

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Bruno Cister Alves

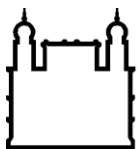
Análise de mecanismos envolvidos no efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 resultante da ativação de TLR2

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIUCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: BRUNO CISTER ALVES

**ANÁLISE DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A
REPLICAÇÃO DO HIV-1 RESULTANTE DA ATIVAÇÃO DE TLR2**

ORIENTADOR: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof.
Prof.
Prof.
Prof.
Prof.

Rio de Janeiro, Novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Durante o período no qual este trabalho foi elaborado, diversas pessoas se fizeram presentes em momentos marcantes. Reservo esta seção para agradecê-las, pois, de uma forma ou de outra, contribuíram para meu crescimento pessoal e para a conclusão deste volume.

Primeiramente agradeço à minha família, especialmente a meus pais e minha irmã, por todo o carinho e por iniciarem minha formação, atuando nela até hoje. Devo tudo a eles.

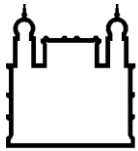
Aos grandes amigos Jairo Ramos e Pedro Ferreira, com quem compartilhei muitas risadas, pelas ajudas em experimentos, conselhos, opiniões, partidas de boliche e momentos dentro e fora do laboratório.

Aos caros colegas e pesquisadores do LPT, em especial a Aline, Ariany, Arnon, Camila, Carol, Danielle, Danielma, Eliane, Julia, Juliana, Larissa, Leandra, Luciana, Luciene, Luiz, Marina, Rafaela, Rodrigo e Tiago por todas as brincadeiras, conversas e discussões, envolvendo ciência ou não.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio financeiro e apoio para participação de eventos.

Aos professores Wilson Savino e Vinícius Cotta, pela oportunidade de trabalhar em um laboratório com integrantes tão alegres e inteligentes, sempre dispostos a ajudar.

Ao meu orientador, professor Dumith Chequer, por todos os conselhos, dicas, opiniões, puxões de orelha e muitas e muitas conversas sobre os mais variados assuntos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

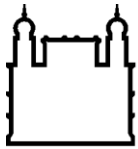
Análise de mecanismos envolvidos no efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 resultante da ativação de TLR2

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruno Cister Alves

Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam maior permeabilidade intestinal, a qual permite a passagem para a circulação sanguínea de elevada quantidade de produtos microbianos, fenômeno conhecido por translocação microbiana. Tal fenômeno induz crônica ativação do sistema imune, um dos principais mecanismos indutores da queda do número de linfócitos T CD4⁺ nos pacientes infectados. Dentre os produtos translocados encontram-se ligantes dos receptores tipo *Toll* (TLR), os quais reconhecem componentes microbianos e podem, portanto, ser ativados por uma grande variedade de patógenos. A ativação de TLR desencadeia uma complexa cascata de sinalização, induz a síntese de diversas citocinas, e modula a função de células dendríticas, macrófagos e linfócitos, células-alvo da infecção pelo HIV-1. Em estudos realizados em nosso laboratório vimos que a ativação de TLR2 resulta na inibição da replicação do HIV-1 em linfócitos e macrófagos, fenômeno este mediado pela citocina IL-10 e por β -quimiocinas. No entanto, tendo em vista a potente resposta imunitária inata desencadeada pela ativação de TLRs, com a produção de ampla variedade de produtos inflamatórios, era possível que outros fatores, como a citocina IL-27, um potente inibidor da replicação do HIV-1, estivessem envolvidos na inibição da replicação viral gerada pela ativação deste receptor. Neste trabalho, investigamos se a IL-27 estaria envolvida na inibição da replicação induzida pela ativação de TLR2. Para tanto, tratamos macrófagos primários humanos com agonistas de TLR2 para analisar a expressão e produção de IL-27 por qPCR e ELISA. Nossos dados mostram que Pam3CSK4, ligante do dímero TLR2/TLR1, promoveu um aumento de expressão de EB13 e p28 (subunidades da IL-27), e que Pam2CSK4 aumentou a expressão de EB13. Os mesmos ligantes aumentaram nos níveis de IL-27p28 solúvel medidos por um kit de ELISA que detecta apenas a subunidade IL-27p28. Entretanto, a IL-27 em sua forma heterodimérica não foi encontrada quando um kit de ELISA capaz de detectar as duas subunidades da IL-27 foi utilizado. A seguir, observamos que a inibição da replicação do HIV-1 por ambos os ligantes de TLR2 foi significativamente revertida por anticorpos policlonais bloqueadores da IL-27. Da mesma forma, o bloqueio da via de MyD88, uma proteína adaptadora com papel na sinalização desencadeada pela maioria dos TLRs, o efeito anti HIV-1 de Pam2CSK4, mas não o de Pam3CSK4. Por que a inibição do HIV-1 mediada por IL-27 é dependente de Interferon tipo 1 (IFN-1), a expressão de IFN-1 e APOBEC3G (um gene estimulado por IFN-1 que inibe o HIV-1) também foi avaliada, e descobrimos que a expressão de nenhum dos dois genes foi modulada pela ativação de TLR2. Finalmente, a ativação de TLR2 induziu aumento na expressão de p35 e p40, subunidades de citocinas da família da IL-12/IL-27. Concluindo, nossos resultados sugerem que a subunidade p28 da IL-27 (IL-27p28) está implicada na redução da replicação do HIV-1 induzida por TLR2 em macrófagos humanos. Nosso estudo também abre caminho para a investigação do papel de outros membros da família de citocinas da IL-12 (como a IL-35) no controle da replicação do HIV-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of the mechanisms involved in the TLR2-activation mediated HIV-1 inhibitory effect

