



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2010

**Andreia Liliana da Silva Análise da diversidade do repertório do TCR V β na
Peixoto infecção pelo VIH**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2010

**Andreia Liliana da Silva Análise da diversidade do repertório do TCR V β na
Peixoto infecção pelo VIH**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Hélder Trindade, Director do Centro de Histocompatibilidade do Sul – CHSul e da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao meu marido, aos meus pais e ao meu irmão, pelo carinho e apoio constantes.

o júri

presidente

Professora Doutora Helena Silva

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Fernando Aires Alves Ventura

Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Professor Doutor Hélder Trindade

Director do Centro de Histocompatibilidade do Sul – CHSul

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A todos aqueles que, de alguma forma, me apoiaram na realização deste trabalho e tornaram possível a sua concretização, o meu sincero obrigado. Ao Professor Doutor Hélder Trindade por ser meu orientador e por me ter aberto as portas do Centro de Histocompatibilidade do Sul, proporcionando a realização desta tese.

Ao Dr. Dário Ligeiro pelo apoio na parte prática e pela disponibilidade demonstrada na revisão desta tese.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira pela orientação prestada, pela disponibilidade e aconselhamento sempre dispensados.

À Mariana pela amabilidade e prontidão no contributo a esta tese.

Aos meus pais, Filipe e Graça, e ao meu irmão Marco pelo apoio e carinho incondicionais.

E por fim, um reconhecimento especial ao Nuno, meu marido, pelo imenso carinho, compreensão, amor e inestimável apoio ao longo desta etapa.

palavras-chave

Repertório do TCR, VIH, Método *Spectratyping*

resumo

Um repertório completo do TCR indica uma população de células T intacta, sem alterações, com potencial de reconhecer um vasto número de imunogénios.

Durante a infecção primária do VIH, a activação e expansão de células T específicas contra o vírus afecta globalmente o repertório do TCR, causando perturbações ao nível da representação individual de cada família V β .

A diversidade do repertório TCR V β pode ser analisada pelo método *Spectratyping*. Este método molecular permite detectar expansões clonais no repertório do TCR, através da visualização do tamanho da região CDR3 dentro de cada família V β .

O presente trabalho teve como principal objectivo analisar a diversidade do repertório dos receptores das células T, TCR V β , nas várias subpopulações celulares T.

O estudo incidiu em 22 indivíduos infectados pelo VIH, antes da adesão à terapêutica anti-retroviral, e em 22 indivíduos seronegativos para o VIH.

A análise do repertório em indivíduos com infecção pelo VIH evidenciou que a maioria das famílias V β do TCR era policlonal e apresentava um perfil de distribuição dos picos anormal ou não-gaussiano. Algumas dessas famílias V β apresentavam expansões dominantes de 1 ou 2 picos de CDR3, principalmente na população T CD8⁺. Esta subpopulação T também foi caracterizada pela ausência de expressão de algumas famílias V β e pela presença de outras em expansões oligoclonais.

Os resultados da análise do repertório da cadeia V β do TCR sugerem uma mudança na composição do repertório de células T em indivíduos com infecção pelo VIH nas diferentes subpopulações T.

keywords

T-cell repertoire, HIV, Spectratyping method

abstract

A full TCR repertoire indicates a T cell population intact, unchanged, with potential to recognize a wide number of immunogens. During the primary infection of HIV, activation and expansion of specific T cells against the virus affects the overall TCR repertoire, causing disorders at the level of individual representation of each V β family. The diversity of the TCR V β repertoire can be analyzed by the Spectratyping method. This molecular method can detect clonal expansions in the TCR repertoire, through the visualization of CDR3 region size within each V β family. The main objective of this work was to study the diversity of the repertoire of T cells receptors, TCR V β , in the several subpopulations of T cells. This study focused on 22 individuals with HIV infection, before the access to antiretroviral therapy, and on 22 healthy individuals. The analysis of the repertoire in individuals infected with HIV showed that the majority of the V β families of the TCR were polyclonal and presented a distribution profile of abnormal peaks or non-Gaussian. Some V β families showed dominant expansions of one or two peaks of CDR3, mainly in the T CD8⁺ population. This T subpopulation was also characterized by the absence of some V β families expression and by the presence of others in oligoclonal expansions. The result of analysis of the repertoire of the TCR V β chain suggest a change in the composition of the T cells repertoire in individuals with HIV infection in the different T subpopulations.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE GRÁFICOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. O Sistema Imunitário	6
1.2. Células do Sistema Imunitário.....	7
1.3. Disfunção no sistema imunitário e imunodeficiência	21
1.4. O Vírus de Imunodeficiência Humana.....	22
1.5. O VIH e a imunidade humoral e celular.....	24
1.6. Análise da diversidade do repertório do TCR V β	27
2. OBJECTIVO	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Local do estudo e População	31
3.2. Material Biológico	31
3.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico em gradiente de densidade	32
3.4. Separação Celular Imunomagnética	32
3.5. Extracção de RNA.....	33
3.6. Determinação da concentração e do grau de pureza do mRNA extraído	34
3.7. Síntese de cDNA.....	34
3.8. Análise da diversidade do repertório TCR V β por <i>Spectratyping</i> da região CDR3 do TCRV β	35
3.8.1. Reacção de PCR primário dos segmentos V β -C β	35
3.8.2. Reacção de extensão V β -C β	36
3.8.3. Preparação das amostras e análise dos produtos amplificados no sequenciador automático	37
3.8.4. Perfil da região CDR3 do TCR, cálculo do tamanho da região CDR3 e frequência das famílias V β	37
3.9. Análise Estatística	39

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1.	Comparação da expressão das famílias V β	41
4.2.	Análise da diversidade do repertório do TCR V β	44
4.3.	Avaliação da complexidade do repertório do TCR V β	47
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	50
6.	REFERÊNCIAS	51
7.	ANEXOS	60
	Anexo 1 - Frequência total (%) de cada Família V β do TCR em linfócitos T CD4 ⁺ , em indivíduos com VIH	61
	Anexo 2 - Frequência total (%) de cada Família V β do TCR em linfócitos T CD8 ⁺ , em indivíduos com VIH	62
	Anexo 3 - Frequência total (%) de cada Família V β do TCR em linfócitos T CD4 ⁺ , em indivíduos Controlo (CTRL)	63
	Anexo 4 - Frequência total (%) de cada Família V β do TCR em linfócitos T CD8 ⁺ , em indivíduos Controlo (CTRL)	64
	Anexo 5 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras VIH CD4 ⁺	65
	Anexo 6 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras VIH CD8 ⁺	66
	Anexo 7 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras Controlo (CTRL) CD4 ⁺	67
	Anexo 8 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras Controlo (CTRL) CD8 ⁺	68
	Anexo 9 - Pontuação de Complexidade das amostras Controlo e VIH nas subpopulações T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	69
	Anexo 10 – Análise dos dados pelo teste ANOVA one-way, com correcção de Bonferroni	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento das células T.	10
Figura 2 - Estrutura do TCR.....	12
Figura 3 - Representação do rearranjo da cadeia β do TCR.	13
Figura 4 - Recombinação somática entre segmentos génicos do TCR (V-D) quando ocorre rearranjo de duas regiões RSS sob a acção de RAG.	14
Figura 5 – Desenvolvimento das células B	18
Figura 6 - Ligação entre o complexo MHC-peptídeo e o TCR de Células T CD4 ⁺	20
Figura 8 - Método <i>Spectratyping</i> da região CDR3 do TCRV β	28
Figura 9 - Repertório do TCR V β com um perfil policlonal normal com distribuição gaussiana em todas as famílias V β	40
Figura 10 - Repertório do TCR V β com um perfil policlonal anormal com distribuição não-gaussiana, com famílias V β com perfil oligoclonal e monoclonal	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das populações em estudo	31
Tabela 2 - Tamanho esperado do produto de amplificação V β -C β para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência da Expressão das Famílias TCR V β , em amostras controlo e VIH na população CD4 ⁺	42
Gráfico 2 - Frequência da Expressão das Famílias TCR V β , em amostras controlo e VIH na população CD8 ⁺	43
Gráfico 3 - Perfil do repertório do TCR V β da população CD4 ⁺ em indivíduos saudáveis.....	45
Gráfico 4 - Perfil do repertório do TCR V β da população CD4 ⁺ em indivíduos com infecção pelo VIH.....	45
Gráfico 5 - Perfil do repertório do TCR V β da população CD8 ⁺ em indivíduos saudáveis.....	46
Gráfico 6 - Perfil do repertório do TCR V β da população CD8 ⁺ em indivíduos com infecção pelo VIH.....	46
Gráfico 7 - Comparação da Pontuação de Complexidade entre amostras Controlo/VIH na população CD4 ⁺ e amostras Controlo/VIH na população CD8 ⁺	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs – Células apresentadoras de antigénio
- BCR – Receptor da célula B
- CD – Agrupamento de diferenciação
- CDR – Região determinante de complementaridade
- DCs – Células dendríticas
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxinucleótidos trifosfato
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- HSC – Células estaminais hematopoiéticas
- MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
- mlg – Imunoglobulinas ligadas à membrana
- PBS – Tampão salino fosfato
- PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico
- PCR – Reacção de polimerização em cadeia
- TCR – Receptor da célula T
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
- RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*
- SBF – Soro bovino fetal
- SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- TA - Temperatura ambiente
- VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana
- V α – Região variável da cadeia alfa do receptor da célula T
- V β – Região variável da cadeia beta do receptor da célula T

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Sistema Imunitário

O Sistema Imunitário protege o corpo humano de infecções provocadas por organismos patogénicos como bactérias, vírus, parasitas e fungos através de dois sistemas: imunidade inata e imunidade adaptativa.

A imunidade inata é uma defesa não específica, que inclui o conjunto através do qual o organismo impede a entrada de agentes estranhos, os reconhece e destrói quando essa entrada acontece. A resposta do organismo é sempre a mesma, qualquer que seja o agente invasor e qualquer que seja o número de vezes que este contacta com o organismo. Não se verifica especificidade, nem memória imunológica. As células intervenientes neste tipo de resposta são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células NK e o complemento.

A imunidade adaptativa ou adquirida é uma defesa específica, que inclui o conjunto de processos através dos quais o organismo reconhece os agentes invasores e os destrói de uma forma dirigida e eficaz. Uma vez que este sistema tenha reconhecido e respondido a um antígeno, ele apresenta memória imunológica (Kindt *et al*, 2008). Assim, um segundo contacto com o mesmo antígeno induz uma reactividade mais intensa. A especificidade da imunidade adaptativa permite a distinção de pequenas diferenças entre antígenos, do reconhecimento do “próprio” e do “não próprio” e da capacidade de responder somente às moléculas “não-próprias” (Abbas *et al*, 2000). Esta especificidade só é possível, devido às características moleculares do receptor das células B (BCR) e receptor das células T (TCR) expressos na superfície dos linfócitos B e T, respectivamente. Além dos linfócitos B e T, também as células apresentadoras de antígeno (APCs) desempenham um papel fundamental na imunidade adaptativa, sendo responsável pela apresentação de antígenos. Este grupo de células garantem memória imunológica, especificidade e diversidade, atributos característicos da imunidade adaptativa (Kindt *et al*, 2008).

É importante referir que os sistemas de imunidade inata e adaptativa não operam independentemente, mas sim como um sistema altamente interactivo e cooperativo, produzindo uma resposta combinada mais efectiva.

1.2. Células do Sistema Imunitário

Todas as células sanguíneas que fazem parte do sistema imunitário têm origem em células precursoras com capacidade de diferenciação em qualquer tipo de células hematopoiéticas, denominadas de células estaminais hematopoiéticas (HSC - *hematopoietic stem cells*) (Kindt *et al*, 2008).

A hematopoiese é um processo regulado e hierárquico, no qual as HSCs se diferenciam em células hematopoiéticas maduras (Banerjee *et al*, 2010). Neste processo, a HSC sofre diferenciação, originando uma célula progenitora mielóide e uma célula progenitora linfóide. Os eritrócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e plaquetas são células com origem comum na célula progenitora mielóide. A célula progenitora linfóide origina os linfócitos B, linfócitos T e células NK (Parra, 2009).

Linfócitos T e a sua ontogenia

Os linfócitos T originam-se na medula óssea e correspondem a cerca de 70-80% dos linfócitos circulantes no sangue periférico. Num processo de maturação de várias fases, passam a expressar vários receptores membranares específicos entre os quais o receptor de células T (TCR), o sistema CD3 e os receptores CD4 ou CD8 (Kindt *et al*, 2008).

O processo de maturação dos linfócitos consiste numa complexa sequência de eventos biológicos, como a proliferação celular, a expressão diferencial de proteínas de membrana, rearranjos génicos do receptor, selecção do repertório de linfócitos maduros, consequente apoptose dos linfócitos não seleccionados e

finalmente a migração celular. Em cada um desses estágios, as células sofrem significativas mudanças celulares e genéticas.

O timo é a estrutura celular/tecidual especializada em manter o ambiente molecular essencial ao desenvolvimento, à maturação das células T e à geração de diversidade do repertório do TCR. Esta diversidade é considerada fundamental para desencadear respostas contra novos agentes patogénicos. Apesar de o timo regredir com a idade, é actualmente reconhecida a funcionalidade do timo adulto, principalmente em situações clínicas em que há necessidade de reconstituir as populações celulares (Appay *et al*, 2010).

O repertório de células T é determinado pelos processos de selecção positiva e negativa que ocorrem no timo (Cossarizza, 1997), durante os quais são seleccionados os timócitos, células T imaturas. A afinidade do TCR por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC – *major histocompatibility complex*) próprias é o parâmetro determinante para o destino do timócito e constitui a base desses processos de selecção. A selecção positiva permite somente a sobrevivência daquelas células T, cujos receptores são capazes de reconhecer as moléculas do MHC próprias, resultando em restrição ao MHC. As células que falham a selecção positiva são eliminadas por apoptose. O outro processo de selecção, denominado selecção negativa, elimina as células T que reagem muito fortemente com moléculas próprias do MHC isoladas ou com o complexo MHC-peptídeos próprios (Goldrath *et al*, 1999). A selecção negativa é o mecanismo que impede a formação de células T com potencial autoreactivo e as condições patológicas da autoimunidade.

Os timócitos no início do seu desenvolvimento não possuem os co-receptores CD4 e CD8 detectáveis. Como estes precursores são fenotipicamente CD4⁻CD8⁻ são denominadas de células DN (duplo-negativas), compreendendo apenas cerca de 3% do número total de timócitos (Goldrath *et al*, 1999).

As células T DN podem ser subdivididas em quatro subpopulações (DN1, DN2, DN3 e DN4), caracterizadas pela presença ou ausência de moléculas de superfície celular, tal como o CD44 (molécula de adesão) e o CD25 (cadeia α do receptor da Interleucina 2, IL-2R α) (Godfrey *et al*, 1993). Quando as células iniciam a expressão de CD25, mantendo a expressão de CD44, são chamadas de

DN2. Durante o período de desenvolvimento crítico da DN2, inicia-se o rearranjo dos genes para as cadeias γ , δ e β do TCR. Entretanto, não há rearranjo no *locus* α do TCR. As células progridem para DN3, a expressão de CD44 é interrompida e o rearranjo das cadeias γ , δ e β do TCR continua. As células destinadas a tornarem-se TCR $\gamma\delta$, divergem na transição entre DN2 e DN3 e tornam-se células T $\gamma\delta$ maduras. A cadeia β recém-sintetizada combina-se com a cadeia pré-T α , associa-se ao grupo CD3 e, em conjunto, formam o pré-TCR ou receptor da célula pré-T. As células DN3 que tiveram um rearranjo produtivo da cadeia β , sofrem proliferação e diferenciação, e promovem a exclusão alélica da cadeia β do TCR. Este facto acontece quando o CD25 perde a sua expressão, as células passam a ser DN4 e os co-receptores CD4 e CD8 são expressos (Janas *et al*, 2010). Durante o período de rápida proliferação, as células expressam CD4⁺CD8⁺, e tornam-se DP (duplo-positivas) (Goldrath *et al*, 1999). Nesta fase DP ocorre o rearranjo da cadeia α do TCR (Janas *et al*, 2010). Os TCRs que não reconhecem os antígenios-próprios apresentados pelas moléculas do MHC morrem por negligência. Os restantes passam pelo rigor da selecção positiva e negativa (Gerondakis *et al*, 2009).

Posteriormente, os timócitos DP que sobrevivem à selecção tímica, desenvolvem-se em timócitos de positividade única – CD4⁺ ou em timócitos de positividade única – CD8⁺. Estas células de positividade única sofrem selecção negativa adicional e migram do córtex para a medula, onde passam do timo para o sistema circulatório (Hale *et al*, 2009).

O desenvolvimento das células T está esquematizado na Figura 1.

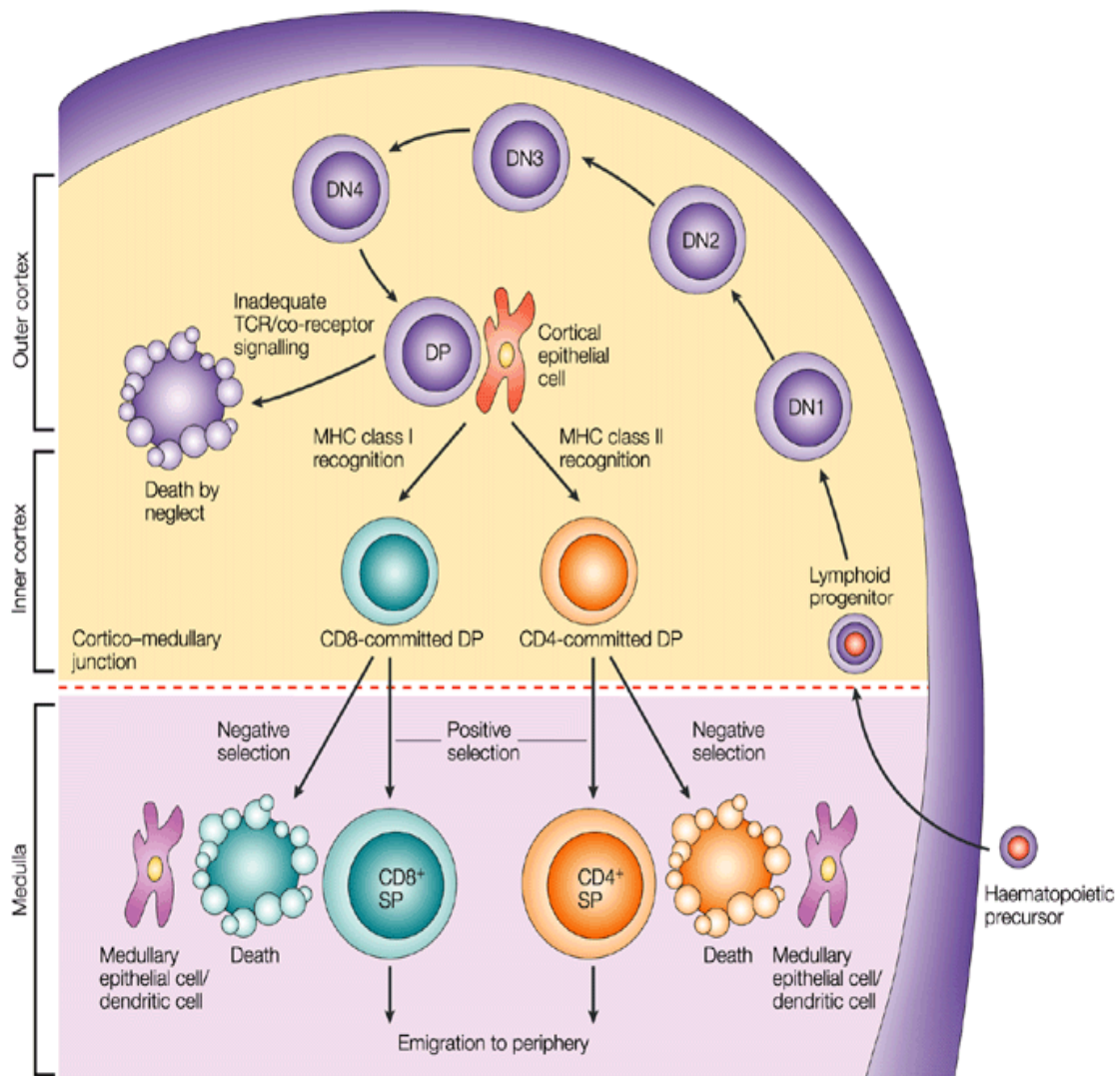


Figura 1 – Desenvolvimento das células T. (Adaptada de Germain, 2002)

Após a selecção e maturação das células T no timo, as células T *naive*, células que ainda não tiveram contacto com o antígeno, circulam entre o sangue periférico e os órgãos linfóides secundários à espera de encontrar um antígeno (Goldrath *et al*, 1999). Quando uma célula T reconhece um antígeno, prolifera e diferencia-se em várias células T efectoras e de memória.

