, 2005). **IFN tipo II**, consistem em um único tipo, IFN- $\gamma$ , que é uma proteína produzida por células NK, Th1 CD4+ e TCD8+, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa, porém não é um INF de atividade antiviral potente, age principalmente como uma citocina efetora da resposta imune (ABBAS, 2005). Recentemente, uma nova classe de citocinas foi descoberta o **IFN tipo III**, também chamado de interferon lambda (IFN $\lambda$ ) ou interleucina 28/29 (IL28/29) que tem estrutura semelhante a IL10, porém tem atividade funcional semelhante ao IFN tipo I (KOTENKO et al., 2003).

Os interferons tipo I e II apresentam atividade antiviral efetora contra uma variedade de vírus, inclusive o HIV-1, porém quanto ao interferon tipo III ou lambda ainda não está clara a sua capacidade de inibir a infecção pelo HIV-1 (HOU et al., 2009).

## 2.2 Interferon Lambda (*IFNL3*)

A família de IFN  $\lambda$  possui três membros: IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) e IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), os quais são codificados por genes agrupados no cromossomo humano 19, que estruturalmente assemelham-se a IL-10, porém são funcionalmente semelhantes à família de interferons tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), devido sua capacidade de ativar os elementos de respostas estimulados por IFN (ISRE) e possuem atividade antiviral (RENALD et al., 2003). O IFN- $\lambda$ 1 possui 5 éxons e os IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 possuem 6 éxons. O IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 possuem 96% de homologia. O padrão conservado de cisteína e o perfil anfipático dos IFNs- $\lambda$  sugerem que estes pertencem a uma família de citocinas helicoidais (SHEPPARD et al., 2003). Provavelmente o IFN- $\lambda$  represente uma ligação evolutiva entre a IL-10 e os IFNs tipo I (CHEN; CARROLL; GADINA, 2006).

Baixos níveis de IFN- $\lambda$  foram detectados em sangue humano, cérebro, pulmão, ovário, pâncreas, pituitária, placenta, próstata, e testículos (SHEPPARD et al., 2003). Assim como os interferons tipo I, os IFNs III também podem ser induzidos em diversas linhagens celulares por dsRNA ou depois de infecção com citomegalovírus, vírus A da influenza, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), e vírus da estomatite vesicular (BRAND et al., 2005; JEWELL et al., 2010; ROBEK et al., 2005; ANK et al., 2006; ONOBUCHI et al., 2007).

Apesar de aparentemente qualquer célula infectada por vírus expressar INF- $\lambda$ , células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares parecem ser os maiores produtores (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003). A expressão de membros da família de INF- $\lambda$  é induzida em ambas as células hematopoiéticas e não hematopoiéticas por diversos vírus que infectam humanos (WITTE et al., 2010).

O receptor do IFN- $\lambda$  é amplamente distribuído em células epiteliais o que sugere que a família de IFN- $\lambda$  evoluiu especificamente para proteger o epitélio da invasão viral (SOMMEREYNS et al., 2008). No entanto, ainda não está claro se o IFN- $\lambda$  tem a capacidade de inibir a infecção pelo HIV-1. Dados publicados por Liu et al. (2012), afirmam que o IFN- $\lambda$ 3 parece exercer a sua função antiviral, em relação ao HIV, pela ativação da via JAK-STAT mediada pela imunidade inata em macrófagos.

O receptor de interferon tipo III é composto por IFN- $\lambda$ R1, o qual é específico para IFN- $\lambda$  e a cadeia acessório IL-10R2, que faz parte dos receptores para IL-10, IL-22 e IL-26 (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003; LANGER; CUTRONE; KOTENKO, 2004). A ativação desses receptores inicia a cascata de uma série de genes associados à inibição da replicação viral, inibição de crescimento celular e apoptose (MAHER, 2008). Apesar dos receptores dos IFNs tipo I e tipo III serem independentes, eles desencadeiam respostas notavelmente semelhantes, principalmente por meio da ativação de transdutor e ativador de transcrição de sinal 1 (STAT-1) e STAT-2, e, em menor medida, a de STAT-3 (DUMOUTIER et al., 2004; BRAND et al., 2005; ZHOU et al., 2007; LASFAR et al., 2006).

Estudos relataram a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) próximo ao IFN- $\lambda$ 3, também conhecido como *IFNL3*, sendo os rs12979860 e rs8099917 fortemente associados com a resposta à terapia em pacientes infectados com o HCV, assim como na eliminação natural do HCV (GE et al., 2009; SUPPIAH et al., 2009). Para o rs12979860, o alelo C está relacionado a bons respondedores e o alelo T a não respondedores. Para rs8099917, o alelo de resposta é identificado como T e o alelo de não respondedores como G. Estudos recentes em pacientes com hepatite C têm associado à presença do polimorfismo do gene *IFNL3* rs12979860, genótipo CC, com o controle do vírus (GE et al., 2009; SUPPIAH et al., 2009; TANAKA et al., 2009; RALLON et al., 2010; RAUCH et al., 2010). A correlação desses SNPs foi também evidenciada em indivíduos com HCV e coinfectados com HIV (RALLON et al., 2010; RAUCH et al., 2010).

Para elucidar se existe alguma associação desse polimorfismo com o controle da infecção pelo HIV, alguns estudos foram realizados em populações americanas de origem africana não sendo evidenciada associação do polimorfismo do gene *IFNL3* com o controle da infecção nessa população (MARTIN et al., 2010; SALGADO et al., 2011; SAJADI et al., 2011).

Martin et al. (2010) realizaram estudo em indivíduos co-infectados com HBV e HIV, a fim de verificar se havia associação do polimorfismo do gene *IFNL3* no SNP rs12979860 com infecção e progressão dessas doenças. Não foi encontrada associação do polimorfismo com a recuperação dos pacientes com HBV e resistência e/ ou progressão da infecção pelo HIV.

Em 2011, Salgado et al. realizaram estudo em um grupo afro-americano, constituído por 25 pessoas vivendo com HIV que controlavam naturalmente a infecção, dos quais 13 eram co-infectados HIV/HCV. Apenas 16% (04/25) possuíam genótipo CC, similar à frequência de pessoas infectadas pelo HIV-1 com carga viral maior que 10.000 cópias/ml. Esta falta de super-representação do genótipo de proteção C/C em controladores de elite em comparação com os pacientes com alta viremia, sugeriu que o SNP *IFNλ3* não desempenha um papel significativo no controle viral nas pessoas consideradas controladoras de elite da replicação do HIV-1 na população afro-americana.

Sajadi et al. (2010) observaram indivíduos que controlavam a replicação do HIV-1 sem TARV, quando infectados pelo HCV. Este mesmo grupo realizou estudo com 172 pessoas afro americanas vivendo com HIV -1 não sendo encontrada associação com o polimorfismo rs12979860, genótipo CC com a referida eliminação.

Rallon et al. (2010) analisaram a prevalência polimorfismo do gene *IFNL3* no SNP rs12979860 em indivíduos vivendo com HIV-1 brancos não progressores e em indivíduos soronegativos expostos ao HIV e não encontraram associação do genótipo CC com a progressão da doença pelo HIV ou proteção contra o HIV.

Entretanto, em uma população caucasiana, Machmach et al. (2013), estudaram PVHA e relataram que a frequência de *IFNλ 3* genótipo CC foi superior em 53 controladores do HIV, que tiveram carga plasmática do HIV-1 menor que 1000 cópias/ mL na ausência de TARV em relação aos 389 em uso de TARV, não controladores, com carga viral maior que 1000 cópias/mL. Sendo o primeiro trabalho publicado a encontrar associação entre o referido polimorfismo e o controle espontâneo do HIV.

Na população brasileira, Ferreira et al. (2012) e Lunge et al. (2012), realizaram estudos em pessoas co-infectadas HCV/HIV, das regiões Sudeste e Sul respectivamente e evidenciaram associação do genótipo CC com o controle do HCV. Constatando assim, a necessidade de maiores investigações em relação à associação do polimorfismo do gene *IFNL3* com o controle do HIV em diferentes populações.

### 2.3 Células Natural Killer (NK)

O comportamento das células NK, também tem sido objeto de estudo na imunopatogenia do HIV, uma vez que ativam o sistema imune, estando diretamente

associadas com o controle das células tumorais e infectadas por vírus. O comprometimento da funcionalidade das células NK pode contribuir com a progressão da infecção pelo HIV (HONG et al., 2010).

As células NK, são grandes linfócitos granulares encontrados no sangue periférico e em vários órgãos, não expressam receptores de superfície típicos dos linfócitos T (TCR) e B (BCR). São populações de linfócitos inatos ativados e capazes de mediar funções efetoras (citotoxicidade, imunomoduladora) importantes na resposta inata contra infecções virais e células tumorais. Em indivíduos saudáveis, elas constituem de 10-15% dos linfócitos circulantes (LANIER et al., 2005).

Desde a sua identificação em 1975 (HERBERMAN et al., 1975) foram denominadas como células nulas, devido à suposta ausência dos referidos receptores. Considerando a sua capacidade natural para lisar as células malignas sem a necessidade de sensibilização antigênica foram chamadas de células assassinas naturais e colocadas no braço inato do sistema imunológico, sendo inicialmente consideradas não específicas nas suas interações com células tumorais ou células infectadas por vírus. No entanto, nas últimas décadas, estudos têm comprovado que as células NK são muito mais complexas, estando envolvidas no controle e eliminação de células malignas e infectadas por vírus, regulação das respostas imunológicas adaptativas, rejeição de transplantes de medula óssea, autoimunidade e manutenção da gravidez. Assim, ficou evidente que as células NK são mais do que assassinas simples, mas têm um papel multifacetado no sistema imunitário (ALTER; ALTFELD, 2009).

A atividade citotóxica das células NK pode aumentar cerca de 20 a 100 vezes em resposta a IL-12, derivada dos macrófagos, conhecida como fator de ativação das células NK, que estimulam a produção de citocinas por estas células. Dentre essas, os IFN- $\alpha$ / $\beta$  que favorecem seus efeitos citotóxicos. Dessa maneira, a população de células NK é a mais importante produtora de interferons no início da infecção, ativando os macrófagos a secretarem citocinas que iniciam a resposta imune adaptativa dos linfócitos T. Quando os linfócitos T assumem suas funções, as células NK têm atividade suprimida pela produção de IL-10 (SARAIVA et al., 2010).

As células NK estão equipadas com uma variedade de receptores que podem influenciar sua reatividade que são responsáveis por diversas funções como a de ativação e inibição da atividade celular, adesão celular e de função quimiotática (MORETTA et al., 2001). As principais classes de receptores incluem os receptores de imunoglobulinas

assassinas (KIR), que se ligam as moléculas de MHC como, as lecitinas do tipo C, os receptores de citotoxicidade (naturais NCR) que ligam hemaglutininas virais, e o receptor de Fc $\gamma$ RIIIa (CD16), que se ligam à região Fc do anticorpo IgG. Os KIRs se ligam as moléculas de classe I do MHC, existentes nas células normais, gerando sinais intracelulares que causam a inibição de fatores específicos de transição. Isto resulta na inibição da ativação das células NK. As células infectadas por vírus ou tumorais, apresentam número significativamente menor de moléculas de classe I do MHC em sua superfície, não permitindo uma ligação efetiva aos KIRs tornando-se suscetíveis à citotoxicidade mediada por células NK (LANIER, L.L, 2005). Assim como os receptores KIRs, outros receptores CD94/NKG2 podem sinalizar de forma positiva e negativa, as funções das células NK. Os receptores inibitórios são os melhores caracterizados, porém grande parte de sua biologia funcional permanece indefinida. Estes receptores são expressos diferencialmente entre os diferentes subconjuntos de células NK e conferem a capacidade para responder de forma seletiva ao encontro com uma célula alvo (BIASSONI et al., 2001).

São reconhecidos três grupos de receptores para IgG humana nas superfícies celulares: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16). O receptor de Fc presente na membrana das células NK reconhecem IgG que estão ligadas à superfície de uma célula-alvo, sendo chamado CD16 ou Fc $\gamma$ RIIIa. A ativação de Fc $\gamma$ RIIIa por IgG provoca a liberação de citocinas como INF- $\gamma$  e de mediadores citotóxicos perforina e granzima presentes no interior da NK, que penetram na célula-alvo e promovem a morte celular, desencadeada por apoptose. Portanto, a molécula CD16 é comumente utilizada como marcador para identificar NK em populações purificadas de linfócitos estando envolvido em uma de suas vias de ativação, e também está presente em neutrófilos e macrófagos (CALIGIURI et al., 2008).

As células NK expressam as moléculas CD16 e CD56, que podem ser usadas para distingui-las de outros tipos celulares. No entanto, as NK não constituem uma população de células homogêneas podendo ser subdivididas em diferentes populações definidas pela expressão relativa dos marcadores CD16 ou Fc $\gamma$ RIIIa, receptor de baixa afinidade para a porção Fc da Imunoglobulina G (IgG) e CD56 (molécula de adesão). Com base em seus marcadores de superfície CD56 e CD16 podem ser divididas em subgrupos, sendo os dois maiores formados por NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (POLI et al., 2009). A identificação das diversas populações de células NK tem sido realizada através do uso de anticorpos monoclonais e técnicas moleculares.

Considerando as diversas funções desenvolvidas pelas células NK no sistema imunológico, e a importância na ativação das respostas tanto inata como adaptativa, as células NK passaram a ser alvo de pesquisa em muitas patologias, sendo a infecção causada pelo HIV uma delas. Embora a importância das células NK em algumas infecções virais já esteja bem documentada, o seu papel na proteção e controle da infecção por HIV-1 ainda não está claro.

Na infecção pelo HIV-1 ocorrem alterações significativas na distribuição das células NK na circulação periférica (ALTER et al., 2005). Vários relatos mostram uma redução significativa na proporção de células NK CD56<sup>bright</sup> (BRENNER et al., 1989; LUCIA et al., 1997; GOODIER et al., 2003; HENNACH et al., 2009). Esta redução parece ser parcialmente atribuída ao aparecimento de um novo subconjunto de células NK que não é facilmente detectável em indivíduos saudáveis, as células NK CD3<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> (ALTER et al., 2005).

Esse subconjunto torna-se mais proeminente em indivíduos com replicação viral ativa, em detrimento dos outros dois subconjuntos de células, CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, o que resulta em um número global estável de células NK durante o curso da infecção por HIV-1. Porém com suas funções de citotoxicidade e imunomoduladora, comprometidas afetando também a resposta adaptativa (GUHA; AYYAVOO, 2013). A TARV está associada com uma redução do sub grupo de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, mas a distribuição de subconjuntos não normaliza completamente (ALTER; ALTFELD, 2009).

Kuri-Cervantes et al. (2014) realizaram estudo em indivíduos infectados, não submetidos à TARV, que mantiveram carga viral em níveis baixos (grupo controle) ou níveis indetectáveis (grupo elite) comparados com progressores (carga viral elevada) e submetidos TARV. Os resultados mostraram que as células NK expressam o marcador CD38 predominantemente nas células CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> estando associado com progressão da doença, evidenciada através das contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e carga viral, ativação de células T (marcadores CD38 e HLA-DR), ativação da imunidade inata, além do marcador de inflamação CD14. O maior índice de ativação foi evidenciado nos indivíduos progressores para AIDS submetidos à TARV quando comparado com o grupo controle. Vale salientar que também foi observada redução da ativação das células NK nos indivíduos tratados. Sugerindo que a ativação das células NK está relacionada à progressão da doença e a TARV age de uma forma imunomoduladora diminuindo sua ativação.

Diante do exposto, investigar se a presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene *IFNL3* (rs12979860) estaria relacionada com as respostas imunológica e virológica de PVHA submetidas à TARV e ativação das células NK em pessoas vivendo com HIV não submetidos à TARV, constituiu nosso estudo.

### **3 HIPÓTESES**

- O polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) influencia as respostas imunológica e/ou virológica das pessoas vivendo com HIV-1 submetidas a TARV.

- O polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) influencia uma maior ativação de células NK em pessoas vivendo com HIV-1 sem TARV.

### **4 OBJETIVOS**

A seguir estão descritos os objetivos do trabalho.

#### **4.1 Geral**

Verificar a frequência de polimorfismo do gene *IFNL3* (rs12979860) e sua associação com as respostas imunológica e/ou virológica em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) submetidas a TARV e com ativação das células NK em PVHA sem TARV.

#### **4.2 Específicos**

##### **Em PVHA submetidas à TARV (Estudo 01):**

- Verificar a frequência do polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) e sua associação com aumento da contagem dos linfócitos TCD4+ (resposta imunológica)
- Verificar a frequência do polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) e sua associação com a carga viral (resposta virológica);

**Em PVHA sem TARV (Estudo 02):**

- Verificar se existe associação do polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) com a quantificação e ativação das células NK.

**5 METODOLOGIA**

Neste tópico estão descritos os procedimentos metodológicos aplicados no estudo.

**5.1 Desenho do estudo**

Foram realizados dois tipos de estudo.

**Caso-Controle:** para verificar as diferentes frequências do polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) entre o grupo das PVHA que apresentaram resposta total e parcial a TARV (CONTROLE) e o grupo de PVHA que não responderam (CASOS) ao tratamento após um ano de observação ( Estudo I )

**Estudo exploratório** para investigar se existe uma associação do polimorfismo do gene *IFNL3* com a quantificação e ativação de células NK em pessoas vivendo com HIVAIDS, sem TARV ( Estudo II )

**5.2 Locais do estudo**

Estudo realizado nos Laboratórios de Imunologia e Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco - LACEN/PE, Laboratório de Biologia Molecular de Vírus – LBMV/ICB/FCM/UPE e Laboratório de imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE.

### 5.3 População do estudo

No estudo I foi verificada a frequência do polimorfismo do gene *IFNL3* PVHA submetidas à TARV, atendidas no Hospital Correia Picanço, localizado na cidade de Recife – PE, no período de setembro de 2013 a janeiro de 2014. As características clínicas foram coletadas retrospectivamente (Apêndice B), enquanto o estudo de genotipagem do *IFNL3* (rs12979860) foi realizado prospectivamente após 1 ano de TARV (combinação de três ou mais medicamentos antirretrovirais). A faixa etária dos participantes foi de 22 a 56 anos no início da TARV, sem uso de antirretroviral prévio, na tentativa de evitar relação com a idade ou variação de terapia como fatores de interferência; considerando que essas pessoas provavelmente tinham sido infectadas com a idade recente antes da terapia. O sangue para genotipagem foi coletado no momento da coleta das amostras para realizar as contagens de células T CD4<sup>+</sup> e quantificação da carga viral após 12 meses de uso da TARV. O estudo foi constituído por 266 amostras de PVHA.

No estudo II foi verificada a existência de associação do polimorfismo do gene *IFNL3*(rs12979860) com a quantificação e ativação das células NK em 25 pessoas recém diagnosticadas com HIV, sem TARV, atendidas no mesmo hospital (HCP). O Grupo controle foi formado por 25 pessoas sem HIV, atendidas no Centro de Tratamento e Aconselhamento (CTA), localizado na cidade do Cabo – PE, no período de maio a julho de 2014. As amostras de sangue obtidas de todos os participantes passaram por testes sorológicos para diagnóstico da hepatite C (HCV) e hepatite B (HBV), obtendo resultados negativos.

### 5.4 Variáveis

Estão descritas abaixo as variáveis independentes utilizadas nos estudos.

#### 5.4.1 Variáveis independentes

- **Idade** definida com Intervalo de tempo entre a data de nascimento e a data de início da TARV, normatizada entre 22 e 56 anos.
  
- **Sexo** : categorizado em masculino e feminino.

- **Tempo de diagnóstico sorológico:** Intervalo de tempo compreendido entre a data do diagnóstico sorológico e a data do início da TARV, categorizado até um período de 12 meses.
- **Caso AIDS:** sim ou não, segundo os critérios utilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil, (Rio de Janeiro/Caracas) para indivíduos com 13 ou mais anos de idade, baseados no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)
- **Polimorfismo do gene *IFNL3*:** caracterizado como alelos C e T para cálculo das frequências alélicas e genótipos CC, CT e TT para cálculo das frequências genotípicas.

#### 5.4.2 - Variáveis dependentes

Estão descritas abaixo as variáveis dependentes utilizadas nos estudos.

##### 5.4.2.1 Para o primeiro estudo as variáveis foram:

- **Contagem dos linfócitos TCD4+:** Definida pela quantificação dos marcadores de superfície celular CD3 associado ao CD4. Os resultados foram pesquisados no prontuário do paciente, 3 meses antes do início da TARV e após 12 meses do início do tratamento.
- **Quantificação da carga viral:** Definida pela quantidade de partículas do HIV ativas por mililitro de plasma sanguíneo, 3 meses antes do início da TARV e 12 meses após, dados obtidos a partir do prontuário.

Estas duas variáveis foram classificadas em dois grupos: resposta total/parcial e ausência de resposta após uso da TARV.

**Resposta total/parcial: PVHA**, com aumento absoluto na contagem de linfócitos T CD4+ igual ou **superior** a 50 células/mm<sup>3</sup> (resposta imunológica) e carga viral indetectável (resposta virológica) ou que apresentaram respostas imunológica ou virológica, 12 meses após o início da TARV em relação às medidas coletadas no início do tratamento (Tan, 2008)

**Ausência de resposta - PVHA**, com aumento absoluto na contagem de linfócitos T CD4+ **inferior** a 50 células/mm<sup>3</sup> (ausência de resposta imunológica) e carga viral detectável (ausência de resposta virológica) 12 meses após o início da TARV em relação às medidas coletadas no início do tratamento (Tan,2008).

5.4.2.2 Para o estudo II as variáveis foram:

- **Quantificação das células NK:** Realizada por meio da marcação de moléculas de superfície CD3/CD16/CD56.

- **Ativação das células NK:** Verificada por meio da marcação de moléculas de superfície de acordo com os seguintes painéis: CD3/CD16/CD56/CD38, CD3/CD16/CD56/CD69 e CD3/CD16/CD56/HLA-DR.

## 5.5 Operacionalizações da pesquisa

As amostras utilizadas no primeiro estudo (APÊNDICE C) foram obtidas a partir de um banco de dados de PVHA proveniente do Hospital Correia Picanço que atenderam aos critérios de inclusão (descritos nas variáveis) estabelecidos para formação dos grupos, referentes as contagens de linfócitos TCD4+ e quantificação da carga viral após um ano de TARV. As características clínicas foram coletadas retrospectivamente nos prontuários, enquanto as genotipagens do *IFNL3* (rs 12979860) foram realizadas prospectivamente após um ano de TARV (APÊNDICE B). Participaram do estudo PVHA com idade entre 22 e 56 anos e com diagnóstico sorológico até um ano no início da TARV. Todos os procedimentos foram realizados após autorização expressa e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Para o estudo II (APÊNDICE D) as amostras foram obtidas de 25 (vinte cinco) PVHA recém diagnósticas, sem uso da TARV, com idade de 20 a 56 anos, atendidas no HCP e por um grupo controle formado por pessoas sem HIV, atendidas no Centro de Tratamento e Aconselhamento (CTA), localizado na cidade do Cabo – PE. As amostras foram pareadas por idade e sexo, visando a formação de uma amostragem a mais homogênea possível. Os dados

secundários necessários para o desenvolvimento do estudo foram coletados através da consulta aos prontuários.

### 5.5.1 Técnicas utilizadas

#### Citometria de fluxo

##### Quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico

A quantificação dos linfócitos T CD4 e CD8 das amostras de sangue venoso, foi realizada através do sistema BD Multitest® (Becton-Dickinson – BD Franklin Lakes, NJ, EUA), o qual baseia-se na utilização de *beads* de referência (“bilhas magnéticas”) para a quantificação absoluta destas subpopulações. Utilizou-se um painel de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de CD4, CD8, CD3 e CD45 marcados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridina-clorofila (PerCP) e APC (Allophycocyanin) respectivamente. As amostras foram analisadas no equipamento FACSCalibur® (BD Biosciences).