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Bruno Cister Alves

HIV-1 infected patients present increased intestinal permeability, which allows the passage of microorganisms or microbial antigens to the blood, phenomenon known as microbial translocation. This phenomenon induces a chronic activation of the immune system of these patients, which is one of the main mechanisms contributing for the decrease of the CD4⁺ T cell number in HIV-1-infected patients. Amongst the translocated products are several agonists of Toll like receptor (TLR), which recognize microbial components and may, therefore, be activated by a large variety of pathogens. TLR activation triggers a complex signaling pathway, induces the synthesis of several cytokines, and modulates the function of dendritic cells, macrophages and lymphocytes, cells that are target for HIV-1 infection. Studies performed in our laboratory show that TLR2 activation results in inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes and macrophages, a phenomenon mediated by IL-10 and β -chemokines. However, because of the potent innate immune response triggered by TLR activation, resulting in the production of a wide variety of inflammatory molecules, it is possible that other factors contribute to reduce the HIV-1 replication in this condition. In this study, we investigate whether the cytokine IL-27, a potent inhibitor of HIV-1 replication, could be involved in inhibition of HIV-1 replication upon activation of TLR2. Thus, human primary macrophages were treated with different TLR2 agonists in order to analyze the expression and production of IL-27 by qPCR and ELISA. We found that Pam3CSK4 increased the expression of EB13 and p28 (IL-27 subunits), and Pam2CSK4 increased the expression of EB13. The same ligands augmented the production of soluble IL-27p28, as measured by an ELISA kit that detects only the IL-27p28 subunit. However, the IL-27 in its heterodimeric structure was not found when an ELISA kit able to detect both IL-27 subunits was used. Next, we observed that the inhibition of HIV-1 replication induced by both TLR2 ligands was significantly reversed by anti-IL-27 monoclonal antibodies. Likewise, the blockage of MyD88 pathway reduced (over 80%) the anti-HIV-1 effect of Pam2CSK4, but not the HIV-1 inhibitory effect induced by Pam3CSK4. Because the IL-27-mediated HIV-1 inhibition is dependent of Interferon type-1 (IFN-1), the expression of IFN-1 and APOBEC3G (an IFN-1 stimulated gene that inhibits HIV-1) was also assessed, and we found that the expression of both genes was not modulated by TLR2 ligation. Finally, the TLR2 activation led to an enhanced expression of p35 and p40, subunits of the IL-12/IL-27 family of cytokines. In conclusion, our results suggest that the IL-27 subunit p28 (IL-27p28) is implicated in the TLR2-induced reduction of HIV-1 replication in primary human macrophages. Our study also warrants the investigation of the role of other members of IL-12 family of cytokines (such as IL-35) in the control of HIV-1 replication.