Funcionalmente, os linfócitos T dividem-se em linfócitos T auxiliares ou *helpers* (Th), que possuem na superfície da membrana o receptor CD4; linfócitos T citotóxicos (Tc), que possuem o receptor CD8 na sua superfície; linfócitos T

supressores ou reguladores (Treg), que são identificados pela presença tanto de CD4 como de CD25 nas suas membranas.

Nos últimos anos, reapareceu o interesse pelas células Tregs em várias áreas da imunologia, uma vez que estas apresentam actividade imunossupressora em fenómenos de autoimunidade (Sakaguchi, 2004; Nishimura *et al*, 2004; Pacholczyk *et al*, 2008) bem como na resposta contra agentes infecciosos. Estas células demonstram inibir respostas específicas de antigénios de células T CD4 e CD8 direccionadas contra tumores, órgãos transplantados, infecções parasitárias, bacterianas, fúngicas ou virais.

Receptor dos Linfócitos T – TCR

O receptor de células T (TCR) é um heterodímero de membrana (Davis *et al*, 1988). Em cerca de 95% dos linfócitos T circulantes, o TCR é composto por duas cadeias α e β , unidas por ligações covalentes, por pontes dissulfeto (Wilson *et al*, 1988). Existe ainda um outro tipo de TCR, menos comum, encontrado num pequeno subgrupo de linfócitos T, composto por uma cadeia γ associada a uma cadeia δ . Além disso, o TCR ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) está associado na membrana a uma molécula de transdução de sinal, CD3, formando o complexo TCR-CD3 (Figura 2). Esta molécula acessória participa na transdução de sinal após a interacção de uma célula T com o antigénio, mas não influencia na interacção com o mesmo. O CD3 é um complexo de cinco cadeias polipeptídicas invariáveis que se associam para formar diferentes dímeros — $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\zeta$, ou $\zeta\eta$ (Kindt *et al*, 2008, Call *et al*, 2007, Guy *et al*, 2009).

A estrutura dos domínios do TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ é semelhante à das imunoglobulinas, sendo formada por um domínio variável (V) e um constante (C). A porção constante das cadeias fica ligada à membrana celular, realizando funções sinalizadoras e efectoras, enquanto a porção variável fica totalmente exposta ao meio extracelular, sendo responsável pela ligação com o complexo MHC-antigénio (Abbas *et al*, 2000).

O domínio variável do TCR apresenta uma enorme diversidade, garantindo o reconhecimento do maior número possível de antígenos, uma vez que, cada estrutura antigênica diferente pode ser reconhecida por apenas uma molécula de TCR específica.

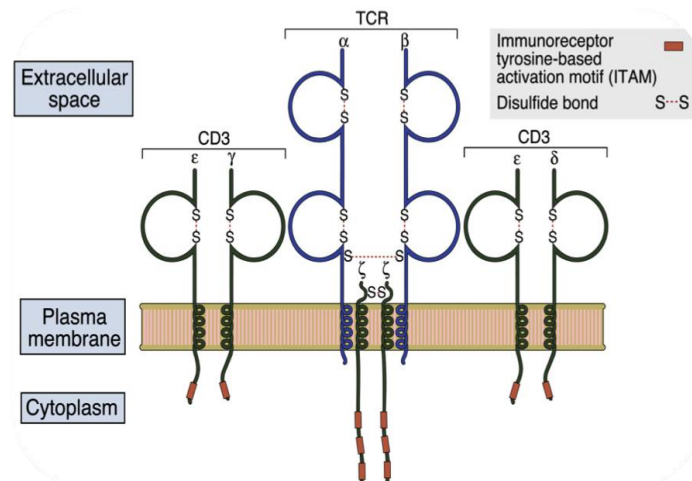


Figura 2 – Estrutura do TCR. (Adaptada de Abbas *et al*, 1999)

Os genes que codificam as cadeias α , β , γ e δ do TCR, para além dos domínios variável (V) e constante (C), também são formados por elementos de junção (J), e para as cadeias β e δ incluem também segmentos génicos de diversidade (D) (Pannetier *et al*, 1993; Fernandes *et al*, 2004; Ochsenreiter *et al*, 2008).

A existência de segmentos génicos V(D)J é uma das primeiras fontes de diversidade do TCR em nível germinal (Tonegawa, 1983). Em princípio, qualquer segmento D pode unir-se a qualquer segmento J, e o conjunto DJ a qualquer segmento V para a formação do RNA (Figura 3). Para que o rearranjo possa ocorrer é essencial o reconhecimento de uma sequência de nucleótidos denominada de sequência sinal de recombinação (RSS – *recombination signal sequence*), composta por uma sequência nucleotídica extremamente conservada, localizada nas extremidades dos segmentos V, D e J. As RSS são fundamentais para o acontecimento do rearranjo entre estes segmentos, funcionando como pontos de reconhecimento e organização para os componentes enzimáticos.

Estas sequências consistem de um bloco conservado de 7 nucleótidos (heptâmero) – CACAGTG, seguido de um separador (*spacer*) de 12 ou 23 nucleótidos (os quais apresentam conservação no número de nucleótidos, mas não ao nível da sequência nucleotídica), seguido por um bloco conservado de 9 nucleótidos (nonâmero) – ACAAAAACC (Hesse *et al*, 1989). A regra base (12/23) que dita a orientação dos rearranjos é a de que apenas podem rearranjar elementos com separadores diferentes (Shlyakhtenko *et al*, 2009). Assim, um elemento com uma sequência sinal composta por um separador de 12 pares de base (bp) apenas rearranja com uma outra cujo separador seja de 23 bp e vice-versa. Desta forma, são impedidos os rearranjos envolvendo elementos do mesmo grupo (V com V, J com J) (Lewis, 1994; Olaru *et al*, 2003).

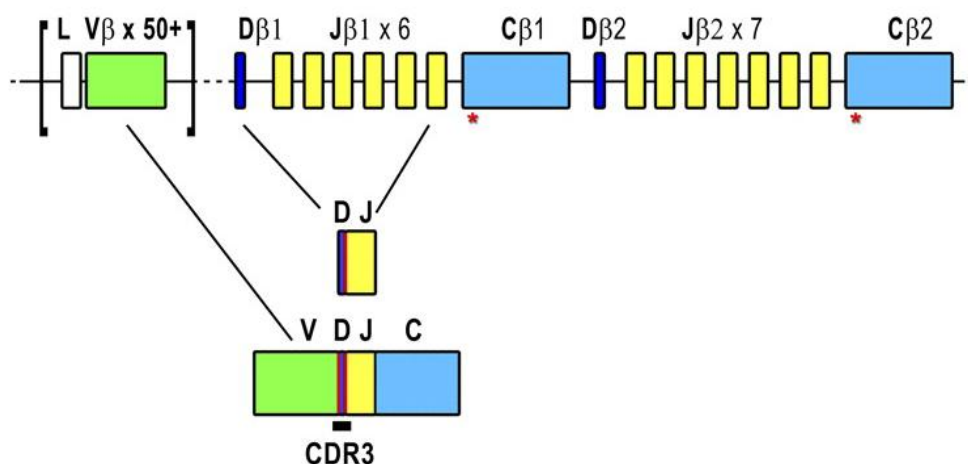


Figura 3 – Representação do rearranjo da cadeia β do TCR. O locus TCR β está localizado no cromossoma 7 e inclui mais de 50 genes TRBV (verde), 2 genes TRBC (azul claro), 2 genes TRBD (azul escuro) e genes TRBJ (amarelo). A primeira recombinação ocorre entre os genes de codificação da região de diversidade (D) com os da região de junção (J). Numa segunda fase, os segmentos DJ são rearranjados com a região variável V. (Adaptada de Genome Res., Freeman *et al*, 2009)

No processo de rearranjo dos segmentos V(D)J constam como principais elementos, as enzimas codificadas pelos genes ativadores de recombinação, designadas de RAG-1 e RAG-2 (Oettinger *et al*, 1990, Gellert, 2002; Kirch *et al*,

1998). Estas enzimas são capazes de clivar o DNA e unir dois segmentos génicos de grupos distintos, na presença da RSS, como é demonstrado na Figura 4.

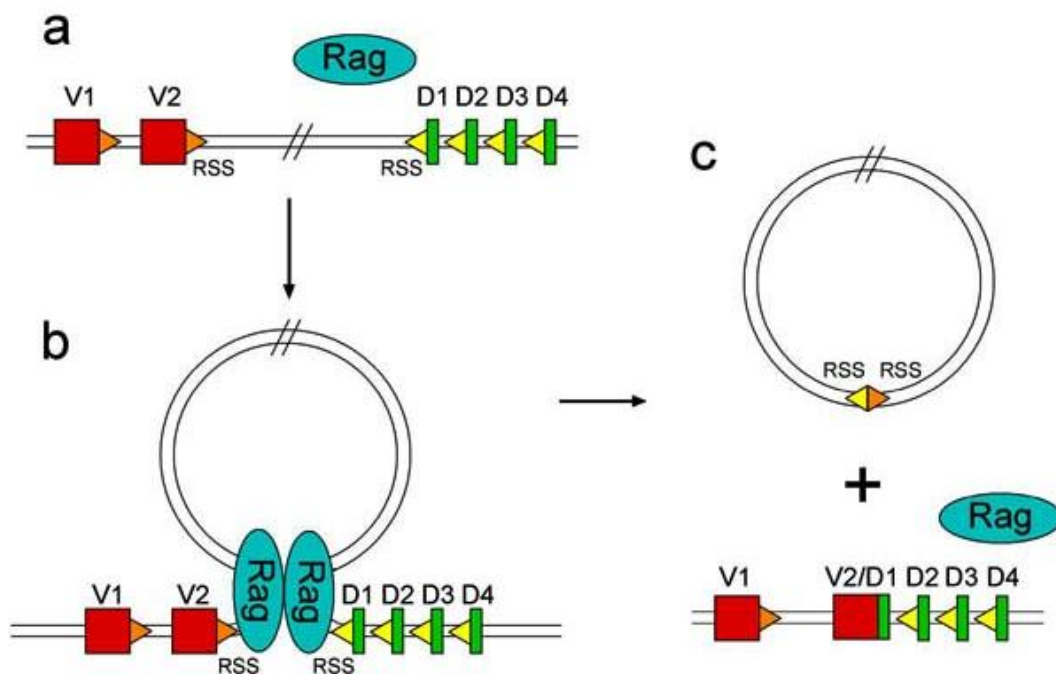


Figura 4 – Recombinação somática entre segmentos génicos do TCR (V-D) quando ocorre rearranjo de duas regiões RSS sob a acção de RAG. (Adaptada de Janeway, 2001)

Os segmentos génicos V das cadeias α e β do TCR codificam as regiões variáveis do receptor, nas quais estão as regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade CDRs (*complementarity determining regions*). Estas regiões são consideradas hipervariáveis por apresentarem maior variabilidade do que as regiões que as separam, denominadas FR (*framework region*) (Abbas *et al*, 2000). As três CDRs da cadeia α , juntamente com as três da cadeia β formam três alças que interagem com o complexo MHC-peptídeo (Yassai *et al*, 2009).

As regiões CDR1 e CDR2 são codificadas pelos genes $V\alpha$ e $V\beta$ e estão envolvidas principalmente no reconhecimento das moléculas do MHC, enquanto que a região CDR3 é gerada pela recombinação somática dos segmentos V e J para $V\alpha$, e dos segmentos V, D e J para $V\beta$ (Okajima *et al*, 2008; Freeman *et al*,

2009) e está envolvida no reconhecimento dos diversos peptídeos apresentados pelas moléculas do MHC, é a região de maior variabilidade (Wu *et al*, 2000; Freeman *et al*, 2009). Esta recombinação somática dos segmentos génicos ocorre durante a maturação dos linfócitos T no timo (Davis *et al*, 1988; Nikolich-Zugich *et al*, 2004).

O potencial da diversidade do repertório do TCR devido à recombinação dos segmentos V(D)J é enorme ($>10^{15}$) (Hodges *et al*, 2008). Contudo, devido a processos de selecção no timo, apenas uma percentagem desses TCR sobrevive e faz parte do repertório de um indivíduo (Cossarizza, 1997; Venturi *et al*, 2008).

A diversidade do TCR é garantida ou pela recombinação somática ou pela combinação de uma determinada cadeia α com uma determinada cadeia β . Tendo em conta o reduzido número de famílias V β comparativamente com as famílias V α descritas, a maior variabilidade da cadeia β , e o facto de uma célula T poder expressar duas cadeias α diferentes mas apenas uma cadeia β – exclusão alélica (Yassai *et al*, 2009), a cadeia V β é preferencialmente mais utilizada como objectivo de estudo (Ochsenreither *et al*, 2008).

Além do facto acima referido, durante o processo de recombinação aleatória são adicionados nucleótidos da região P (de Palindrómicos), e também são inseridos nucleótidos da região N (do inglês Non-germline-regions) (Cossarizza, 1997). Esta reacção é catalisada pela enzima terminal desoxinucleotidil-transferase (TdT) (Fernandes *et al*, 2005). Desta junção imprecisa resultam segmentos de CDR3 com diferentes comprimentos que avaliam a diversidade do TCR (Pannettier *et al*, 1995; Fernandes *et al*, 2005).

Como resultado destas recombinações genéticas, cada célula T apresenta um único TCR e a diversidade do repertório pode ser caracterizada através da análise do CDR3 em qualquer momento, dentro de cada população (Wu *et al*, 2000).

Um repertório de células T completo indica uma população de células T intacta, sem alterações, com potencial de reconhecer um vasto número de imunogénios (Kharbanda *et al*, 2003). Assim, uma vez que o TCR é a chave para o início de uma resposta imunitária, o delineamento da composição do repertório do TCR de um indivíduo pode contribuir para a compreensão da resposta do

sistema imunitário contra infecções ou tumores, da patogénese de doenças auto-imunes, bem como para a compreensão da manutenção de um sistema imunitário saudável (Muraro *et al*, 2000).

Em humanos, os genes da cadeia β do TCR estão localizados no cromossoma 7, ocupando uma extensão de cerca de 685 kb. As cópias dos segmentos génicos D e J são poucas, mas existem 65 segmentos génicos V β nesta região. Destes 65, 46 são funcionais enquanto 19 são definidos como pseudogenes (Rowen *et al*, 1996; Subrahmanyam *et al*, 2001). Estes últimos são definidos como segmentos génicos não funcionais que contêm mutações no módulo de leitura ou defeitos na RSS, mas que apresentam homologia significativa com os segmentos génicos funcionais (Rowen *et al*, 1996). Utilizando como critério de selecção 75% de homologia nas sequências (Crews *et al*, 1981), os 65 segmentos génicos TCRVB estão agrupados em 30 subfamílias génicas (apenas 22 famílias funcionais), que podem conter de 1 a 9 membros (Su *et al*, 2001).

A diversidade gerada por um vasto repertório pode ser ainda maior, considerando a possibilidade de ocorrência de polimorfismos no TCRVB (Hodges *et al*, 2008).

Linfócitos B e a sua ontogenia

As células B, envolvidas na imunidade humoral, são responsáveis pela produção de anticorpos específicos para cada microrganismo e consequente neutralização e destruição desses agentes.

Os linfócitos B originam-se e diferenciam-se na medula óssea. O progenitor B é desde muito cedo, caracterizado pela recombinação dos segmentos V, D e J da cadeia pesada da imunoglobulina e posterior recombinação dos segmentos V e J da cadeia leve, codificando o receptor das células B (BCR) (LeBien *et al*, 2008; Ahn *et al*, 2009). O BCR é um complexo proteico transmembranar composto por uma imunoglobulina ligada à membrana (mIg) e heterodímeros ligados por pontes dissulfeto denominados Ig- α /Ig- β .

As células B imaturas expressam somente IgM na superfície da membrana. Estas células abandonam a medula óssea e adquirem na sua superfície IgD, tornando-se células B maduras *naive* (que ainda não tiveram contacto com o antigénio) (LeBien *et al*, 2008). Os linfócitos B são activados nos centros germinais dos órgãos linfóides secundários e como resposta há proliferação e desenvolvimento de células plasmáticas. Durante as reacções nos centros germinais, muitas células B activadas sofrem apoptose e apenas uma pequena minoria sobrevive e diferencia-se em centroblastos, que por sua vez, sofrem expansão clonal na zona escura dos centros germinais (Frasca *et al*, 2009). A activação e consequente formação de células plasmáticas produtoras de imunoglobulinas são influenciadas pela interacção das células B CD40 com a molécula co-estimuladora dos linfócitos T CD4, o ligando CD40 (CD40L) (Ahn *et al*, 2009). Concomitantemente com a hipermutação somática dos genes da região variável e a imunoglobulina que troca de classes de IgM para IgG ou IgA, as células B completam a sua maturação, diferenciando-se em centrócitos na zona clara dos centros germinais (Frasca *et al*, 2009). Consequentemente, originam plasmócitos e células B memória, as quais podem expressar diferentes isótipos devido à troca de classes.

No fim do processo de maturação, uma célula B madura imunocompetente contém sequências que codificam uma região variável funcional de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve.

Após o estímulo antigénico de uma célula B madura nos órgãos linfóides periféricos, o rearranjo adicional de segmentos da região constante pode gerar mudanças no isótopo expresso, que por sua vez altera as funções biológicas da molécula de imunoglobulina sem que a sua especificidade seja modificada.

Ao longo deste processo de maturação e diferenciação, a selecção negativa ocorre em várias fases com o propósito de promover a auto-tolerância, na medida em que, a perda desta regulação pode resultar em células auto-reactivas que levariam à produção de anticorpos contra os próprios antigénios (Hawker, 2009).

Os genes da imunoglobulina são únicos e sofrem elevadas taxas de recombinação e mutação somática, com o objectivo de gerar diferentes anticorpos. A diversidade de anticorpos é alcançada devido à existência de

numerosos segmentos de genes V, D e J de linhagem germinativa; à confluência combinatória dos segmentos V(D)J, que acontece nas células pró e pré-B e é iniciada pelas proteínas de recombinação RAG-1 e RAG-2 (Parra, 2009); à adição de nucleótidos da região P (P-adição), à adição de nucleótidos da região N (N-adição); à associação combinatória de cadeias leve e pesada; à hipermutação somática, em que nucleótidos individuais em unidade VJ e VDJ são trocados por outros alternativos, modificando a especificidade das imunoglobulinas codificadas; à troca de classes entre os genes de região constante, em que após estimulação de uma célula B por um antígeno, o DNA de cadeia pesada pode sofrer um rearranjo adicional no qual a unidade VDJ da cadeia pesada pode combinar com qualquer segmento do gene constante (Maul *et al*, 2010).

A diversidade dos anticorpos é produzida como a diversidade do TCR, mas acrescentando o facto de a diversidade dos anticorpos também resultar da mutação somática.

Na Figura 5 está esquematizado o desenvolvimento das células B.

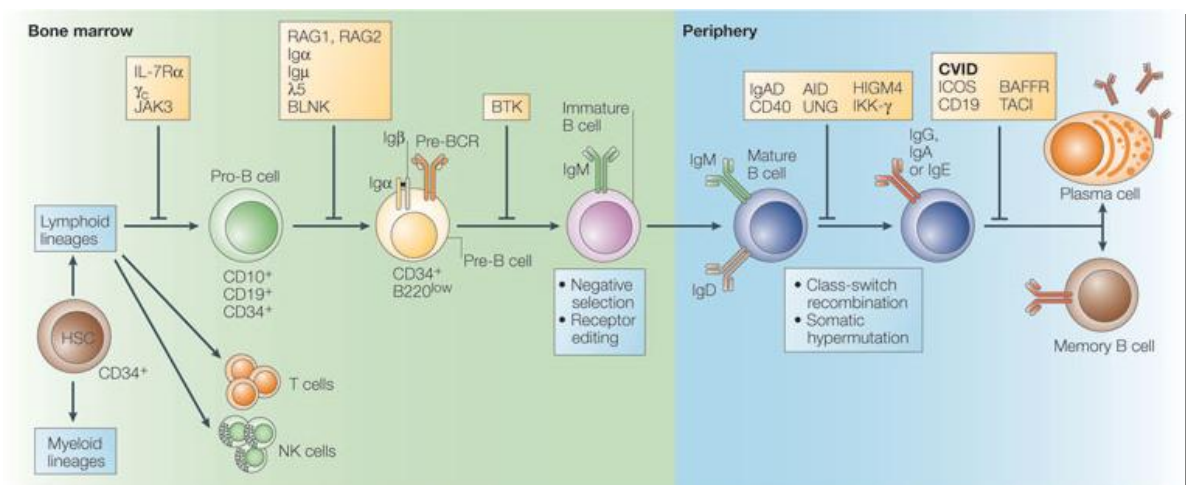


Figura 5 – Desenvolvimento das células B. (Adaptada de Cunningham-Rundles *et al*, 2005)

Células Apresentadoras de Antígeno (APCs) e a interação MHC-TCR

Apesar de todas as células nucleadas expressarem moléculas de MHC classe I e são, portanto, capazes de apresentar peptídeos antígenicos às células

T CD8⁺, a apresentação de antígenos às células T CD4⁺ necessitam de APCs (Brinchmann, 2000).