##### Quantificação e ativação das células *natural killer* (NK) no sangue periférico

As células NK foram analisadas em sangue periférico no contexto *ex-vivo* utilizando os anticorpos monoclonais: CD3(FITC, clone SK7)/ CD16(PECy7, clone eBioCB16)/ CD56(PE, clone CMSSB)/ HLA-DR (APC, clone LN3), CD38(APC, clone HIT2) e CD69(APC, clone FN50), todos adquiridos da Ebioscience (San Diego, CA). A ativação das células foi analisada através dos painéis: CD3/CD16/CD56/HLA-DR, CD3/CD16/CD56 /CD38 e CD3 / CD16 / CD56 / CD69.

Para identificação das células NK, foram coletados 5 mL de sangue periférico de cada participante em tubos com EDTA. Alíquotas de 100 µL desse sangue foram transferidas para tubos de poliestireno contendo em cada tubo um dos painéis de anticorpos descritos acima, totalizando 04(quatro) tubos para cada amostra com o tubo controle sem monoclonal, incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, 1 mL de solução de lise eritrocitária (BD FACS Brand Lysing Solution) foi adicionado aos tubos, seguida de duas

lavagens com 1mL de PBS e centrifugação (5 minutos, a 400G, temperatura ambiente). Após lavagem, a suspensão celular foi ressuspensa em solução fixadora (IC Fixation Buffer; eBioscience). As amostras foram então analisadas (40 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickinson) através do software “Cell Quest Pro”. As análises dos dados foram realizadas com software V.10 FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **Técnicas Moleculares:**

#### Carga viral ou determinação do número de cópias de RNA do HIV-1 no plasma sanguíneo:

Realizada a partir do plasma, através da tecnologia de amplificação bDNA. A técnica foi realizada utilizando o kit Versant® HIV RNA 3.0 assay (Siemens, Tarrytown, NY, EUA) com intervalo de detecção de 50 a 500.000 cópias de RNA/mL de plasma ( System 340 bDNA analyzer)

#### Determinação do polimorfismo do gene *IFNL3*

#### **Extração de DNA**

O DNA das amostras foram extraídos a partir de sangue total (EDTA) com kit QIAamp Mini Spin Columns (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

#### **Genotipagem de *IFNL3* (rs12979860)**

Para detecção das variáveis polimórficas, foi utilizada a metodologia PCR em tempo real, (qPCR) através da detecção de mutações (SNPs), usando o sistema TAQMAN®, que consiste de uma técnica que utiliza sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para ser complementar a cadeia de DNA alvo em estudo. O sistema funciona de forma que uma sonda desenhada é específica para a mutação e outra para o alelo selvagem. A sonda tem em sua estrutura molecular um *Quencher*, que inibe o sinal emitido pelo fluorocromo ou repórter, assim que ocorre o pareamento e hidrólise da sonda pela taq polimerase. Durante a PCR, o composto fluorescente é liberado e a fluorescência captada pela máquina e analisada em um gráfico, desta forma a detecção da mutação é observada. Este tipo de sonda possui uma tecnologia chamada de MGB (*Minor Groove Binder*), a qual tem a capacidade de se ligar

na cavidade menor do DNA aumentando a especificidade e diminuindo o background da reação. Foram utilizadas sondas específicas, FAM-TGGTTCGCGCCTTC-MGB, alelo C e VIC-CTGGTTCACGCCTTC-MGB, alelo T e os iniciadores 5'-GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' e 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3' frente e reverso, respectivamente. As sondas, primers e protocolos validados para o SNPs estão disponíveis em <http://snp500cancer.nci.nih.gov>

### 5.6 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, através do CAAE: 04725712.3.0000.520, parecer N° 137.729 de 30/10/2012 (ANEXO A).

### 5.7 Análise estatística

Para o primeiro estudo a análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SPSS versão 17.0 do pacote (SPSS, Inc., Chicago, IL). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher, quando apropriado. Comparações de dois grupos foram realizadas pelo t de Student para teste paramétrico ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para testes não paramétricos conforme distribuição dos dados. A regressão logística foi realizada utilizando o método stepwise forward, as contagens de células TCD4 +, carga viral e genótipos *IFNL3* foram incluídos no modelo. Os resultados foram apresentados por meio de odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P < 0,05.

Os dados do segundo estudo foram analisados através dos softwares SPSS 8.0 e GraphPad Prisma 5.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) empregando-se testes não paramétricos. Para as análises intra grupos (Paciente x Paciente) o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado e para análises entre os grupos (Paciente x Controles) foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. As correlações foram feitas através do teste de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% (p < 0,05 = estatisticamente significativos).

## **6 RESULTADOS**

Detalhamento dos estudos realizados em forma de artigo.

### **6.1 Resultados - Estudo I**

**Genótipos CC/CT do *IFNL3* rs12979860 como marcadores genéticos na resposta imunológica e virológica à TARV em pacientes brasileiros infectados com HIV.**

(Artigo 1 - versão em inglês disposta no Apêndice C – submetido à revista **AIDS Patient Care and STDs**)

## INTRODUÇÃO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecções virais, sendo responsável por conter o avanço inicial dos patógenos, ativando inflamação e induzindo a resposta específica adaptativa contra os mesmos. Este primeiro contato pode estabelecer uma relação relativamente equilibrada entre o vírus e controle antiviral do hospedeiro. Na literatura, estudos sugerem que a resposta inata desempenha importante papel na evolução da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).<sup>1,2</sup> Entre as moléculas antivirais que participam da resposta inata, os interferons (IFNs) do tipo I e II são conhecidos há décadas como citocinas antivirais clássicas, porém recentemente uma nova classe de citocinas, IFN tipo III ou interferon lambda (IFN $\lambda$ ), tem sido extensamente estudada, apresentando também uma potente atividade antiviral.<sup>3,4</sup> A família de IFN $\lambda$  possui três membros: IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) e IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B). Todos os quais são codificados por genes agrupados no cromossomo 19, que estruturalmente assemelham-se a interleucina-10 (IL-10), mas que são funcionalmente semelhantes à família de interferons tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), devido sua capacidade de ativar os ISRE (elementos de respostas estimulados por IFN).<sup>5</sup> A expressão de membros da família de IFN- $\lambda$  é induzida em ambas as células hematopoiéticas e não hematopoiéticas por diversos vírus que infectam humanos.<sup>6</sup> Ao contrário da sinalização do IFN tipo I, a sinalização do IFN- $\lambda$  exibe especificidade celular mais restrita, uma vez que o receptor para o IFN- $\lambda$  é estreitamente distribuído em células epiteliais, sugerindo que estes IFN- $\lambda$  são relacionados a resposta antivirais epitelial inata.<sup>7</sup> Diversos estudos têm demonstrado que o IFN- $\lambda$  tem a capacidade de inibir a replicação de vários vírus, incluindo o vírus da hepatite B e C, citomegalovírus, vírus herpes simplex tipo 2 e vírus da estomatite vesicular.<sup>8-11</sup> Em relação ao HIV, o IFN- $\lambda$ 3 parece exercer a sua função antiviral pela ativação da via JAK-STAT mediada pela imunidade inata em macrófagos.<sup>12</sup> A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) próximo ao gene *IFNL3* (codificando IFN $\lambda$ 3) é fortemente associado com a resposta a terapia em HCV ou pacientes com co-infecção HCV/HIV, assim como o controle natural da infecção por HCV.<sup>13-15</sup>

O polimorfismo *upstream* do *IFNL3*, rs12979860, apresentando o alelo C foi identificado como preditor da depuração viral e resposta anti-viral sustentada seguindo terapia convencional com IFN- $\alpha$  e ribavirina.<sup>16,17</sup>

Uma vez que os pacientes co-infectados com HCV/HIV com o genótipo CC submetidas à terapia com IFN- $\alpha$  e ribavirina apresentaram um aumento do controle viral, este estudo foi concebido para investigar se a presença do SNP no *IFNL3* rs12979860 estaria relacionada com as respostas imunológica e virológica em pessoas vivendo com HIV/AIDS em uso de terapia antirretroviral (TARV).

## MÉTODOS E PACIENTES

### População do estudo

Todos os pacientes deste estudo foram de Pernambuco (PE), Brasil e atendidos no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital Correia Picanço. Os pacientes que foram diagnosticados com infecção pelo HIV e receberam tratamento específico para HIV de acordo com o consenso brasileiro.<sup>18</sup> As características clínicas foram coletadas retrospectivamente, enquanto o estudo de genotipagem do *IFNL3* (rs12979860) foi realizado prospectivamente após 1 ano de TARV (combinação de três ou mais medicamentos antirretrovirais).

Para este estudo foram selecionados uma faixa etária dos 22 a 56 anos no início da TARV e sem uso de antirretroviral prévio, na tentativa de evitar relação com a idade ou variação de terapia como fatores de interferência; considerando que estes pacientes provavelmente tinham sido infectados com a idade recente antes da terapia. O sangue para genotipagem foi coletado no momento ou próximo das últimas contagens de células T CD4<sup>+</sup>. A amostra incluiu 266 pessoas, sendo 30 não respondedores (NR) ao tratamento, definidos como os pacientes que não conseguiram aumentar a contagem de células T CD4<sup>+</sup> ( $\geq 50$  células/ $\mu$ l) em comparação com a contagem inicial e também apresentaram cargas virais detectáveis, após 1 ano de TARV; e 236 que apresentaram respostas imunológica e/ou virológica (RIV), definidos como indivíduos que tinham contagens de células T CD4<sup>+</sup> concordantes ou discordantes  $\geq 50$  células / $\mu$ l e carga viral indetectável após 1 ano de TARV. As contagens das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram realizadas a partir de amostras de sangue total, usando o BD Multitest® (Becton-Dickinson - BD Franklin Lakes, NJ, EUA), no Laboratório de Imunologia do Laboratório Central do Estado (LACEN-PE). A quantificação do número de cópias de RNA viral foi realizada a partir do plasma, através da tecnologia de amplificação bDNA. A técnica foi realizada utilizando o kit Versant® HIV RNA 3.0 assay

(Siemens, Tarrytown, NY, EUA). O intervalo de detecção deste sistema foi de 50 a 500.000 cópias de RNA/mL de plasma.

### **Coleta de amostras, extração de DNA e genotipagem de *IFNL3* rs12979860**

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo EDTA e mantidas a -20 ° C por 24 horas até a extração de DNA. O DNA foi extraído a usando o kit de purificação genômico (Promega, Madison, WI) seguindo as instruções do fabricante.

O SNP rs12979860 foi genotipado pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando sondas específicas, FAM-TGGTTCGCGCCTTC-MGB, alelo C e VIC-CTGGTTCACGCCTTC-MGB, alelo T e os iniciadores 5'-GCCTGTCTGTACTGAACCA-3' e 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3' *forward* e *reverse*, respectivamente. As sondas, primers e protocolos validados para o SNPs estão disponíveis em <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher, quando apropriado. Comparações de dois grupos foram realizadas pelo t de Student para teste paramétrico ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para testes não paramétricos conforme distribuição dos dados. A regressão logística foi realizada utilizando o método *stepwise forward*, as contagens de células TCD4 +, carga viral e genótipos *IFNL3* foram incluídos no modelo. Os resultados foram apresentados por meio de odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P <0,05.

### **Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo CAAE: 04725712.3.0000.5208, parecer N° 137.729 de 30/10/2012 e foi realizado em conformidade com as disposições da declaração de Helsinki e guia de boas práticas clínicas. Consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes.

A população estudada foi constituída por 266 (duzentos e sessenta e seis) pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), das quais 30 (trinta) apresentaram ausência de resposta imunológica e virológica (NR), correspondendo a 11,3% e 236 (duzentos e trinta e seis) que apresentaram respostas imunológica e/ou virológica (RIV), correspondendo a 88,7% da população. Para ambos os grupos a avaliação da resposta foi realizada no período de 12 meses de início do uso da TARV (Tabela 1).

**Tabela 1 - Características clinico-epidemiológicas de PVHA com falha na resposta a TARV e com resposta virológica e/ou imunológica**

	NR <sup>1</sup> (N=30)	RIV <sup>2</sup> (N=236)	<i>P</i> -valor
<b>Sexo</b>			
Masculino	22 (0,73)	150 (0,66)	0,31
Feminino	08 (0,27)	86 (0,36)	
<b>Idade em anos no início da TARV*</b>	36 (31-40)	36 (31-43)	0,79
<b>AIDS</b>			
Sim	27 (0,90)	211 (0,89)	1,00
Não	03 (0,10)	25 (0,11)	
<b>T CD4+ e carga viral (CV) antes da TARV</b>			
TCD4+ / $\mu$ L*	231,5 (121,0 – 389,3)	167,0 (57,25 – 274,8)	<b>0,02</b>
VL cópias/mL*	58.950 (16.250 – 152.500)	100.000 (8.348 – 280.000)	0,38

<sup>1</sup> NR: Não Responde (Ausência de resposta imunológica e virológica; <sup>2</sup> RIV: Resposta Imunológica e/ou Virológica;

\* Mediana IQR (25% - 75%)

Fonte: própria autora (2014)

Em relação as características da população: 172 (cento e setenta e dois) eram do sexo masculino sendo que 22 não apresentaram nenhum tipo de resposta (NR) e 150 apresentaram resposta (RIV), 94 (noventa e quatro) eram do sexo feminino das quais 08 não apresentaram resposta (NR) e 86 apresentaram resposta (RIV). Não foi observada associação entre sexo e a resposta ao TARV ( $p=0,31$ ). Caso AIDS também não diferiu entre grupos ( $p=1,00$ ). Contagens altas de células T CD4+antes da TARV estiveram associadas ao sucesso da TARV ( $p=0,02$ ). Em contraste, a carga viral (CV) valores antes da terapia não mostraram associação

( $p=0,38$ ) (Tabela 1). Foi também observado que o rs12979860 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do alelo C foi de 42%. A frequência do genótipo TT foi de 16% enquanto CT/CC foi de 84%. Ambas as frequências alélica e genotípica foram semelhantes à frequência anteriormente encontradas em doadores de sangue normais de acordo com a região.<sup>19</sup>

Em relação à associação entre genótipos *IFNL3* rs12979860 e resposta terapêutica, observou-se uma associação entre os genótipos CC/CT com uma melhor resposta ao tratamento ( $p=0,037$ , OR 2,55 IC 1,08-6,03) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Associação entre alelos e genótipos do *IFNL3*(rs 1297860) com não resposta (NR) e resposta imunológica e/ou virológica (RIV) em PVHA submetidas a TARV**

<i>IFNL3</i> (rs12979860)	NR <sup>1</sup> (N=30/60)	RIV <sup>2</sup> (N=236/472)	<i>P</i> -valor	OR (IC)
<b>Alelos</b>				
T	33 (0,55)	192 (0,41)	<b>0,038</b>	1,78 (1,04-3,06)
C	27 (0,45)	280 (0,59)		
<b>Genótipos</b>				
TT	09 (0,30)	34 (0,14)	<b>0,037</b>	2,55 (1,08-6,03)
CC/CT	21 (0,70)	202 (0,86)		

<sup>1</sup> NR: Não Responde (Ausência de resposta imunológica e virológica); <sup>2</sup> RIV: Resposta Imunológica e/ou Viroológica;  
Fonte: própria autora (2014)

No entanto, não foi encontrada diferença entre esses genótipos e células T CD4 + ou

**Tabela 3 - Polimorfismo do *INFL3* (rs12979860) e sua associação com as variáveis dependentes CD4 + CV em pessoas submetidas a TARV**

Antes da TARV	<i>INFL3</i> (rs12979860) Genótipos			<i>P</i> -value
	CC	CT	TT	
CD4+ células / $\mu$ L*	378 (96-287)	206 (55-281)	203 (51-298)	0,590
VL cópias/mL*	62.550 (5.128-24.8500)	100.000 (7.897 – 24.5500)	123.795 (58.900-36.9000)	0,051

\* Mediana IQR (25% - 75%)

Fonte: própria autora (2014)

valores de carga viral (CV) antes da terapia (Tabela 3).

Em um modelo de regressão logística multivariada, os genótipos CC/CT do rs12979860 e número de células T CD4 + antes de TARV foram independentemente associados à resposta a TARV ( $p=0,027$  OR 2,52 IC 1,02-6,21 e  $p=0,002$  e OR 0,997 IC 0,995-0,999, respectivamente).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, encontramos uma associação positiva, favorável ao genótipo CC/CT rs12979860 no *IFNL3*, com respostas virológica e imunológica a TARV. Além disso, os números mais baixos de células T CD4+, antes do tratamento, foram associados com a resposta a TARV. A análise multivariada mostrou uma associação independente *IFNL3* CC/CT e baixa contagem de células T CD4 + com a resposta ao tratamento por um período de 1 ano ( $p=0,027$  e  $p=0,002$ , respectivamente).

A maioria dos estudos investigando o genótipo CC rs12979860 do *IFNL3* em pessoas infectadas pelo HIV, foram direcionados para estudar a resposta em pacientes co-infectados com HCV mostrando, principalmente, a associação com a terapia HCV e resposta bem sucedida.<sup>20</sup> Curiosamente, evidências mostram um mecanismo de controle antiviral comum tanto para ambos HCV e HIV.<sup>21,22</sup> Em uma população caucasiana Machmach et al. (2013)<sup>22</sup> estudando pacientes infectados pelo HCV/HIV, relatou que a frequência de genótipo CC rs12979860 do *IFNL3* foi maior em 53 controladores de HIV, que eram HIV positivo e tinham carga viral plasmática < 1000 cópias/mL, na ausência de TARV em comparação com 389 não controladores.<sup>22</sup>

No presente estudo, a influência dos genótipos CC/CT *IFNL3* foi associada aos parâmetros imunológicos e virológicos simultaneamente, diferindo de estudos anteriores que consideraram o controle do vírus e a contagem de células T CD4+ como condições separadas.<sup>23</sup>

Estudos anteriores com indivíduos afro-americanos não mostraram associação do controle do HIV com o genótipo CC rs12979860 do *IFNL3*.<sup>24,25</sup> Isto sugere que a significância do polimorfismo rs12979860 do *IFNL3* como marcador genético para resposta a TARV em pessoas infectadas com HIV pode diferir dependendo da etnia como foi observado

para o HCV.<sup>16</sup> Uma vez que a população brasileira têm características altamente misturadas devido a contribuição dos europeus, africanos e ameríndios, diferenças na frequência do polimorfismo rs12979860 do *IFNL3* pode ser altamente variável entre os brasileiros.

No entanto, estudos realizados em brasileiros com co-infecção HIV-HCV revelaram que o genótipo CC *IFNL3* em rs12979860 tem uma associação positiva com resposta a terapia bem sucedida para HCV,<sup>26</sup> assemelhando-se aos resultados encontrados com europeus.<sup>16</sup> Na verdade, um estudo de indivíduos da miscigenada população brasileira, infectados por HCV genótipos 1, 2 e 3 mostrou que a ascendência não interferiu com a resposta à terapia de HCV em pacientes com o genótipo CC em rs12979860, enquanto que interferia em pacientes portadores de CT e TT genótipos.<sup>27</sup>

Além disso, a frequência do genótipo CC em rs12979860 na população brasileira de pessoas não infectadas mostrou-se maior que a encontrada em africanos, mas ligeiramente inferior aos Europeus.<sup>19</sup> Esses achados sugerem uma significativa contribuição europeia na população estudada no Brasil, como observado em estudos dos antecedentes brasileiros.<sup>28</sup> Assim, a associação dos genótipos CC/CT com controle imunológico/viral observado é similar aos resultados descritos por Machmach et al. (2013),<sup>22</sup> que estudou pacientes brancos espanhóis, mas diferiu dos estudos que investigaram pacientes infectados afro-americanos. Portanto, os genótipos CC/CT do rs12979860 como um marcador genético para terapia bem sucedida para o HIV parece ser adequado mesmo no contexto de miscigenação brasileira e precisa ser confirmada em outros estudos prospectivos.

No entanto, nossos resultados estão alinhados com as evidências de que *IFNL3* genótipos CC rs12979860 pode contribuir para o controle do HIV, em pacientes submetidos a 1 ano de TARV.<sup>22</sup> Em parte, isto pode estar relacionado ao fato de que, os pacientes com genótipo CC *IFNL3* mostram uma menor carga viral de HIV antes da terapia (mediana de 62,550 do HIV-1 RNA cópias/ml: p=0,05). No entanto, na análise multivariada, apenas baixos níveis de células T CD4+ antes da TARV e *IFNL3* CC/CT permaneceram independentemente associados a uma melhor resposta.

O genótipo CC rs12979860 propicia a co-segregação com o não *IFNL4*, gerando genótipo TT em ss469415590, o qual foi associado as expressões diferentes de RNAm *IFNL3* devido regulação epigenética.<sup>29</sup> Além disso, o genótipo CC em rs12979860 está em forte desequilíbrio de ligação ( $r^2=0,94$ ) com o rs4803217 situado na região não traduzida a 3 '(UTR) do RNAm *IFNL3*, o qual permite estabilidade de transcrição. Este polimorfismo

influenciado pelo elemento ricos em AU (ARE) mediada (AMD) de *IFNL3* RNAm, bem como a ligação de micro RNAs induzidos pelo HCV durante a infecção.<sup>30</sup> Portanto, reforçando o poder do *IFNL3* CC em rs12979860 como um marcador genético de sucesso terapêutico da infecção pelo HCV e talvez no controle do HIV.

Por outro lado, em um estudo longitudinal com 484 pacientes diagnosticados com infecção pelo HIV, mostrou que o genótipo CC rs12979860 em *IFNL3* foi associado com uma diminuição da probabilidade de sobrevivência quando comparado com o genótipo não-CC. Os autores sugerem que os achados podem estar relacionados a um maior viremia plasmática e reconstituição imune possivelmente alterada associada à expressão do *IFNλ*.<sup>31</sup> A reconstituição imune como um fenômeno associado à sobrevivência da CC-portadores propostas pelos autores é mais provável já que se considerar que a hiperativação do sistema imune leva à progressão da doença. Por conseguinte, os *IFNL3* rs12979860 parecem ter efeitos diferentes em conformidade com o tempo da terapia.

Os IFN λs 1, 2 e 3 podem induzir proteção antiviral através da JAK-STAT, via de transdução de sinal, incluindo a fosforilação de STAT2 e ativação do complexo ISGF3 de transcrição, funções até então específicas dos IFN tipo I.<sup>3</sup> O IFNλ3 exerce sua função anti-HIV através da ativação da via JAK-STAT mediada pela imunidade inata em macrófagos,<sup>13</sup> apoiando nossos resultados sobre a influência do polimorfismo *IFNL3* na TARV para o HIV *in vivo*.

Em conclusão, os genótipos CC/CT do *IFNL3* rs12979860 foram associados a uma melhor resposta imunológica e virológica para TARV em pacientes infectados por HIV no período de 1 ano de observação, representando um valioso marcador genético para início de TARV na população brasileira. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de investigar o resultado em longos períodos de TARV.