Sumário

<i>AUTOR: BRUNO CISTER ALVES</i>	II
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO	8
OS RECEPTORES TIPO <i>TOLL</i> (TLR)	8
VIAS DE SINALIZAÇÃO DOS TLRs	9
RECEPTOR TIPO <i>TOLL</i> 2 (TLR2)	10
INTERLEUCINA 27 (IL-27)	11
O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)	14
ASPECTOS GENÔMICOS E ESTRUTURAIS DO HIV-1	17
CICLO REPLICATIVO E A INFECÇÃO PELO HIV-1	20
IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1	22
RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO HIV-1	25
IMUNOMODULAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1	26
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
REAGENTES	31
OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS	31
ISOLADOS VIRAIS, REAGENTES E “KITS”	32
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS	32
ANÁLISE DA SÍNTESE DE IL-27 E IL-27P28	32
ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE IL-27 NA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL	32
PCR EM TEMPO REAL (QPCR) PARA AVALIAR A MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE	33
ESTATÍSTICA	33
RESULTADOS	34
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DE IL-27 APÓS TRATAMENTO COM LIGANTES DE TLR2	34

DE TLR2 35

DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	47
PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE.....	61

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da localização celular dos TLRs humanos.	9
Figura 2 – Esquema representativo das vias de sinalização intracelular ativadas pelos TLRs.	10
Figura 3 – Representação esquemática da IL-27, seu receptor e vias de transdução de sinal.	12
Figura 4 – Pessoas infectadas pelo HIV no mundo e prevalência em adultos.	15
Figura 5 – Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.....	16
Figura 6 – Estrutura do vírion do HIV-1.	18
Figura 7 – Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.....	19
Figura 8 –Ciclo replicativo do HIV-1.	21
Figura 9 – Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1.	22
Figura 10 – Análise da modulação da expressão das subunidades da IL-27.	34
Figura 11 – Produção de IL-27p28 por macrófagos humanos tratados com ligantes de TLR2.....	36
Figura 12 – Produção de Il-27 por macrófagos humanos tratados com ligantes de TLR.....	37
Figura 13 – Atividade da Il-27 e ou das suas subunidades na inibição do HIV-1 induzida pela ativação de TLR2.....	38
Figura 14 – Participação de MyD88 na inibição do HIV-1 induzida por ativação de TLR.....	39
Figura 15 – Expressão dos níveis de mRNA de IFN-beta e de APOBEC3G ou 3F.....	40
Figura 16 – Expressão de CLF-1, p35 e p40 por macrófagos estimulados com ligante de TLR2 (Pam3CSK4) ou TLR4 (LPS).....	41

INTRODUÇÃO

OS RECEPTORES TIPO *TOLL* (TLR).

Descobertos na década de 1980, os receptores tipo *Toll* (TLR) são receptores celulares pertencentes a um grupo conhecido como receptores reconhecedores de padrões moleculares (PRRs), os quais reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), componentes de diversos tipos de microorganismos infecciosos ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), moléculas expostas por células danificadas ou mortas. (Akira e Sato, 2003; Takeda *et al.*, 2004). Este tipo de receptor foi inicialmente denominado Receptor *Toll* quando foi identificado na mosca *Drosophila melanogaster*. Neste inseto, este receptor é necessário tanto para o estabelecimento correto da polaridade dorso-ventral quanto para o seu desenvolvimento embrionário adequado (Hashimoto *et al.*, 1988).

Charles Janeway e Ruslan Medzhitov (1997) identificaram a presença de receptores homólogos no genoma humano, então denominados “Receptores tipo *Toll*” (“*Toll-like Receptors*”). Tais receptores foram descritos em componentes celulares da imunidade inata que, ao serem estimulados por seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas com atividade pró-inflamatória e aumentavam a expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células (Medzhitov *et al.*, 1997). No presente, 12 membros da família TLR são reconhecidos em camundongos, enquanto 10 membros são reconhecidos no genoma humano (revisado por Kawai e Akira, 2010).

Os TLRs são divididos em dois subgrupos, de acordo com sua localização celular. Um desses grupos é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10, que são expressos na superfície celular e reconhecem componentes da membrana microbiana, principalmente lipídeos, lipoproteínas e proteínas (Figura 1). O outro grupo é composto por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, como o retículo endoplasmático (ER), endossomos, lisossomos e endolisossomos; esses reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Figura 1) (revisado por Kawai e Akira, 2010).