As células apresentadoras de antígeno são células especializadas que incluem os macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. As APCs são distintas pela sua capacidade de expressar nas suas membranas as moléculas do MHC de classe II, e pela produção de citocinas que activam os linfócitos Th.

As APCs internalizam o antígeno por pinocitose, fagocitose ou endocitose mediada por receptores, processam o antígeno e apresentam uma parte desse antígeno ligado a uma molécula do MHC de classe II na superfície da sua membrana. As células T CD4⁺ (Th) interagem com o complexo MHC-peptídeo através do TCR (Figura 6a) (Brinchmann, 2000). Para além deste reconhecimento, para ocorrer a proliferação celular é necessária a interacção de moléculas co-estimuladoras entre as duas células, tais como, as moléculas da família B7, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) na APC e CD28, na célula T (Yadav *et al*, 2007; Piconi *et al*, 2007).

Contudo, existem alguns produtos proteicos bacterianos ou virais que podem iniciar a activação das células T, sem a necessidade do processamento antigénico pelo MHC da célula alvo, como é o caso dos superantígenos. Estes, ligam-se simultaneamente ao domínio V β de um TCR e à cadeia α de uma molécula do MHC de classe II sem serem processados por uma APC (Figura 6b) (Sundberg *et al*, 2007).

Após a ligação com o receptor de células T, o superantígeno activa um elevado número destas células em repouso, 20% da população total das mesmas. Desta forma, os superantígenos podem iniciar a produção de quantidades elevadas de citocinas inflamatórias (TNF- α e β , Interleucina-2 e INF- γ), e consequente aparecimento de doenças auto-imunes (Sundberg *et al*, 2007).

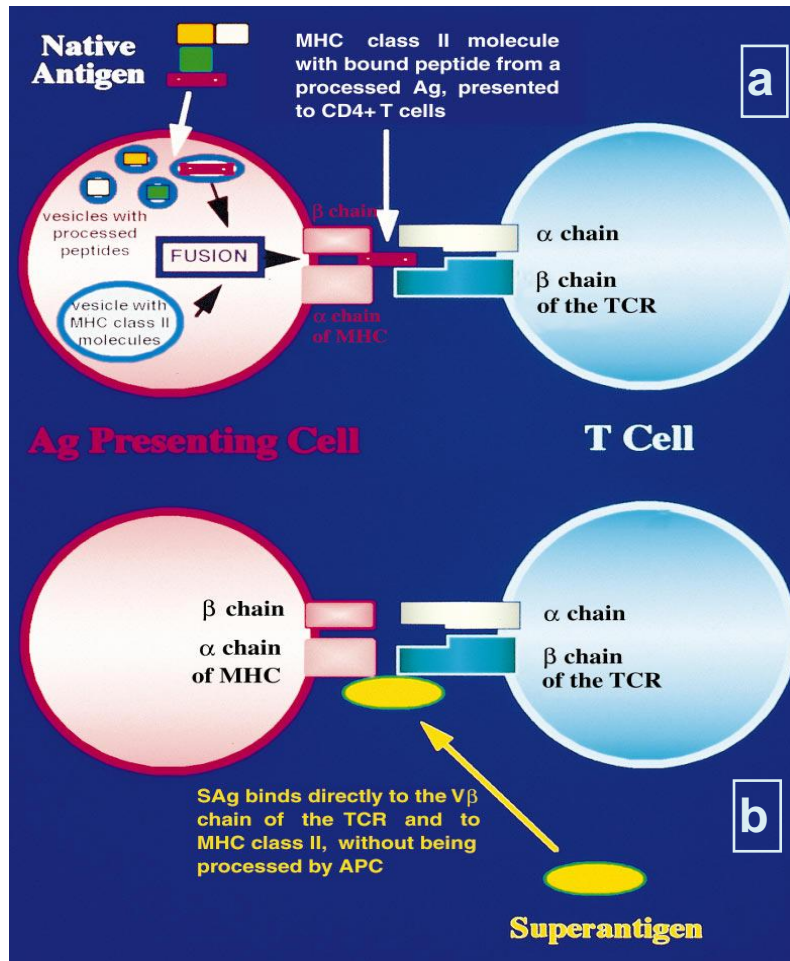


Figura 6 – a) Ligação entre o complexo MHC-peptídeo e o TCR de Células T CD4⁺ através de APC - As APCs internalizam o antígeno. As proteínas antigénicas digeridas são processadas pelos organelos intracelulares, os peptídeos penetram dentro das moléculas do MHC classe II, formando o complexo MHC-peptídeo que é transportado para a superfície das APCs, onde vai activar as células T CD4⁺ através da ligação com o TCR. **b)** Ligação entre o complexo MHC-peptídeo e o TCR de Células T CD4⁺ mediada por um superantígeno. Um superantígeno liga-se simultaneamente ao domínio V β de um TCR e à cadeia α de uma molécula do MHC de classe II sem ser processado por uma APC (Adaptada de Cossarizza, 1997).

Células Dendríticas (DCs)

As células dendríticas desempenham um papel essencial de ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Patil *et al*, 2010).

As DCs podem-se apresentar em dois estados funcionais distintos: células imaturas e maduras. As DCs imaturas estão presentes em tecidos periféricos e são principalmente células fagocíticas, enquanto que as DCs maduras são encontradas nos órgãos linfóides e são especializadas na apresentação de antígenos (Rescigno *et al*, 2009), sendo a população celular com mais capacidade para o fazer.

As DCs imaturas expressam moléculas de MHC classe I e II e algumas moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86. Durante o processo de maturação, as DCs sofrem alterações funcionais e fenotípicas e expressam não só moléculas do MHC classe I e II, moléculas estimuladoras CD80 e CD86, mas também CD40, bem como moléculas de adesão. As DCs maduras, aumentam a secreção de citocinas e quimiocinas, o que atrai as células T *naive* para o local (Bringmann *et al*, 2010).

1.3. Disfunção no sistema imunitário e imunodeficiência

A descrição de imunidade inata e adaptativa refere um sistema imunitário interactivo, que actua em todo o organismo defendendo-o dos microrganismos capazes de causarem doenças infecciosas, ou impedindo o desenvolvimento e proliferação descontrolada de células malignas que podem conduzir à formação de neoplasias. Esta visão geral não estaria completa sem referir que o sistema imunitário pode, e algumas vezes realmente acontece, funcionar de maneira inadequada.

O sistema imunitário perde a sua eficiência e quando não é capaz de detectar o que é próprio, atacando células e tecidos do hospedeiro, tem como resultado a autoimunidade. As doenças auto-imunes são caracterizadas pela perda de tolerância imunológica a antígenos próprios e consequente destruição de tecidos por células auto-reactivas e auto-anticorpos.

Existem várias manifestações comuns de disfunção imunitária como é o caso das alergias e asma, em que determinadas substâncias aumentam a sensibilidade em vez de darem protecção.

Quando qualquer componente da imunidade inata ou adaptativa falha e não consegue proteger o organismo dos agentes causadores de doenças ou das células malignas, o resultado é a imunodeficiência, a qual pode ser diferenciada em dois tipos. A imunodeficiência primária resulta de um defeito ou desenvolvimento anormal do sistema imunitário, geralmente é congênita. A imunodeficiência secundária ou adquirida é a perda de função do sistema imunitário e resulta da exposição a vários agentes patogênicos.

Até ao momento, a imunodeficiência secundária mais comum é o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que resulta de uma infecção pelos Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH).

1.4. O Vírus de Imunodeficiência Humana

Este vírus foi descrito em 1984 como um novo tipo de retrovírus, semelhante aos vírus HTLV-I e HTLV-II, mas com características morfológicas, biológicas e imunológicas próprias. No mesmo ano foi denominado por HTLV-III pela equipa de investigadores americanos liderada por Robert Gallo e por LAV (*Lymphadénopathie Virus*) pelo grupo francês de investigadores liderado por Luc Montagnier. Posteriormente, uniformizou-se, denominando-o por VIH (Vahlne, 2009).

Os vírus associados à etiologia da SIDA (VIH-1 e VIH-2), pertencem à família *Retroviridae*, género *Lentivirus*. As infecções por lentivirus mostram tipicamente um percurso crónico da doença, um longo período de latência, replicação viral persistente e envolvimento do sistema nervoso central.

Este vírus tem um invólucro exterior constituído por uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro e por glicoproteínas virais. A glicoproteína externa, gp120 (no VIH-1) ou gp105 (no VIH-2), está ancorada ao invólucro pela glicoproteína transmembranar (gp41 no VIH-1 ou gp36 no VIH-2) (Helseth *et al*, 1991; Morikawa *et al*, 1992).

Todos os retrovírus, incluindo o VIH, possuem três genes principais: *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). O gene *gag* é o gene

que codifica as proteínas estruturais do core, a p24 e a p17, enquanto o gene *env* codifica o precursor da glicoproteína do envelope viral, gp160, que é clivada em gp120 e gp41, duas glicoproteínas importantes na ligação do vírus com os linfócitos T CD4 (Boutonnet *et al*, 2002). O gene *pol* codifica várias enzimas (protease, integrase, ribonuclease, e transcriptase reversa) envolvidas na integração e replicação viral (Murray *et al*, 2006).

A partícula viral do VIH é composta por duas fitas de RNA no interior de um núcleo proteico, envolvido por uma envelope lipídico, como é demonstrado na Figura 7.

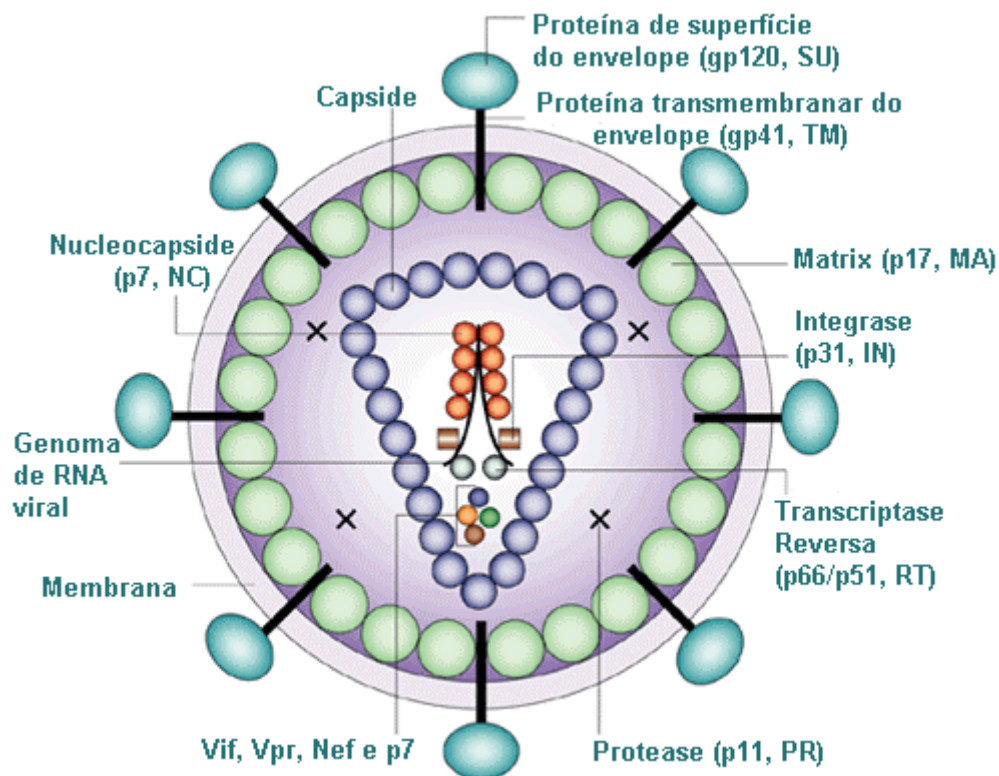


Figura 7 – Estrutura do VIH-1 (Adaptada de Robinson, 2002).

O ciclo de vida do VIH consiste nas seguintes etapas: entrada do vírus na célula; o RNA é transcrito reversamente em DNA, pela transcriptase reversa; essa cópia de DNA (pró-vírus) a partir do genoma viral de RNA, é integrada no genoma da célula e é replicada juntamente com o DNA celular; ocorre lise celular quando o pró-vírus é expresso para formar novas partículas virais. O pró-vírus pode

permanecer latente nas células até que algum sinal regulador inicie o processo de expressão (Prescott. *et al*, 1996).

Os principais alvos do VIH são as células, como linfócitos T, monócitos e macrófagos (Planque *et al*, 2008; Mogensen *et al*, 2010).

A infecção pelo VIH é caracterizada por uma insidiosa deterioração do sistema imunitário (Smith, 2006). O VIH, ao infectar os linfócitos T CD4+, conduz à descoordenação do sistema imunitário e à sua progressiva inoperância, acabando por se estabelecer uma imunodeficiência – SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida). Em consequência dessa imunodeficiência o indivíduo infectado acaba por ficar vulnerável a toda a espécie de invasores microbianos e com menor capacidade de controlo das células neoplásicas. Surgem assim as infecções oportunistas e as neoplasias (linfomas, Sarcoma de Kaposi) características da SIDA, e que são os verdadeiros responsáveis pela morte do indivíduo infectado.

Após a infecção primária, muitos pacientes entram numa fase assintomática que pode durar em média 10 anos, no entanto, durante este período muitas partículas virais são produzidas todos os dias, em quase todos os indivíduos (Brinchmann, 2000).

1.5. O VIH e a imunidade humoral e celular

Alterações nos linfócitos B

Alterações nas funções das células B na infecção pelo VIH têm sido descritas, mas as consequências dessas alterações apenas têm sido exploradas. Embora quase todos os indivíduos com VIH produzam anticorpos contra o vírus, está documentado que apenas uma parte deles tem a capacidade de o neutralizar (Doria-Rose *et al*, 2009). Esta capacidade dos anticorpos contra o VIH neutralizarem as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41 pode ter uma grande importância na imunidade adaptativa e tem sido objecto de estudo para o desenvolvimento de uma vacina profilática para o VIH (Levy, 2009). Contudo, a

persistência do agente infeccioso e a sua variabilidade genética permite que a maior parte dos vírus não sejam neutralizados pelos anticorpos.

Embora a neutralização do VIH seja um parâmetro importante de protecção e que necessite de ser estudado, os anticorpos que têm menos afinidade com o vírus também têm que ser considerados, já que eles facilitam a infecção das células T, macrófagos e outras células. Estes anticorpos reforçam a infecção pelo VIH e estão associados com o desenvolvimento da doença. (Levy, 2009).

Uma das alterações imunológicas mais frequentes e precoces associadas à infecção pelo VIH é a hipergamaglobulinemia, ou seja, aumento na produção de imunoglobulinas como Ig G, IgA, IgM ou IgE e ocorre devido a uma activação anormal dos linfócitos B induzida pelo VIH (Moir *et al*, 2010).

Alterações nas células dendríticas

Na infecção pelo VIH, as células dendríticas têm um papel importante tanto na imunidade inata como na adaptativa. As DCs são células apresentadoras de antígeno das células T e B e produzem citocinas que influenciam a resposta imunitária.

Em todo o mundo, o VIH é mais frequentemente transmitido pela via sexual, as células dendríticas estão perto ou na superfície da mucosa dos sítios envolvidos, desempenhando um papel preponderante na iniciação da infecção pelo VIH. Estas células manifestam grande afinidade pela glicoproteína do envelope gp120 e conseguem reter as partículas infecciosas durante dias, facilitando a apresentação do vírus nas células susceptíveis (Fauci, 2007). Estima-se que as primeiras células a serem afectadas pelo VIH são as DCs de Langerhans, residentes na zona subepitelial da vagina e do recto (Brinchmann, 2000).

Alterações nos linfócitos T

As características mais evidentes da imunodeficiência causada pelo VIH são o aumento da carga viral e a diminuição, ou até mesmo ausência, do número de células T CD4⁺ (Mogensen *et al*, 2010; Norris *et al*, 2001). Pode também ocorrer a destruição de algumas células infectadas no processo de replicação e libertação do vírus do interior dessas células.

Os linfócitos T CD4⁺ através da produção de citocinas, tem um papel importante no apoio da resposta imunitária das células B e outras células T, e algumas células podem ter actividade citotóxica. As células Th CD4⁺ têm um papel importante na eficiência da resposta das células T CD8⁺ e são convenientemente divididas em Th1 e Th2, dependendo das citocinas produzidas. A interacção das células T CD4⁺ com as células dendríticas é importante na determinação da produção de citocinas específicas (Levy, 2009). Contudo, um elevado número de partículas virais são produzidas diariamente através das células T CD4⁺ infectadas, e esta replicação acontece predominantemente nos órgãos linfóides secundários (Brinchmann, 2000).

Os linfócitos T CD4⁺ reguladores (Tregs) têm recebido uma especial atenção na infecção pelo VIH. Estas células podem ser identificadas por vários marcadores fenotípicos, por diferentes funções e mecanismos de acção (Levy, 2009).

Pacientes com infecção pelo VIH também apresentam alterações nas células T CD8⁺. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos têm um papel importante no controlo da virémia e eliminação de células infectadas, na medida em que, a resposta citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ é direccionada contra as proteínas do vírus (Pantaleo *et al*, 1997).

O repertório do TCR em indivíduos normais é altamente diversificado e está envolvido no reconhecimento de uma grande variedade de antigénios (Kostense *et al*, 1998). Durante a infecção primária do VIH, a activação e expansão de células T específicas contra o vírus, afecta globalmente o repertório do TCR causando perturbações ao nível da representação individual de cada família V β

(Pantaleo *et al*, 1994; Pantaleo *et al*, 1997, Soudeyns *et al*, 2000).

Perturbações importantes no repertório da região variável da cadeia β do TCR são frequentemente observadas na infecção primária pelo VIH, resultantes de expansões oligoclonais de células T nas subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺, com as células T CD8⁺ a serem afectadas em maior amplitude do que as células T CD4⁺ (Yin *et al*, 2009). Este acontecimento deve-se ao facto da resposta específica dos linfócitos T citotóxicos para o VIH ser composta por uma variabilidade de clones T CD8⁺ em expansão oligoclonal (Soudeyns *et al*, 2000). A frequência e a magnitude destas perturbações no repertório do TCRV β durante a infecção pelo VIH têm estado relacionadas com a progressão da doença e efeito da terapia (Soudeyns *et al*, 2000).

1.6. Análise da diversidade do repertório do TCR V β

Como referido anteriormente, um repertório completo de TCR indica uma população de células T intacta e com potencial para reconhecer inúmeros imunogénios.

Actualmente, o repertório do TCR pode ser analisado por citometria de fluxo, pelo uso de anticorpos monoclonais anti-V β específicos ou por técnicas de biologia molecular baseadas em PCR. Estas técnicas permitem a identificação e quantificação de famílias em expansão (Langerak *et al*, 2001).

Para além destas técnicas, a diversidade do repertório TCR V β pode ser analisada pelo método *Spectratyping*. Este método molecular consegue detectar expansões clonais no repertório do TCR, através da visualização do tamanho da região CDR3 dentro de cada família V β (Pannetier *et al*, 1993; Pannetier *et al*, 1995; Gorski *et al*; Verfuërth *et al*, 2000; Killian *et al*, 2005).

O esquema do método *spectratyping* está ilustrado na Figura 8.