**REFERÊNCIAS**

1. Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. Clin Immunol 2008; 126(3):235-242.
2. Borrow P, Robin JS, Annapurna V. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. Retrovirology 2010; 7:84.
3. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin W, et al. IFN-ls mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol 2003; 4(1):69-77.
4. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol 2003; 4(1):69-77.
5. Renald JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. Nat Rev Immunol 2003; 3(8):667-676.
6. Witte K, Witte E, Sabat R, et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. Cytokine Growth Factor Rev 2010; 21(4):237-251.
7. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, et al. IFN-lambda (IFN- $\lambda$ ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. PLoS Pathog 2008; 4(3) e1000017.
8. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. J Virol 2005; 79(6):3851-3854.
9. Brand S, Beigel F, Olszak T, et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289(5): 960-968.
10. Ank N, West H, Bartholdy C, et al. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. J Virol 2006; 80(9):4501-4509.
11. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, et al. 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. J Biol Chem 2007; 282 (10):7576-7581.
12. Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, et al. IFN  $\lambda$ 3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. Plos One 2012;7(4): e 35902.
13. Rallon NI, Naggie S, Benito JM, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. AIDS 2010; 24(8):23-29.
14. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology 2010;138 (4):1338-1345

15. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL-28b with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet 2009; 41(10):1105-1109
16. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009; 461(7262):399-401.
17. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL-28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet 2009; 41(10):1100-1104
18. \_\_\_\_ Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasil. Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2013. Available on: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/diversos/Protocolo%20to%20HIV%202013.pdf>
19. Vasconcelos LR, Moura P, do Carmo RF, et al. Low IL10 serum levels as key factor for predicting the sustained virological response to IFN $\alpha$ /ribavirin in Brazilian patients with HCV carrying IL28B CT/TT genotype. Hum Immunol 2014; S0198-8859(14)00181-185.
20. Stenkvist J, Weiland O, Sonnerborg A, et al. High HCV treatment uptake in the Swedish HIV/HCV co-infected cohort. Scand J Infect Dis 2014:1-9.
21. Ruiz-Mateos E, Machmach K, Romero-Sanchez MC, et al. Hepatitis C virus replication in Caucasian HIV controllers. J Viral Hepat 2011; 18(7):350-357
22. Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sanchez MC, et al. *IL28B* Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. J Infect Dis 2013. 207(4):651-5.
23. Hartfield M, Bull R, White PA, et al. Evidence that hepatitis C virus genome partly controls infection outcome. Evol Appl 2014; 7(5):533-547.
24. Salgado M, Kirk GD, Cox A, et al. Protective interleukin-28B genotype affects hepatitis C virus clearance, but does not contribute to HIV-1 control in a cohort of African-American elite controllers/suppressors. AIDS 2011; 25(3):385-7
25. Sajadi MM, Shakeri N, Talwani R, et al. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. Clin Transl Sci 2011; 4(4):282-4.
26. Ferreira PR, Santos C, Côrtes R, et al. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. J Antimicrob Chemother 2012; 67(2):509-510.
27. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. Liver Int 2012; 32(3):476-486.

28. Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. Braz J Med Biol Res 2009;42(10):870-876.

29. Bibert S, Roger S, Calandra T, et al. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. J Exp Med 2013; 210(6):1109-1116.

30. McFarland AP, Horner SM, Jarret A. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. Nat Immunol 2014;15(1):72-9.

31. Parczewski M, Bander D, Leszczyszyn-Pynka M, et al. IL28B CC genotype is associated with higher all cause mortality in antiretroviral treated HIV infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses 2012;28(12): 1640-1646.

## **6.2 Resultados - Estudo II**

**Associação do polimorfismo do gene do *IFNL3* e aumento da expressão de CD69 em células NK de pessoas vivendo com HIV sem TARV**

(Artigo 2 – versão em inglês disposta no Apêndice D – submetido à revista **Journal of Virology**)

## INTRODUÇÃO

As células NK são as principais células efetoras da imunidade inata na defesa contra infecções virais, através do efeito citotóxico o qual destrói células infectadas e através da produção de citocinas imunoreguladoras as quais podem influenciar a resposta imune adaptativa, assim como, inibir diretamente a replicação viral (1).

Suas habilidades funcionais são associadas a distintas subpopulações definidas com base na expressão dos antígenos de superfície CD56 e presença ou ausência de CD16. As NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> apresentam uma maior atividade citolítica, enquanto as NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> são predominantemente produtoras de citocinas e apresentam função imunomoduladora (2). As subpopulações de NK diferem também em relação à distribuição nos tecidos, sendo a NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> predominante no sangue periférico enquanto que a NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> nos órgãos linfóides (3, 4).

Na infecção causada pelo HIV-1 a imunidade inata também é comprometida ocorrendo alterações significativas em número e funções das células NK. Diminuição da atividade citolítica das células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e maior produção de citocinas das CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> são associadas à progressão da doença (5). Estando também associado ao aparecimento de um novo subconjunto de células NK que não é facilmente detectável em indivíduos saudáveis, as células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>. Este subconjunto torna-se mais proeminente em indivíduos com replicação viral ativa, em detrimento dos outros dois subconjuntos de células, que resulta num número global aparentemente estável de células NK durante o curso da infecção pelo HIV-1, porém com suas funções citolíticas e imunomoduladoras comprometidas, afetando também a resposta adaptativa (6)

Durante a infecção pelo HIV-1 ocorre ativação crônica do sistema imune, sendo consequência direta da ativação das células T o aumento dos níveis intracelulares do fator nuclear kappa B (NF-κB), que aumenta a transcrição do vírus e a produção de novos virions que infectam os novos alvos (7). Um ciclo vicioso é portanto estabelecido, durante o qual a replicação do HIV-1 promove a ativação imune e consequente replicação viral.

A ativação crônica do sistema imune repercute negativamente na funcionalidade das células NK. A ativação das células NK pode ser mensurada em estudos *in vitro*, através das moléculas de superfície tais como CD38 que é uma ectoenzima glicoproteica que regula os

níveis de cálcio citoplasmático e age como uma molécula de adesão. Outros marcadores de ativação de células NK são o HLA-DR, e o receptor de lectina do tipo C CD69 (1,8-10).

A ativação das células NK pode ser desencadeada por fatores solúveis da imunidade inata tais como os interferons (IFNs).

Inicialmente a entrada do HIV-1 provoca a produção do IFN, principalmente por células dendríticas plasmocitóides (pDC), que são as principais fontes de IFN tipo I e tipo III (IFN $\lambda$ ), anteriormente denominado IL29 (IFN $\lambda$ 1), IL28A (IFN $\lambda$ 2) e IL28B (IFN $\lambda$ 3) (6, 11). Em estudos de genoma, associações do alelo C e genótipo CC em rs12979860 no gene *IFNL3* têm sido relacionadas com a capacidade de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) responderem com sucesso a terapia e eliminarem espontaneamente o HCV (12).

Em relação à infecção pelo HIV a influência do polimorfismo na *IFNL3* rs12979860 não está bem estabelecida. Pacientes afro-americanos co-infectados, HIV-HCV apresentaram associação do genótipo *IFNL3* CC com HCV, porém, nenhuma associação foi observada no controle do HIV ou progressão da doença em pacientes infectados pelo HIV (13, 14). Contudo, em uma coorte espanhola de pessoas vivendo com HIV, o genótipo CC foi independentemente associado com o controle espontâneo do HIV (15).

Curiosamente, o alelo T do *IFNL3* rs12979860 e a frequência do gene *KIR2DS3* apresentam um sinergismo para risco aumentado de infecção crônica por HCV em uma coorte de mulheres irlandeses, no entanto, a base biológica desta sinergia não é conhecida (16).

Neste estudo, hipotetizamos que os genótipos *IFNL3* CC/CT, considerando um efeito dominante do alelo C, estariam associados a maior expressão de marcadores de ativação de NK no grupo de pessoas vivendo com HIV, não tratados. Nossos resultados mostraram que o grupo de PVHA não tratadas, apresentou diferenças nas subpopulações de NK e no perfil de ativação, comparado ao grupo controle e que os genótipos *IFNL3* CC/CT foram associados à expressão de CD69 em subpopulações de NK.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### População do estudo

A população do presente estudo foi constituída por 25 pessoas vivendo com HIV-1/AIDS (PVHA) sem TARV, atendidas no Hospital Correia Picanço (Recife, Pernambuco, Brasil) e 25 voluntários saudáveis (controle) que foram atendidos no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) do Município do Cabo de Santo Agostinho (Pernambuco, Brasil). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE sendo realizado em conformidade com as disposições da declaração de Helsinki. As amostras de sangue obtidas de todos os participantes passaram por testes sorológicos para diagnóstico da hepatite C (HCV) e hepatite B (HBV), obtendo resultados negativos.

Os dois grupos, PVHA e controle, foram pareados considerando as variáveis independentes idade (20 a 56 anos  $\pm$  3 anos) e sexo dos componentes. Amostras de sangue foram coletadas para realizar contagem das células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Carga viral (grupo PVHA), genotipagem do gene *IFNL3* (rs12979860) e imuofenotipagem das células NK. As contagens das células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foram realizadas a partir de amostras de sangue total, usando o BD Multitest<sup>®</sup> (Becton-Dickinson - BD Franklin Lakes, NJ, EUA), no Laboratório de Imunologia do Laboratório Central do Estado (LACEN-PE). A quantificação do número de cópias de RNA viral foi realizada a partir do plasma (grupo PVHA), utilizando o kit Abbott RealTime HIV-1 *m2000sp* (Abbott Qualitative) com intervalo de detecção de 50 a 500.000 cópias de RNA/mL de plasma, e o equipamento utilizado foi o The Abbott *m2000* RealTime System, no laboratório de Virologia do LACEN-PE.

### Coleta de amostras, extração de DNA e genotipagem de *IFN $\lambda$ 3* (rs12979860)

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA e mantidas a -20 ° C por 24 horas até a extração de DNA. O DNA foi extraído a partir de sangue total usando o kit de Purificação genômico (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante.

O SNP *IFN $\lambda$ 3* (rs12979860) foi genotipado por PCR em tempo real realizado pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando sondas específicas, FAM-TGGTTCGCGCCTTC-MGB, alelo C e VIC-CTGGTTCACGCCTTC-MGB, alelo T e os

iniciadores 5'-GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' e 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3' frente e reverso, respectivamente. As sondas, primers e protocolos validados para o SNPs estão disponíveis em <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.

### **Citometria de fluxo**

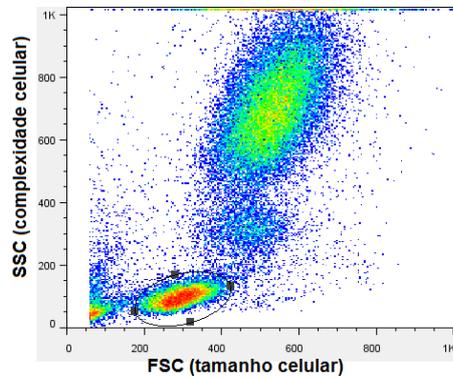
Células NK foram analisadas em sangue periférico no contexto *ex-vivo* utilizando os painéis de anticorpos monoclonais: CD3(FITC, clone SK7)/ CD16(PECy7, clone eBioCB16)/ CD56(PE, clone CMSSB)/ HLA-DR (APC, clone LN3), CD3/CD16/CD56/CD38(APC, clone HIT2) E CD3/CD16/CD56/CD69(APC, clone FN50), todos adquiridos da Ebioscience (San Diego, CA).

Para identificação das células NK, foram coletados 5 mL de sangue periférico em EDTA de cada participante. Alíquotas de 100 uL desse sangue foram transferidas para tubos de poliestireno contendo um dos painéis descritos acima, sendo incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, 1 mL de solução de lise eritrocitária (BD FACS Brand Lysing Solution) foi adicionado aos tubos, seguida de duas lavagens com 1mL de PBS e centrifugação (5 minutos, a 400G, temperatura ambiente). Após uma lavagem, a suspensão celular foi ressuspendida em solução fixadora (IC Fixation Buffer; eBioscience). As amostras foram então analisadas (40 mil eventos/tubo) em citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickinson) através do software "Cell Quest Pro". As análises dos dados foram realizadas com software V.10 FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **Estratégia de análise na citometria de fluxo**

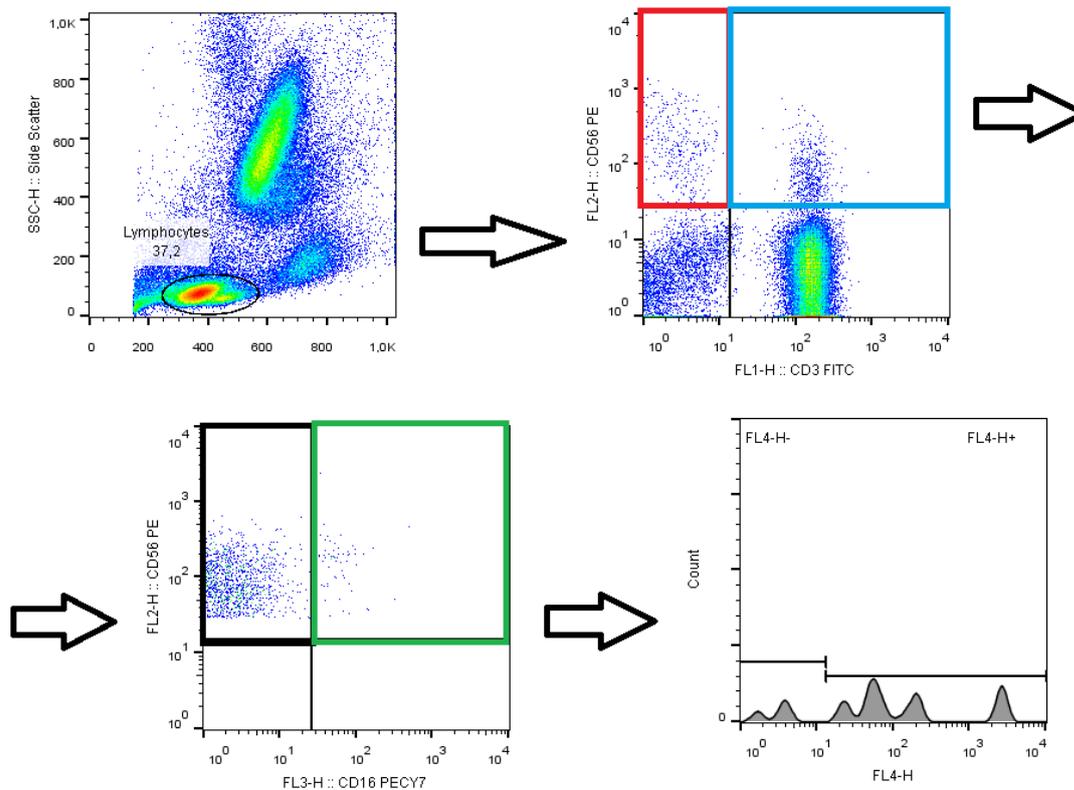
As análises foram realizadas inicialmente delimitando-se a região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (Figura 1). A partir dessa região os gráficos de fluorescência e histogramas foram construídos, delimitando-se os quadrantes/regiões de análise (Figura 2 e 3). Os limites dos quadrantes foram sempre baseados na população negativa e titulações dos anticorpos. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e ou/histograma. As estratégias de análise para cada uma das populações estão descritas nas Figuras 2 e 3.

**Figura 1 - Exemplo de gráfico FSC x SSC em sangue periférico com delimitação na região linfocitária**



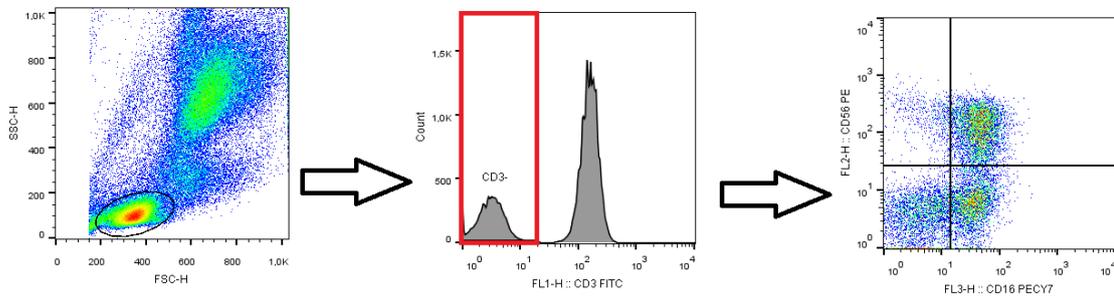
Fonte: própria autora (2014)

**Figura 2 - Estratégia para análise de células NK e seus marcadores na citometria de fluxo.**



Nota: Dados obtidos com o Software FlowJo

Fonte: própria autora (2014)

**Figura 3 - Estratégia para análise de células CD56 e CD16.**

Fonte: própria autora (2014)

### Análise estatística

Os dados foram analisados através dos softwares SPSS 8.0 e GraphPad Prisma 5.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) empregando-se testes não paramétricos. Para as análises intra grupos (Paciente x Paciente) o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado e para análises entre os grupos (Paciente x Controles) foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativos).

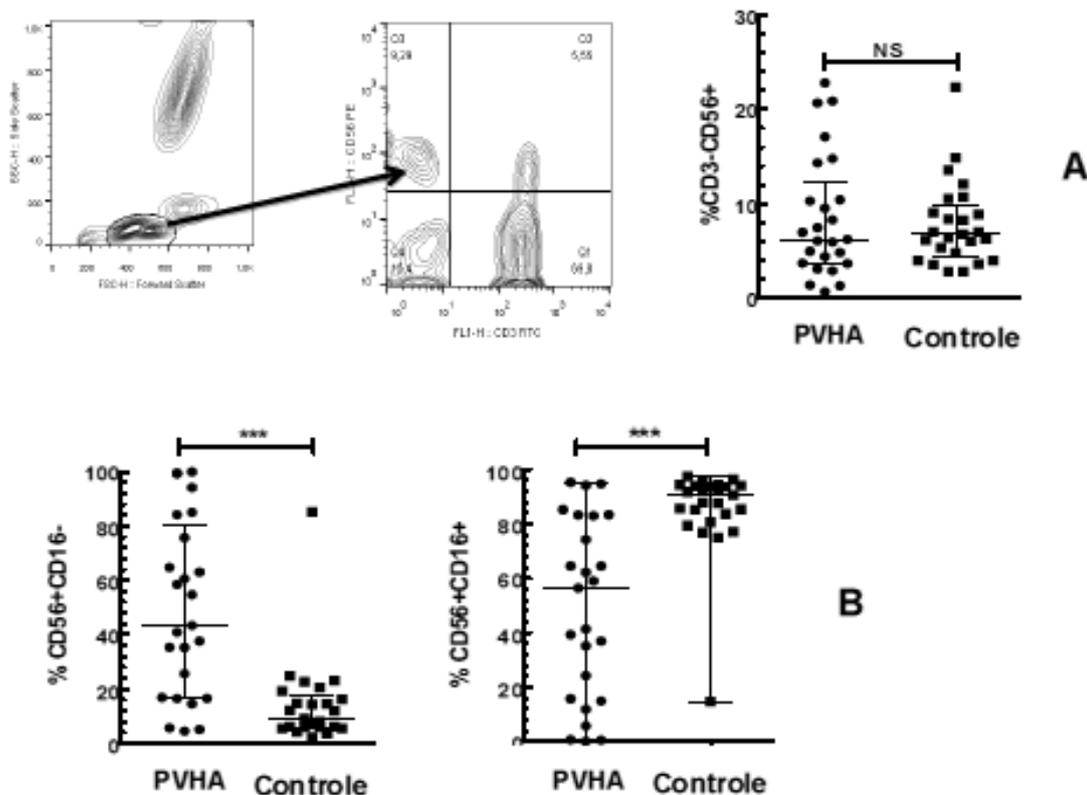
### Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo CAAE: 04725712.3.0000.520, parecer N° 137.729 de 30/10/2012 e foi realizado em conformidade com as disposições da declaração de Helsinki e guia de boas práticas clínicas. Consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes.

## RESULTADOS

Com relação ao número de células NK os resultados não mostraram diferenças entre os grupos (Figura 4). Porém, a subpopulação de células  $CD3^-CD56^+CD16^-$  foi maior no grupo PVHA ( $p < 0,0001$ ), enquanto que a subpopulação  $CD3^-CD56^+CD16^+$  estava aumentada no grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 4). A proporção de células  $CD3^-CD56^-CD16^+$  não variou entre os grupos ( $p = 0,46$ ). Em indivíduos com HIV-1 o aumento de  $CD3^-CD56^-CD16^+$  está relacionado a um comprometimento das funções citotóxicas das células.

**Figura 4 - Análise por citometria de fluxo mostrando *Contour Plot* representativo que definem as células NK  $CD3^-CD56^+$  e suas subpopulações em PVHA sem TARV e grupo controle**

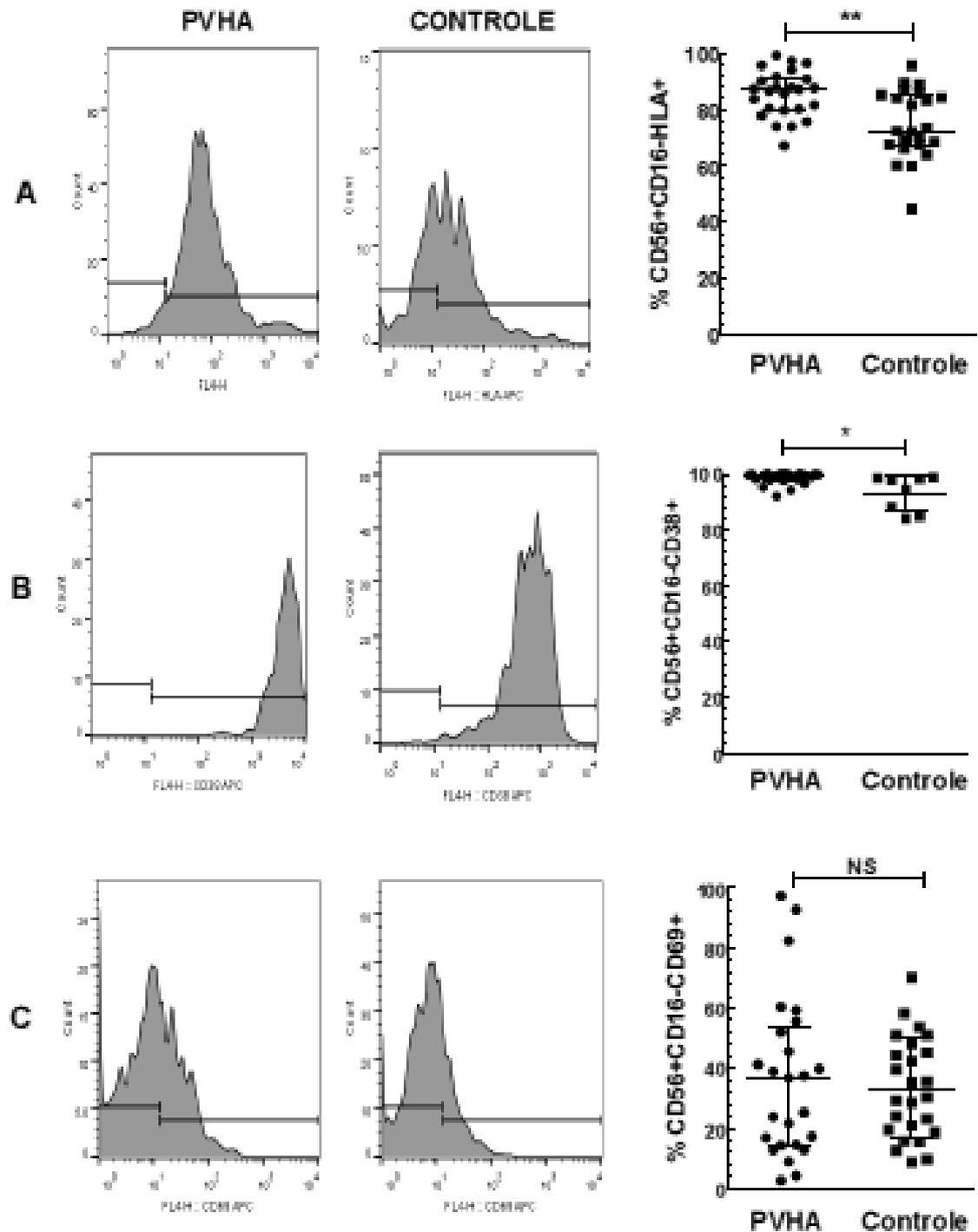


(A) *Contour Plot* representativo da população de linfócitos adquiridos e diferentes percentuais de NK  $CD3^-CD56^+$  entre os grupos infectados pelo grupo PVHA e controle ( $p = 0,46$ ). (B) Percentagens de subpopulações de NK  $CD56^+CD16^-$  e  $CD56^+CD16^+$  em PVHA e grupo controle ( $p < 0,0001$  para ambas comparações).