O TLR4 foi o primeiro membro da família dos TLR a ser isolado e reconhece, entre outros PAMPs, o lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano, um dos componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998; Akira *et al.*, 2006). A flagelina, maior constituinte do flagelo de bactérias como, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, é reconhecida pelo TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001). TLR3 e TLR9 associam-se ao reconhecimento viral através dos ligantes dsRNA e DNA (sequências CpG não-metiladas presentes no DNA bacteriano), respectivamente. Os receptores TLR7 e TLR8 reconhecem ssRNA e são

expressos em vesículas endocíticas e compartimentos lisossômicos (revisado por Beutler, 2009). Os TLRs são glicoproteínas transmembranares compostas por três domínios: o domínio extracelular; composto de repetições ricas em leucinas (LRR) e que está envolvido na ligação direta, ou através de moléculas acessórias, aos PAMPs; o domínio transmembranar, de passagem única, e o domínio intracitoplasmático, homólogo ao receptor da interleucina-1 (TIR). Todos são essenciais para que a sinalização intracelular através de moléculas adaptadoras ocorra (Jin e Lee, 2008).

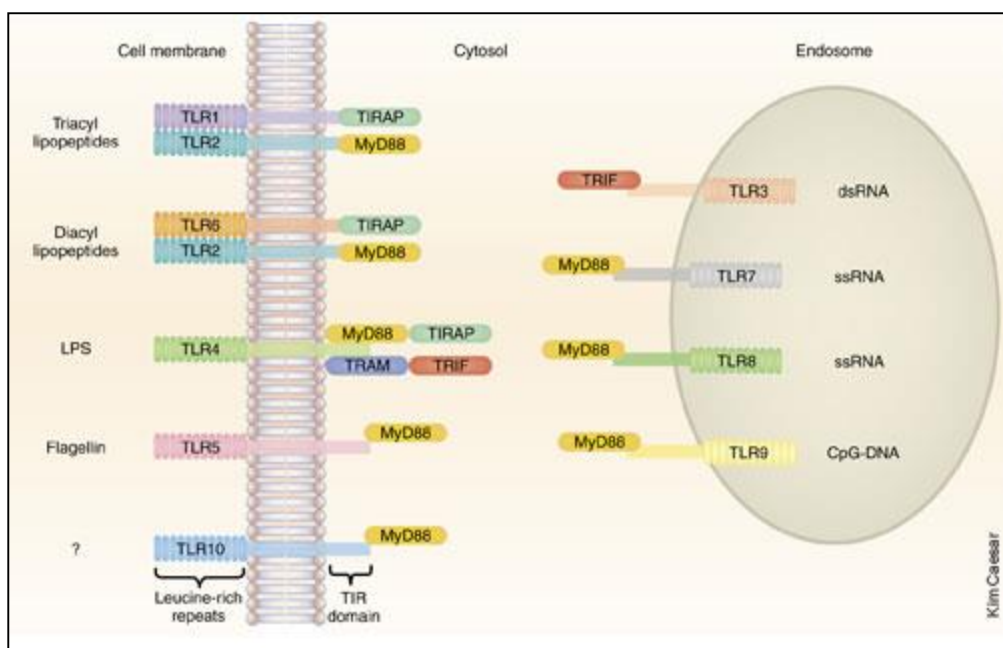


Figura 1. Esquema representativo da localização celular dos TLRs humanos. O esquema mostra tanto os receptores na superfície celular quanto os de vesículas intracelulares (Fonte: Kawai e Akira, 2010).

VIAS DE SINALIZAÇÃO DOS TLRs.

O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs desencadeia uma complexa cascata de sinalização intracelular, ativando as células que os expressam, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos, induzindo a translocação de diferentes fatores de transcrição para o núcleo, entre eles o NF- κ B (Kumar *et al.*, 2009).

A sinalização intracelular resultante da ativação dos TLRs requer diversas moléculas adaptadoras, como MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF (figura 2). A sinalização dependente da proteína MyD88 é compartilhada por todos os tipos de TLR, exceto o TLR3 (Takeuchi *et al.*, 2000a). Essa cascata inicia-se com a ativação do próprio MyD88, levando ao recrutamento das enzimas IRAK4, IRAK1, IRAK2 e/ou IRAK-M. IRAK-4 tem um papel essencial na ativação do NF- κ B e na via de sinalização de MAPK. A ativação sequencial das proteínas IRAK1 e IRAK2 resulta na interação com TRAF6, que cataliza a ubiquitinação de NEMO,

que por sua vez induz em última instância a ativação do NF- κ B, por meio de fosforilação e subsequente degradação das proteínas I κ B (Yamamoto *et al.*, 2004, revisado por Kawai e Akira, 2010).