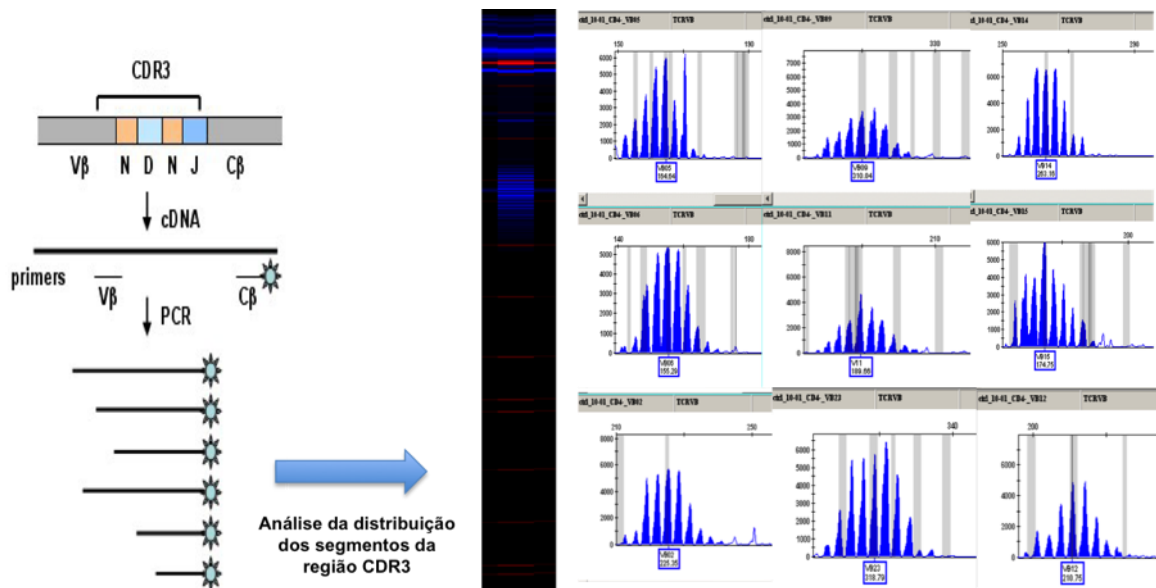


Figura 8 – Método *Spectratyping* da região CDR3 do TCRV β - Esta técnica é iniciada por uma amplificação por PCR dos segmentos V β -C β , utilizando primers específicos para cada uma das 22 famílias V β . O produto desta reacção é submetido a outra amplificação, utilizando um primer adicional marcado com FAM. Em seguida, estes segmentos amplificados são separados por electroforese, e com o auxílio de um sequenciador automático e de um software é possível calcular o tamanho dos diferentes segmentos (picos) de CDR3.

Considerando que a distribuição dos picos CDR3 da cadeia V β do TCR numa população normal de células T segue uma curva de Gauss, com aproximadamente 8 picos para cada família V β , esta metodologia permite detectar variações na distribuição desses segmentos numa determinada população celular. Assim, qualquer expansão clonal anormal no repertório, pode ser detectada com os picos de CDR3 que se desviam da distribuição gaussiana normal (Pannetier *et al*, 1993; Pannetier *et al*, 1995; Gorski *et al*, 1994; Wu *et al*, 2000).

Por outro lado, respostas intensas do sistema imunitário, como doença aguda do enxerto contra o hospedeiro – GVDH (do inglês *graft-versus-host disease*), rejeição do transplante de órgãos sólidos, infecção ou doença auto-imune, estão associadas a perfis oligoclonal (com poucos picos de CDR3) ou monoclonal (com um único pico de CDR3, que corresponde a uma população de células T em expansão clonal) (Wu *et al*, 2000).

Inúmeros estudos têm sido documentados, de alterações no repertório do TCR V β durante a progressão da doença e efeito da terapia, na infecção pelo VIH (Kharbanda *et al*, 2003).

Durante a infecção primária pelo VIH, a activação e expansão de células T específicas para combater a doença, afectam a diversidade do repertório do TCR na representação relativa de cada família V β (Grant *et al*, 2002). O grau de perturbações no repertório do TCR representa a capacidade da resposta das células T na infecção pelo VIH, no entanto, perturbações moderadas em várias famílias V β dentro do TCR pode significar um percurso menos agressivo da doença do que perturbações severas apenas num pequeno número de famílias V β (Pantaleo *et al*, 1997, Grant *et al*, 2002).

No presente estudo foi realizada a análise da diversidade de repertório do TCR em indivíduos com infecção pelo VIH, que ainda não tinham iniciado terapêutica anti-retroviral, e em indivíduos seronegativos para o VIH.

2. OBJECTIVO

Face à evidência de que um repertório de TCR completo indica uma população de células T intacta e com o potencial de reconhecer inúmeros imunogénios, este trabalho teve como principal objectivo analisar a diversidade do repertório dos receptores das células T, TCR V β , nas várias subpopulações celulares T em doentes infectados pelo VIH e em indivíduos saudáveis (população controlo). Para tal foram separadas e enriquecidas suspensões de células mononucleares periféricas nas subpopulações T CD4+ e T CD8+.

Também foi objectivo deste trabalho, identificar as alterações clonotípicas do repertório T na infecção pelo VIH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do estudo e População

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Sul.

O estudo incidiu em 22 indivíduos infectados pelo VIH que foram referenciados ao laboratório para determinação da presença de HLA-B*5701 como factor de contra-indicação à terapêutica anti-retroviral com Abacavir. Como população controlo recrutaram-se 22 indivíduos seronegativos para o VIH.

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos das populações incluídas no estudo.

Tabela 1 – Dados das populações em estudo

População Controlo N=22	
Idade	Média: 28 Intervalo: 18 – 41 anos
Género:	Masculino: 7 (32%) Feminino: 15 (68%)
População Doentes VIH N=22	
Idade	Média: 41 Intervalo: 9 – 62 anos
Género:	Masculino: 14 (64%) Feminino: 8 (36%)

3.2. Material Biológico

O estudo genético das amostras foi efectuado em mRNA obtido a partir de aproximadamente 6mL de sangue periférico colhido com EDTA.

3.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico em gradiente de densidade

A centrifugação em gradiente de densidade é um método simples e rápido de isolar células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), que se serve das diferenças de densidade entre as células mononucleares e os restantes elementos encontrados no sangue.

As amostras de 6mL de sangue periférico colhidas com EDTA foram homogeneizadas, cuidadosamente aplicadas sobre a 3mL de Lymphoprep (Áxis-Shield, Oslo, Norway) (Densidade = $1,077 \pm 0,001$ g/mL) e centrifugadas a $800 \times g$, durante 30min., à temperatura ambiente (22°C), para a obtenção da banda de células mononucleares. As células presentes no anel leucocitário foram cuidadosamente retiradas, lavadas com RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e centrifugadas a $250 \times g$ durante 10min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS com 2% FCS, 1mM EDTA, e processadas num analisador automático hematológico (*Sysmex XT 1800i*) para a sua contagem. A concentração das células foi ajustada a 1×10^6 cél./mL.

3.4. Separação Celular Imunomagnética

A separação celular foi realizada com o sistema EasySep Human CD4+ Positive Selection, (StemCell Technologies, Grenoble França). A suspensão de células mononucleares ($1-2 \times 10^6$ cél./mL) foi colocada num tubo compatível com o magneto EasySep e foi adicionado 25 μ L da solução de anticorpos para selecção positiva CD4⁺. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente durante 15min. Seguidamente, foram adicionadas 25 μ L das nanopartículas magnéticas previamente homogeneizadas e incubado 10min. à temperatura ambiente. Findas estas incubações, o tubo foi colocado sob o campo magnético do suporte EasySep durante 5min. A solução decantada contém a população celular depletada de CD4⁺ e na fracção magnética ficam as células CD4⁺. As

nanopartículas magnéticas foram lavadas em 1mL de tampão PBS e ficaram mais 5min. no campo magnético para retirar qualquer resto de população negativa que não tenha sido eliminada. Após eliminar o sobrenadante, foi adicionado 500µL de PBS com 2% FCS, 1mM EDTA e homogeneizada a fracção magnética. Ambas as fracções foram transferidas para tubos *ependorf* previamente identificados e centrifugados a 3000 x g durante 5min. Por fim, foi retirado o sobrenadante com cuidado, para não danificar o *pellet* e procedeu-se ao isolamento de RNA total.

Este processo de purificação celular possibilita a obtenção de suspensões com uma pureza fenotípica > 98% (dados internos do laboratório não apresentados).

3.5. Extracção de RNA

A extracção de RNA das fracções celulares CD4⁺ e CD4⁻ foi realizada utilizando o sistema QIAmp RNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo standard do fabricante. Em breve, foi preparada uma solução de 300µL de tampão RLT (solução de lise) e mercaptoetanol (1:100) para cada amostra. O *pellet* de células foi ressuspense e homogeneizado até à lise completa nos 303µL da solução preparada anteriormente. Cada lisado foi colocado directamente na coluna de filtração. As colunas de filtração foram centrifugadas 2min. a 14000 x g. Ao lisado colectado no tubo, foi adicionado 300µL de etanol a 70% (a mesma quantidade de RLT), a mistura foi homogeneizada e carregada na coluna de ligação. Esta foi centrifugada durante 30s a 14000 x g, depois foi transferida para um tubo novo e descartado o tubo de colecta, foi adicionado 500µL de tampão RW1 à coluna. O mesmo procedimento foi efectuado para 2 lavagens com a solução RPE. Após a última, a coluna foi centrifugada no máximo de velocidade durante 3min., de forma a libertar a membrana de afinidade de quaisquer resíduos das soluções de lavagem. A coluna de afinidade foi transferida para um *ependorf* de 1,5mL, e o RNA retido foi eluído com 50µL de H₂O *Nuclease free*. Para aumentar o rendimento, a

eluição foi repetida com a mesma solução. Por fim, as colunas foram eliminadas e as amostras foram guardadas.

3.6. Determinação da concentração e do grau de pureza do mRNA extraído

O RNA total obtido foi quantificado por leitura no espectrofotómetro (Beckman, DU530, Califórnia, EUA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280nm. A concentração foi calculada a partir da absorvância (A) a 260nm pela lei de Beer-Lambert usando como coeficiente de extinção para o RNA o factor 40 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)⁻¹ cm^{-1} .

A pureza das soluções de RNA foi verificada através da razão A260/A280, sendo que, amostras que se encontram entre o intervalo 1,8–2,2 são consideradas livres de contaminantes (como proteínas, sais, polissacarídeos e compostos orgânicos).

Posteriormente, as amostras foram congeladas a – 80°C.

3.7. Síntese de cDNA

A transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada utilizando o sistema Superscript III First Strand Synthesis, (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) de acordo com o seguinte protocolo.

Por reacção foram adicionados numa microplaca de PCR 40 μL de RNA total, 1,25 μL de oligo (dT) (50 μM), 1,25 μL de random hexamers (50ng/ μL) e 2,5 μL de annealing buffer. Esta mistura foi incubada durante 5min a 65°C num termociclador para remoção de estruturas secundárias e colocada imediatamente em gelo. Foi adicionado à mistura anterior 20 μL de tampão (2x First Strand Reaction Mix) e 5 μL da mistura enzimática com actividade transcriptase reversa e antinuclease SuperScript III/RNase. A placa com os componentes da reacção foi centrifugada brevemente, incubada no termociclador durante 8min a 25°C, 50min

a 50°C, 5min a 85°C e depois de terminada a incubação, a placa foi colocada de imediato no gelo. As amostras de cDNA foram congeladas a – 20°C.

3.8. Análise da diversidade do repertório TCR V β por Spectratyping da região CDR3 do TCRV β

Esta técnica permite analisar qualitativamente a diversidade do repertório de linfócitos T e detectar expansões clonais de populações celulares (Pannetier *et al*, 1993; Gorski *et al*, 1994).

O método implica uma amplificação por PCR dos segmentos V β -C β do TCR, com oligonucleótidos específicos para cada uma das famílias V β , usando como template o cDNA derivado de RNA isolado de células T. Nesta reacção é amplificado o segmento V(D)J que contém a região CDR3 do TCR. O produto desta reacção é submetido a uma reacção de extensão com um oligonucleótido comum, marcado com o fluorocromo fluoresceína (FAM). Os fragmentos de DNA resultantes dessa reacção são separados por electroforese capilar. Da análise dos electroferogramas é possível calcular o tamanho (em pares de bases) dos diferentes fragmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3, estimar a frequência de cada família V β no repertório do TCR e analisar a clonalidade e distribuição (gaussiana ou não-gaussiana) dos picos na região CDR3.

3.8.1. Reacção de PCR primário dos segmentos V β -C β

A reacção de PCR possibilita a amplificação dos segmentos génicos V β -C β do TCR.

Efectuou-se uma solução *mix* primária 2x concentrada, com 2x tampão PCR Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), 6mM de MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), 400 μ M dNTP's, (Promega, Madison, Wi, EUA) e H₂O MilliQ. Para cada amostra preparou-se 450 μ L de solução *mix* secundária contendo 1x solução primária, 15UI de Platinum Taq DNA Polymerase,

(Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), 50µL de cDNA e H₂O q.b. para o volume final. Esta solução foi armazenada em gelo.

Numa microplaca de PCR foram colocadas as 22 soluções com as misturas de primers *Vβ1* a *Vβ24* + *Cβ* a 0,5µM no volume final da reacção. A cada uma destas misturas foi adicionado 15µL da *mastermix* secundária.

A PCR foi feita num termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) sob o seguinte perfil térmico 3min a 94°C (desnaturação inicial); seguidos de 40 ciclos de 30s a 94°C (desnaturação), 45s a 58°C (*annelling*) e 45s a 72°C (extensão), completando com uma extensão final de 7min a 72°C.

De forma a avaliar o sucesso e eficiência da PCR os produtos das 22 reacções foram carregados em gel de agarose a 2% corado com 15µL de brometo de etídeo (10mg/mL), e submetidos a electroforese submarina de 200 volts, durante 35min.

3.8.2. Reacção de extensão Vβ-Cβ

Na reacção de extensão foi utilizado um primer de consenso, localizado em *TCR-Cβ* e marcado com FAM. Esta reacção tem como objectivo marcar os fragmentos de PCR de forma a serem detectáveis no sequenciador automático de DNA mantendo, no entanto, a estequiometria da reacção.

Os produtos das 22 reacções de PCR específicas de cada família Vβ foram diluídos com a adição de 25µL de H₂O MilliQ e alicotados 5µL para uma placa de PCR. Preparou-se uma solução *mix*, com 1x solução *mix* primária e 0,1µM do oligonucleótido Cβ-FAM e adicionados a cada produto de PCR distribuídos na placa, 7µL desta mistura reaccional.

Esta reacção foi processada num termociclador durante 1min e 30s a 94°C (desnaturação inicial), seguidos de 8 ciclos de 30s a 94°C (desnaturação), 45s a 60°C (*annelling*), 45s a 72°C (extensão), completando com uma extensão final de 45min a 72°C.

3.8.3. Preparação das amostras e análise dos produtos amplificados no sequenciador automático

Os produtos de PCR resultantes da reacção de *extensão* foram diluídos com 15µL de água. Foram retirados 5µL para uma nova placa e adicionados 10µL de Hi-Di Formamide, (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) com 0,2µL de Gene Scan™ 500 Rox Size Standard (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia).

A mistura foi desnaturada durante 5min a 94°C com arrefecimento rápido em gelo por 10min. As amostras foram submetidas a electroforese capilar num sequenciador automático ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) com o protocolo aquisição standard para separação de fragmentos em um array de 36cm com o uso do polímero de separação POP7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

3.8.4. Perfil da região CDR3 do TCR, cálculo do tamanho da região CDR3 e frequência das famílias Vβ

Considerando que a região CDR3 está compreendida entre os resíduos de aminoácidos 95-106 da cadeia variável β do TCR e que a posição dos primers utilizados (Vβ e Cβ) são fixas, o tamanho observado para o produto de PCR Vβ-Cβ marcado depende do tamanho da junção *V(D)J* de cada TCR específico.

O tamanho (em pares de bases) do segmento CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos para cada família Vβ foi estimado previamente, como é demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Tamanho esperado do produto de amplificação V β -C β para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos

<i>Famílias Vβ</i>	<i>Tamanho (pares de bases)</i>	<i>Famílias Vβ</i>	<i>Tamanho (pares de bases)</i>
V β 1	187	V β 13	324
V β 2	225	V β 14	263
V β 3	165	V β 15	174
V β 4	186	V β 16	143
V β 5	164	V β 17	160
V β 6	155	V β 18	185
V β 7	187	V β 20	210
V β 8	271	V β 21	147
V β 9	310	V β 22	338
V β 11	188	V β 23	318
V β 12	211	V β 24	330

Estes dados são utilizados para o cálculo de cada segmento de CDR3 através do software Gene MapperTM (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo comparados com um marcador de peso molecular conhecido (Gene ScanTM 500 Rox Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) que foi previamente carregado com as amostras. Isto possibilita distinguir os diferentes tamanhos, em pares de bases. O pico correspondente a 10 resíduos de aminoácidos é definido por um número de pares de bases conhecido, assim como, cada 3 pares de bases corresponde a 1 resíduo de aminoácido. A análise fornecida pelo software inclui o tamanho (expresso em pares de bases), a altura e área do pico.

A distribuição dos segmentos de CDR3 pode apresentar um perfil policlonal normal, com uma curva de Gauss, contendo 8 a 10 picos para cada família (Wu *et al*, 2000), sendo classificada com pontuação 8 (*score* = 8). Uma pontuação 0 indica a ausência da família V β enquanto uma pontuação 1 demonstra um perfil monoclonal com um único pico que corresponde a uma expansão clonal de células T. Uma família V β com pontuação 2 indica um perfil biclonal, uma

pontuação 3 indica a presença de 3 picos, e assim sucessivamente. A complexidade total de uma amostra é calculada através do somatório da pontuação de cada família V β , sendo a pontuação de complexidade (*complexity score*) máxima possível para este trabalho de 176 (8 x 22 famílias V β) (Wu *et al*, 2000).

3.9. Análise Estatística

As frequências das famílias V β foram avaliadas e comparadas entre Controlo/VIH na população CD4⁺ e entre Controlo/VIH na população CD8⁺ utilizando estatística numérica e gráfica. As pontuações de complexidade foram calculadas através do somatório da pontuação de cada família V β e comparadas entre Controlo CD4⁺ e VIH CD4⁺, Controlo CD8⁺ e VIH CD8⁺. Estes dados são apresentados graficamente com as médias \pm SEM das quantificações para cada população e foram analisados pelo método de análise de variância de um factor ANOVA, com correcção de Bonferroni para as comparações múltiplas. As discrepâncias entre os valores dos indivíduos saudáveis e indivíduos com VIH, nas várias populações T, foram consideradas estatisticamente significativas para valores de *P* inferiores a 5% ($P < 0,05$).

Esta análise estatística foi executada com recurso ao programa informático *GraphPad Prism* (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

A classificação do perfil do repertório do TCR dentro de cada família V β foi quantificada para cada subpopulação T CD4⁺ e CD8⁺, em indivíduos infectados pelo VIH e em indivíduos saudáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar a diversidade do repertório dos linfócitos T nas várias subpopulações celulares, suspensões de células mononucleares periféricas foram previamente enriquecidas e separadas em subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺.

Para a avaliação da diversidade do repertório dos receptores das células T, TCR V β , foi utilizado o método *Spectratyping* da região CDR3 do TCRV β . Este método permite a análise da composição clonal de uma população de células T e da sua diversidade geral baseada na distribuição dos segmentos de CDR3 do TCR.

Neste estudo foi avaliada a diversidade do repertório da cadeia V β do TCR em 22 doentes infectados pelo VIH e em 22 indivíduos seronegativos para o VIH.

As Figuras 9 e 10 mostram os gráficos de distribuição dos segmentos CDR3 analisados pelo software Gene MapperTM. Os gráficos (ou espectros) representam a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias em função do comprimento da região CDR3 em pares de bases.