Fonte: própria autora (2014)

As figuras 5 e 6 mostram as análises quanto aos marcadores de ativação HLA-DR, CD38 e CD69 das células NK: o grupo de PVHA mostrou maior expressão do HLA-DR em ambas subpopulações CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (p=0,0015 e p=0,0067) em relação ao controle, sugerindo que apesar do diagnóstico sorológico de 84% dos infectados (21/25) ter sido realizado em 2014, estes apresentavam indícios de uma infecção crônica. A expressão CD38 nas subpopulações CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> também se mostrou aumentada (p=0,0087 e p=0,001 respectivamente). O CD69 não mostrou diferença de expressão entre os grupos.

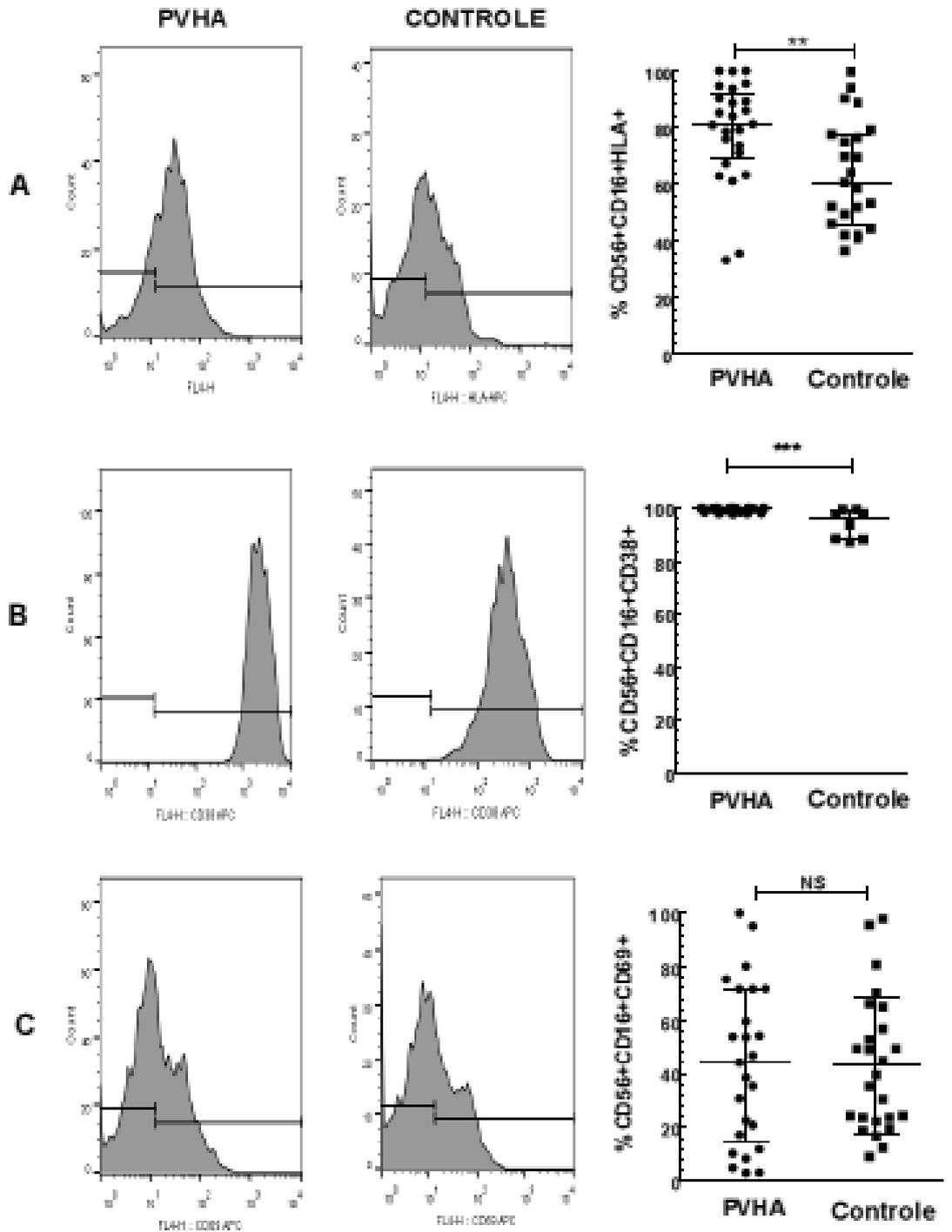
**Figura 5 - Resultados da citometria de fluxo da subpopulação NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e expressão de marcadores de ativação HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>**



*Density plot* representativos com diferenças na expressão da percentagem de (A) HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0015$ ), (B) CD38<sup>+</sup> ( $p=0,01$ ) e (C) CD69<sup>+</sup> ( $p=0,492$ ) nos grupos PVHA e controle.

Fonte: própria autora (2014)

**Figura 6 - Resultados da citometria de fluxo da subpopulação NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e expressão de marcadores de ativação HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>**



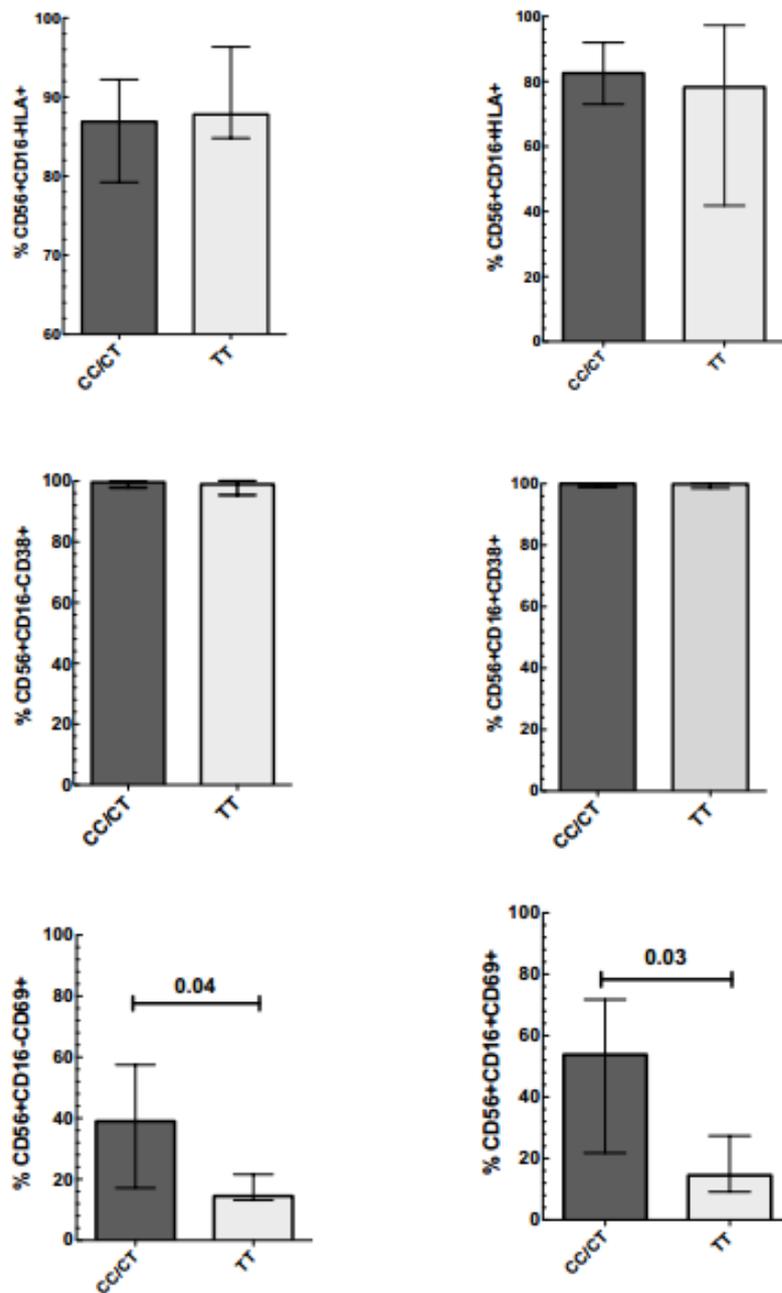
*Density plot* representativos com diferenças na expressão da percentagem de (A) HLA-DR<sup>+</sup> (p=0,006), (B) CD38<sup>+</sup> (p=0,001) e (C), CD69<sup>+</sup> (p=0,472) nos grupos PVHA e controle.

Fonte: própria autora (2014)

No grupo de PVHA com  $CD4^+$  acima de 350 cel/ $\mu$ L apresentou maior número de células NK ( $p=0,0133$ ), apenas a subpopulação  $CD56^+CD16^-$  mostrou um aumento de HLA-DR+ ( $p=0,018$ ) e a  $CD56^+CD16^+$  aumento de CD69+ ( $p=0,0102$ ), enquanto CD38 aumentou nas duas subpopulações,  $CD56^+CD16^-$  e  $CD56^+CD16^+$ , em relação às PVHA com  $CD4^+$  abaixo de 350 cel/  $\mu$ L ( $p=0,0054$  e  $p= 0,0033$  respectivamente).

Os resultados das associações entre os genótipos CC/CT vs. TT do gene *IFNL3* (rs12979860) com o número de células NK não mostraram diferenças significativas (Figura 7). Contudo, quanto aos marcadores de ativação, foi evidenciada maior expressão de CD69 nas subpopulações  $CD56^+CD16^+$  e  $CD56^+CD16^-$  associada aos genótipos CC/CT ( $p=0,03$  e  $p=0,04$  respectivamente). Não foi encontrada associação do polimorfismo do gene *IFNL3* (rs 12979860) com a contagem de linfócitos T  $CD4^+$  nas pessoas vivendo com HIV-1 que participaram deste estudo.

**Figura 7 - Associação do polimorfismo *IFNL3* com os marcadores de ativação de subpopulações das células NK**



Histogramas mostrando as diferenças no percentual de expressão de marcadores de ativação nas subpopulações de NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, respectivamente, (A), HLA-DR<sup>+</sup> (p=0,319 e p=0,415), (B) CD38<sup>+</sup> (p=0,373 e p=0,421) e (C), CD69<sup>+</sup> (p=0,04 e p=0,03) no grupo PVHA separados pelos genótipos *IFNL3* CC/CT e TT.

Fonte: própria autora (2014)

## DISCUSSÃO

Neste estudo evidenciamos que as células NK não apresentaram diferenças quantitativas no grupo PVHA com relação ao grupo controle, contudo, em relação às subpopulações de NK, houve aumento de NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 4) e maior nível de expressão de HLA-DR<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup> nas subpopulações estudadas em PVHA (figura 5 e 6). Além disso, demonstramos que a expressão de CD69 parece estar associada de forma positiva com os genótipos CC/CT rs12979860 do *IFNL3* (Figura 7).

O fato do número de células NK não apresentar diferença entre os grupos PVHA e controle, sugere que, de uma forma geral, os indivíduos do grupo PVHA não deveriam estar na fase aguda da infecção, na qual se esperaria uma expansão das células NK (17).

Alter et al. (5) relataram que a infecção pelo HIV-1 leva a uma diminuição na função citolítica das células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e da ativação das CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, que estaria relacionada com a progressão da doença. Em relação às subpopulações da NK nós observamos um aumento das células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> no grupo de PVHA, que pode refletir distúrbios na compartimentalização das subpopulações de NK, uma vez que essas células são predominantemente encontradas nos tecidos linfoides secundários (SLT) em comparação com o sangue periférico. Além disso, o aumento da expressão de marcadores de ativação tais como HLA-DR e CD38 em ambas subpopulações de NK poderia estar relacionado com a progressão da doença, como mostrado na Figura 5 e 6 (10, 18).

Por outro lado, nossos resultados mostraram que o grupo de PVHA apresentou menor número de NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, indicando fase crônica da infecção como descrito anteriormente em um estudo com pacientes infectados pelo HIV, virgens de tratamento (18). No entanto, a falta do aumento do número de NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, a qual tem sido relacionada como uma diferenciação defeituosa de CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> para CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> na infecção por HIV, podem indicar que a maturação de células NK está preservada no grupo infectado com HIV, aqui estudado (5,18).

Portanto, o perfil de ativação das células NK no grupo de PVHA, evidencia uma infecção crônica, apesar do diagnóstico sorológico de 84% dos pacientes (21/25) ter sido realizado em um período menor que um ano, no entanto, a falta do comprometimento característico das células NK CD56<sup>+</sup> indica diferenciação relativamente preservada das funções imunológicas (5). Em relação à expressão do CD69 não observamos diferenças entre

PVHA e o grupo controle, o que está de acordo com os achados anteriores, uma vez que o CD69 é considerado um marcador de ativação aguda das células NK (19,20).

Os resultados quanto à frequência de NK e suas subpopulações no grupo PVHA separados pela contagem de T CD4<sup>+</sup>, mostraram que indivíduos com T CD4<sup>+</sup> ≥ 350 céls/μL possuem maior número de células NK e maior expressão de CD69<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> em NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> respectivamente, contudo, a expressão de CD38<sup>+</sup> aumentou significativamente em ambas subpopulações.

Kuri-Cervantes et al. (10) demonstraram que em pacientes infectados pelo HIV-1, a expressão de CD38<sup>+</sup> em células NK, principalmente, na subpopulação CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> está associada com marcadores de progressão para a doença, como a contagem de T CD4<sup>+</sup>, a carga viral, a ativação de células T, inflamação e a ativação da imunidade inata. De fato, o estímulo persistente da imunidade inata contra o HIV-1 parece resultar em uma hiperativação crônica com efeitos deletérios das células T (21).

Entretanto, a compreensão dos mecanismos pelos quais a ativação imune crônica leva a um efeito supressor ainda é limitada. O fato de no presente estudo a expressão do HLA-DR<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup> no grupo PVHA ter sido associado com maior número de células T CD4<sup>+</sup> sugere uma heterogeneidade no tempo de infecção e / ou diferenças no estado de ativação das células NK, uma vez que a data precisa da infecção não pode ser estabelecida.

Adicionalmente mostramos uma associação entre os genótipos CC/CT com maior expressão de CD69<sup>+</sup> em NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> do grupo de PVHA, mas não identificamos diferenças relativas aos marcadores HLA-DR e CD38. Estudos sugerem que o aumento da expressão de CD69 em NK reflete aumento da citotoxicidade contra várias células alvo (22, 23). Linfócitos de pacientes com HIV-1 estimulados com antígeno ou mitógeno apresentaram uma expressão diminuída de CD69 em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, foi demonstrado que a gp120 inibe a expressão de CD69 em cultura de linfócitos estimulados por fito hemaglutinina, o que também poderia afetar a ativação de linfócitos T *in vivo* (24).

A função exercida pela molécula CD69 na resposta imune parece ser complexa. Os prováveis mecanismos de modulação em linfócitos T seriam: i) deleção de linfócitos pela indução de apoptose após ativação, ii) uma sinalização parcial durante a apresentação de antígenos parece estar relacionada a indução de expressão de CD69, relacionada com estado anérgico dos linfócitos em doenças inflamatórias crônicas (25).

No presente estudo o aumento da expressão do CD69 nas subpopulações de NK nos indivíduos CC/CT do grupo de PVHA poderia influenciar na ativação da resposta imune, afetando o equilíbrio de ativação crônica do sistema imunológico e imuno supressão. Portanto, esta hipótese precisa ser demonstrada por estudos funcionais.

Curiosamente, produtos solúveis secretados por ambas, maduras ou imaturas pDC podem induzir a expressão de CD69 em células NK; este efeito é, em parte, devido à IFN $\alpha$  (9). A expressão de CD69 permite a retenção temporária de células nos tecidos linfóides, o que pode levar a um efeito antiviral indireta (20).

Considerando que as células pDC são encontradas na circulação, no SLT, assim como, em tecidos infectados e são também a principal fonte de IFN $\lambda$ 3 (26), é possível que as pessoas portadores do alelo C podem provocar forte ativação autocrina das pDC induzida pela auto regulação do IFN $\alpha$ . Este efeito pode estar relacionado com as evidências de que o alelo C induz altos níveis séricos de IFN $\lambda$ 3 (27). Assim, a associação observada da expressão do CD69 com CC/CT genótipos poderia resultar na ativação das pDC pelo IFN $\lambda$ 3. Surpreendentemente, tem sido proposto que a produção de IFN- $\lambda$  e a resposta das pDC tem potencial de influenciar mecanismos de resistência do hospedeiro antivirais globais (26).

Em conclusão, pessoas com diagnóstico recente para HIV, virgens de tratamento, apresentaram um perfil ativado de células NK, com perda de CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e foi evidenciado que a expressão do CD69 em ambas subpopulações parece estar indiretamente sendo influenciada pelo polimorfismo do *IFNL3*.

## REFERÊNCIAS

1. **Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S.** 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687.
2. **Caligiuri MA.** 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**(3):461-9. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438.
3. **Brunetta E, Hudspeth KL, Mavilio D.** 2010. Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J. Leukoc. Biol.* **88**(6):1119-30. doi: 10.1189/jlb.0410225.
4. **De Maria A, Moretta L.** 2011. Revisited function of human NK cell subsets. *Cell Cycle* **10**(8):1178-9.
5. **Alter G, Altfeld M.** 2009. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J. Intern. Med.* **265**(1):29-42. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02045.x
6. **Guha D, Ayyavoo V.** 2013. Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1. *ISRN AIDS* **2013**:954806. doi: 10.1155/2013/954806.
7. **Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG.** 1988. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(13):4700-4.
8. **Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV.** 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **16**(2):83-92
9. **Benlahrech A, Donaghy H, Rozis G, Goodier M, Klavinskis L, Gotch F, Patterson S.** 2009. Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon  $\gamma$  secretion and cytotoxic activity by plasmacytoid dendritic cells is regulated through overlapping but different pathways. *Sensors (Basel)* **9**(1):386-403. doi: 10.3390/s90100386.
10. **Kuri-Cervantes L, de Oca GS, Avila-Ríos S, Hernández-Juan R, Reyes-Terán G.** 2014. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *J. Leukoc. Biol.* **96**(1):7-16. doi: 10.1189/jlb.0913514.
11. **Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP.** 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**(1):69-77.

12. **Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M.** 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**(7265):798-801. doi: 10.1038/nature08463.
13. **Salgado M, Kirk GD, Cox A, Rutebemberwa A, Higgins Y, Astemborski J, Thomas DL, Thio CL, Sulkowski MS, Blankson JN.** 2011. Protective interleukin-28B genotype affects hepatitis C virus clearance, but does not contribute to HIV-1 control in a cohort of African-American elite controllers/suppressors. *AIDS* **25**(3):385-7. doi: 10.1097/QAD.0b013e328341b86a.
14. **Sajadi MM, Shakeri N, Talwani R, Howell CD, Pakyz R, Redfield RR, Parsa A.** 2011. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. *Clin. Transl. Sci.* **4**(4):282-4. doi:10.1111/j.1752-8062.2011.00307.x
15. **Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sanchez MC, Abad MA, Ferrando-Martínez S, Genebat M, Pulido I, Viciano P, González-Escribano MF, Leal M, Ruiz-Mateos E.** 2013. *IL28B* Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. *J. Infect. Dis.* **207**(4):651-5. doi: 10.1093/infdis/jis717.
16. **Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, Guinan KJ, Hagan R, O'Farrelly C, Gardiner CM.** 2011. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(14):5736-41. doi: 10.1073/pnas.1016358108.
17. **Naranbhai V, Altfeld M, Karim SS, Ndung'u T, Karim QA, Carr WH.** 2013. Changes in Natural Killer cell activation and function during primary HIV-1 Infection. *PLoS One.* **8**(1):e53251. doi: 10.1371/journal.pone.0053251.
18. **Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B, Galiani MD, Gonzalez R, Solana R, Peña J.** 2002. Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *J. Clin. Immunol.* **22**(3):176-83.
19. **Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R.** 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**(1):159-65.
20. **Whitmire JK.** 2011. Induction and function of virus-specific CD4+ T cell responses. *Virology* **411**(2):216-28. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.015.
21. **Boasso A, Shearer GM.** 2008. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin. Immunol.* **126**(3):235-42.
22. **Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Phillips JH.** 1988. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and

phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* **167**(5):1572-85

23. **Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E.** 2003. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology.* **207**(2):85-93.24.
24. **Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW.** 1996. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **11**(1):95-104.
25. **Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F.** 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* **26**(3):136-40. doi: 10.1172/JCI200319112.
26. **Yin Z, Dai J, Deng J, Sheikh F, Natalia M, Shih T, Lewis-Antes A, Amrute SB, Garrigues U, Doyle S, Donnelly RP, Kotenko SV, Fitzgerald-Bocarsly P.** 2012. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **189**(6):2735-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102038.
27. **Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD, Nattermann J, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U.** 2011. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol.* **54**(5):859-65. doi:10.1016/j.jhep.2010.08.020.

## 7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- Genótipos CC/CT rs12979860 no *IFNL3* foram associados a um efeito positivo para as respostas imunológica e virológica à TARV em pacientes infectados pelo HIV-1, o que pode ser explorado como um possível marcador genético de resposta à TARV no período de 12 meses.
- Os genótipos CC/CT rs12979860 no *IFNL3* mostraram uma tendência de associação com uma menor carga viral quantificada antes da TARV (P=0,05), entretanto, não mostrando um efeito pré tratamento em relação as contagens de linfócitos T CD4+
- Em relação aos parâmetros imunológicos e /ou virológicos influenciados pelo o *IFNL3*, o modelo dominante CC/CT parece ser o mais adequado para analisar os efeitos da resposta a TARV.
- Foi observada diminuição da subpopulação NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> no grupo de pessoas vivendo com HIV/AIDS, corroborando com os achados da literatura;
- Ocorreu maior expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD38 em ambas subpopulações NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> do grupo PVHA, sugerindo evolução crônica da infecção;
- Não foi observada diferença significativa entre os grupos (PVHA e controle) em relação à expressão do CD69 o que está de acordo com os achados anteriores, considerando que o CD69 é um marcador de ativação aguda das células NK.
- Foi observada uma associação entre o polimorfismo do *IFNL3* (rs12979860) e ativação de células NK, entre a expressão de CD69 e os genótipos CC/CT, porém os marcadores HLA-DR e CD38 não mostraram diferenças de expressão.
- O estudo mostrou evidências que apoiam a influência do polimorfismo do *IFNL3* na resposta ao tratamento do HIV e na ativação de células NK em PVHA.
- Estudos longitudinais futuros empregando uma maior amostragem devem ser realizados para confirmar a utilização do polimorfismo *IFNL3* rs 12979860 como marcador de resposta a TARV em um período maior que 12 meses.
- Realizar estudos longitudinais avaliando a ativação das NK em períodos diferentes da infecção, uma vez que, nossos resultados apoiam a hipótese de que o *IFNL3* parece ter uma importante influência na resposta inicial do HIV-1 e indiretamente na modulação da resposta imune celular via células NK

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p.

ALTER, G.; ALTFELD, M. NK cells in HIV-1 infection: Evidence for their role in the control of HIV-1 infection. **J Intern Med.**, v.265, n.1, p.29-42, Jan. 2009.

ANK, N. et al. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. **J. Virol.**, v.80, n.9, p.4501-4509, Maio 2006.

APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **J. Pathol.**, v.214, n.2, p.231-241, Jan. 2008.

BIASSONI, R. et al. Human natural killer cell receptors and co-receptors. **Immunol Rev.**, v.181, p.203-214

BENITO, J.M. et al. CD38 expression on CD8+ T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. **AIDS. Res. Hum. Retroviruses.**, v.20, n.2, p.227-233, Fev. 2004.

BENITO, J.M. et al. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v.14, n.2, p.128-135, Fev. 1997.

BENLAHRECH, A. et al. Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon  $\gamma$  Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. **Sensors (Basel)**, v.9, n.1, p.386-403, Jan. 2009.

BIBERT, S. et al. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism, which improves HCV clearance prediction. **J Exp Med.**, v. 210, n. 6, p.1109-1116. Jun. 2013.