Na via de ativação independente da proteína MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa NF- κ B através de outras duas moléculas adaptadoras, como TRIF e TRAM. A via dependente de TRIF pode também atuar via outros fatores de transcrição (além de NF- κ B) como IRF3, IRF5 ou IRF7, que levam à ativação dos genes que codificam IFN- α / IFN- β (Doyle *et al.*, 2006; revisado por O'Neill, 2008; revisado por Kawai e Akira, 2010) (Figura 2).

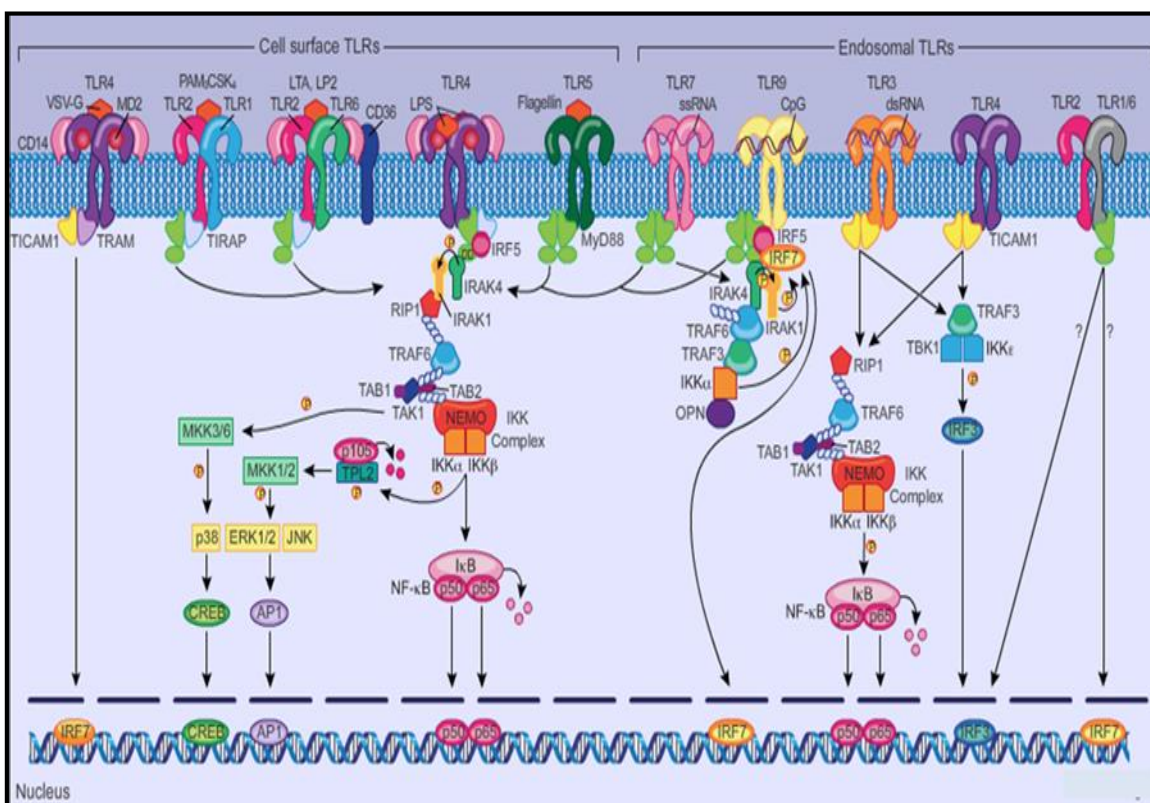


Figura 2. Esquema representativo das vias de sinalização intracelular ativadas pelos TLRs. O esquema mostra as vias dependente e independente de MyD88 (Fonte: Kumar e colaboradores, 2009).

RECEPTOR TIPO *TOLL* 2 (TLR2).