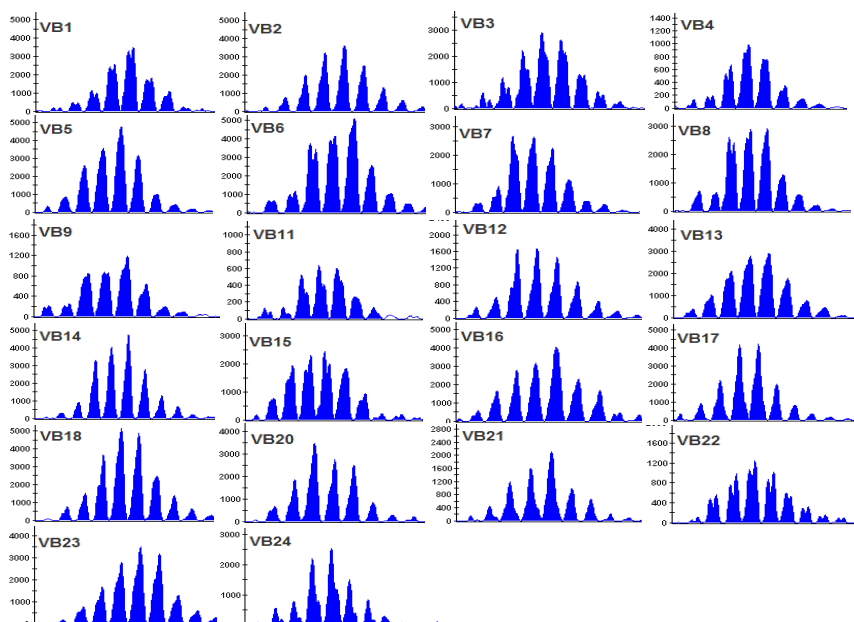


Figura 9 – Repertório do TCR V β com um perfil policlonal normal com distribuição gaussiana em todas as famílias V β

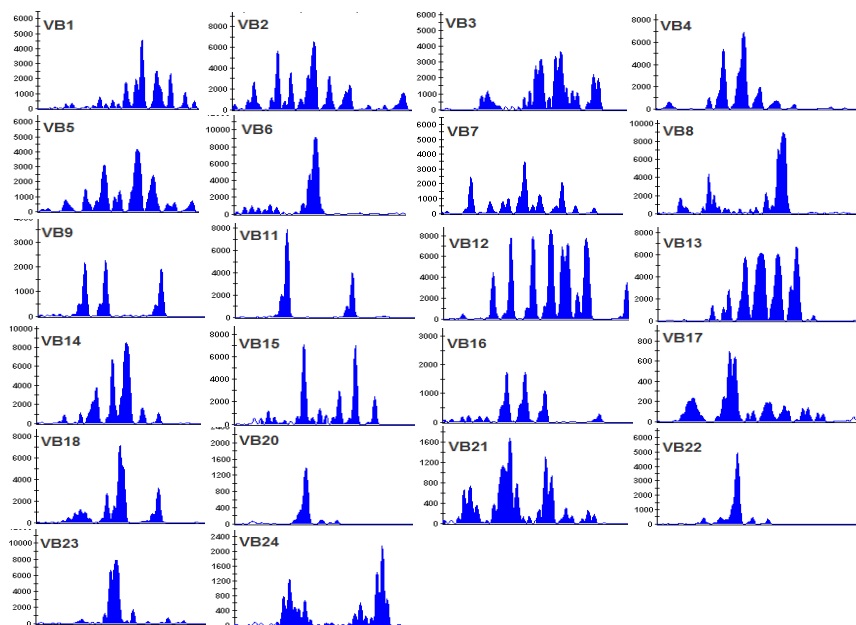


Figura 10 – Repertório do TCR V β com um perfil policlonal anormal com distribuição não-gaussiana, com famílias V β com perfil oligoclonal e monoclonal

Com base nestes gráficos, calculou-se a frequência de cada pico da região CDR3 das famílias V β e a frequência total de cada família V β para uma determinada amostra, a partir do valor da área dos picos de fluorescência, segundo as seguintes fórmulas: $\%VB_n = (\text{área pico } VB_n / \Sigma \text{ área todos } VB) \times 100$, $\%VB \text{ Total} = (\Sigma \text{ área todos picos } VB_n / \Sigma \text{ área todos } VB) \times 100$, respectivamente.

4.1. Comparação da expressão das famílias V β

Foram comparadas as frequências totais de cada família V β em amostras controle e VIH na população CD4⁺, e as famílias V β 2, V β 5, V β 13, V β 17 e V β 20 apresentaram diferenças na sua expressão com significado estatístico ($P < 0,05$) (Gráfico 1). As famílias V β 2, V β 5, V β 13, apresentaram maior expressão nas amostras VIH CD4⁺, enquanto que as famílias V β 17 e V β 20 estiveram mais fortemente expressadas nas amostras controle CD4⁺. Estas diferenças foram estatisticamente significativas.

Este aumento de expressão de algumas famílias V β na infecção pelo VIH, poderá indicar a utilização preferencial de algumas famílias V β no combate à doença.

Um estudo realizado descreve o aumento da expressão da V β 2 só na população CD4⁺ e não na população CD8⁺ em doentes com infecção pelo VIH (Hodara *et al*, 1993), acontecimento também verificado neste estudo.

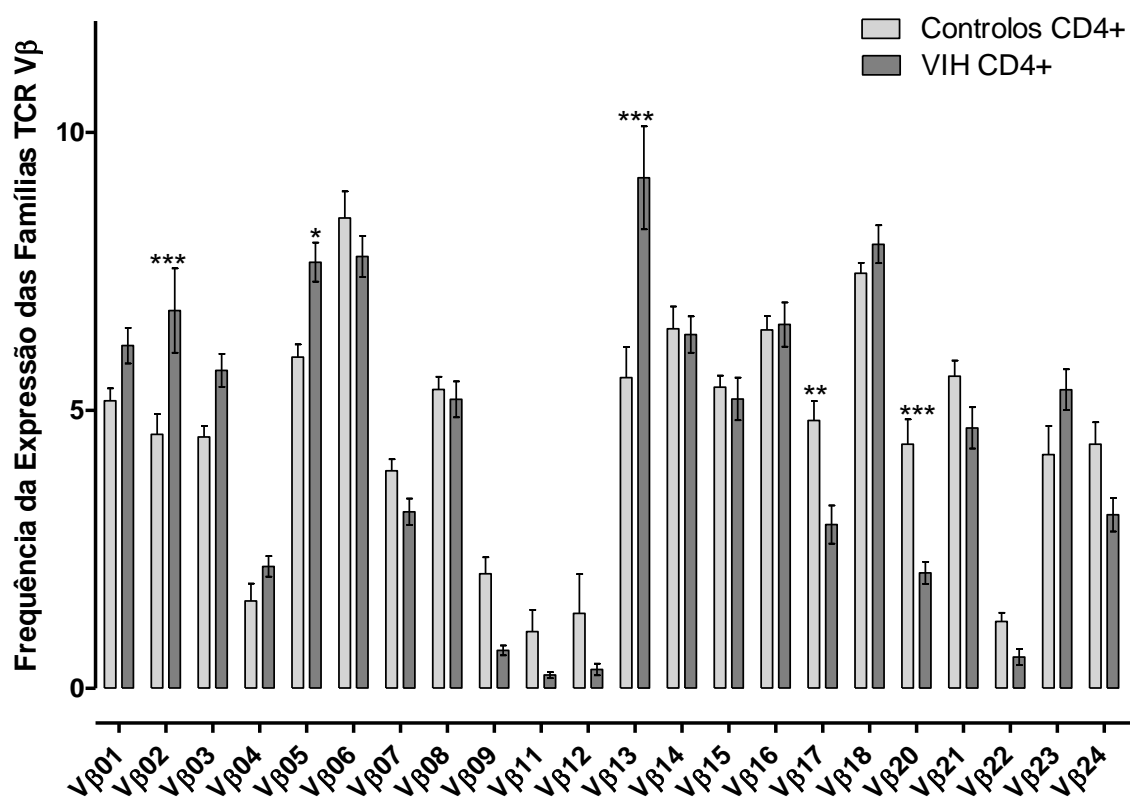


Gráfico 1 – Frequência da Expressão das Famílias TCR V β , em amostras controlo e VIH na população CD4⁺. Os dois grupos foram comparados utilizando o teste de ANOVA one-way , com correcção de Bonferroni. Os asteriscos (*) indicam o significado estatístico das comparações (* P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0.001).

Os valores da frequência total de cada família V β no repertório de cada indivíduo, em amostras VIH e controlo, na população T CD4⁺, podem ser visualizados na íntegra nos Anexos 1 e 3, respectivamente.

Também foram comparadas as frequências totais de cada família V β em amostras controlo e VIH na população CD8⁺, mas as diferenças encontradas não atingem significado estatístico (Gráfico 2). Este acontecimento pode estar relacionado com o facto desta subpopulação T CD8⁺ poder estar a utilizar clones reactivos no combate à infecção pelo VIH.

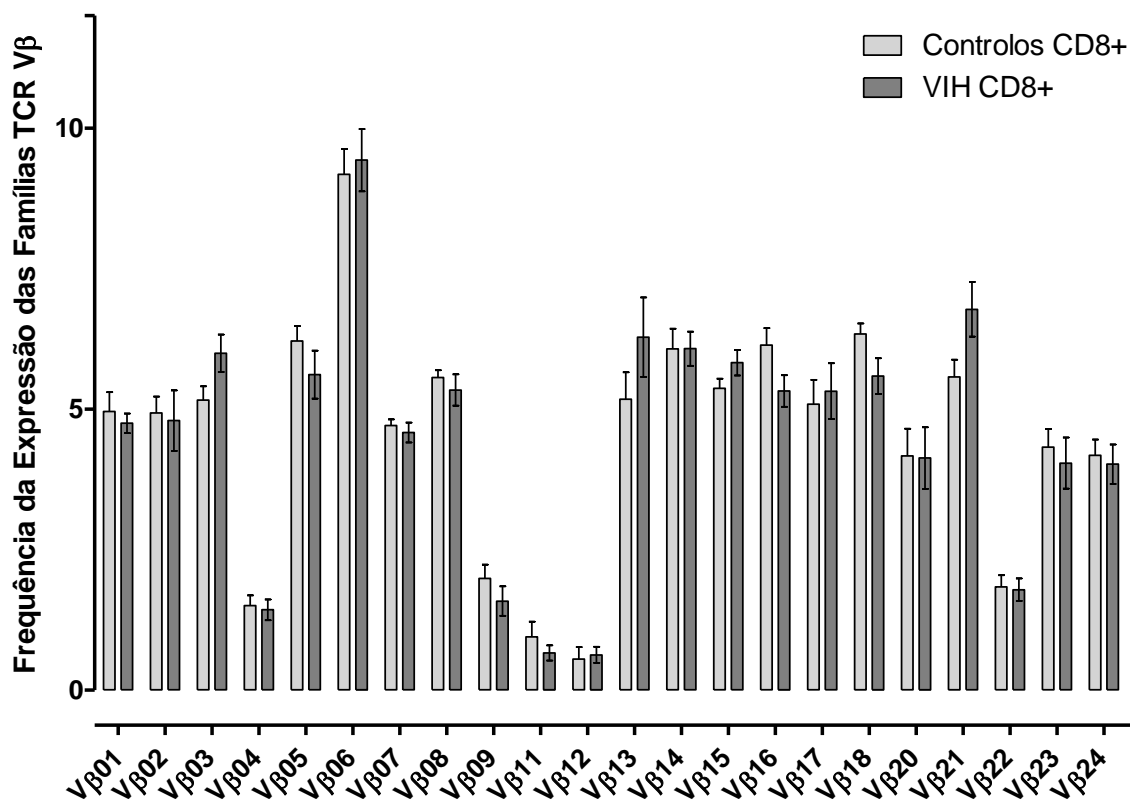


Gráfico 2 – Frequência da Expressão das Famílias TCR V β , em amostras controlo e VIH na população CD8⁺. Os dois grupos foram comparados utilizando o teste de ANOVA one-way, com correcção de Bonferroni.

Estes valores da frequência total de cada família V β no repertório de cada indivíduo, em amostras VIH e controlo, na população T CD8⁺, podem ser visualizados na íntegra nos Anexos 2 e 4, respectivamente.

Neste estudo, foi possível constatar que as famílias V β 4, V β 9, V β 11, V β 12 e V β 22, nas amostras controlo e VIH das populações T CD4⁺ e T CD8⁺, detêm uma menor expressão face às outras famílias V β .

4.2. Análise da diversidade do repertório do TCR V β

Na análise do repertório, as famílias foram classificadas como famílias policlonais gaussianas, se apresentassem vários picos de CDR3 evidenciando uma distribuição normal ou gaussiana dos picos; famílias policlonais não-gaussianas, se apresentassem vários picos de CDR3 mas com uma distribuição anormal ou não-gaussiana (policlonal skewed), podendo haver descontinuidade da distribuição devido à ausência de alguns picos ou à existência de um pico com área total $\geq 40\%$ ou 2 picos dominantes perfazendo uma área total de 70%; famílias oligoclonais, se apresentassem uma distribuição não-gaussiana, com 4 picos, ou menos, de CDR3; famílias monoclonais, se apresentassem um pico dominante com uma área superior a 90%, revelando uma população em expansão clonal. Algumas famílias V β não foram amplificadas em alguns indivíduos e foram designadas de famílias não expressas. A classificação das várias famílias V β , nas diferentes amostras, pode ser explorada nos Anexos 5, 6, 7 e 8.

Esta classificação foi adaptada das análises do repertório do TCR descritas na literatura (Wu *et al*, 2000; Sloand *et al*, 2005).

A análise do repertório do TCR V β na população T CD4⁺ em indivíduos saudáveis apresentou quase exclusivamente famílias V β com um perfil policlonal gaussiano, com cerca de 90%, havendo uma pequena parte destas famílias com os restantes perfis, policlonal não-gaussiano e oligoclonal. Nesta população T CD4⁺ apenas uma amostra não expressou uma família V β – V β 12 e não foi visível famílias com distribuição monoclonal (Gráfico 3). Por outro lado, o perfil do repertório do TCR V β em indivíduos com VIH, na população T CD4⁺, apresentou várias famílias V β policlonais, com perfil de distribuição dos picos anormal, não-gaussiano, com expansões dominantes de 1 ou 2 picos de CDR3. Nestes indivíduos foram encontradas famílias V β com distribuição oligo e monoclonal, havendo algumas famílias V β que não foram amplificadas (Gráfico 4).

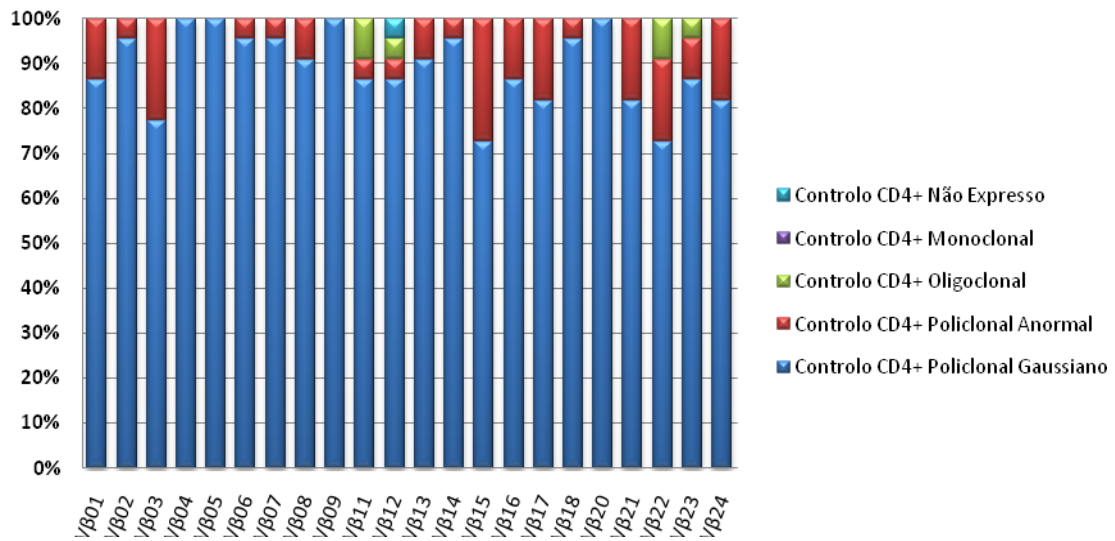


Gráfico 3 – Perfil do repertório do TCR Vβ da população CD4⁺ em indivíduos saudáveis.

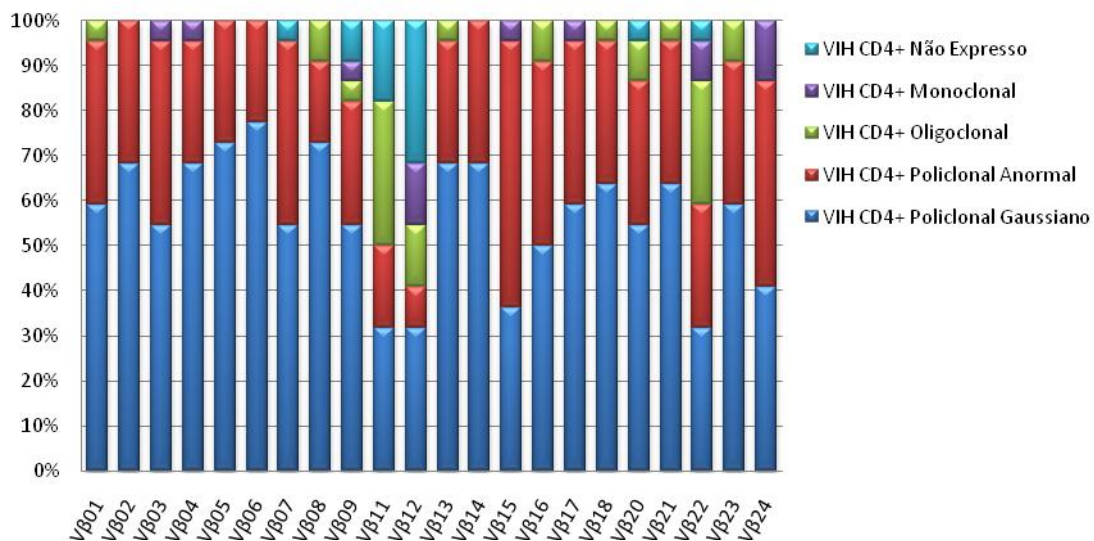


Gráfico 4 – Perfil do repertório do TCR Vβ da população CD4⁺ em indivíduos com infecção pelo VIH

O repertório do TCR Vβ na população CD8⁺ em indivíduos saudáveis, apresentou predominantemente famílias Vβ com perfil policlonal gaussiano, mas também manifestou uma percentagem de famílias com uma distribuição policlonal não-gaussiana. Apenas uma minoria apresentou um perfil com uma distribuição monoclonal e a ausência de expressão de uma família, Vβ 12, só se verificou em duas destas amostras controlo (Gráfico 5).

No entanto, o perfil do repertório do TCR V β em indivíduos com VIH, na população CD8⁺, apresentou um perfil muito alterado, com várias famílias V β policlonais, com distribuição dos picos anormal, não-gaussiana, com expansões dominantes de 1 ou 2 picos de CDR3. Nesta população, apenas uma pequena parte das famílias V β , cerca de 20%, apresentou uma distribuição dos segmentos CDR3 policlonal normal ou gaussiana (Gráficos 6).

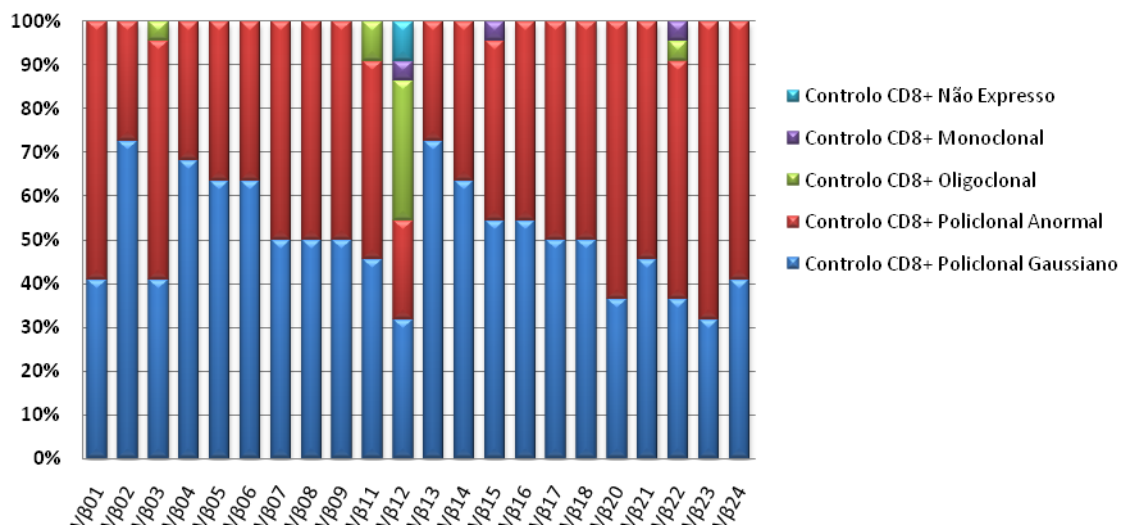


Gráfico 5 – Perfil do repertório do TCR V β da população CD8⁺ em indivíduos saudáveis.