BOASSO, A.; SHEARER, G.M. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. **Clin. Immunol.**, v.126, n.3, p.235-242, Mar. 2008.

BOJARSKA-JUNAK, A. et al. Natural killer-like T CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells in chronic lymphocytic leukemia: intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome. **Oncol. Rep.**, v.24, n.3, p.803–810, Set. 2010.

BORROW, P. et al. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. **Retrovirology.**, v.7, n.84, p.1-17, Out. 2010.

BORREGO, F. et al.. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. **Immunology.**, v. 97, n. 1, p.159-65. 1999.

BRAND, S. et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.289, n.5, p.960-968, Nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico**, 2013.

BRENCHLEY, J.M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat. Med.**, v.12, n.12, p.1365–1371, Dez. 2006.

BRENNER, B.G. et al. Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases. **J. Leukoc. Biol.**, v.46, n.1, p.75-83, Jul. 1989.

BRUNETTA, E. et al. Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. **J. Leukoc. Biol.** v.88, n. 6. p.1119-30. 2010

CALIGIURI, M A. Human natural killer cells. **Blood.**, v. 112, n.3 p. 461-469, Aug.2008

CANQUE, B. et al. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages. **Blood.**, v.87, n.5, p.2011–2019, Mar. 1996.

CAVALCANTE, L.N. et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver Int.**, v.32, n. 3, p.476-486. Mar. 2012.

CHEN, Q.; CARROLL, H. P.; GADINA, M. The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. **Vitam. Horm.**, v. 74, p. 207– 228, 2006.

CLAUSEN, J. et al. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. **Immunobiology**. v.207, n. 2, p.85-93, 24. 2003

COTTER, R.L. et al. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection,  $\beta$ -chemokine production, and CCR5 expression in CD40L-stimulated macrophages: immune control of viral entry. **J. Virol.**, v.75, n.9, p.4308–4320, Maio 2001.

DEAYTON, J.R. et al. Rapid reconstitution of humoral immunity against cytomegalovirus but not HIV following highly active antiretroviral therapy. **AIDS**. v.16, n.16, p.2129-2135, Nov. 2002.

De MARIA, A.; MORETTA, L. Revisited function of human NK cell subsets. *Cell Cycle*.,v.10, n. 8, p.1178-9, April. 2011.

DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**., v.381, n.6584, p.661-666, Jun. 1996.

DOUEK, D.C. et al. HIV preferentially infects HIV specific CD4 T cells. **Nature**., v.417,n.6884, p.95-98, Maio 2002.

DRING M.M. et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.108, n.14, p. 5736-41, 2011.

DUMOUTIER, L., A. et al. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.31, p.32269–32274, Jul. 2004.

FERREIRA, R. et al. Association between *IFNL3* gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. **J Antimicrob Chemother.**, v. 67, n.2, p.509-510, Fev. 2012.

FINKEL, T.H. et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. **Nat. Med.** v.1, n.2, p.129-134, Fev. 1995.

GE, D. et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature.**, v.461, n.7262, p.399-401, Set. 2009

GEA-BANACLOCHE, J.C.; CLIFFORD, L.H. Immune reconstitution in HIV infection. **AIDS.**, v.13, p.25-38, 1999.

GIORGI, J.V. et al. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.**, v.29, n.4, p.346-355, Abr. 2002.

GOODIER, M.R. et al. Loss of the CD56<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> NK cell subset and NK cell interferon-gamma production during antiretroviral therapy for HIV-1: partial recovery by human growth hormone. **Clin. Exp. Immunol.**, v.134, n.3, p.470-476, Dez. 2003.

GROUX, H. et al. Activation-induced death by apoptosis in cd4<sup>+</sup> t cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. **J. Exp. Med.**, v.175, n.2, p.331-340, Fev. 1992.

GUHA, D.; AYYAVOO, V. Innate Immune Evasion Strategies by Human Immunodeficiency Virus Type 1. **ISRN AIDS.**, v., n.954806, p.1-25, Ago. 2013.

HONG, H. S. et al. Loss of CCR7 expression on CD56 (bright) NK cells is associated with a CD56(dim)CD16<sup>+</sup> NK cell-like phenotype and correlates with HIV viral load. **PLoS One.**, v.7, n. 9, 44820, 2012.

HERBERMAN, R.B.; NUNN, M.E.; LAVRIN, D.H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. **Int J Cancer.**, v.16, n.2, p. 216-229, Ago. 1975.

HARTFIELD, M. et al. Evidence that hepatitis C virus genome partly controls infection outcome. **Evol Appl.**, v.7, n. 5, p. 533-547, May. 2014.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J.; KAMPS, B.S. Pathogenesis of HIV-1 infection. In: **HIV Medicine Flying Publisher**, 2005. Disponível em: <<http://www.hivmedicine.com>>. Acesso em: 17 Set. 2014.

HOU, W. et al. Lambda Interferon Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages. **J. Virol.**, v.83, n.8, p.3834-3842, Abr. 2009.

JEWELL, N.A. et al. Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo. **J. Virol.**, v.84, n.21, p. 11515–11522, Nov. 2010.

KAWAKAM, K. et al. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**,v.85, n.13, p.4700-4, Jul. 1988

KOTENKO, S.V. et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat. Immunol.**, v.4, n.1, p.69-77, Jan. 2003.

KROWKA, J.F. et al. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.** v.11, n.1, p.95-104. 1996.

KURI-CERVANTES, L. et al. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. **J. Leukoc. Biol.** v. 96, n.1, p.7-16, Jul. 2014.

YIN, Z. et al. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. **J. Immunol.** v.189, n.6, p. 2735-45. 2012.

LANGER, J.A; CUTRONE, E.C.; KOTENKO, S. The class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 15, n. 1, p. 33–48, Fev. 2004.

LANGHANS, B. et al. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. **J Hepatol.** v. 54, n. 5, p. 859-65. May. 2011.

LANIER, L.L. et al. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. **J. Exp. Med.** v.167, n. 5, p. 1572-85, May. 1988.

LANIER, L.L. NK Cell Recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v.23, p.225–274, Abr. 2005.

LASFAR, A.A. et al. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. **Cancer Res.**, v.66, n.8, p.4468–4477, Abr. 2006.

LAWN, S.D.; BUTERA, S.T.; FOLKS, T.M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14,n.4, p.753-777, Out. 2001.

LELIGDOWICZ, A. et al. Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. **J. Clin. Invest.**, v.117, n.10, p.3067–3074, Out. 2007.

LIU, M.Q. et al. IFN  $\lambda$ 3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. **Plos One.**, v.7, n.4, e35902, Abr. 2012.

LUCIA, M.B. et al. CD16+CD56+CD8+ natural killer (NK) cells are decreased during HIV infection. **Eur. J. Histochem.**, v.41, n.2, p. 197-198, 1997.

LUNGE, V.R. et al. IFN $\lambda$ 3 Polymorphism Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Infection in a Southern Brazilian HIV Type 1 Population. **AIDS Res Hum Retroviruses.**, v. 28, n.2, p.215-219, Fev. 2012.

MACHMACH, K. et al. *IFN $\lambda$ 3* Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. **J. Infect. Dis.** v.207, n.4, p.651–655, Fev. 2013.

McFARLAND, A.P. et al. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. **Nat Immunol.** v.15, n.1, p.72-9. Jan. 2014.

MAHER, S. G., et al. IFN $\alpha$  and IFN $\lambda$  differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. **Cancer Biol Ther.**, v.7, n.7, p.1109–1115, Jul. 2008.

MARTIN, M.P. et al. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. **J. Infect. Dis.**, v.202, n.11, p.1749–1753, 2010.

MILLER, V. et al. Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the Euro SIDA Study. **Ann. Intern. Méd.**, v.130, n.7, p.570-577, Abr. 1999.

\_\_\_\_ Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasil. Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2013. Available on:

<http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/diversos/Protocolo%20to%20HIV%202013.pdf>

MONTOYA, P.A. et al. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. **Clin. Immunol.**, v.120, n.2, p.138–146, Ago. 2006.

MORETTA, A. et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p.197-223. 2001. Review.

NARANBHAI, V. et al. Changes in Natural Killer cell activation and function during primary HIV-1 Infection. **PLoS One**. v. 8, n.1, p. e53251, Jan. 2013.

ONOGUCHI, K. et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.282, n.10, p.7576-7581, Mar. 2007.

PANTALEO, G. et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature.**, v.362, n.6418, p.355-358, Mar. 1993.

PANTALEO, G.; FAUCI, A.S. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. **Annu. Rev. Immunol.**, v.13, p.487-512, 1995.

PARCZEWSKI, M. et al. IL28B CC genotype is associated with higher all cause mortality in antiretroviral treated HIV infected patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v.28, n.2, p. 1640-1646, Dec. 2012.

PENA, SD. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res.**, v.42, n.10, p. 870-876, Sep. 2009.

POLI, et al. CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology.**, v.126, n.4, p.458-465, Abr. 2009.

RALLON, N.I. et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. **AIDS.**, v.24, n.8, p.23–29, May 2010.

RAUCH, A. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterology**. v.138, n.4, p.1338–1345, Abr. 2010.

RENALD, J. C. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 8, p. 667–676, Ago. 2003.

ROBEK, M.D.; BOYD, B.S.; CHISARI, F.V. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. **J. Virol.**, v.79, n.6, p.3851-3854, Mar. 2005.

RUIZ-MATEOS, E. et al. Hepatitis C virus replication in Caucasian HIV controllers. **J Viral Hepat.**, v. 18, n.7, p. 350-357, Jul. 2011.

SAJADI M.M. et al. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. **Clin Transl Sci.**, v. 4, n.4, p.282-284, Ago. 2011

SALGADO, M. et al. Protective interleukin-28B genotype affects hepatitis C virus clearance, but does not contribute to HIV-1 control in a cohort of African-American elite controllers/suppressors. **AIDS.**, v.25, n.3, p.385-387, Jan. 2011.

SANCHO, D. et al.. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. **Trends Immunol.** v. **26**, n. 3, p.136-40, Mar. 2005.

SARAIVA M; O´GARRA A. The regulation of IL-10 production by imune cells. **Nat Rev Immunol.**, v.10, n. 3, p. 170-181, Feb. 2010.

SHEPPARD, P., *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 63–68, Jan. 2003.

SILVESTRI, G. et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. **Immunity**, v. 18, n.3, p.441–452, Mar. 2003.

SODORA , D.L.; SILVESTRI,G. Immune activation and AIDS pathogenesis .**AIDS.**,v. 22, n.4, p.439 – 446, Feb. 2008.

SOMMEREYNS, C. et al. IFN-Lambda (IFN-1) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. **PLoS Pathog.**, v.4, n.3, e1000017, Mar. 2008.

STENKVIST, J. et al. High HCV treatment uptake in the Swedish HIV/HCV co-infected cohort. **Scand J Infect Dis.**, v.46, n.9, p. 624-32, Jul. 2014.

SUPPIAH, V. et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nat. Genet.**, v.41, n.10, p.1100-1104, Set. 2009.

TANAKA, Y. et al. Genome-wide association of IL-28b with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet.**, v.41, n.10, p.1105-1109, Out. 2009.

TAN R, et al. Clinical outcome of HIV- infected antiretroviral-naïve patients with discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.** v.47, n. 5, p.553-8, Abr.2008.

TARAZONA R, et al.. Selective depletion of CD56<sup>dim</sup> NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naïve HIV-1-seropositive individuals. **J.Clin. Immunol.**, v.22, n.3, p.176-83, May. 2002

THOMAS D.L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature.**, v. 461, n.7265, p.798-801. Oct.2009.

VASCONCELOS, L.R. et al. Low IL10 serum levels as key factor for predicting the sustained virological response to IFN $\alpha$ /ribavirin in Brazilian patients with HCV carrying IL28B CT/TT genotype. **Hum Immunol.**, v.75, n.8, p.895-900, Aug. 2014

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science.**, v 331, n.6013, p.44-9, Jan. 2011.

WEISS, L. et al. HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 $\alpha$  in vitro. **AIDS.**, v.3, n.11, p.695-699, Nov. 1989.

WITTE, K. et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.21, n.4, p.237-251, Ago. 2010.

ZHOU, Z.O.J. et al. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the JAK-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. **J. Virol.**, v.81, n.14, p.7749-7758, Jul. 2007.

## APÊNDICES

### Apêndice A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa: Polimorfismo do gene IL28B e ativação de células NK e linfócitosT CD8 em pacientes HIV+

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Polimorfismo do gene IL28B e ativação de células NK linfócitosT CD8 em pacientes HIV+

Pesquisador Responsável: Valéria Oliveira de Melo Ferreira

Endereço/Telefone/e-mail para contato (inclusive ligações a cobrar):Av. Conselheiro Rosa e Silva, 1715 APT 701, (81) 34272917 - 91247737

Pesquisadores participantes: Maria Rosângela Coelho /Patrícia Muniz

Telefones para contato: 81 9952 9246 / 81 9646 9951

Estou sendo convidado (a) para participar de um estudo que tem como objetivo investigar se o polimorfismo do gene IL28B pode influenciar a contagem dos linfócitos TCD8, ativação da células NK e quantificação da carga viral em indivíduos vivendo com HIV, sendo necessário utilizar 4 ml do meu sangue coletado no Hospital Correia Picanço para realizar as contagens rotineiras de CD4/CD8 e quantificação da carga viral no LACEN/PE. Fui informado que meu médico e eu ficaremos sabendo de todos os resultado obtido através deste estudo.

Todo material descrito e o sangue coletado serão trabalhados com o máximo rigor científico e minha identidade será mantida em sigilo. Os relatórios e publicações resultantes dessa pesquisa conterão os resultados de forma sumarizada e, portanto, não haverá forma de identificação.

Autorizo Também que minhas amostras sejam utilizadas para avaliação de outros genes e no momento serei ou não consultado.

Os riscos que corro ao participar deste estudo estão relacionados ao local da punção, como exemplo: sensibilidade local /formigamento e mancha arroxeadada que podem ser minimizados com os cuidados higiênicos tópicos, pressão local após o procedimento. Raramente são observadas infecções decorrentes da punção, mas, caso haja, eu serei adequadamente tratado (a) sem qualquer ônus. Quanto aos benefícios diretos, fui informado

que as células e moléculas que serão estudadas poderão esclarecer melhor a evolução da doença no meu organismo, auxiliando na terapia contra o HIV. Portanto, os resultados desta pesquisa poderão contribuir com o entendimento de como o sistema imunológico age contra o HIV auxiliando no desenvolvimento de uma possível estratégia de tratamento.

A minha participação não implica em remuneração para mim ou para os meus familiares, tratando-se de colaboração voluntária para o conhecimento científico.

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, RG/ CPF/\_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo \_\_\_\_\_, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a)\_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_ Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

\_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: Valéria Oliveira de Melo Ferreira

Assinatura: \_\_\_\_\_

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**Apêndice B – FORMULÁRIO DA PESQUISA****(Estudo 01)**

NOME \_\_\_\_\_

SEXO \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO \_\_\_\_\_

ANO HIV REAGENTE \_\_\_\_\_

ANO INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

IDADE NO INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

TEMPO DE HIV POSITIVO \_\_\_\_\_

CASO AIDS \_\_\_\_\_

CD4+ ANTES DO INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

CV ANTES DO INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

CD4+ 12 MESES APÓS INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

CV 12 MESES APÓS INÍCIO DA TARV \_\_\_\_\_

COINFECCÕES \_\_\_\_\_

**(Estudo 02)**

NOME \_\_\_\_\_

SEXO \_\_\_\_\_

IDADE \_\_\_\_\_

TEMPO DE DIAGNÓSTICO \_\_\_\_\_

CASO AIDS \_\_\_\_\_

CONTAGEM DE CELULAS TCD4+NADIR \_\_\_\_\_

CARGA VIRAL NADIR \_\_\_\_\_

COINFECCÕES \_\_\_\_\_

**Apêndice C – VERSÃO DO ARTIGO I EM INGLÊS****SUBMETIDA À REVISTA: AIDS Patient Care and STDs****Title**

*IFNL3* CC/CT genotypes at rs12979860 show a protective effect for the immunological and virological response to HAART in HIV Brazilian infected patients

**Running Head:** *IFNL3* CC/CT genotypes and response to HAART in HIV patients

Valéria Oliveira de Melo Ferreira<sup>1,2\*</sup>, Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho<sup>2,3</sup>, Carla Maria Mola de Vasconcelos<sup>1</sup>, Luydson Vasconcelos<sup>5</sup>, Ulisses Ramos Montarroyos<sup>4</sup>, Pablo Rafael<sup>6</sup> Silveira Oliveira e Patrícia Moura<sup>2,4</sup>

1-Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE), Immunology Section, Recife, Pernambuco, Brazil.

2-Post-Graduation Program in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

3-Department of Physiology and Pharmacology, Laboratory of Immunopathology Keiz-Asami (LIKA), Division of Virology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

4- Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco –UPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

5-Liver institute of Pernambuco-IFP, Recife, Pernambuco, Brazil.

6-Laboratory of Patology and Biointervention, Centre of Research Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil.

\*Correspondent author: Valéria Oliveira de Melo Ferreira

Avenue Conselheiro Rosa e Silva 1715/701, Jaqueira

CEP 52050-020 Recife- Pernambuco – Brazil

Email: [vomferreira@yahoo.com.br](mailto:vomferreira@yahoo.com.br)

**ABSTRACT**

HIV-HCV co-infected patients carrying the *IFNL3* genotype CC at rs12979860 submitted to therapy with Ribavirin/IFN $\alpha$  achieve enhanced viral control. Therefore this study aimed to investigate whether the SNP in the *IFNL3* at rs12979860 would be related to the immunological and virological responses of people living with HIV/AIDS undergoing HAART. The clinical characteristics were collected retrospectively, while the *IFNL3* genotyping was performed prospectively after 1-year HAART. We enrolled 266 patients, 30 HIV HAART non-responders, who failed to increase  $\geq 50$  cells/ $\mu$ L CD4<sup>+</sup> T cell counts compared to the initial counting and had detectable HIV-1 RNA copies/mL at 1-year; and 236 immunological/virological responders (CD4<sup>+</sup> T cell counts  $\geq 50$  cells/ $\mu$ L and undetectable HIV-1 RNA copies/mL at 1-year). In a multivariate logistic regression model the *IFNL3* rs12979860 genotypes CC/CT and CD4<sup>+</sup> T cells low counting before HAART were independently associated to HAART response ( $p= 0.027$  OR 2.52 IC 1.02 – 6.21 and  $p= 0.002$  OR 0.997 IC 0.995–0.999, respectively). In conclusion, the *IFNL3* CC/CT genotypes at rs12979860 had protective effect to the immunological and virological response to HAART, representing a valuable genetic marker for therapy response in Brazilian population. Consequently, further studies are necessary in order to investigate the potential of *IFNL3* polymorphism as genetic marker of HIV therapy.

Key words: Therapy. Innate Immunity. Interferon. Polymorphism and Genetic Marker.

## INTRODUCTION

Innate immunity is the first line of defence against viral infections, being responsible for containing the initial breakthrough of pathogens, activating inflammation and eliciting adaptive specific response against them. This first contact can establish a relatively balanced relationship between virus and host antiviral state. Studies in the literature suggest that the innate response plays an important role in the disease progression caused by the human immunodeficiency virus (HIV).<sup>1,2</sup> Among the antiviral molecules that participate in the innate response, the type I and II interferons (IFNs) have been known for decades as classic antiviral cytokines, however, a new class of IFNs type III or IFN-lambda (IFN $\lambda$ ) recently has been extensively studied, showing also potent antiviral activity.<sup>3,4</sup> IFN $\lambda$  family has three members: IFN $\lambda$ 1 (IL-29), IFN $\lambda$ 2 (IL-28A) and IFN $\lambda$ 3 (IL-28B). All of which are encoded by genes clustered on human chromosome 19, which structurally resemble the interleukin-10 (IL-10), but functionally are similar to the family of type I interferons (IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ ), due to its ability to activate the ISRE (elements stimulated by IFN responses).<sup>5</sup> Expression of members of the IFN $\lambda$  family is induced in both hematopoietic and non-hematopoietic cells by various viruses that infect humans.<sup>6</sup> Unlike the signalling of IFN type I, the IFN $\lambda$  signalling displays more restrictedly cellular specificity, since the receptor for IFN $\lambda$  is closely distributed in epithelial cells, suggesting that these IFNs are related to innate antiviral epithelial response.<sup>7</sup> Several studies have shown that IFN $\lambda$  has the ability to inhibit replication of a number of viruses, including hepatitis B and C, cytomegalovirus, herpes simplex virus type 2 and vesicular stomatitis virus.<sup>8-11</sup> Regarding HIV, the IFN $\lambda$ 3 seems to exert its antiviral function by activating JAK-STAT pathway-mediated innate immunity in macrophages.<sup>12</sup> The presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) near the *IFNL3* gene (encoding IFN $\lambda$ 3) is strongly associated with the response of therapy in HCV or HCV/HIV infected patients, as well as with natural control of HCV infection.<sup>13-15</sup>

The polymorphism upstream *IFNL3*, rs12979860, showing allele C was identified as predictor of viral clearance and sustained anti-viral response following conventional ribavirin and IFN $\alpha$  therapy.<sup>16,17</sup>

Since the HIV- HCV co-infected patients carrying genotype CC submitted to therapy with ribavirin and IFN- $\alpha$  present enhanced viral control, this study was designed to investigate

whether the *IFNL3* rs12979860 polymorphism would be related to the immunological and virological responses of people living with HIV/AIDS undergoing antiretroviral therapy (HAART).

## **METHODS AND PATIENTS**

### **Patients and treatment**

All patients in this study were from Pernambuco (PE), Brazil and were attended at the Infectious Diseases Service of Correia Picanço. The patients were diagnosed for HIV infection and received HIV specific treatment following the Brazilian consensus.<sup>18</sup> The clinical characteristics were collected retrospectively, while the *IFNλ3* genotyping study was performed prospectively after 1 year of the HAART (combination of 3 or more antiretroviral drugs).

For this study we selected an age range of the 22 to 56 years old at beginning of HAART and lack of previously antiretroviral treatment in attempt to avoid age-related or therapy variation interfering factors; considering that these patients probably had been infected at earlier age before therapy. The blood for genotyping was collected at the time or near the last CD4+ T cell counts. The sample included 266 patients, being 30 HIV HAART non-responders (NR), defined as the patients who failed to increase CD4+ T cell counts ( $\geq 50$  cells/ $\mu$ l) compared to the initial counting and also showed detectable HIV-1 RNA copies/mL after 1 year of HAART; and 236 immunological/virological responders (IVR), defined as subjects who had concordant or discordant CD4+ T cell counts by  $\geq 50$  cells/ $\mu$ l and undetectable HIV-1 RNA copies/mL at 1 year of HAART. The CD4+ and CD8+ T cells counting were measured from fresh whole blood samples, using the BD Multitest® (Becton-Dickinson – BD, NJ, EUA), at the State Central Laboratory (LACEN, Pernambuco, Brazil). Plasma HIV-RNA load was measured in fresh samples using the bDNA amplification technology (Versant HIV RNA 3.0 Assay® Siemens, Tarrytown, NY). The detection range of the system was 50-500,000 copies of RNA/mL.

### **Sample collection, DNA extraction and genotyping of *IFNL3* rs12979860**

Whole blood samples were collected in tubes containing EDTA solution and kept at -20°C for 24h until DNA extraction. The DNA was extracted using the Wizard Genomic

Purification Kit (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions.

The SNP rs12979860 was genotyped by the TaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, CA), using specific probes, FAM-TGGTTCGCGCCTTC-MGB, allele C and VIC-CTGGTTCACGCCTTC-MGB, allele T and primers 5'-GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' and 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3' forward and reverse respectively. The probes, primers and validated protocols for the SNPs are available at <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS statistical software package version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Categorical variables were compared using the  $\chi^2$  Test or Fisher's exact Test when appropriate. Two-group comparisons were performed using the Student's t test for parametrically or Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test for non-parametrically distributed data. Logistic regression was performed using forward stepwise method. CD4+ T cell counts; viral load and *IFNL3* genotype were included in the model. The results are presented using odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). The differences were considered statistically significant when the *P*-value was <0.05.