Dentre os 10 TLRs descritos em humanos, um receptor com grande importância é o TLR2, uma vez que este reconhece uma grande variedade de PAMPs, podendo estes serem derivados de fungos, bactérias, protozoários, micobactérias e vírus, como, por exemplo, lipopeptídeos de bactérias, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico de bactérias Gram positivas, lipoarabinomananos de micobactérias, zymosan (componente da parede celular de fungos), tGPI-mucina (glicosilfosfatidilinositol) de *Trypanosoma cruzi* e hemaglutininas do vírus

sarampo (Takeuchi *et al.*, 2000b; Quesniaux *et al.*, 2004; revisado por Underhill, 2003; Ropert e Gazzinelli, 2004).

O TLR2 forma heterodímeros com TLR1 (TLR2/TLR1) e TLR6 (TLR2/TLR6), podendo, dessa forma, discriminar diferentes componentes microbianos (Jin *et al.*, 2007). O heterodímero TLR2/TLR1 reconhece lipopeptídeos triacilados de bactérias Gram-negativas (Takeda *et al.*, 2002). Já o heterodímero TLR2/TLR6 reconhece lipopeptídeos diacilados de bactérias Gram-positivas e micoplasmas (Kang *et al.*, 2009; Quesniaux *et al.*, 2004).

Alguns estudos forneceram informações sobre os mecanismos envolvidos na discriminação entre as estruturas das lipoproteínas. Após o reconhecimento do ligante pelo heterodímero TLR2/TLR1, duas das três cadeias do lipopeptídeo triacilado (por exemplo, Pam3CSK4) interagem com o TLR2, enquanto que a terceira cadeia se liga ao canal hidrofóbico do TLR1. Dessa maneira, o reconhecimento dos lipopeptídeos triacilados torna-se mais fácil. Entretanto, o TLR6 não possui o canal hidrofóbico, e isso impede que o complexo TLR2/TLR6 reconheça lipopeptídeos triacilados, porém ele é capaz de reconhecer lipopeptídeos diacilados (Jin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Quando os heterodímeros TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 são ativados, estes induzem a via de sinalização celular dependente da proteína adaptadora MyD88, conforme descrito anteriormente.

INTERLEUCINA 27 (IL-27).

Citocinas são proteínas com função na sinalização celular que são secretadas por células e afetam o comportamento de outras células e, muitas vezes, da própria célula secretora. Quimiocinas, interferons, interleucinas e outros fatores são exemplos de Citocinas, que são produzidas por uma ampla variedade de células, como macrófagos, linfócitos B e T e mastócitos. A IL-27 pode ter efeitos anti ou pró-inflamatórios em elementos da imunidade inata ou adaptativa. Dentre os efeitos anti-inflamatórios exercidos pela IL-27 estão a inibição da síntese de IFN- γ em células T CD4⁺ e CD8⁺ e por células *Natural Killer T* (NKT), e a inibição da síntese de IL-4 e IL-5 em células T CD4⁺ e células NKT, enquanto como efeitos pró-inflamatórios podem ser ressaltados o aumento da proliferação de células T CD4⁺ e o aumento da citotoxicidade de células T CD8⁺ (Villarino *et al.*, 2004). Esta citocina é secretada como um heterodímero formado pelas subunidades *Epstein-Barr-induced gene 3* (EBI3) e p28 (figura 3) e apresenta características estruturais semelhantes à de outros membros da família da Interleucina 12 (IL-12), uma vez que p28 é uma subunidade com quatro hélices e EBI3 é estruturalmente semelhante a um receptor solúvel de citocinas (Pflanz *et al.*, 2002), porém difere por não apresentar ligação covalente entre suas subunidades. A expressão de EBI3 já

foi amplamente detectada em diferentes células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo células dendríticas e macrófagos, assim como em células ativadas do endotélio vascular, sincíciotrofoblastos e epitélio intestinal (Pflanz *et al.*, 2002; Coulomb-L'Hermine *et al.*, 2007; Maaser *et al.*, 2004). A cadeia EBI3 também pode associar-se à subunidade p35 da IL-12, formando a IL-35 (Collison *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado que a subunidade p28 também pode ser secretada independentemente de EBI3, e que quando em sua forma monomérica atua como um inibidor da sinalização da IL-27. A subunidade p28 também pode ser encontrada associada a um receptor solúvel de citocinas, o “fator semelhante a citocina 1” (CLF). O dímero p28/CLF é produzido por células dendríticas e tem atividade biológica descrita em células *Natural Killer* (NK) (Crabe *et al.* 2009).