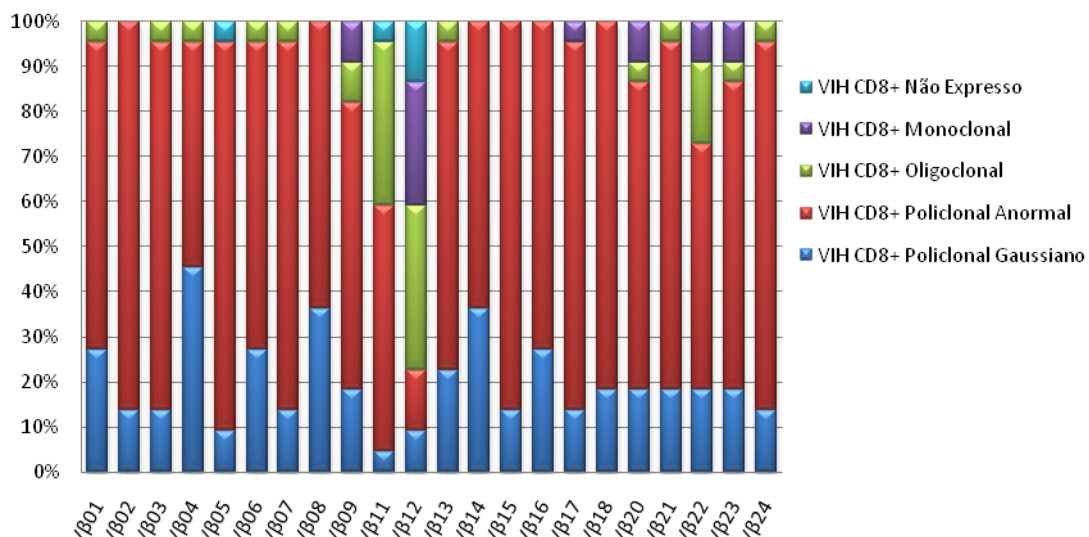


Gráfico 6 – Perfil do repertório do TCR V β da população CD8⁺ em indivíduos com infecção pelo VIH.

Estas perturbações no repertório do TCR V β , em indivíduos com a infecção pelo VIH, com maior alteração nas células T CD8⁺ do que nas T CD4⁺, foram coincidentes com estudos prévios (Kharbanda *et al*, 2003; Halapi *et al*, 1999; Maini *et al*, 1999; Pantaleo *et al*, 1997; Rebai *et al*, 1994; Soudeyns *et al*, 2000). Uma possível explicação pode dever-se à resposta subsequente de cada subpopulação ao antígeno (Kharbanda *et al*, 2003).

Nesta análise é evidente que a infecção pelo VIH influencia o número de famílias V β que apresenta um perfil anormal, manifestando oligoclonalidade ou até mesmo clonalidade de células T.

A infecção pelo VIH condiciona fortemente o repertório das células T, alterando a capacidade de resposta do sistema imunitário.

4.3. Avaliação da complexidade do repertório do TCR V β

A diversidade do repertório da cadeia V β do TCR foi analisada com base na pontuação de complexidade (*complexity score*) calculado para cada amostra (Wu *et al*, 2000). O sistema de pontuação de complexidade é calculado através do somatório do número dos picos visualizados em cada família V β .

A pontuação de complexidade máxima deste estudo foi de 176 (8x22famílias). Nas amostras controlo, na população CD4⁺, o valor mais baixo foi de 159 (CTRL 3) e o mais alto de 176 (CTRL 9 e CTRL 13), enquanto que na população CD8⁺, o valor mais baixo foi de 162 (CTRL 2) e o mais alto de 176 (CTRL 13). Nas amostras VIH, população CD4⁺, o valor mais baixo foi de 66 (VIH 7) e o mais elevado de 172 (VIH 20), enquanto que na população CD8⁺, o valor mais baixo foi de 130 (VIH 1) e o mais elevado de 174 (VIH 21). Os resultados da pontuação de complexidade de todas as amostras estudadas podem ser visualizados no Anexo 9.

A comparação da pontuação de complexidade entre amostras controlo e amostras VIH é apresentado no Gráfico 7. De uma pontuação máxima possível de 176, a pontuação média na população CD4⁺ foi de 171 em indivíduos seronegativos para o VIH e 152 em doentes infectados pelo VIH, enquanto que na

população CD8⁺ foi de 169 em indivíduos saudáveis e 153 em doentes infectados pelo VIH.

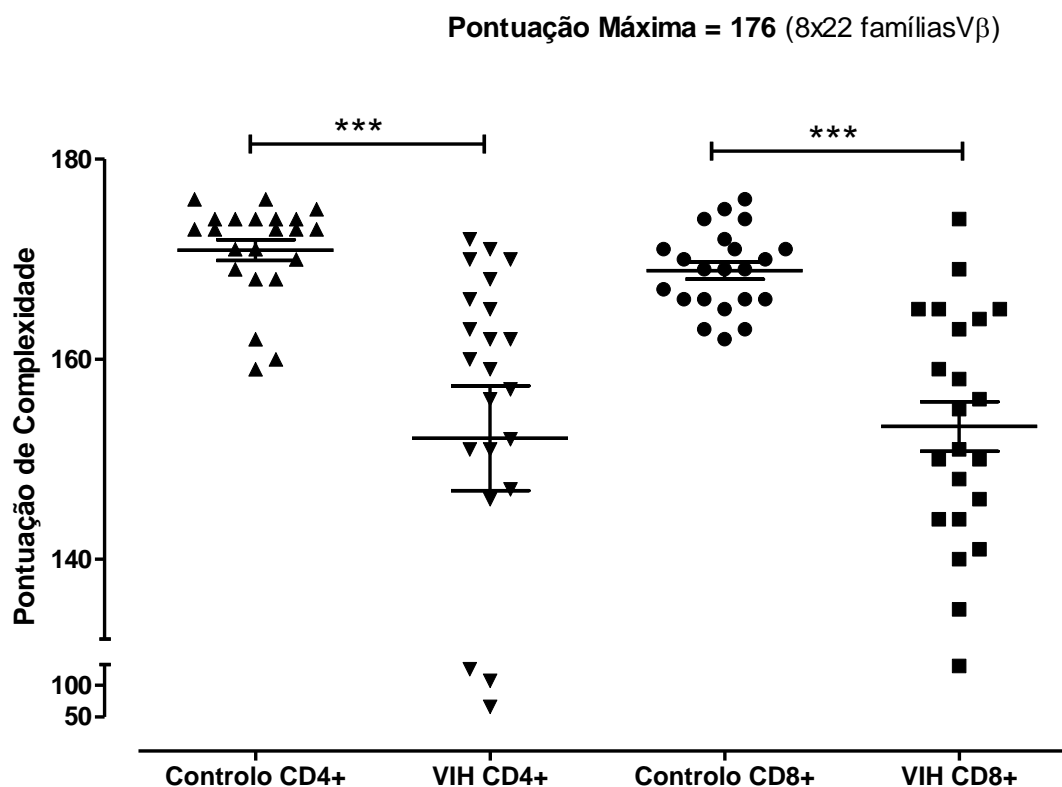


Gráfico 7 – Comparação da Pontuação de Complexidade entre amostras Controlo/VIH na população CD4⁺ e amostras Controlo/VIH na população CD8⁺. Os grupos foram comparados utilizando o teste de ANOVA one-way, com correcção de Bonferroni. Os asteriscos (*) indicam significado estatístico das comparações (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

Este esquema quantitativo de pontuação para medir o grau de deficiência do repertório do TCR Vβ de cada amostra demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre indivíduos saudáveis e com infecção pelo VIH. Como era esperado, as amostras controlo tinham espectros diversos e complexos. Por outro lado, os espectros dos indivíduos infectados pelo VIH eram bastante heterogêneos, com valores com uma grande amplitude. Estes resultados podem dever-se ao facto de os indivíduos estarem em diferentes fases de desenvolvimento da doença.

Esta comparação da pontuação de complexidade entre indivíduos controlo e indivíduos com VIH demonstra distúrbios demasiado elevados na composição do repertório destes últimos, diminuindo muito a diversidade do repertório das células T e a capacidade destas reconhecerem diferentes imunogénios na resposta imunitária. Este facto pode ser a explicação da vulnerabilidade destes doentes a patogénios oportunistas.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O propósito deste trabalho consistia em analisar a diversidade do repertório somático TCRVB em doentes infectados pelo VIH e em indivíduos saudáveis.

Esta análise do repertório do TCR V β em indivíduos saudáveis comprovou que a maioria das famílias V β do TCR apresentavam um perfil policlonal com uma distribuição normal ou gaussiana dos vários segmentos de CDR3. O repertório TCRVB das células T CD8⁺ apresentam um maior numero de famílias V β com distúrbios quando comparado ao das células T CD4⁺ e a frequência de expansões mono e oligoclonais na população controlo é igualmente superior nas células T CD8⁺.

A análise do repertório em indivíduos com infecção pelo VIH evidenciou que a maioria das famílias V β do TCR era policlonal e apresentava um perfil de distribuição dos picos anormal ou não-gaussiano. No entanto, algumas dessas famílias V β apresentavam expansões dominantes de 1 ou 2 picos de CDR3. Essas expansões foram encontradas principalmente na população T CD8⁺ e uma possível explicação reside na resposta de cada subpopulação T a antigénios. Esta subpopulação T também foi caracterizada pela ausência de expressão de algumas famílias V β e pela presença de outras em expansões oligoclonais. Em geral, os resultados da análise do repertório da cadeia V β do TCR sugerem uma mudança na composição do repertório de células T em indivíduos infectados pelo VIH nas diferentes subpopulações T.

Como habitualmente acontece no processo da investigação científica, as questões colocadas no início do trabalho levantam outras que aguardam resposta. Se por um lado ficou demonstrado o repertório do TCR V β em doentes com a infecção pelo VIH antes da adesão à terapêutica anti-retroviral, fica por determinar se o repertório destes mesmos doentes após 6 meses e 1 ano de tratamento normaliza ou permanece alterado. Também poderia haver interesse em determinar a correlação das perturbações no repertório do TCR e a carga viral, avaliando em que medida o controlo da replicação viral restabelece o repertório do TCR nestes indivíduos com infecção pelo VIH.

6. REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3 ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 1999.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4 ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders Company; 2000.
- Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2009; 5(5):557-564.
- Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging.* 2010; 2:78-81.
- Banerjee P, Crawford L, Samuelson E, Feuer G. Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology.* 2010; 7:8.
- Boutonnet N, Janssens W, Boutton C, Verschelde J, Heyndrickx L, Beirnaert E, Groen G, Lasters I. Comparison of predicted scaffold-compatible sequence variation in the triple-hairpin structure of human immunodeficiency virus type 1 gp41 with patient data. *J. Virol.* 2002; 7595-7606.
- Brinchmann JE. Differential responses of T cell subsets: possible role in the immunopathogenesis of AIDS. *AIDS.* 2000; 14:1689-1700.
- Bringmann A, Held S, Heine A, Brossart P. RNA Vaccines in Cancer Treatment. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010:623687.
- Call ME, Wucherpfenning KW. Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:841-850.
- Crews S, Griffin J, Huang H, Calame K, Hood L. A single VH gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell.* 1981; 25(1):59-66.
- Cossarizza A. T-cell repertoire and HIV infection: Facts and perspectives. *AIDS.* 1997; 11:1075-1088.

- Cunningham-Rundles C, Ponda PP. Molecular defects in T- and B- cell primary immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5(11):880-892.
- Davis MM, Bjorkman PJ. T cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988; 334:395-402.
- Doria-Rose NA, Connors M. Antibody Secreting B-cells in HIV Infection. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2009; 4(5):426-430.
- Fauci AS. Pathogenesis of HIV Disease: Opportunities for New Prevention Interventions. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45 Suppl 4:S206-212.
- Fernandes S, Chavan S, Chitnis V, Kohn N, Pahwa S. Simplified Fluorescent Multiplex PCR Method for Evaluation of the T-Cell Receptor V β -Chain Repertoire. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 477-483.
- Frasca D, Blomberg BB. Effects of aging on B cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21(4):425-430.
- Freeman JD, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Res.* 2009; 19 (10):1817-1824.
- Gellert M. V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Nature.* 2002; 420 (6914):429-34.
- Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2(5):309-322.
- Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF-KB Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2010; 2:a000182. Epub 2009.
- Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3 CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 1993; 150:4244-4252.
- Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999; 402:255-262.

- Gorski J, Yassai MB, Zhu X, Kissela B, Keever C, Flomenberg N. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping: correlation with immune status. *J. Immunol.* 1994; 152: 5109-5119.
- Grant M, Pardoe I, Whaley M, Montaner JSG, Harrigan PR. The T cell receptor V beta repertoire shows little change during treatment interruption-related viral rebound in chronic HIV infection. *AIDS.* 2002; 16(2):287-290.
- Guy CS, Vignali DAA. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol Rev.* 2009; 232(1):7-21.
- Halapi E, Jeddi-Tehrani M, Blucher A, Andersson R, Rossi P, Wigzell H, Grunewald J. Diverse T-cell receptor CDR3 length patterns in human CD4+ and CD8+ T lymphocytes from newborns and adults. *Scand. J. Immunol.* 1999; 49(2):149-154.
- Hale JS, Fink PJ. Back to the Thymus: Peripheral T Cells Come Home. *Immunol. Cell Biol.* 2009; 87(1):58-64. Epub 2008.
- Hawker K. B cells as a target of immune modulation. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 2009; 12(4):221-5.
- Helseth E, Olshevsky U, Furman C, Sodroski J. Human Immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 1991; 65(4):2119-2123.
- Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev.* 1989; 3(7):1053-1061.
- Hodara VL, Jeddi-Tehrani M, Grunewald J, Andersson R, Scarlatti G, Esin S, Holmberg V, Libonatti O, Wigzell H. HIV infection leads to differential expression of T-cell receptor V beta genes in CD4+ and CD8+ T cells. *AIDS.* 1993; 7(5):633-688.
- Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56(1):1-11.

- Janas ML, Varano G, Gudmundsson K, Noda M, Nagasawa T, Turner M. Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *J. Exp. Med.* 2010; 207:247-261.
- Janeway C. *Immunobiology 5: the immune system in health and disease.* 2001. New York, Garland Pub.
- Kharbanda M, McCloskey TW, Pahwa R, Sun M, Pahwa S. Alterations in T-Cell Receptor V β Repertoire of CD4 and CD8 T Lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10:53-58.
- Killian MS, Sabado RL, Kilpatrick S, Hausner MA, Jamieson BD, Yang OO. Clonal breadth of the HIV-1-specific T-cell receptor repertoire in vivo as determined by subtractive analysis. *AIDS.* 2005;19:887-896.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby.* 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- Kirch SA, Rathbun GA, Oettinger MA. Dual role of RAG2 in V(D)J recombination: catalysis and regulation of ordered Ig gene assembly. *EMBO J.* 1998; 17(16): 4881-4886.
- Kostense S, Raaphorst FM, Notermans DW, Joling J, Hooibrink B, Pakker NG, Danner SA, Teale JM, Miedema F. Diversity of T-cell receptor BV repertoire in HIV-1-infected patients reflects the biphasic CD4+ T-cell repopulation Kinetics during highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1998; 12:F235-F240.
- Langerak AW, Beemd R, Wolvers-Tettero ILM, Boor PPC, Lochem EG, Hooijkaas H, Dongen JJM. Molecular and flow cytometric analysis of the V β repertoire for clonality assessment in mature TCR $\alpha\beta$ T-cell proliferations. *Blood.* 2001; 98:165-173.
- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008; 112(5):1570-1578.
- Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS.* 2009; 23:147-160.

- Lewis SM. The Mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological and comparative analyses. *Adv Immunol.* 1994; 56:27-150.
- Maini MK, Casorati G, Dellabona P, Wack A, Beverley PC. T cell clonality in immune responses. *Immunol. Today.* 1999; 20(6):262-266.
- Maul RW, Gearhart PJ. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. *Immunol Res.* 2010; 47:113-122.
- Mogensen T, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology.* 2010; 7:54.
- Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(4): 235-245.
- Morikawa Y, Moore JP, Fenouillet E, Jones IM. Complementation of human immunodeficiency virus glycoprotein mutations in trans. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1907-1913.
- Muraro PA, Jacobsen M, Necker A, Nagle JW, Gaber R, Sommer N, Oertel WH, Martin R, Hemmer B. Rapid identification of local T cell expansion in inflammatory organ diseases by flow cytometric T cell receptor Vbeta analysis. *J. Immunol. Methods.* 2000; 246:131-143.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica.* 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(2):123-132.
- Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising *Foxp3*⁺*CD25*⁺*CD4*⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2004; 16(8):1189-1201.
- Norris PJ, Rosenberg ES. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS.* 2001; 15(suppl 2):S16-S21.

- Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, Nagorsen D, Schrama D, Becker J, Thiel E, Keilholz U. Relative quantification of TCR Vbeta-chain families by real time PCR for identification of clonal T-cell populations. *J. Transl Med.* 2008; 6:34.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248(4962):1517-1523.
- Okajima M, Wada T, Nishida M, Yokoyama T, Nakayama Y, Hashida Y, Shibata F, Tone Y, Ishizaki A, Shimizu M, Saito T, Ohta K, Toma T, Yachie A. Analysis of T cell receptor V β diversity in peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 155:166-172. Epub 2008.
- Olaru A, Patterson DN, Villey I, Livák F. DNA-Rag Protein Interactions in the Control of Selective D Gene Utilization in the TCR β Locus. *J. Immunol.* 2003; 171:3605-3611.
- Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008;125(4):450-458.
- Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zoller M, Kourilsky P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90 (9):4319-4323.
- Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today.* 1995; 16(4):176-181.
- Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekalytt RP, Fauci AS. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature.* 1994; 370(6489):463-467.
- Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, Vaccarezza M, Cohen OJ, Daucher M, Graziosi C, Schnittman SS, Quinn TC, Shaw GM, Perrin L, Tambussi G, Lazzarin A, Sekaly RP, Soudeyns H, Corey L, Fauci AS. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of

disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:254-258.

Parra M. Epigenetic events during B lymphocyte development. *Epigenetics.* 2009; 4(7):462-468.

Patil S, Pincas H, Seto J, Nudelman G, Nudelman I, Sealfon SC. Signaling network of dendritic cells in response to pathogens: a community-input supported knowledgebase. *BMC Syst. Biol.* 2010; 4:137.

Piconi S, Trabattoni D, Saresella M, Iemoli E, Schenal M, Fusi A, Borelli M, Chen L, Mascheri A, Clerici M. Effects of Specific Immunotherapy on the B7 Family of Costimulatory Molecules in Allergic Inflammation. *J. Immunol.* 2007; 178:1931-1937.

Planque S, Nishiyama Y, Taguchi H, Salas M, Hanson C, Paul S. Catalytic antibodies to HIV: Physiological role and potential clinical utility. *Autoimmun. Rev.* 2008; 7(6):473-479.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology.* 3ed. US: Wm C Brown Publishers, 1996.

Rebai N, Pantaleo G, Demarest JF, Ciurli C, Soudeyns H, Adelsberger JW, Vaccarezza M, Walker RE, Sekaly RP, Fauci AS. Analysis of the T-cell receptor beta-chain variable-region (V beta) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: evidence for perturbations of specific V beta segments in CD4+ T cells of the virus-positive twins. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91(4):1529-1533.

Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(9):2241-2250.

Robinson HL. New Hope for an AIDS Vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(4):239-250.

Rowen L, Koop BF, Hood L. The Complete 685-kilobase DNA Sequence of the Human beta T cell receptor locus. *Science.* 1996; 272(5269):1755-1762.

- Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:531-562.
- Shlyakhtenko LS, Gilmore J, Kriatchko AN, Kumar S, Swanson PC, Lyubchenko YL. Molecular Mechanism Underlying RAG1/RAG2 Synaptic Complex Formation. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(31):20956-20965.
- Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M, Ramkissoon S, Risitano AM, Keyvanafar K, Lu J, Basu A, Barrett AJ, Young NS. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005; 106(3):841-851.
- Smith SM. The pathogenesis of HIV infection: stupid may not be so dumb after all. *Retrovirology.* 2006;3:60.
- Soudeyns H, Champagne P, Holloway CL, Silvestri GU, Ringuette N, Samson J, Lapointe N, Sékaly RP. Transient T cell receptor beta-chain variable region-specific expansions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J. Infect. Dis.* 2000; 181(1):107-120.
- Soudeyns H, Campi G, Rizzardi GP, Lenge C, Demarest JF, Tambussi G, Lazzarin A, Kaufmann D, Casorati G, Corey L, Pantaleo G. Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor β chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood.* 2000; 95(5):1743-1751.
- Su C, Nei M. Evolutionary Dynamics of the T-Cell receptor VB Gene Family as Inferred from the Human and Mouse Genomic Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2001; 18(4):503-513.
- Subrahmanyam L, Eberle MA, Clark AG, Kruglyak L, Nickerson DA. Sequence variation and linkage disequilibrium in the human T-cell receptor beta (TCRB) locus. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69(2): 381-395.

- Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin. Immunol.* 2007; 19(4):262-271.
- Tonegawa S. Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature.* 1983; 302(5909):575-581.
- Vahlne A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology.* 2009; 6:40.
- Venturi V, Chin HY, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The Role of Production Frequency in the Sharing of Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ TCRs between Macaques. *J. Immunol.* 2008; 181:2597-2609.
- Verfuerth S, Peggs K, Vyas P, Barnett L, O'Reilly RJ, Mackinnon S. Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood.* 2000; 95:3990-3995.
- Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth R, Hood L. Structure, Organization and Polymorphism of Murine and Human T-cell Receptor α and β Chain Gene Families. *Immunol. Rev.* 1988; 101:149-172.
- Wu CJ, Chillemi A, Alyea EP, Orsini E, Neuberg D, Soiffer RJ, Ritz J. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood.* 2000; 95(1):352-9.
- Yadav D, Sarvetnick N. B7-2 Regulates Survival, Phenotype, and Function of APCs. *J. Immunol.* 2007; 178:6236-6241.
- Yassai MB, Naumov YN, Naumova EN, Gorski J. A clonotype nomenclature for T cell receptors. *Immunogenetics.* 2009; 61:493-502.
- Yin L, Kou ZC, Rodriguez C, Hou W, Goodenow MM, Sleasman JW. Antiretroviral Therapy Restores Diversity in the T-Cell Receptor V β Repertoire of CD4 T-Cell Subpopulations among Human Immunodeficiency Virus Type 1- Infected Children and Adolescents. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(9):1293-1301.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Frequência total (%) de cada Família Vβ do TCR em linfócitos T CD4⁺, em indivíduos com VIH

Família Vβ	Amostras VIH CD4+																					
	VIH1	VIH2	VIH3	VIH4	VIH5	VIH6	VIH7	VIH8	VIH9	VIH10	VIH11	VIH12	VIH13	VIH14	VIH15	VIH16	VIH17	VIH18	VIH19	VIH20	VIH21	VIH22
Vβ01	5,32	5,04	5,58	5,94	7,55	5,80	2,55	6,54	5,75	5,65	5,91	5,11	5,72	5,51	8,70	5,30	8,41	9,34	8,09	6,60	5,11	6,09
Vβ02	6,65	5,54	6,08	5,37	7,53	5,89	20,98	6,70	6,47	3,94	6,47	9,80	5,85	7,73	8,11	4,54	6,43	4,20	8,96	4,07	4,08	4,08
Vβ03	5,71	6,30	5,65	4,57	5,31	3,94	4,81	5,74	3,59	4,77	7,31	8,61	7,88	6,41	7,70	5,70	6,83	5,38	6,34	3,23	5,10	4,93
Vβ04	3,15	2,28	2,67	2,24	4,50	2,63	1,47	3,15	3,72	1,90	2,49	2,47	1,98	2,16	1,94	1,39	1,38	1,25	1,36	1,53	1,34	1,27
Vβ05	6,97	7,42	7,58	7,58	9,76	7,62	10,44	10,30	8,11	7,34	5,64	6,51	4,94	8,90	9,29	5,49	5,04	6,85	9,28	9,67	6,78	7,12
Vβ06	6,96	9,40	7,82	7,79	6,96	9,34	3,03	9,33	5,99	8,34	7,16	7,17	8,94	6,07	7,66	7,81	6,89	12,23	7,40	7,31	8,03	9,26
Vβ07	4,14	3,90	3,83	2,24	3,63	2,87	0,00	3,70	3,13	4,00	3,55	1,17	3,55	2,97	1,63	3,93	4,21	4,02	2,26	3,01	3,86	4,29
Vβ08	3,95	5,32	5,88	6,07	8,34	6,96	1,38	5,30	5,82	6,36	5,87	4,43	5,20	3,95	3,77	5,59	5,73	2,17	4,98	5,92	5,32	6,09
Vβ09	0,47	1,14	0,64	0,71	0,58	0,54	0,00	1,09	0,96	0,00	0,79	0,11	0,58	0,58	0,34	0,83	0,81	0,17	1,12	0,76	1,65	1,21
Vβ11	0,51	0,14	0,96	0,00	0,59	0,79	0,00	0,24	0,15	0,00	0,23	0,00	0,24	0,16	0,06	0,13	0,14	0,19	0,35	0,09	0,12	0,18
Vβ12	0,13	2,03	0,40	0,00	0,00	0,37	0,00	0,76	0,52	0,29	0,05	0,00	0,13	0,00	0,00	0,33	0,30	0,20	0,00	0,93	1,00	0,02
Vβ13	10,15	7,31	9,44	7,83	5,57	7,89	24,07	8,76	7,87	8,10	9,91	13,66	8,45	13,98	10,23	8,71	5,84	2,22	13,52	6,30	6,74	5,49
Vβ14	7,78	5,50	6,45	7,33	8,36	7,55	3,78	4,11	6,80	6,09	5,80	8,55	6,41	4,59	4,65	5,41	7,98	5,89	3,92	8,87	7,37	6,79
Vβ15	4,61	5,02	4,03	4,35	7,43	4,94	0,44	2,87	5,52	4,69	5,11	8,08	5,50	3,20	5,45	5,08	7,75	8,01	6,22	5,43	6,70	4,07
Vβ16	7,67	3,34	5,31	7,29	7,25	5,44	1,66	6,76	6,56	6,59	7,27	3,27	8,19	7,05	7,01	6,48	5,95	9,98	6,68	8,21	8,01	8,00
Vβ17	3,28	7,02	4,18	3,69	1,60	3,29	0,26	1,37	2,58	4,19	1,98	0,63	2,30	2,97	1,08	3,40	2,61	5,88	1,76	2,99	3,68	4,09
Vβ18	9,91	5,96	7,83	9,51	4,22	6,52	10,01	9,05	9,32	7,71	7,66	4,55	8,80	9,01	9,28	9,07	7,46	8,91	9,04	7,50	7,66	6,77
Vβ20	1,12	3,95	2,04	2,17	0,97	2,38	2,40	2,37	2,18	3,78	1,64	2,30	0,00	0,74	1,78	2,55	1,60	3,23	1,30	2,39	2,48	2,32
Vβ21	2,94	3,06	3,18	4,38	1,60	4,15	8,59	1,99	6,02	4,93	3,67	5,81	4,94	4,30	3,96	4,97	7,67	7,70	4,73	4,69	4,56	5,24
Vβ22	0,26	0,75	0,43	0,58	0,57	0,47	0,64	0,18	0,13	1,33	0,35	0,05	0,51	0,20	0,07	3,12	0,14	0,05	0,00	0,63	0,56	1,42
Vβ23	5,91	4,98	7,22	7,06	4,61	6,31	2,22	6,28	6,79	5,81	7,11	5,89	6,23	6,65	5,56	5,96	5,80	1,51	0,92	5,03	5,06	5,27
Vβ24	2,41	4,58	2,81	3,28	3,05	4,30	1,26	3,41	2,02	4,18	4,04	1,83	3,66	2,87	1,72	4,22	1,04	0,61	1,76	4,87	4,81	5,99

Anexo 2 - Frequência total (%) de cada Família Vβ do TCR em linfócitos T CD8⁺, em indivíduos com VIH

Família Vβ	Amostras VIH CD8+																					
	VIH1	VIH2	VIH3	VIH4	VIH5	VIH6	VIH7	VIH8	VIH9	VIH10	VIH11	VIH12	VIH13	VIH14	VIH15	VIH16	VIH17	VIH18	VIH19	VIH20	VIH21	VIH22
Vβ01	4,93	4,06	4,12	3,79	3,62	4,93	6,31	5,20	4,37	3,79	5,27	5,25	4,88	5,67	3,57	5,20	4,90	6,16	5,45	5,14	3,51	4,38
Vβ02	8,09	6,67	6,49	4,09	5,93	3,63	13,43	5,26	3,18	3,75	5,31	5,46	4,16	5,20	4,53	4,15	1,83	1,05	2,74	4,68	2,90	2,98
Vβ03	6,41	7,90	7,35	4,56	5,54	7,52	3,34	4,33	4,56	4,25	5,88	9,28	5,14	4,44	6,25	6,59	8,02	6,54	7,58	7,04	4,90	4,46
Vβ04	1,05	3,60	3,09	0,99	1,65	2,01	3,15	0,24	1,13	0,98	0,88	1,78	0,83	1,20	1,09	0,61	1,14	1,46	1,81	1,05	1,02	0,71
Vβ05	5,55	6,20	7,02	5,64	5,56	4,71	10,12	0,00	4,52	3,57	5,71	6,64	7,04	6,41	5,24	6,76	6,15	2,44	6,79	7,93	4,97	4,58
Vβ06	2,61	8,52	7,83	10,62	9,36	7,47	4,96	9,54	10,98	13,19	9,36	7,96	11,46	8,28	11,51	10,14	13,03	9,63	13,37	7,17	9,14	11,38
Vβ07	6,28	3,29	4,52	4,77	4,49	4,91	3,25	4,32	4,87	5,59	5,04	4,21	4,78	4,95	4,07	2,94	5,52	5,63	5,04	4,02	3,61	4,78
Vβ08	0,72	5,14	5,80	5,78	6,50	5,07	3,52	5,44	5,91	5,32	6,51	6,47	5,71	4,53	6,88	5,93	4,82	6,68	5,44	4,82	4,97	5,53
Vβ09	0,02	0,34	0,39	2,74	0,70	2,24	0,21	4,23	1,60	0,27	1,02	1,55	0,67	1,90	1,04	3,66	1,30	0,68	1,93	1,61	3,56	3,24
Vβ11	0,05	0,54	0,59	2,11	1,15	1,13	0,21	0,46	1,21	0,00	0,31	2,16	0,27	0,22	0,10	0,73	0,19	1,53	0,71	0,17	0,27	0,44
Vβ12	0,00	1,26	0,19	0,06	0,01	2,00	0,00	1,69	0,73	0,80	0,11	0,17	1,35	0,19	0,04	1,64	0,79	0,14	0,00	0,67	1,67	0,31
Vβ13	13,73	9,82	9,29	3,19	6,80	4,49	14,20	6,61	7,13	1,09	5,41	6,36	7,66	5,85	5,03	3,16	6,86	1,03	4,01	6,29	4,44	5,76
Vβ14	7,89	6,89	7,33	6,03	5,16	4,47	10,25	5,88	5,38	4,45	4,26	6,34	6,44	7,29	5,70	7,45	6,38	5,53	4,65	6,21	5,37	4,31
Vβ15	5,94	5,55	4,98	4,96	5,00	7,36	3,83	4,41	6,20	4,58	4,94	5,11	7,12	5,61	7,93	6,59	6,41	7,20	6,34	5,63	6,55	5,93
Vβ16	6,61	2,59	3,40	5,19	4,79	3,76	4,81	2,98	5,11	6,23	5,46	5,59	5,70	6,82	6,74	5,19	6,41	7,49	6,28	6,37	4,05	5,57
Vβ17	5,19	7,04	2,66	6,80	3,26	1,89	2,01	6,53	4,83	7,89	6,97	2,93	5,75	6,35	4,05	4,54	3,76	10,69	3,21	4,29	8,97	7,43
Vβ18	7,57	5,94	3,44	6,28	5,83	5,79	6,71	2,61	4,21	7,22	6,59	3,69	4,35	6,11	2,36	6,70	5,44	7,15	6,00	6,43	6,83	5,72
Vβ20	3,29	2,69	3,05	7,67	5,04	4,60	0,96	6,12	6,37	9,15	2,98	3,42	0,07	2,51	7,46	2,78	1,05	2,07	0,87	4,26	6,80	7,68
Vβ21	1,24	2,92	4,51	5,76	6,28	8,38	5,33	8,39	7,81	7,15	6,11	7,59	6,40	5,28	5,77	7,38	8,73	10,75	10,94	6,33	6,68	9,37
Vβ22	0,92	0,27	0,87	2,28	2,97	2,66	0,48	2,56	2,88	2,92	2,39	0,25	1,39	1,94	0,96	2,73	1,17	2,85	2,12	1,67	2,33	0,75
Vβ23	9,10	5,68	7,72	2,90	5,40	4,51	2,34	7,72	3,67	3,51	3,39	3,43	4,08	4,86	4,33	0,45	0,69	2,32	3,75	4,05	2,67	2,34
Vβ24	2,82	3,09	5,36	3,80	4,94	6,46	0,59	5,49	3,32	4,31	6,10	4,34	4,74	4,39	5,34	4,67	5,43	1,00	0,98	4,16	4,77	2,36

Anexo 3 - Frequência total (%) de cada Família Vβ do TCR em linfócitos T CD4⁺, em indivíduos Controlo (CTRL)

Família Vβ	Amostras CTRL CD4 ⁺																					
	CTRL1	CTRL2	CTRL3	CTRL4	CTRL5	CTRL6	CTRL7	CTRL8	CTRL9	CTRL10	CTRL11	CTRL12	CTRL13	CTRL14	CTRL15	CTRL16	CTRL17	CTRL18	CTRL19	CTRL20	CTRL21	CTRL22
Vβ01	6,47	4,98	6,23	2,56	5,89	5,63	4,12	6,48	3,93	6,08	5,94	5,02	6,66	5,37	4,91	3,98	4,91	5,94	5,02	4,23	5,23	4,27
Vβ02	4,25	4,56	6,96	9,66	6,91	3,89	2,77	5,42	3,59	4,03	3,16	3,42	3,07	4,25	4,46	4,02	3,92	2,65	4,38	3,50	7,21	4,41
Vβ03	2,07	4,85	6,00	4,41	6,22	4,91	4,02	5,00	3,56	4,76	4,29	4,30	4,63	4,64	4,57	4,83	4,24	4,93	5,17	2,73	5,53	3,79
Vβ04	4,98	1,43	2,00	6,80	1,94	1,10	1,15	1,99	0,66	1,24	1,22	1,09	0,96	0,68	1,18	0,51	0,67	0,78	0,80	1,08	1,22	1,08
Vβ05	6,64	5,44	7,93	7,40	4,09	6,46	5,37	7,52	4,77	6,86	5,11	6,22	7,17	6,00	6,05	4,75	5,79	6,42	5,66	4,55	6,42	4,47
Vβ06	7,70	7,97	6,17	1,59	7,65	8,05	10,52	8,33	6,80	8,19	7,58	8,77	9,07	7,31	8,38	8,47	8,49	10,15	12,42	11,55	8,68	12,24
Vβ07	2,92	4,53	2,71	1,07	2,03	4,73	4,60	3,42	4,20	4,42	4,97	4,14	4,43	4,35	4,34	4,28	4,56	4,35	4,78	4,55	3,42	3,30
Vβ08	5,52	4,15	5,49	1,48	4,08	5,94	5,29	5,44	5,77	5,68	6,37	5,67	5,99	5,48	6,12	6,11	6,44	5,98	5,69	5,70	4,39	5,54
Vβ09	6,75	2,26	0,46	3,16	0,42	2,01	2,55	0,61	2,63	1,06	1,19	1,45	1,15	1,83	1,62	1,84	1,79	1,73	3,88	3,28	1,02	2,65
Vβ11	2,70	0,35	0,25	8,83	0,72	1,34	0,84	0,64	0,59	0,36	1,00	0,76	0,69	0,68	0,25	0,20	0,43	0,63	0,68	0,29	0,04	0,19
Vβ12	10,46	0,51	0,00	12,61	0,27	0,35	0,09	0,03	0,51	0,33	0,10	0,35	0,51	0,44	0,42	0,19	0,47	0,38	0,15	0,23	0,26	1,04
Vβ13	7,40	4,12	9,78	11,25	10,04	4,79	4,57	4,98	5,27	5,73	4,90	4,91	1,94	6,68	5,78	4,35	5,35	0,86	1,94	5,15	8,45	4,74
Vβ14	1,09	7,27	7,82	1,22	7,02	6,44	6,68	7,78	7,32	6,79	6,36	6,44	7,47	6,00	8,32	7,84	8,13	7,30	6,45	6,24	7,40	4,88
Vβ15	5,16	5,92	5,26	3,38	4,47	4,30	5,06	4,99	6,41	5,51	5,35	5,82	4,65	6,76	7,01	6,64	6,78	3,65	5,62	5,51	5,24	5,68
Vβ16	3,65	6,94	6,41	4,00	7,85	6,87	7,02	8,07	5,27	6,46	7,32	7,31	7,93	4,99	6,78	6,61	6,08	6,94	6,49	5,66	7,41	5,75
Vβ17	2,00	5,03	1,82	0,61	4,90	5,44	6,14	3,61	7,17	4,90	5,47	5,88	4,63	5,07	5,85	5,48	6,80	6,03	5,58	5,53	3,10	5,00
Vβ18	6,99	6,50	8,62	6,73	9,33	7,74	7,29	8,69	7,00	7,21	6,87	8,75	8,27	7,08	7,42	6,65	6,75	8,68	6,88	7,15	6,04	7,64
Vβ20	0,80	5,83	1,01	0,26	1,66	5,70	4,52	1,92	5,50	3,83	5,40	5,40	4,59	6,69	7,36	4,68	5,83	4,13	4,84	6,69	3,25	6,77
Vβ21	2,45	6,21	4,14	2,50	4,82	6,11	5,10	5,19	7,15	6,09	5,61	5,96	5,74	6,28	6,60	6,55	7,56	6,17	4,33	6,25	6,08	6,69
Vβ22	0,84	1,93	0,19	0,06	0,20	1,82	2,24	0,10	1,73	1,03	1,42	1,63	1,35	1,30	0,46	1,22	1,03	1,51	2,26	2,15	0,25	1,77
Vβ23	7,77	3,75	6,78	9,39	8,13	0,31	3,78	5,92	3,60	5,09	4,83	0,54	4,09	4,26	0,87	3,81	1,67	5,02	1,67	3,14	4,99	3,12
Vβ24	1,38	5,47	3,95	1,02	1,35	6,09	6,24	3,86	6,57	4,34	5,54	6,16	5,04	3,87	1,25	7,00	2,33	5,75	5,31	4,84	4,34	4,98

Anexo 4 - Frequência total (%) de cada Família Vβ do TCR em linfócitos T CD8⁺, em indivíduos Controlo (CTRL)