### Ethical considerations

The present study was approved by the Ethical Committee in Research of the Federal University of Pernambuco under the protocol- CAAE: 04725712.3.0000.5208 and was conducted in accordance with the provisions of the declaration of Helsinki and good clinical practice guidelines. Informed written consent was obtained from all participants.

### RESULTS

The studied population comprised 266 persons living with HIV/AIDS, including 30 individuals with neither immunological and virological response here termed non-responders (NR), comprising 11.3%; and 236 individuals showing immunological and/or virological response (IVR) comprising 88.7% of the population. For both groups the response evaluation was done in the period of 12 months of post-HAART scheme (Table 1).

Regarding the population characteristic: 172 were male (22 NR and 150 IVR), 94 were females (8 NR and 86 IVR). No association was observed between sex and response to

HAART ( $p=0.31$ ). Previously AIDS report also didn't differ between the groups ( $p=1.00$ ). Higher counting of CD4+ T cells before HAART was associated to successful HAART response ( $p=0.02$ ). In contrast, the viral load (VL) values before therapy showed no association ( $p=0.38$ ) (Table 1). We observed also that rs12979860 was in the Hardy-Weinberg equilibrium. Its minor allelic frequency (C allele) was 42%. The frequency of genotype TT was 16% while CT/CC was 84%. Both allelic and genotypic frequencies were similar to the previously reported frequency found in normal blood donors matched by region.<sup>19</sup>

When studies on *IFNL3* rs12979860 genotypes and therapy response were conducted, we have found that the CC/CT genotypes were associated with better response to therapy ( $p=0.037$ , OR 2.55 IC 1.08-6.03) (Table 2). However, no difference was found between those genotypes and CD4+ T cells or the viral load (VL) values before therapy (Table 3).

In a multivariate logistic regression model the CC/CT from rs12979860 and CD4+ T cells numbers before HAART were independently associated with HAART response ( $p=0.027$  OR 2.52 IC 1.02-6.21 and  $p=0.002$  OR 0.997 IC 0.995-0.999, respectively).

## DISCUSSION

In the present study, we found a favorable influence of the genotypes CC/CT rs12979860 at *IFNL3* in the virological and immunological response to HAART. Also, lower numbers of CD4+ T cell counting, before treatment, was associated to the HAART response. The multivariate analysis showed an independent association for rs12979860 and low CD4+ T cell counting with the therapy response for 1-year HAART period ( $p=0.027$  and  $p=0.002$ , respectively).

The majority of the studies investigating *IFNL3* CC rs12979860 genotyping in HIV infected people were designed to study the response in the HIV-HCV co-infected patients showing, mainly, the association with HCV therapy successful response.<sup>20</sup> Interestingly, evidences show a common antiviral control mechanism for both HCV and HIV.<sup>21,22</sup> In a Caucasian population, Machmach *et al.*<sup>22</sup> studying HIV-HCV infected patients reported that the frequency of *IFNL3* CC was higher in 53 HIV controllers, who were anti-HIV positive and had <1000 HIV-1 RNA copies/mL plasma load in absence of antiretroviral therapy compared to 389 HIV infected patients submitted to antiretroviral therapy which were considered no controllers.<sup>22</sup> Herein the influence of *IFNL3* CC/CT genotypes was associated

to immunological and virological parameters simultaneously differing from previously studies that considered either virus control or CD4+ T cell counting as separated conditions.<sup>23</sup>

Previous studies with African-American individuals show no association of HIV control and *IFNL3* SNP.<sup>24,25</sup> This suggests that the significance as a genetic marker of the polymorphism *IFNL3* at rs12979860 for response to HAART in HIV-infected people may differ depending on the ethnicity as it was observed for HCV.<sup>16</sup> Since Brazilian population has a highly admixture characteristic with contribution of European, African and Amerindian origin, differences in the frequency of the polymorphism *IFNL3* at rs12979860 could highly vary among Brazilians.

However, the studies done in Brazilians with HIV-HCV co-infection revealed that *IFNL3* CC genotype at rs12979860 had a positive association with successful therapy response for HCV,<sup>26</sup> resembling the results found with Europeans.<sup>16</sup> In fact, a study in Brazilian admixed population infected with HCV genotypes 1, 2 and 3 showed that, ancestry did not interfered in the response to HCV therapy of patients with CC genotype at rs12979860, whereas it interfered in patients carrying C/T and T/T genotypes.<sup>27</sup>

Also, the frequency of the CC genotype at rs12979860 in non-infected Brazilian admixed population showed to be higher than that found in Africans, but slightly lower than Europeans.<sup>19</sup> Those findings suggest a significant European contribution on Brazilian studied population as observed in previously study investigating genetic ancestry markers in the Brazilians.<sup>28</sup> Therefore, the association of CC/CT genotypes with immunological/viral control observed here is similar to the results reported by Machmach *et al*<sup>22</sup>, which studied Spanish white patients, but differs from the studies that investigated African-Americans infected patients. Thus, the CC/CT genotypes at rs12979860 as a genetic marker for the HIV successful therapy response seems to be suitable even in admixed Brazilian context and needs to be confirmed in further prospective studies.

Nevertheless, our results are aligned with the evidences that *IFNL3* CC allele rs12979860 may contributes to the HIV control, in patients submitted to 1 year of HAART.<sup>22</sup> In part, it could be related to the fact that, the patients with *IFNL3* CC genotype showed the lowest HIV VL before therapy (median 62,550 HIV-1 RNA copies/mL;  $p=0.05$ ). However, in multivariate analysis, only low levels of CD4+ T cells before HAART and *IFNL3* CC/CT remained independently associated to better response.

The favorable CC genotype at rs12979860 co-segregates with the non-*IFNL4*, generating TT genotype at ss469415590, which was associated to differential expression of *IFNL3* mRNA due epigenetic regulation.<sup>29</sup> Also, CC genotype at rs12979860 is in strong linkage disequilibrium ( $r^2=0.94$ ) with the rs4803217 situated at the 3' untranslated region (UTR) of *IFNL3* mRNA, which leads to transcript stability. This polymorphism influenced AU-rich element (ARE)-mediated decay (AMD) of *IFNL3* mRNA, as well as the binding of HCV-induced microRNAs during infection.<sup>30</sup> Therefore, reinforcing the power of *IFNL3* CC at rs12979860 as a genetic marker of therapy success in HCV infection and maybe in the HIV control.

On the other hand, a longitudinal study with 484 HIV infected patients showed that the *IFNL3* CC genotype at rs12979860 was associated with a decreased probability of survival when compared to the non-CC genotype. The authors suggested that the findings may be related to higher plasma baseline HIV viremia and possibly altered immune reconstitution associated to the IFN $\lambda$  expression.<sup>31</sup> The immune reconstitution as a phenomenon associated to the survival of CC-carriers proposed by those authors is mostly probable since one consider that the hyper activation of immune system leads to disease progression. Consequently, the *IFNL3* rs12979860 seem to have different effects accordingly the time of therapy.

The IFN $\lambda$ s 1, 2 and 3 can induce antiviral effects thru the JAK-STAT signal transduction pathway, including the phosphorylation of STAT2 and activation of the ISGF3 transcription complex, functions previously related to the actions of type I IFNs.<sup>3</sup> The IFN $\lambda$ 3 exerts its anti-HIV function by activating JAK-STAT pathway-mediated innate immunity in macrophages,<sup>13</sup> supporting our results concerning the influence of the *IFNL3* polymorphism on the HAART for HIV *in vivo*.

In conclusion, the *IFNL3* CC/CT genotypes at rs12979860 were associated to better immunological and virological response to HAART in HIV infected patients in the period of 1 year of observation, representing a valuable genetic marker for early HAART response in Brazilian population. Consequently, further studies are necessary in order to investigate this effect in longer period of HAART therapy.

## REFERENCES

1. Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. Clin Immunol 2008; 126(3):235-242.
2. Borrow P, Robin JS, Annapurna V. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. Retrovirology 2010; 7:84.
3. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin W, et al. IFN-Is mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol 2003; 4(1):69-77.
4. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol 2003; 4(1):69-77.
5. Renald JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. Nat Rev Immunol 2003; 3(8):667-676.
6. Witte K, Witte E, Sabat R, et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. Cytokine Growth Factor Rev 2010; 21(4):237-251.
7. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, et al. IFN-lambda (IFN- $\lambda$ ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. PLoS Pathog 2008; 4(3) e1000017.
8. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. J Virol 2005; 79(6):3851-3854.
9. Brand S, Beigel F, Olszak T, et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289(5): 960-968.
10. Ank N, West H, Bartholdy C, et al. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. J Virol 2006; 80(9):4501-4509.
11. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, et al. 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. J Biol Chem 2007; 282 (10):7576-7581.
12. Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, et al. IFN  $\lambda$ 3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. Plos One 2012;7(4): e 35902.
13. Rallon NI, Naggie S, Benito JM, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. AIDS 2010; 24(8):23-29.
14. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology 2010;138 (4):1338-1345.
15. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL-28b with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet 2009; 41(10):1105-1109.
16. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009; 461(7262):399-401.
17. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL-28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet 2009; 41(10):1100-1104.
18. \_\_\_\_ Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasil. Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2013. Available on: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/diversos/Protocolo%20to%20HIV%202013.pdf>.

19. Vasconcelos LR, Moura P, do Carmo RF, et al. Low IL10 serum levels as key factor for predicting the sustained virological response to IFN $\alpha$ /ribavirin in Brazilian patients with HCV carrying IL28B CT/TT genotype. Hum Immunol 2014; S0198-8859(14)00181-185.
20. Stenkvist J, Weiland O, Sonnerborg A, et al. High HCV treatment uptake in the Swedish HIV/HCV co-infected cohort. Scand J Infect Dis 2014:1-9.
21. Ruiz-Mateos E, Machmach K, Romero-Sanchez MC, et al. Hepatitis C virus replication in Caucasian HIV controllers. J Viral Hepat 2011; 18(7):350-357
22. Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sanchez MC, et al. IL28B Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. J Infect Dis 2013. 207(4):651–5.
23. Hartfield M, Bull R, White PA, et al. Evidence that hepatitis C virus genome partly controls infection outcome. Evol Appl 2014; 7(5):533-547.
24. Salgado M, Kirk GD, Cox A, et al. Protective interleukin-28B genotype affects hepatitis C virus clearance, but does not contribute to HIV-1 control in a cohort of African-American elite controllers/suppressors. AIDS 2011; 25(3):385-7.
25. Sajadi MM, Shakeri N, Talwani R, et al. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. Clin Transl Sci 2011; 4(4):282–4.
26. Ferreira PR, Santos C, Côrtes R, et al. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. J Antimicrob Chemother 2012; 67(2):509-510.
27. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. Liver Int 2012; 32(3):476-486.
28. Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. Braz J Med Biol Res 2009;42(10):870-876.
29. Bibert S, Roger S, Calandra T, et al. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. J Exp Med 2013; 210(6):1109-1116.
30. McFarland AP, Horner SM, Jarret A. The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. Nat Immunol 2014;15(1):72-9.
31. Parczewski M, Bander D, Leszczyszyn-Pynka M, et al. IL28B CC genotype is associated with higher all cause mortality in antiretroviral treated HIV infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses 2012;28(12): 1640-1646.

**TABLE 1.** Clinico-epidemiological characteristics of persons living with HIV/AIDS with failure to respond to ART and virological response and / or immunological.

	<b>NR</b> <b>(N=30)</b>	<b>IVR</b> <b>(N=236)</b>	<b>P-Value</b>
<b>Sex</b>			
Male	22 (0.73)	150 (0.66)	0.31
Female	08 (0.27)	86 (0.36)	
<b>Age at HAART*</b> <b>(years)</b>	36 (31-40)	36 (31-43)	0.79
<b>AIDS previously</b>			
Yes	27 (0.90)	211 (0.89)	1.00
No	03 (0.10)	25 (0.11)	
<b>T CD4+ and Viral load (VL)</b> <b>before HAART</b>			
TCD4+ / $\mu$ L*	231.5 (121 - 389.3)	167 (57.25 - 274.8)	<b>0.02</b>
VL copies/mL*	58,950 (16,250 - 152,500)	100,000 (8,348 - 280,000)	0.38

**TABLE 2.** Frequencies of the *IFNL3* rs12979860 allelic and genotypic polymorphism at rs12979860 in patients with non-response (NR) and with immunological and virological response (IVR) to 1-year HAART in persons living with HIV.

<i>IFNL3</i> (rs12979860)	NR (N=30/60)	IVR (N=236/472)	<i>P-Value</i>	OR (CI)
<b>Alleles</b>				
T	33 (0.55)	192 (0.41)	<b>0.038</b>	1.78 (1.04 - 3.06)
C	27 (0.45)	280 (0.59)		
<b>Genotypes</b>				
TT	09 (0.30)	34 (0.14)	<b>0.037</b>	2.55 (1.08 - 6.03)
CC/CT	21 (0.70)	202 (0.86)		

**TABLE 3.** Association of the *IFNL3* rs12979860 genotypes with CD4+ T cells counting and plasma viral load (VL) of HIV before the 1-year HAART.

<b>Before HAART</b>	<b><i>IFNL3</i> (rs12979860) genotypes</b>			<b><i>P</i>-value</b>
	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
CD4+ cells / $\mu$ L*	378 (96 - 287)	206 (55 - 281)	203 (51 - 298)	0.590
VL copies/mL*	62,550 (5,128 – 24,8500)	100,000 (7,897 – 24,5500)	123,795 (58,900 - 36,9000)	0.051

**Apêndice D – VERSÃO DO ARTIGO II EM INGLÊS****SUBMETIDA À REVISTA:** Journal of Virology**Association of *IFNL3* gene polymorphism and increased expression of CD69 on NK cells subsets in ART-naïve HIV infected individuals**

Valéria Oliveira de Melo Ferreira<sup>1,2\*</sup>, Maria Carolina Accioly<sup>4</sup>, Valéria Pereira<sup>4</sup>, Carla Maria Mola de Vasconcelos<sup>1</sup>, Luydson Richardson Silva Vasconcelos<sup>6</sup>, Patrícia Moura<sup>2,4</sup> e Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho<sup>2,3</sup>

1- Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), Setor de Imunologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

2- Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

3- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Laboratório de Imunopatologia Keiz-Asami(LIKA), Setor de Virologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

4- Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães –FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brasil.

5- Instituto de Ciências biológicas, Universidade de Pernambuco –UPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

6- Instituto do Fígado de Pernambuco – IFP, Recife, Pernambuco, Brasil.

\* Correspondence:

Valéria Oliveira de Melo Ferreira  
Avenida Conselheiro Rosa e Silva 1715/701, Jaqueira  
CEP 52050-020 Recife- Pernambuco - Brasil  
Email: [vomferreira@yahoo.com.br](mailto:vomferreira@yahoo.com.br)

**ABSTRACT**

Type III interferons or lambda interferon (IFN- $\lambda$  1 or IL-29, IFN-or IL-28A  $\lambda$  2,  $\lambda$  3 IFN-or IL-28b) and the NK cells are the main components of innate immunity controlling viral replication. However, the influence of polymorphism in *IFNL3* in response to HIV treatment is controversial. Thus, we aimed to explore the hypothesis that the CC/CT genotypes in *IFNL3* related to spontaneous cure of HCV infection also would be related to enhancement in the activation of NK cells from patients with HIV treatment naïve. This study included 25 people living with HIV without antiretroviral therapy and 25 HIV-negative individuals, which were compared regarding the percentage differences in the number of NK cells and their subsets, as well as the activation expression profile of HLA-DR, CD38 and CD69. Besides, association of the *IFNL3* polymorphism with the activation expression profile of NK was investigated. The results showed an increase in NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> subset and decreased NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ), and increased expression of HLA-DR and CD38 molecules in both NK subsets in HIV infected group compared to the control group. Regarding the polymorphism *IFNL3* and activation of NK, we observed an association between the expression of CD69 and genotypes CC/CT ( $p = 0.03$ ). In conclusion, the present study provides evidence supporting the influence of polymorphism *IFNL3* in the activation of NK cells in untreated HIV infected patients.

**Keyword:** NK cell. Innate immunity, Interferon, Polymorphism.

## INTRODUCTION

NK cells are the principal antiviral effector cells of innate immunity. NK cells presents cytotoxic of immunoregulatory functions, which influence adaptive immune response (1). Their functional abilities are associated with distinct subpopulations defined based on the expression of surface markers molecules, CD56 and CD16. The NK CD56+CD16+ subset shows predominantly cytolytic activity, while CD56+CD16- subset present, mainly, immunomodulatory activity (2). Subpopulations of NK also differ with respect to tissue distribution; being the CD56+CD16+ the main subset in the peripheral blood while the CD56+CD16- are found mostly in the secondary lymphoid organs (3, 4).

The infection caused by HIV-1 leads to changes in NK cells number, distribution and function. The progression of HIV infection has been associated with the decreased of the NK CD16+CD56+ subset cytolytic activity and the increased cytokines production of NK CD56+CD16- (5). Additionally, a new subset of NK cells, the CD56-CD16+, which is not commonly detectable in healthy individuals, becomes more prominent in subjects with active viral replication (6). The chronic HIV-1 infection leads to persistent activation of T cells with increased intracellular levels of nuclear factor B (NF- $\kappa$ B), which in turn enhance HIV transcription and production of new virions (7). Thus, the chronic infection leads to a vicious cycle during which the replication of HIV-1 promotes immune activation and subsequent viral replication.

Activation of NK cells can be measured in *in vitro* through the surface molecules such as the CD38 ectoenzyme, which regulates levels of cytoplasmic calcium and acts as an adhesion molecule. Other activation markers of NK cells are the HLA-DR and the C-type lectin receptor CD69 (1, 8-10). The activation of NK cells can be triggered by innate immunity soluble factors such interferons (IFNs).

Initial HIV-1 entry elicits IFN primarily production by plasmacytoid dendritic cells (pDC), which are the main source of the IFN type I and type III (IFN $\lambda$ ) previously named IL29 (IFN $\lambda$ 1), IL28A (IFN $\lambda$ 2) and IFNL3 (IFN $\lambda$ 3) (6, 11). In genome wide association studies, the allele C and genotype CC at rs12979860 in the gene *IFNL3* have been associated with the ability of the patients infected by hepatitis C virus (HCV) successfully respond to therapy and spontaneously clearance of HCV (12).

Regarding HIV infection, the influence of the polymorphism *IFNL3* at rs12979860 is not well established. The HIV-HCV African-Americans co-infected patients showed

association of the *IFNL3* CC genotype with HCV clearance, however, no association was seen in HIV control or disease progression in HIV infected patients (13, 14). Instead, in a HIV infected Spanish cohort the genotype CC was independently associated with spontaneous HIV control (15).

Interestingly, the allele T of *IFNL3* at rs12979860 and an NK cell gene, *KIR2DS3*, synergize to increase the odds to HCV infection in Irish women; however, the biological basis of this synergy remains unrevealed (16). Herein, we hypothesized that the *IFNL3* CC/CT genotypes, representing a dominant model would be associated to higher expression of NK activation markers in naïve-treated HIV infected group. Our findings showed that the naïve-treated HIV infected group presented differences in the NK subsets and an NK activated profile compared to control group and that the *IFNL3* CC/CT genotypes was associated to CD69 expression on NK subsets.

## MATERIALS AND METHODS

### Population study

The population of this study consisted of 25 people living with HIV-1 without HAART at the Hospital Correia Picanço (Recife, Pernambuco, Brazil) and 25 healthy volunteers (controls) who were collected at the Center for Counseling and Testing (CTA) of Cabo de Santo Agostinho (Pernambuco, Brazil). All participants signed an informed consent form (ICF), the study was approved by the ethics committee of UFPE being conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Blood samples obtained from all participants underwent serological tests for diagnosis of hepatitis C (HCV) and hepatitis B (HBV), obtaining negative results.

The two groups, HIV infected individuals without HAART and control were matched considering the independent variables age (20-56 years  $\pm$  3 years) and gender. Blood samples were collected to perform counting of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, viral load (HIV infected individuals group), *IFNL3* gene genotyping (rs12979860) and immunophenotyping of NK cells. The counts of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells were performed from whole blood samples using the BD Multitest® (Becton-Dickinson - BD Franklin Lakes, NJ) in the Immunology Laboratory of the Central Laboratory of the State (LACEN-PE). The quantification of the number of copies of viral RNA was performed from plasma by using Abbott RealTime HIV-1 *m2000sp* (Abbott

Qualitative), and the range of detection of this system was from 50 to 500,000 copies of RNA/ml.

### **Sample collection, DNA extraction and genotyping of *IFNL3* rs12979860**

Whole blood samples were collected in tubes containing EDTA solution and kept at -20°C for 24h until DNA extraction. The DNA was extracted using the Wizard Genomic Purification Kit (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions.

The SNP rs12979860 was genotyped by the TaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, CA), using specific probes, FAM-TGGTTCGCGCCTTC-MGB, allele C and VIC-CTGGTTCACGCCTTC-MGB, allele T and primers 5'-GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' and 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3' forward and reverse respectively. The probes, primers and validated protocols for the SNPs are available at <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.

### **Flow cytometry**

NK cells were analyzed in peripheral blood in an *ex vivo* context using the following monoclonal antibodies panels: CD3 (FITC, clone SK7) / CD16 (PECy7, clone eBioCB16) / CD56 (PE, clone CMSSB) / HLA-DR (APC, clone LN3), CD3 / CD16 / CD56 / CD38 (APC, clone HIT2) and CD3 / CD16 / CD56 / CD69 (APC, clone FN50), all purchased from eBioscience (San Diego, CA).

For the identification of NK cells, 5 ml of peripheral blood was collected in EDTA tubes for each participant. 100 ul aliquots of this blood were transferred to polystyrene tubes containing one of the panels described above, and incubated for 30 minutes at room temperature (RT). After incubation, 1 ml of erythrocyte lysing solution (BD FACS Lysing Solution- BD Bioscience, San Jose, CA) was added to the tubes, and the cells were then washed twice by centrifugation with PBS (400xg, 5 min). After washing, the cells were resuspended in fixing solution (IC Fixation Buffer; eBioscience, San Diego, CA). The samples were analyzed (40.000 events/tube) through flow cytometer (FACSCalibur-BD, San Jose, CA) using the software CELLQuestPro™ (BD Bioscience, San Jose, CA) for acquisition of data. Data analyzes was performed with the FlowJo V.10 software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### Flow cytometry strategy analysis

Analyses were done initially delimitating the lymphocytic region in a Forward Scatter (FSC) versus side scatter (SSC) graph (supplementary Figure 1). Based on this region the fluorescence graphs (FL1 \_ FL2) were constructed, delimitating the quadrants for analyses. The quadrant limits were based on the negative population and previous antibodies titration. The values considered for the fluorescence analysis were the percentage of the quadrant region for each quadrant. The strategies of analysis for each of the populations are described in supplementary Figures 2 and 3.

### Statistical Analysis

The statistical analyses were performed through SPSS 8.0 and GraphPad Prism 5.1 software's, using nonparametric tests after normality test. For comparative analysis of groups, the Kruskal–Wallis test was used to detect differences between more than two groups, for binary comparison the Mann–Whitney U-test was used. The results were considered statistically significant with  $p$ -value  $< 0.05$ .

## RESULTS

Regarding the number of NK cells we showed that there was no differences between the groups of HIV infected individuals and control (Figure 1a). However, the NK subpopulation  $CD56^+CD16^-$  was significantly higher in HIV infected group, while the NK  $CD56^+CD16^+$  was lower in comparison to control (Figure 1b and 1c). It has been reported that in individuals with HIV-1 the increase in a specific subpopulation, the  $CD56^-CD16^+$ , which is related to an impairment of the cytotoxic function, herein we didn't find differences in the number of this subpopulation comparing the studied groups ( $p= 0.46$ , data not shown).