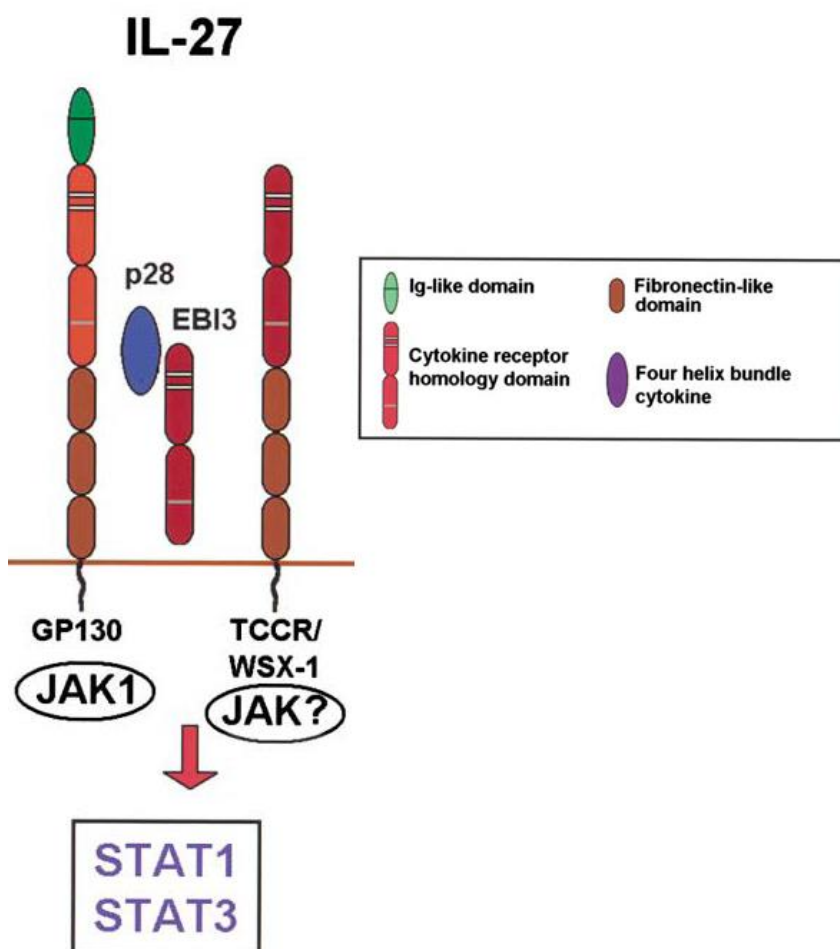


Figura 3. Representação esquemática da IL-27, seu receptor e vias de transdução de sinal. A figura mostra as duas subunidades da IL-27 (EBI3 e p28), bem como as subunidades de seu receptor (WSX-1 e gp130) (Fonte: Trinchieri *et al.* 2003).