Família Vβ	Amostras CTRL CD8 ⁺																					
	CTRL1	CTRL2	CTRL3	CTRL4	CTRL5	CTRL6	CTRL7	CTRL8	CTRL9	CTRL10	CTRL11	CTRL12	CTRL13	CTRL14	CTRL15	CTRL16	CTRL17	CTRL18	CTRL19	CTRL20	CTRL21	CTRL22
Vβ01	3,38	5,00	4,96	0,75	4,95	2,94	3,18	4,83	7,01	4,55	4,03	3,75	4,80	7,11	6,21	4,62	6,91	4,23	6,09	6,58	6,59	6,70
Vβ02	6,24	5,04	5,98	5,82	4,98	3,20	2,62	4,41	6,52	3,57	3,55	3,27	3,42	5,14	6,18	4,71	4,95	4,29	5,21	4,45	8,17	6,81
Vβ03	2,65	6,36	5,44	2,35	3,88	7,20	4,92	4,57	4,99	5,79	5,18	5,02	5,57	6,34	4,63	5,19	5,77	5,42	6,12	4,67	6,05	5,52
Vβ04	4,63	2,08	1,20	1,03	1,41	0,97	0,77	0,55	2,52	1,09	1,22	0,96	1,04	1,41	1,62	1,49	1,77	1,31	1,08	1,13	2,31	1,53
Vβ05	6,11	7,47	6,91	4,43	5,62	4,95	5,09	5,67	8,82	6,10	6,00	5,26	5,81	6,51	6,30	6,27	3,42	6,69	7,47	5,94	7,61	8,20
Vβ06	6,81	6,20	7,48	7,15	9,00	14,26	8,89	8,39	8,28	8,85	11,05	12,60	9,70	9,94	7,50	9,85	9,57	13,25	9,89	8,95	6,30	8,02
Vβ07	4,69	4,51	3,78	4,72	4,10	3,93	4,91	5,17	4,60	4,57	4,85	4,62	4,97	5,59	4,43	4,42	4,92	5,90	4,88	4,99	3,90	5,14
Vβ08	3,83	5,30	5,88	4,53	5,90	5,53	5,54	6,07	6,31	5,64	6,39	5,92	6,21	5,89	5,38	5,78	4,88	5,70	5,28	5,90	5,63	4,94
Vβ09	4,32	1,00	1,11	4,08	1,76	2,34	2,68	2,03	0,52	2,39	2,07	2,04	3,33	0,98	0,88	0,70	1,09	3,75	2,82	2,08	0,93	0,86
Vβ11	4,24	0,30	0,30	5,16	1,05	1,06	0,67	0,63	0,36	0,89	1,46	1,11	0,92	0,44	0,22	0,19	0,50	0,73	0,07	0,28	0,21	0,08
Vβ12	3,99	0,09	0,07	2,94	0,70	0,10	0,48	0,19	0,07	1,01	0,09	0,50	0,47	0,24	0,06	0,00	0,04	0,79	0,02	0,00	0,08	0,31
Vβ13	2,96	7,24	6,65	5,45	4,95	3,14	4,85	5,28	8,93	3,88	3,86	3,44	2,43	3,07	9,03	5,94	4,46	2,22	4,21	6,34	10,59	5,04
Vβ14	7,54	4,13	7,31	6,83	6,09	5,42	5,03	5,93	7,74	4,51	1,46	4,70	6,07	7,55	7,22	6,20	7,79	4,39	6,32	4,87	7,87	8,66
Vβ15	6,43	5,21	5,25	6,79	6,44	4,63	5,26	6,66	4,21	5,20	5,12	5,73	5,83	4,09	4,08	5,46	5,39	6,10	4,20	5,40	5,76	4,91
Vβ16	6,95	7,06	5,81	8,35	5,40	4,01	4,98	5,23	6,73	5,81	4,61	4,94	3,56	7,02	7,33	6,62	7,14	4,02	8,47	8,10	6,83	6,07
Vβ17	2,87	3,37	3,57	3,24	8,52	6,70	8,25	7,17	3,64	7,68	7,66	6,82	6,14	5,98	3,29	5,33	4,70	4,98	2,06	4,10	2,10	3,81
Vβ18	5,60	7,37	6,05	6,79	6,93	6,15	7,44	5,84	4,91	5,46	6,16	6,11	6,28	7,02	7,07	6,03	6,20	7,68	6,34	8,01	4,85	5,19
Vβ20	1,03	3,97	3,57	1,44	4,37	7,31	6,48	5,77	1,02	5,18	7,61	7,03	7,03	2,85	4,69	3,49	1,45	7,28	3,35	2,36	1,62	2,87
Vβ21	2,82	5,47	7,62	3,89	4,67	6,74	7,20	6,19	5,26	7,04	7,02	6,81	7,23	5,83	3,16	5,09	6,31	6,99	4,93	3,68	4,32	4,33
Vβ22	3,41	1,10	1,54	4,19	2,31	2,80	2,32	2,22	0,61	2,15	2,41	2,69	1,72	0,81	1,44	2,03	1,63	0,10	0,54	1,41	0,70	2,27
Vβ23	7,29	5,13	5,22	6,06	3,43	2,74	5,90	3,69	3,50	3,97	3,46	2,57	3,33	0,29	5,46	5,08	5,84	3,24	5,05	4,95	4,17	4,82
Vβ24	2,22	6,60	4,32	4,01	3,53	3,87	2,54	3,52	3,46	4,66	4,75	4,12	4,13	5,90	3,83	5,51	5,30	0,93	5,61	5,81	3,42	3,94

Anexo 5 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras VIH CD4⁺

Amostras VIH CD4 ⁺																						
Família V β	VIH1	VIH2	VIH3	VIH4	VIH5	VIH6	VIH7	VIH8	VIH9	VIH10	VIH11	VIH12	VIH13	VIH14	VIH15	VIH16	VIH17	VIH18	VIH19	VIH20	VIH21	VIH22
V β 01	PG	PS	PG	PG	PS	PG	OL	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PG
V β 02	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG
V β 03	PG	PS	PS	PG	PS	PS	MO	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG
V β 04	PG	PS	PG	PG	PG	PG	MO	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG
V β 05	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
V β 06	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
V β 07	PS	PG	PG	PG	PS	PS	Não expressa	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG
V β 08	PG	PS	PG	PG	PS	PS	OL	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG
V β 09	PS	PS	PG	PG	PG	PG	Não expressa	PG	PS	Não expressa	PG	MO	PS	PS	PS	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG
V β 11	PG	OL	PG	Não expressa	OL	PG	Não expressa	PG	OL	Não expressa	PG	Não expressa	PS	OL	OL	PS	PS	OL	PG	PG	OL	PS
V β 12	OL	MO	PG	Não expressa	Não expressa	PG	Não expressa	PG	PG	PG	OL	Não expressa	MO	Não expressa	Não expressa	PS	PS	OL	Não expressa	PG	PG	MO
V β 13	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PS	OL	PG	PG	PG	PG
V β 14	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG
V β 15	PS	PS	PG	PS	PS	PS	MO	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG
V β 16	PS	PS	PG	PS	PS	PS	OL	PS	PS	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PG
V β 17	PG	PS	PG	PG	PS	PG	MO	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS
V β 18	PG	PS	PG	PG	PG	PS	OL	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS
V β 20	PS	PS	PS	PG	PS	PG	OL	PG	PS	PG	PS	OL	Não expressa	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
V β 21	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PG	OL	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG
V β 22	PG	PG	PG	PG	PG	PS	OL	PS	OL	PG	PS	MO	OL	OL	OL	PS	OL	MO	Não expressa	PS	PG	PS
V β 23	PG	PS	PG	PG	PS	PS	OL	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	OL	PS	PG	PG	PS
V β 24	PS	PS	PG	PS	PS	PS	MO	PG	PG	PG	PS	MO	PG	PG	PS	PG	PS	MO	PG	PS	PG	PS

PG - Policlonal gaussiano (8-10 picos com picos dominantes ao centro da distribuição)

PS – Policlonal anormal não gaussiano. (*Policlonal Skewed*) (se um pico \geq 40% da área total ou se 2 picos dominantes perfazem 70% da área total)

OL – Oligoclonal (2 a 4 picos)

MO – Monoclonal (um pico dominante com área > a 90%)

Classificação adaptada de: Wu *et al*, 2000; Sloand *et al*, 2005

Anexo 6 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família Vβ em amostras VIH CD8+

Família Vβ	Amostras VIH CD8+																						
	VIH1	VIH2	VIH3	VIH4	VIH5	VIH6	VIH7	VIH8	VIH9	VIH10	VIH11	VIH12	VIH13	VIH14	VIH15	VIH16	VIH17	VIH18	VIH19	VIH20	VIH21	VIH22	
Vβ01	PS	PS	PS	PG	OL	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	
Vβ02	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ03	PS	PS	PS	PG	PS	OL	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ04	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PG	OL	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS
Vβ05	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	Não expressa	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ06	PG	PG	PS	PG	PS	OL	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS
Vβ07	OL	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ08	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PG
Vβ09	MO	PS	PS	PG	PS	PS	OL	PS	PS	PS	PS	MO	PS	PG	PS	PS	PS	OL	PG	PG	PS	PS	
Vβ11	OL	PS	PS	PG	PS	PS	OL	OL	PS	Não expressa	OL	PS	OL	OL	OL	PS	OL	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ12	Não expressa	MO	OL	OL	MO	OL	Não expressa	PS	PG	PG	OL	OL	MO	OL	MO	MO	OL	OL	Não expressa	PS	PS	MO	MO
Vβ13	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	OL	PS	PS	PG	PS	PS
Vβ14	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PS
Vβ15	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ16	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PG
Vβ17	MO	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ18	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ20	MO	PS	PS	PS	PS	OL	PS	PS	PS	PG	PS	PS	MO	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS
Vβ21	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	OL	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS
Vβ22	PS	PS	PS	PG	PS	OL	OL	PS	PS	PG	PS	PS	OL	PS	PS	PS	OL	PG	PS	MO	PG	MO	MO
Vβ23	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	OL	MO	MO	PG	PS	PS	PS	PS
Vβ24	OL	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS

PG - Policlonal gaussiano (8-10 picos com picos dominantes ao centro da distribuição)

PS – Policlonal anormal não gaussiano. (*Policlonal Skewed*) (se um pico ≥ 40% da área total ou se 2 picos dominantes perfazem 70% da área total)

OL – Oligoclonal (2 a 4 picos)

MO – Monoclonal (um pico dominante com área > a 90%)

Classificação adaptada de: Wu *et al*, 2000; Sloand *et al*, 2005

Anexo 7 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família Vβ em amostras Controlo (CTRL) CD4⁺

Família Vβ	Amostras CTRL CD4 ⁺																					
	CTRL1	CTRL2	CTRL3	CTRL4	CTRL5	CTRL6	CTRL7	CTRL8	CTRL9	CTRL10	CTRL11	CTRL12	CTRL13	CTRL14	CTRL15	CTRL16	CTRL17	CTRL18	CTRL19	CTRL20	CTRL21	CTRL22
Vβ01	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG
Vβ02	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ03	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ04	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ05	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ06	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ07	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ08	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG
Vβ09	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ11	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	OL	PG
Vβ12	PG	PG	Não expressa	PG	PG	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS
Vβ13	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG
Vβ14	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG
Vβ15	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PG	PG	PG
Vβ16	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ17	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS
Vβ18	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ20	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ21	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG
Vβ22	PG	PG	PG	OL	OL	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS
Vβ23	PG	PG	PG	PG	PG	OL	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG
Vβ24	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG

PG - Policlonal gaussiano (8-10 picos com picos dominantes ao centro da distribuição)

PS – Policlonal anormal não gaussiano. (*Policlonal Skewed*) (se um pico ≥ 40% da área total ou se 2 picos dominantes perfazem 70% da área total)

OL – Oligoclonal (2 a 4 picos)

MO – Monoclonal (um pico dominante com área > a 90%)

Classificação adaptada de: Wu *et al*, 2000; Sloand *et al*, 2005

Anexo 8 - Classificação do Repertório do TCRVB em cada Família V β em amostras Controlo (CTRL) CD8⁺

Família V β	Amostras CTRL CD8 ⁺																						
	CTRL1	CTRL 2	CTRL3	CTRL 4	CTRL 5	CTRL 6	CTRL 7	CTRL 8	CTRL 9	CTRL1 0	CTRL1 1	CTRL1 2	CTRL1 3	CTRL1 4	CTRL1 5	CTRL16	CTRL1 7	CTRL1 8	CTRL1 9	CTRL20	CTRL2 1	CTRL2 2	
V β 01	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	
V β 02	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG
V β 03	PG	PS	PS	PS	PS	OL	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	
V β 04	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PG	PS	
V β 05	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PG	
V β 06	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PG	
V β 07	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS	
V β 08	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PG	
V β 09	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PG	
V β 11	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	OL	PS	OL	PS	
V β 12	PG	OL	OL	PS	PS	PG	PS	PG	OL	MO	PG	PS	PS	PG	OL	Não expressa	OL	PG	OL	Não expressa	OL	PG	
V β 13	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PG	
V β 14	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	
V β 15	PG	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PG	MO	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PS	
V β 16	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PG	
V β 17	PG	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PG	PS	PS	
V β 18	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PG	PG	PG	PS	PS	PG	
V β 20	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PG	
V β 21	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PG	
V β 22	PG	OL	PS	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PS	PS	PS	PS	PS	PG	MO	PG	PG	PS	PS	
V β 23	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	
V β 24	PS	PS	PG	PS	PS	PS	PS	PG	PS	PG	PG	PG	PS	PS	PG	PS	PG	PS	PS	PG	PS	PG	

PG - Policlonal gaussiano (8-10 picos com picos dominantes ao centro da distribuição)

PS – Policlonal anormal não gaussiano. (*Policlonal Skewed*) (se um pico \geq 40% da área total ou se 2 picos dominantes perfazem 70% da área total)

OL – Oligoclonal (2 a 4 picos)

MO – Monoclonal (um pico dominante com área > a 90%)

Classificação adaptada de: Wu *et al*, 2000; Sloand *et al*, 2005

Anexo 9 - Pontuação de Complexidade das amostras Controlo e VIH nas subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺

Amostras	Pontuação de Complexidade	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
CTRL 1	174	175
CTRL 2	171	162
CTRL 3	159	169
CTRL 4	160	172
CTRL 5	162	170
CTRL 6	170	169
CTRL 7	173	171
CTRL 8	168	174
CTRL 9	176	165
CTRL 10	175	171
CTRL 11	173	169
CTRL 12	173	174
CTRL 13	176	176
CTRL 14	174	163
CTRL 15	171	166
CTRL 16	169	166
CTRL 17	174	170
CTRL 18	174	166
CTRL 19	173	163
CTRL 20	173	166
CTRL 21	168	167
CTRL 22	174	171

Amostras	Pontuação de Complexidade	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
VIH 1	165	130
VIH 2	162	155
VIH 3	171	165
VIH 4	157	169
VIH 5	152	150
VIH 6	163	146
VIH 7	66	144
VIH 8	168	144
VIH 9	162	164
VIH 10	156	163
VIH 11	159	156
VIH 12	107	148
VIH 13	147	140
VIH 14	151	165
VIH 15	146	150
VIH 16	170	158
VIH 17	160	141
VIH 18	125	135
VIH 19	151	159
VIH 20	172	165
VIH 21	170	174
VIH 22	166	151

Anexo 10 – Análise dos dados pelo teste ANOVA one-way, com correcção de Bonferroni

▪ **Análise estatística das frequências das família V β na população T CD4⁺**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
V β 01 CTRL CD4+ vs V β 01 HIV CD4+	-0,9891	1,885	No	ns	-2.595 to 0.6171
V β 02 CTRL CD4+ vs V β 02 HIV CD4+	-2,226	4,242	Yes	***	-3.833 to -0.6201
V β 03 CTRL CD4+ vs V β 03 HIV CD4+	-1,198	2,283	No	ns	-2.804 to 0.4081
V β 04 CTRL CD4+ vs V β 04 HIV CD4+	-0,6232	1,187	No	ns	-2.229 to 0.9831
V β 05 CTRL CD4+ vs V β 05 HIV CD4+	-1,706	3,251	Yes	*	-3.313 to -0.1001
V β 06 CTRL CD4+ vs V β 06 HIV CD4+	0,6905	1,316	No	ns	-0.9158 to 2.297
V β 07 CTRL CD4+ vs V β 07 HIV CD4+	0,7368	1,404	No	ns	-0.8694 to 2.343
V β 08 CTRL CD4+ vs V β 08 HIV CD4+	0,1782	0,3395	No	ns	-1.428 to 1.784
V β 09 CTRL CD4+ vs V β 09 HIV CD4+	1,375	2,621	No	ns	-0.2308 to 2.982
V β 11 CTRL CD4+ vs V β 11 HIV CD4+	0,7814	1,489	No	ns	-0.8249 to 2.388
V β 12 CTRL CD4+ vs V β 12 HIV CD4+	1,011	1,926	No	ns	-0.5953 to 2.617
V β 13 CTRL CD4+ vs V β 13 HIV CD4+	-3,594	6,847	Yes	***	-5.200 to -1.987
V β 14 CTRL CD4+ vs V β 14 HIV CD4+	0,1036	0,1975	No	ns	-1.503 to 1.710
V β 15 CTRL CD4+ vs V β 15 HIV CD4+	0,2123	0,4045	No	ns	-1.394 to 1.819
V β 16 CTRL CD4+ vs V β 16 HIV CD4+	-0,09818	0,1871	No	ns	-1.704 to 1.508
V β 17 CTRL CD4+ vs V β 17 HIV CD4+	1,873	3,569	Yes	**	0.2669 to 3.479
V β 18 CTRL CD4+ vs V β 18 HIV CD4+	-0,5214	0,9934	No	ns	-2.128 to 1.085
V β 20 CTRL CD4+ vs V β 20 HIV CD4+	2,317	4,415	Yes	***	0.7106 to 3.923
V β 21 CTRL CD4+ vs V β 21 HIV CD4+	0,9318	1,776	No	ns	-0.6744 to 2.538
V β 22 CTRL CD4+ vs V β 22 HIV CD4+	0,6386	1,217	No	ns	-0.9676 to 2.245
V β 23 CTRL CD4+ vs V β 23 HIV CD4+	-1,166	2,222	No	ns	-2.772 to 0.4403
V β 24 CTRL CD4+ vs V β 24 HIV CD4+	1,271	2,422	No	ns	-0.3353 to 2.877

▪ **Análise estatística da frequência das família V β na população T CD8⁺**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
V β 01 CTRL CD8+ vs V β 01 HIV CD8+	0,2123	0,4376	No	ns	-1.273 to 1.697
V β 02 CTRL CD8+ vs V β 02 HIV CD8+	0,1373	0,2830	No	ns	-1.348 to 1.622
V β 03 CTRL CD8+ vs V β 03 HIV CD8+	-0,8295	1,710	No	ns	-2.314 to 0.6553
V β 04 CTRL CD8+ vs V β 04 HIV CD8+	0,07500	0,1546	No	ns	-1.410 to 1.560
V β 05 CTRL CD8+ vs V β 05 HIV CD8+	0,5955	1,227	No	ns	-0.8893 to 2.080
V β 06 CTRL CD8+ vs V β 06 HIV CD8+	-0,2536	0,5228	No	ns	-1.738 to 1.231
V β 07 CTRL CD8+ vs V β 07 HIV CD8+	0,1232	0,2539	No	ns	-1.362 to 1.608
V β 08 CTRL CD8+ vs V β 08 HIV CD8+	0,2245	0,4628	No	ns	-1.260 to 1.709
V β 09 CTRL CD8+ vs V β 09 HIV CD8+	0,4027	0,8301	No	ns	-1.082 to 1.888
V β 11 CTRL CD8+ vs V β 11 HIV CD8+	0,2873	0,5921	No	ns	-1.198 to 1.772
V β 12 CTRL CD8+ vs V β 12 HIV CD8+	-0,07182	0,1480	No	ns	-1.557 to 1.413
V β 13 CTRL CD8+ vs V β 13 HIV CD8+	-1,102	2,272	No	ns	-2.587 to 0.3825
V β 14 CTRL CD8+ vs V β 14 HIV CD8+	-0,001364	0,002811	No	ns	-1.486 to 1.483
V β 15 CTRL CD8+ vs V β 15 HIV CD8+	-0,4555	0,9388	No	ns	-1.940 to 1.029
V β 16 CTRL CD8+ vs V β 16 HIV CD8+	0,8136	1,677	No	ns	-0.6712 to 2.298
V β 17 CTRL CD8+ vs V β 17 HIV CD8+	-0,2300	0,4741	No	ns	-1.715 to 1.255
V β 18 CTRL CD8+ vs V β 18 HIV CD8+	0,7505	1,547	No	ns	-0.7343 to 2.235
V β 20 CTRL CD8+ vs V β 20 HIV CD8+	0,04000	0,08245	No	ns	-1.445 to 1.525
V β 21 CTRL CD8+ vs V β 21 HIV CD8+	-1,205	2,483	No	ns	-2.689 to 0.2803
V β 22 CTRL CD8+ vs V β 22 HIV CD8+	0,04727	0,09744	No	ns	-1.438 to 1.532
V β 23 CTRL CD8+ vs V β 23 HIV CD8+	0,2855	0,5884	No	ns	-1.199 to 1.770
V β 24 CTRL CD8+ vs V β 24 HIV CD8+	0,1600	0,3298	No	ns	-1.325 to 1.645

▪ **Análise estatística das pontuações de complexidade nas populações T CD4⁺/CD8⁺**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CTRL CD4+ vs VIH CD4+	18,82	4,467	Yes	***	9.203 to 28.43
CTRL CD8+ vs VIH CD8+	15,59	3,701	Yes	***	5.976 to 25.21