Figures 2a and 3a shows the analysis regarding the markers HLA-DR, CD38 and CD69 NK cells: HIV infected group showed higher expression of HLA-DR<sup>+</sup> on both NK  $CD56^+CD16^-$  and  $CD56^+CD16^+$  ( $P= 0.0015$  and  $p= 0.006$  respectively) compared to control, suggesting that despite the serological diagnosis of 84% of those infected (21/25) have been done in 2014, the analysis of NK subpopulation evidences signs of chronic infection. Figure 2b and 3b shows the NK subpopulations  $CD56^+CD16^-$  and  $CD56^+CD16^+$  respectively with an increase of CD38 expression in HIV infected group for both subpopulations ( $p=0.008$  and

p=0.001 respectively). On the other hand, the CD69 expression on the NK subpopulations showed no differences between the groups.

The HIV infected group with CD4+ > 350 cells/ $\mu$ L showed higher number of NK cells compared to ones with CD4+  $\leq$  350 cells/ $\mu$ L (p= 0.013) and an increase expression of HLA-DR<sup>+</sup> in the NK 56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (p= 0.018), as well as, increased expression of CD69<sup>+</sup> in the NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (p= 0.010), which suggests differences in the activation profile of the HIV infected group related to CD4+ T cells. On the other hand, the expression of CD38 was enhanced in the two NK subpopulations (p= 0.0054 and p= 0.0033 respectively) in the HIV infected group CD4+ > 350 cells/ $\mu$ L in comparison to CD4+  $\leq$  350 cells/ $\mu$ L (Figure 4). Indicating a CD38 cytotoxicity activity independently of CD4+ T cell counting.

The results of the associations between the CC/CT genotypes vs. TT *IFNL3* (rs12979860) gene with the number of total NK cells showed no significant differences (Figure 5). However, there was higher expression of CD69 on CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subsets and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> associated with the genotypes CC/CT (p= 0.03 and p= 0.04 respectively). Ensuing, regarding the *IFNL3* genotypes and the counting of CD4+ T cells, the results showed lower median levels in individuals carrying CC/CT (182 cells/ $\mu$ L) compared to TT (704 cells/ $\mu$ L) (p= 0.06).

## DISCUSSION

In this study, NK cells showed no quantitative differences in HIV infected naïve-treated group compared to health individuals control group, however, in relation to subsets of NK, we observed an increase of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> subset in HIV infected group, also we showed higher expression of HLA-DR and CD38 markers in HIV infected group. Furthermore, we demonstrated that expression of CD69 was associated with *IFNL3* genotypes CC/CT rs12979860.

The fact that the number of NK cells did not show differences between the control and HIV infected groups suggests that, in general, the individuals in the HIV group didn't seem to be in the acute phase of infection, in which the NK cells expansion is expected (17).

Alter et al. (5) reported that infection by HIV-1 leads to a decrease in the cytolytic function of CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells and also diminished activation of CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, which in turn was associated with the disease progression. Regarding the NK subsets we observed enhancement of the NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> in HIV infected group, which could reflect disorders

of NK subsets compartmentalization, since these cells are predominantly found in the secondary lymphoid tissue (SLT) compared to peripheral blood. Additionally, the enhancement expression of NK activation markers such HLA-DR and CD38 in both NK subsets could be related to the early progression of disease as showed in Figure 2 and 3 (10, 18).

On the other hand, our results showed that HIV infected group had lower number of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, indicating chronic phase of infection as previously described in a study with treatment-naive HIV infected patients (18). However, the lack of the enhancement in the number of NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, which has been related to defective differentiation of CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> to CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> in HIV infection, may indicate that the maturation of NK cells is still preserved in the HIV infected group studied herein (5, 18).

Therefore, the profile of NK cells activation in the HIV infected group evidences a chronic infection despite the serological diagnosis of 84% of those patients (21/25) have been carried out in less than one year period, however, lack of the characteristic impairment in the NK cell CD56<sup>+</sup> differentiation indicates relatively preservation of immune functions (5). In relation to CD69 expression, we observed no differences between control and HIV group, which is in agreement with previous findings, since CD69 is predominantly a molecule marker in acute activation of NK (19, 20).

The results for the frequency of NK cells and their subsets in HIV group separated by CD4<sup>+</sup> T cells showed that individuals with CD4<sup>+</sup> T  $\geq$  350 cells/ $\mu$ L have higher number of NK cells, and increased expression of CD69 and HLA-DR in CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> NK subsets respectively, however, expression of CD38 was significantly increased in both NK subsets.

Kuri-Cervantes et al. (10) showed that in patients infected with HIV-1, the expression of CD38 on NK cells, mainly in the subset CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> is associated with disease progression markers such as CD4<sup>+</sup>T cell, viral load, T cell activation, inflammation and activation of innate immunity. In fact, the persistent stimulation of innate immunity against HIV-1 appears to result in a chronic hyper activation with deleterious effects of T cells (21). However, the understanding of the mechanisms by which chronic immune activation leads to a suppressive effect is still limited. The fact that in present study, we observed differential expression of HLA-DR, and CD69 related to the NK subsets based on the CD4<sup>+</sup> T cells

counting, suggests heterogeneity in the time of infection and/or differences in NK cells activation state.

Additionally, we showed an association between CC/CT genotype with increased expression of CD69 in both CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> in HIV group but no differences regarding the HLA-DR and CD38 markers. Studies suggest that increased expression of CD69 reflects an increase in NK cytotoxicity against various target cells (22, 23). Lymphocytes from patients infected by HIV-1 submitted to antigen or mitogen stimulation showed decrease in the CD69 expression compared to control group. Ensuing, gp120 induced the inhibition of CD69 expression in lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin, suggesting that it could also affect the activation of T lymphocytes *in vivo* (24).

In two independent animal models, the deficiency of CD69 showed an exacerbation of the immune response. The influence of CD69 molecule on the immune response regulation appears to be complex. The probable mechanisms of modulation in T lymphocytes would be: i) deletion of lymphocytes by inducing apoptosis after activation and ii) expression of CD69 seems to result from partial signaling during antigen presentation, rendering an anergic state of lymphocytes in chronic inflammatory diseases (25).

In the present study, the increased expression of CD69 on NK subsets in the individuals carrying CC/CT of the HIV group could to influence the activation of the immune response, affecting the balance of chronic activation of immune system and immune suppression. Therefore, further studies are needed to clarify this hypothesis.

Interestingly, soluble secreted products from either mature or immature pDC can induce the CD69 expression on NK cells; this effect is, in part, due to the IFN $\lambda$  (9). The expression of CD69 enables temporary cells retention in the lymphoid tissues, which can lead to an indirect antiviral effect.

Since the pDC cells are found in the circulation, in the SLT as well as in infected tissues and are also the major source of IFN $\lambda$ 3 (26), it is possible that the individuals carrying the C allele could elicits stronger autocrine pDC activation inducing IFN $\lambda$  up regulation. This effect could be related to the evidences that the C allele induces higher serum levels of IFN $\lambda$ 3 (27). Thus, the observed association of CD69 expression with CC/CT genotypes could result from the pDC activation by IFN $\lambda$ 3. Strikingly, it has been proposed that IFN- $\lambda$  production and response by pDC has the potential to influence global antiviral host resistance mechanisms (26).

In conclusion, early-diagnosed HIV naïve-treated individuals presented an activated NK cells profile with loss of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and evidenced that the CD69 expression of on both NK subsets seem to be indirectly influenced by the *IFNL3* polymorphism.

## REFERENCES

1. **Vivier E, Raulot DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S.** 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687.
2. **Caligiuri MA.** 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**(3):461-9. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438.
3. **Brunetta E, Hudspeth KL, Mavilio D.** 2010. Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J. Leukoc. Biol.* **88**(6):1119-30. doi: 10.1189/jlb.0410225.
4. **De Maria A, Moretta L.** 2011. Revisited function of human NK cell subsets. *Cell Cycle* **10**(8):1178-9.
5. **Alter G, Altfeld M.** 2009. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J. Intern. Med.* **265**(1):29-42. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02045.x.
6. **Guha D, Ayyavoo V.** 2013. Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1. *ISRN AIDS* **2013**:954806. doi: 10.1155/2013/954806.
7. **Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG.** 1988. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(13):4700-4.
8. **Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV.** 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **16**(2):83-92.
9. **Benlahrech A, Donaghy H, Rozis G, Goodier M, Klavinskis L, Gotch F, Patterson S.** 2009. Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon  $\gamma$  secretion and cytotoxic activity by plasmacytoid dendritic cells is regulated through overlapping but different pathways. *Sensors (Basel)* **9**(1):386-403. doi: 10.3390/s90100386.
10. **Kuri-Cervantes L, de Oca GS, Avila-Ríos S, Hernández-Juan R, Reyes-Terán G.** 2014. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *J. Leukoc. Biol.* **96**(1):7-16. doi: 10.1189/jlb.0913514.
11. **Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP.** 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**(1):69-77.
12. **Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M.** 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**(7265):798-801. doi: 10.1038/nature08463.

13. **Salgado M, Kirk GD, Cox A, Rutebemberwa A, Higgins Y, Astemborski J, Thomas DL, Thio CL, Sulkowski MS, Blankson JN.** 2011. Protective interleukin-28B genotype affects hepatitis C virus clearance, but does not contribute to HIV-1 control in a cohort of African-American elite controllers/suppressors. *AIDS* **25**(3):385-7. doi: 10.1097/QAD.0b013e328341b86a.
14. **Sajadi MM, Shakeri N, Talwani R, Howell CD, Pakyz R, Redfield RR, Parsa A.** 2011. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. *Clin. Transl. Sci.* **4**(4):282-4. doi:10.1111/j.1752-8062.2011.00307.x.
15. **Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sanchez MC, Abad MA, Ferrando-Martínez S, Genebat M, Pulido I, Viciano P, González-Escribano MF, Leal M, Ruiz-Mateos E.** 2013. IL28B Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. *J. Infect. Dis.* **207**(4):651-5. doi: 10.1093/infdis/jis717.
16. **Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, Guinan KJ, Hagan R, O'Farrelly C, Gardiner CM.** 2011. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(14):5736-41. doi: 10.1073/pnas.1016358108.
17. **Naranbhai V, Altfeld M, Karim SS, Ndung'u T, Karim QA, Carr WH.** 2013. Changes in Natural Killer cell activation and function during primary HIV-1 Infection. *PLoS One.* **8**(1):e53251. doi: 10.1371/journal.pone.0053251.
18. **Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B, Galiani MD, Gonzalez R, Solana R, Peña J.** 2002. Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *J. Clin. Immunol.* **22**(3):176-83.
19. **Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R.** 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**(1):159-65.
20. **Whitmire JK.** 2011. Induction and function of virus-specific CD4+ T cell responses. *Virology* **411**(2):216-28. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.015.
21. **Boasso A, Shearer GM.** 2008. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin. Immunol.* **126**(3):235-42.
22. **Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Phillips JH.** 1988. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* **167**(5):1572-85.
23. **Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E.** 2003. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology.* **207**(2):85-93.
24. **Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW.** 1996. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **11**(1):95-104.
25. **Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F.** 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* **26**(3):136-40. doi: 10.1172/JCI200319112.
26. **Yin Z, Dai J, Deng J, Sheikh F, Natalia M, Shih T, Lewis-Antes A, Amrute SB, Garrigues U, Doyle S, Donnelly RP, Kotenko SV, Fitzgerald-Bocarsly P.** 2012. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **189**(6):2735-45. doi: 10.4049/jimmunol.1102038.

27. **Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD, Nattermann J, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U.** 2011. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol.* **54**(5):859-65. doi:10.1016/j.jhep.2010.08.020.

## Legends of Figure List

**Figure 1.** Flow cytometer analysis showing plots defining CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells and NK subpopulations. (A) Representative plots for lymphocyte population acquire and differences of NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> percentages between HIV infected and control groups (p= 0.46). (B) Percentages of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subsets in HIV infected and control groups (p < 0.0001 for both comparisons).

**Figure 2.** Flow cytometry results of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and HLA-DR, CD38 and CD69 activation markers. Representative density plots with the differences in the percentage expression of (A) HLA-DR (p= 0.0015), (B) CD38 (p= 0.01) and (C) CD69 (p= 0.492) in the HIV infected and control groups.

**Figure 3.** Flow cytometry results of NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and HLA-DR, CD38 and CD69 activation markers. Representative density plots with the differences in the percentage expression of (A) HLA-DR (p= 0.006), (B) CD38 (p= 0.001) and (C) CD69 (p= 0.472) in the HIV infected and control groups.

**Figure 4.** Association the *IFNL3* polymorphism with the activation markers of NK subsets. Histograms showing the differences in the percentage expression of activation markers on the CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> respectively (A) HLA-DR (p= 0.319 and p= 0.415), (B) CD38 (p= 0.373 and p= 0.421) and (C) CD69 (p= 0.04 and p= 0.03) in the HIV infected group separated by *IFNL3* CC/CT and TT genotypes.

Figure 1

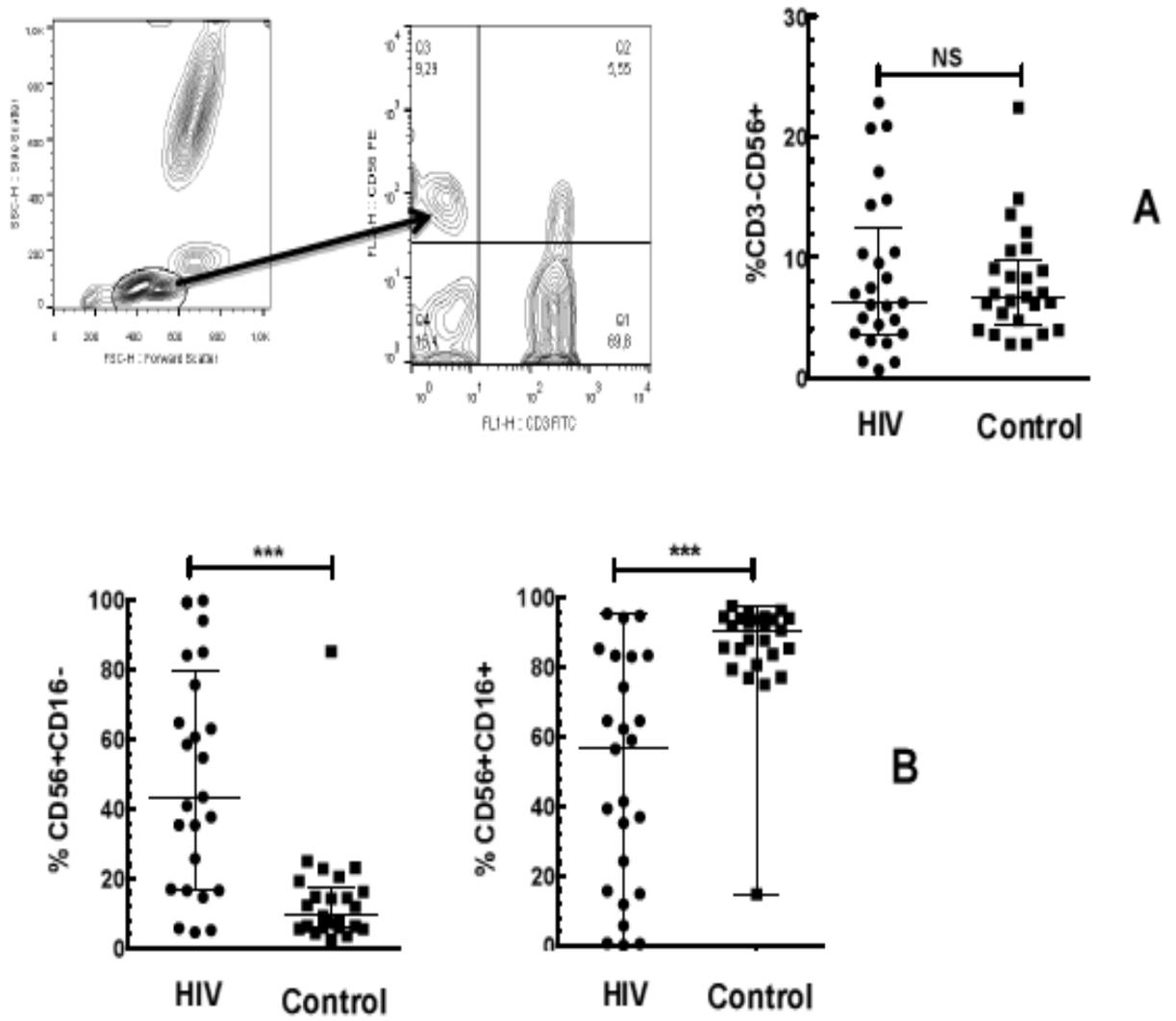


Figure 2

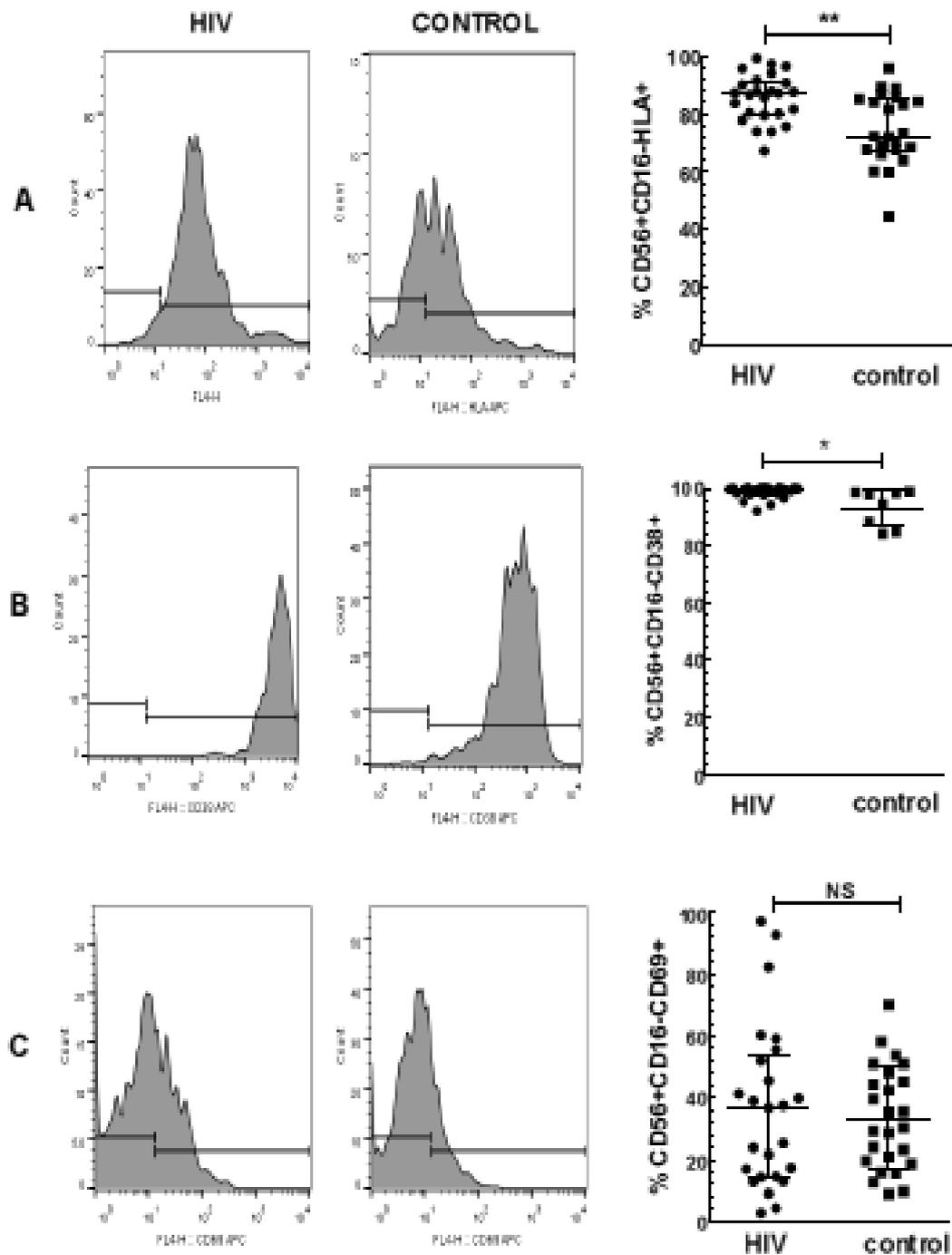


Figure 3

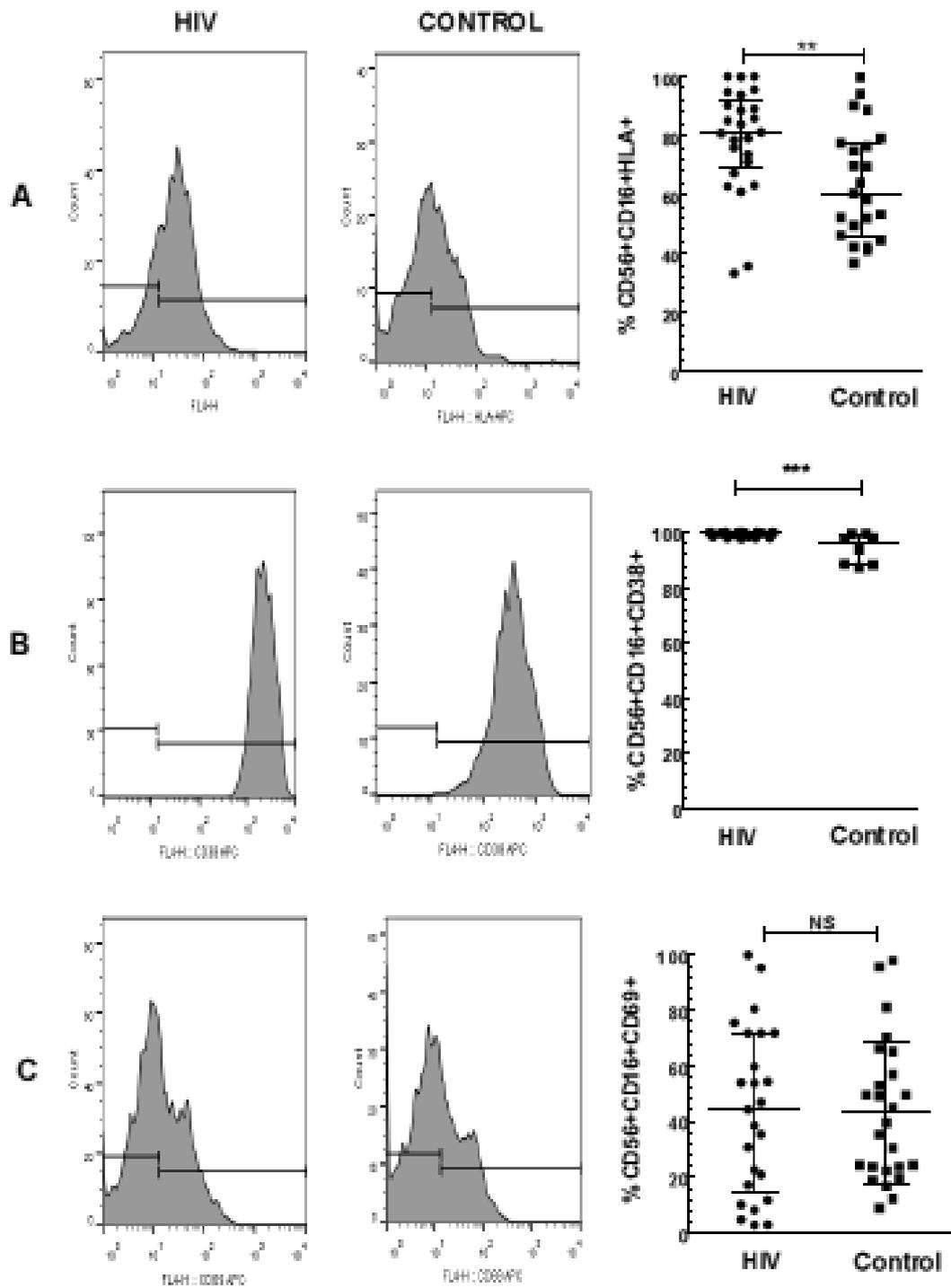
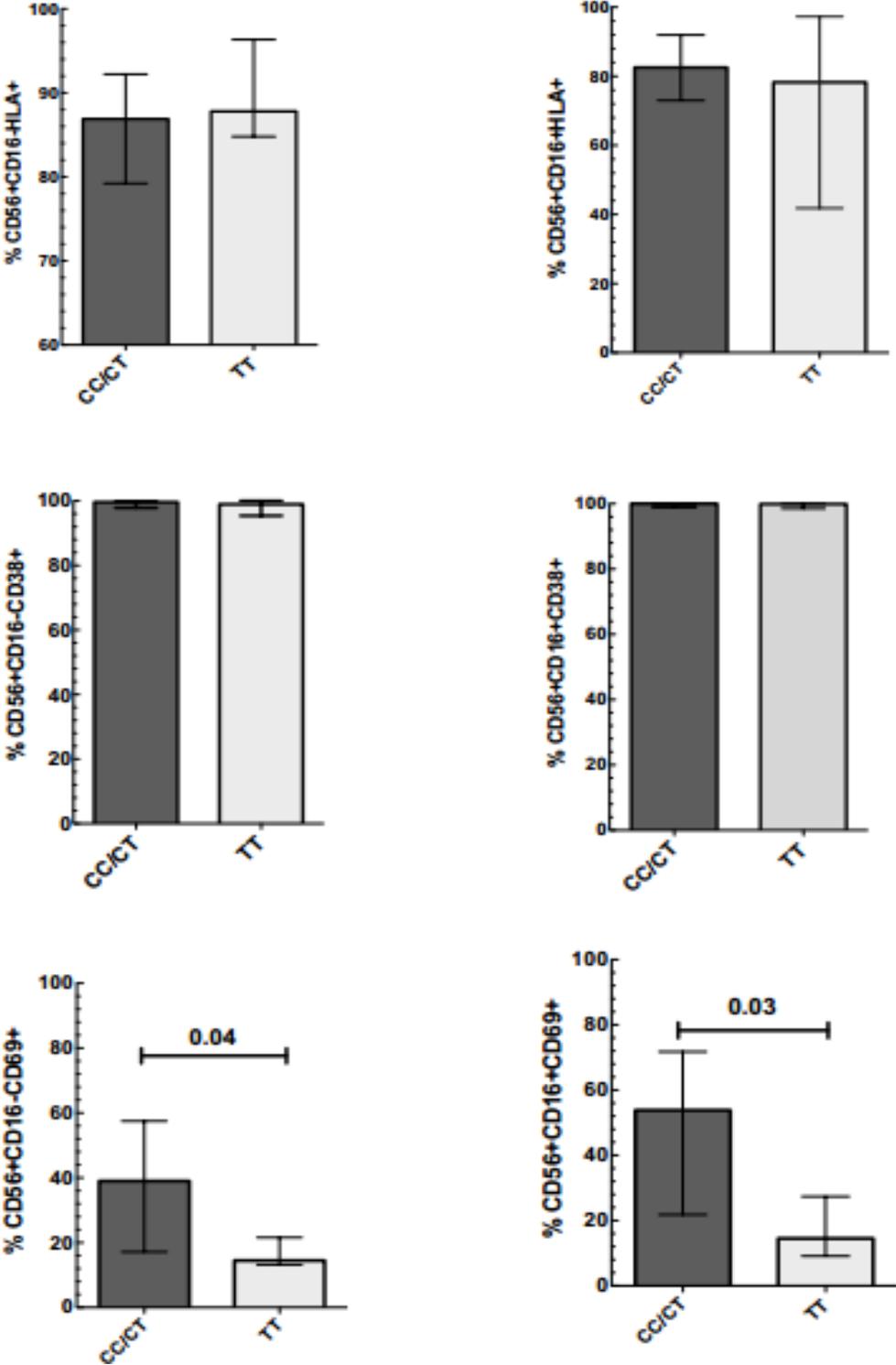
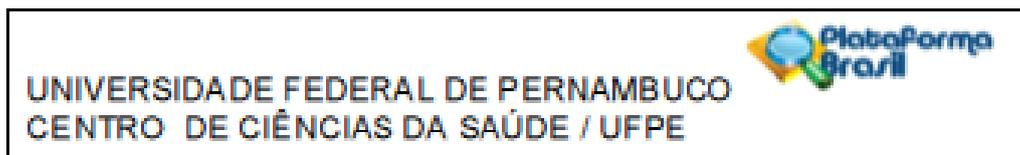


Figure 4



## ANEXOS

### Anexo A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Verificar associação da frequência do polimorfismo do gene *IL28b* de pacientes HIV+ com a contagem e ativação de células NK;

Verificar associação da frequência do polimorfismo do gene *IL28b* com ativação de células NK e quantificação da carga viral;

Verificar associação da frequência do polimorfismo do gene *IL28b* de pacientes HIV+ e contagem de linfócitos T CD8+;

Verificar associação da contagem de Linfócitos TCD8+ e NK com a quantificação da carga viral.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os benefícios estão devidamente delineados no projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido. Os riscos estão bem delineados e são inerentes ao procedimento de coleta da amostra

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um tema bastante atual referente ao entendimento do mecanismo molecular do padrão de resposta imune que os indivíduos portadores do HIV apresentam e como isto está correlacionado com a evolução da AIDS e os processos de diagnóstico e tratamento. Esperasse que os resultados sirvam de subsídio informacional para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e acompanhamento dos pacientes aidséticos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todas as cartas de anuência, os currículos e termo de consentimento livre e esclarecido estão devidamente anexados.

#### **Recomendações:**

Nenhuma

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 03 de Novembro de 2012

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO (Coordenador)

**Anexo B – CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN-PE**

 <b>SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO</b> <b>SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE</b> DIRETORIA GERAL DE LABORATÓRIOS PÚBLICOS-LACEN NÚCLEO DE ESTUDO E PESQUISA-NEPEL	 LACEN - SES - PE
---	---

Recife, 23 de agosto de 2011.

**CARTA DE ANUÊNCIA**

Informamos para todos os fins, inclusive junto aos Comitês de Ética existente, que o **LACEN-PE**, concorda em facultar as instalações e colaborar com o projeto de pesquisa de doutorado **POLIMORFISMO DO GENE IL28B E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS NK E LINFÓCITOS TCD8 EM PACIENTES HIV**, da Dra. VALÉRIA DE MELO FERREIRA, dessa Instituição, sob a orientação da profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho da Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, oferecendo as condições necessárias para a sua execução.

Respeitosamente,



Dr. Mário Honorato da Silva  
Coordenador do Núcleo de Estudo e Pesquisa

**Mário Honorato da Silva**  
Coord. do Núcleo de Estudos e Pesquisa  
nepeLacem - Mat. 268164-1

Rua João Fernandes Vieira, S/N- Boa Vista  
CEP-50.050.020- Fones 3181-6406/6407 Fax 31816146  
E-mail: nepe.lacempe@hotmail.com

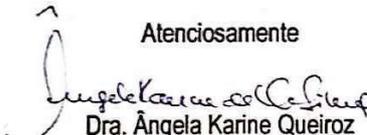
## Anexo C – CARTA DE ANUÊNCIA DO HCP

**SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO**  
**HOSPITAL CORREIA PICANÇO**

**CARTA DE ANUÊNCIA**

Declaramos que anuímos com a realização da pesquisa intitulada **"Polimorfismo da IL28B e ativação de células NK e linfócitos TCD8 em pacientes HIV+"** a ser desenvolvido por Valeria Ferreira, sob a coordenação de Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, procedente da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical – Mestrado e Doutorado, com o compromisso dos autores de divulgar o nome do Hospital nos resultados da pesquisa, assim como, fornecer uma cópia do estudo para nossa instituição ao final do mesmo seja na forma de monografias, dissertações, teses artigos publicados, entre outros.

Atenciosamente

  
Dra. Ângela Karine Queiroz  
Gestora do Hospital Correia Picanço

Recife 17/04/12

**HOSPITAL CORREIA PICANÇO**  
DRA. ÂNGELA KARINE DE QUEIROZ E SILVA  
GERENTE GERAL - MAT. 244629-4

Rua: Padre Roma, 149 Tamarineira-Recife  
Fone: 3184-3980(central)  
E-mail: hospcp@saude.pe.gov.br

## **Anexo D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO AIDS Patient Care and STDs**

### **AIDS Patient Care and STDs**

\*2013 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2014

**Latest Impact Factor\* is 3.576**

ISSN: 1087-2914 • Published Monthly •

Online ISSN: 1557-7449

### **Mary Ann Liebert, Inc. Submission Benefits Package**

Your submission to *AIDS Patient Care and STDs* provides you with robust tools and support to ensure maximum impact and readership for your work. By submitting your manuscript, you'll receive:

- **Complimentary 12-month AuthorCite® membership**  
*Exclusively licensed by Mary Ann Liebert, Inc., AuthorCite® delivers a 360-degree view of your article from submission to publication to market impact. With an AuthorCite® membership, you'll receive end-to-end manuscript submission tracking, a custom online microsite to promote you and your research, a professional suite of metrics and analytics to measure the impact of your article, 30-day OpenLink™ article sharing, and much more.*
- **Rapid, rigorous peer-review** and editorial attention
- **Immediate deposit to PubMed** and other indexing services upon online publication
- **Exposure to thousands of thought-leaders** in your field, maximizing readers, citations, and downloads
- **Fast Track online-ahead-of-print publication**
- **Global availability in over 170 countries**
- **Open Access publication options**

### **Submitting Your Manuscript**

Submitting your manuscript to *AIDS Patient Care and STDs* delivers a comprehensive benefits program that ensures high-quality review of your research and maximum impact for

your work. This includes a one-year membership to **AuthorCite™**, a robust author services platform for increasing the visibility of your research, and includes the ability to **freely share your article for 30 days**. *AIDS Patient Care and STDs* carries a manuscript processing charge\* of \$50.00 USD upon submission of each new manuscript.

Upon payment, you will be provided a Manuscript Submission Code, and will be prompted to enter this information when uploading your files to our peer-review system. ***Please note:*** Securing a token does not automatically create an account in our peer-review system. If you do not already have an account, you will be asked to create one before you can begin your submission.

Submissions do not need to be completed at once. Submitting authors/agents may begin the submission process, save their work, and return to the site to complete the upload(s) at a later time. There is no limit on the number of times one can save their work and subsequently resume the submission. Doing so will not incur additional charges.

### **Manuscript Revisions**

Processing charges and submission codes are NOT required for revisions to previously submitted papers. To upload a **revision** of a paper, the submitting author should log in to their Author Center at <http://mc.manuscriptcentral.com/aidspatientcare> and click on ***“Revised Manuscripts in Draft.”*** The paper will appear in this area, and the submitting author will be able to upload revised files without paying any charges or entering a submission code.

### **Please be sure to follow the Instructions for Authors below on Manuscript Preparation.**

Authors whose submissions do not comply with the Instructions for Authors will have their papers un-submitted so that the file(s) may be adjusted accordingly. Directions regarding the necessary corrective actions will be provided in an email to the corresponding author at the time the paper is un-submitted. The submitting author/agent will then be provided the opportunity to re-upload the corrected file(s). If a paper is un-submitted, the paper will reside in the corresponding author's "Author Center" as a draft, and the submitting author/agent will be able to make the necessary adjustments and re-upload the paper without incurring another manuscript processing charge.

*\*The manuscript processing charge is independent of editorial decision and is non-refundable.*

### **Preparation of Manuscript**

Be sure these instructions are followed exactly.

We welcome contributions on topics of major significance in biotherapy, radiopharmaceuticals, and related fields that may be of the following types: (1) Reviews; (2) Research Papers; and (3) Short Communications. Each coauthor accepts responsibility for the entire contents of the manuscript. Contributions to the journal are published at no charge to the author. Once a paper has been accepted for publication, it cannot be withdrawn. Authors will have the option to indicate one reviewer who should be excluded (non-preferred) from review of their manuscript. Authors will also have the option to suggest preferred reviewers during the submission process if they like.

### **Abstracts**

ABSTRACT should be capitalized and centered on the page and have one space below. The text of the abstract is single spaced and should be limited to 200 words. This should appear on a separate page.

### **Key words**

Please provide a short list of key words to follow the Abstract. You will also be asked to enter keywords during online submission.

### **Tables and Figures**

Each table should be prepared in a separate file. Tables should be cited in the text (see Table 1). Tables should be submitted in Microsoft Word.

Each figure should be prepared in a separate file with the figure number visible. Each figure should be cited in text (Fig. 1). Legends should be on a separate page from the figures.

### **Please follow these guidelines for submitting figures:**

- Do **NOT** embed art files into a Word or PDF document.
- Line illustrations should be submitted at 1200 dpi.
- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 dpi.
- Save as either TIFF or EPS files.
- Color art must be saved as CMYK – **not RGB**.
- Black and White art must be submitted as grayscale – **not RGB**.
- Do **NOT** submit PowerPoint, PDF, Bitmap or Excel files.

Please name your artwork files with the submitting author's name i.e. SmithFig1.tif, SmithTable2.tif etc. Label figures and tables inside the files in addition to naming the file with the figure or table number. (ie: When figures or table files are opened, the figure or table number should appear inside the file.) **Authors who do not follow these guidelines may have their submission returned to them without being reviewed.**

You will be given directions on how to correct any files which do not pass.

### **ADDITIONAL INFORMATION ABOUT ART FILES**

**Converting Word or Excel files:** Perhaps the best and easiest way to **convert Word or Excel files** into a format which is suitable for print is to scan them using the guidelines below :

- All files should be scanned at 100% size.
- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- save file as: .tif or .eps

If you need directions on how to **convert a Power Point slide** to acceptable format go to <http://www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf>

### **Footnotes**

Footnotes should be typed single spaced at the bottom of the appropriate page and separated from the text by a 3-inch line starting from the left margin with one space above and below it. Footnotes should be used only when essential.

### **Acknowledgments**

Collaborations, sources of research funds, and other acknowledgments must be listed in a separate section at the end of the text ahead of the REFERENCES section.

### **AUTHOR DISCLOSURE**

All authors are expected to disclose any institutional or commercial affiliations that might pose a conflict of interest regarding the publication of a manuscript. Institutional affiliations, as indicated on the title page, should include all corporate affiliations and any funding sources that support the work. Other types of affiliation, including consultantships, honoraria, stock

ownership, equity interests, arrangements regarding patents, or other vested interests should be disclosed in the Acknowledgments section.

## References

Cite references within the text by a superscripted Arabic number as in the following example: [. . .as described previously.<sup>1,4</sup>]. List references by number (1, 2, etc.) in the order in which they appear in the text. Type single spaced, although separated from each other by one line of space. Use Chemical Abstracts format for references. For journal citations: (1) surname of author(s) and initials; (2) title of article; (3) journal; (4) volume number; (5) first page of citation; and (6) year in parentheses. For book citations: (1) surname of author(s) and initials; (2) title of book; (3) editor of book (if applicable); (4) edition of book (if applicable); (5) publisher; (6) city of publication; (7) year of publication (not in parentheses); and (8) page reference (if applicable). For book and journal references, if there are more than four authors, list only the first three, followed by et al. For patents:(1) country of original registration; (2) patent number; and (3) month, day, and year of issuance. When data from an unpublished source are given, supply complete information (e.g., researcher's name and location). If work is in press, give journal in which it is to be published or publisher.

## IMPORTANT

Please upload individual files of all manuscript material—do NOT upload a single PDF file containing all text, figure, and table files of your paper. Once all individual files are uploaded onto Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and the peer-review process.

## Permissions

Written permission to use copyrighted material must be obtained from the publisher (not the author or editor). The publication from which the figure, table, or text is taken must be listed in REFERENCES. Finally, the first footnote of a reprinted table, or the last sentence of the legend of a reprinted figure, should read “reprinted by permission from Ref. (00),” using appropriate reference number. All permissions must be listed.

## Correspondence

Be sure to provide the complete name and address to which correspondence should be directed.

**Disclosures**

Funding sources for research must be disclosed for all manuscripts accepted for publication.

**Reprints**

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

**Publisher**

The Journal is published 12 times per year by Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801-5215. Telephone: (914) 740-2100; fax: (914) 740-2101; e-mail: [info@liebertpub.com](mailto:info@liebertpub.com) ; online: [www.liebertpub.com](http://www.liebertpub.com)

## **Anexo E – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO JOURNAL OF VIROLOGY**

### **JOURNAL OF VIROLOGY**

**IMPACT FACTOR: 4.648**

Print ISSN: 0022-538X

Online ISSN: 1098-5514

### **ORGANIZATION AND FORMAT**

#### **Editorial Style**

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals* (American Society for Microbiology, 2014, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 7th ed. (Greenwood, Santa Barbara, CA, 2011), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and References, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages should have continuous line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter “oh” (O); the numeral one (1), the letter “el” (l), and the letter “eye” (I); and a multiplication sign (×) and the letter “ex.” (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the “insert symbol” function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

**Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.**

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

### Full-Length Papers

Full-length papers should include the elements described in this section.

**Title, running title, and byline.** Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not allowed. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. Indicate the specific virus(es) under study in the title or abstract as appropriate. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, all authors' affiliations at the time the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be addressed (see [“Correspondent footnote”](#) below). [Please review this sample title page for guidance.](#)

Also include on the title page the word count for the abstract and the word count for the text (excluding the references, table footnotes, and figure legends).

**Study group in byline.** A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

**Correspondent footnote.** The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

**Structured abstract.** JVI full-length research papers have structured abstracts with two sections: “Abstract” and “Importance.” The “Abstract” section should be no more than 250 words and should concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and indicate the specific virus under study. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text. The “Importance” section

should be no more than 150 words and should provide a nontechnical explanation of the significance of the study to the field.

**Introduction.** The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the present study. Choose references carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

**Materials and Methods.** The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ( $\times g$  rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than to state “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

**Results.** In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Data in tables (e.g., cpm of radioactivity) should not contain more significant figures than the precision of the measurement allows. Illustrations (particularly photomicrographs and electron micrographs) should be limited to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

**Discussion.** The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

**Acknowledgments.** The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: “This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute.”

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

**Appendixes.** Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length paper or short-form paper. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

## References

In the reference list, references are numbered in the order in which they are cited in the article (citation-sequence reference system); ASM no longer uses the citation-name system with an alphabetized reference list. In the text, references are cited parenthetically by number in sequential order. Data that are not published or not peer reviewed are simply cited parenthetically in the text (see section ii below).

**(i) References listed in the References section.** The following types of references must be listed in the References section:

- Journal articles (both print and online)
- Books (both print and online)
- Book chapters (book title is required)
- Patents
- Theses and dissertations
- Published conference proceedings
- Meeting abstracts (from published abstract books or journal supplements)
- Letters (to the editor)
- Company publications
- In-press journal articles, books, and book chapters (publication title is required)

**Provide the names of all the authors and/or editors for each reference; names should not be abbreviated with “et al.”** Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the [PubMed Journals Database](#) (National Library of Medicine, National Institutes of Health), the primary source for ASM style. EndNote versions 6 and earlier do not contain the current ASM reference style.

To update your EndNote style, go

to [http://endnote.com/downloads/styles?title\\_op=contains&title=american+society+for+](http://endnote.com/downloads/styles?title_op=contains&title=american+society+for+)

[microbiology](#). Click the Download button, and save the style in your EndNote Style folder (it should replace any earlier versions). All ASM journals use the same reference style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive *prgQ* promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J. Bacteriol.* **194**:3386-3394.
2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2274-2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}
3. **Cox CS, Brown BR, Smith JC.** *J. Gen. Genet.*, in press.\* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
4. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA.** 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295, <sup>AL</sup> emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404-414. *In* Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.
5. **Stratagene.** 2006. *Yeast DNA isolation system: instruction manual*. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}
6. **Forman MS, Valsamakis A.** 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276-1288. *In* Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.
7. **Fitzgerald G, Shaw D.** *In* Waters AE (ed), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.\* {Chapter title is optional.}
8. **García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis*

- Rheum. **39**(Suppl 9):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}
9. **Carlson E.** 2013. Selective penicillin-binding protein imaging probes reveal substructure in bacterial cell division, p 59. Final Program 113th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. {Abstract title is optional.}
  10. **Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP.** 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr D-1658. {Abstract title is optional.}
  11. **Green PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251-254. *In* Crawford RL, Hanson RS (ed), Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
  12. **O'Malley DR.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}
  13. **Odell JC.** April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}
  14. **Elder BL, Sharp SE.** 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

\*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., JVI00123-14) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book. Online-only references must provide essentially the same information that print references do. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers.

1. **Bina XR, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE.** 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). *mBio* **4**(5):e00366-13. doi:10.1128/mBio.00366-13.
2. **Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D.** 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* **115**:e718-e724. doi:10.1542/peds.2004-1133.

3. **Dionne MS, Schneider DS.** 2002. Screening the fruitfly immune system. *Genome Biol.* **3**:reviews1010-reviews1010.2. doi:10.1186/gb-2002-3-4-reviews1010.
4. **Giegé R, Springer M.** 2012. Aminoacyl-tRNA synthetases in the bacterial world. *EcoSal Plus* doi:10.1128/ecosalplus.4.2.1.

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

**Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP.** 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00586-06.

Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

**Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM.** 13 February 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.041593698.

(ii) **References cited in the text.** References that should be cited in the text include

- Unpublished data
- Manuscripts submitted for publication
- Unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings)
- Personal communications
- Patent applications and patents pending
- Computer software, databases, and websites

These references should be made parenthetically in the text as follows:

... similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

... system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

... as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts and posters, etc.}

... this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}

... available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>).

... using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.state.micro.edu>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

**(iii) Citations in abstracts.** Because the abstract must be able to stand apart from the article, references cited in it should be clear without recourse to the References section. Use an abbreviated form of citation, omitting the article title, as follows.

(P. S. Satheshkumar, A. S. Weisberg, and B. Moss, *J. Virol.* 87:10700–10709, 2013, doi:10.1128/JVI.01258-13)

(J. H. Coggin, Jr., p. 93–114, in D. O. Fleming and D. L. Hunt, ed., *Biological Safety. Principles and Practices*, 4th ed., 2006)

“... in a recent report by D. A. Hopwood [*mBio* 4(5):e00612-13, 2013, doi:10.1128/mBio00612-13] . . . .”

This style should also be used for Addenda in Proof.

**(iv) References related to supplemental material.** If references must be cited in the supplemental material, list them in a **separate** References section within the supplemental material and cite them by those numbers; do not simply include citations of numbers from the reference list of the associated article. If the same reference(s) is to be cited in both the article itself and the supplemental material, then that reference would be listed in both References sections

## Figure Legends

On initial submission, each legend should be placed in the text file *and* be incorporated into the image file beneath the figure to assist review.

Legends should provide enough information so that the figure is understandable without frequent reference to the text. However, detailed experimental methods must be described in the Materials and Methods section, not in a figure legend. A method that is unique to one of several experiments may be reported in a legend only if the discussion is very brief (one or two sentences). Define all symbols used in the figure and define all abbreviations that are not used in the text.

## Tables

Tables that contain artwork, chemical structures, or shading must be submitted as illustrations in an acceptable format at the modification stage. The preferred format for regular tables is Microsoft Word; however, WordPerfect and Acrobat PDF are also acceptable. Note that a straight Excel file is not currently an acceptable format. Excel files must be either embedded in a Word or WordPerfect document or converted to PDF before being uploaded.

Tables should be formatted as follows. Arrange the data so that **columns of like material read down, not across**. The headings should be sufficiently clear so that the meaning of the data is understandable without reference to the text. See the "[Abbreviations](#)" section of these Instructions for those that should be used in tables. Explanatory footnotes are acceptable, but more-extensive table "legends" are not. Footnotes should not include detailed descriptions of the experiment. Tables must include enough information to warrant table format; those with fewer than six pieces of data will be incorporated into the text by the copy editor. [Table 2, on page 106](#), is an example of a well-constructed table.