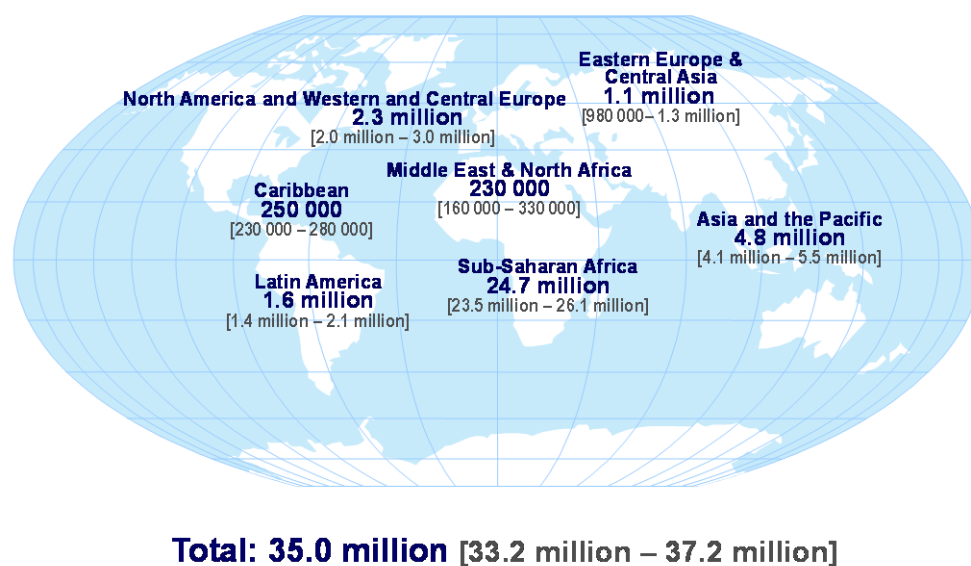
O receptor da IL-27 (IL-27R) é expresso por células tronco hematopoiéticas de todas as linhagens linfóides e mielóides, bem como pelo endotélio vascular (Shimizu *et al.*, 2006) e queratinócitos (Kanda and Watanabe, 2008), além de monócitos, células dendríticas, linfócitos T e B, células NK e mastócitos (Villarino *et al.*, 2004). A expressão do IL-27R por diversos tipos celulares demonstra o amplo potencial imunomodulador desta citocina. Assim como a própria citocina, o receptor de IL-27 é um heterodímero, composto pelas subunidades WSX-1 e gp130 (figura 3) que, assim como a própria IL-27, também podem ser encontrados separadamente. A subunidade WSX-1 pode se ligar à IL-27 mesmo na ausência de gp130, entretanto a transdução de sinal só ocorre quando ambas subunidades estão associadas. A gp130 é uma molécula altamente promíscua e que, através de diferentes associações (gp130/gp130; gp130/LIFR; gp130/OSMR β), pode servir de receptor para sete citocinas, além da IL-27. Ao ser ativado pela ligação da IL-27, o IL-27R ativa a via de sinalização Janus Cinase/Transdutor de Sinal e Ativador de Transdução (JAK/STAT). JAK associa-se aos domínios intracelulares do IL-27R e se ativa por fosforilação logo após a ligação do receptor com a citocina. Em seguida, as JAKs fosforilam os fatores de transcrição STAT, permitindo que estes formem dímeros e se transloquem para o núcleo da célula, onde vão induzir a transcrição de genes efetores (Takeda *et al.*, 2003).

As células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos, são as principais fontes de produção de IL-27. A expressão das duas subunidades da IL-27 é positivamente regulada pela estimulação de APCs por ligantes de diferentes TLRs. Agonistas de TLR3, TLR4 e TLR9 têm alto potencial de indução de IL-27 em APCs (Pflanz *et al.*, 2002; Pirhonen *et al.*, 2007; Remoli *et al.*, 2007; Schuetze *et al.*, 2005). Além dos TLRs, a produção de IL-27 também pode ser induzida através da ligação de citocinas, como a IL-1 β e o Interferon tipo 1 (IFN-1), e do fator co-estimulador CD-40L (Schnurr *et al.*, 2005; Wirtz *et al.*, 2005; Greenwell-Wild *et al.*, 2009).

Após esses estímulos, diferentes fatores de transcrição tornam-se responsáveis pela transcrição dos genes que codificam para EBI3 e p28, juntos ou individualmente. O heterodímero p50/p65 de NF- κ B pode ativar a produção de EBI3, enquanto c-Rel, outro fator NF- κ B, mostra-se pouco importante na transcrição de p28 (Wirtz *et al.* 2005; Liu *et al.* 2007). Da mesma forma, diferentes Fatores Reguladores de Interferon (IRF), como IRF1 e IRF3, podem estimular a produção de p28 por se ligarem à sua região promotora (Liu *et al.* 2004; Molle *et al.* 2007).

O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS).

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a qual é caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (Pantaleo e Fauci, 1995). A AIDS consiste em uma pandemia, que é hoje considerada uma preocupação global que tem exigido esforços conjuntos da comunidade científica, dos governos e da sociedade em geral, para a sua efetiva prevenção e controle. De acordo com dados do Programa das Nações Unidas para HIV e AIDS (Figura 4), estima-se que 35 milhões (33,1 – 37,2 milhões) de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o globo terrestre (UNAIDS, 2013). No Brasil, o Ministério da Saúde informou que os novos números de AIDS, atualizados até dezembro de 2013, contabilizam aproximadamente 718.000 casos registrados desde 1980. Em relação a disseminação, a taxa de incidência oscila em torno de 20,2 casos de AIDS por 100 mil habitantes, e em 2012, foram notificados 39.185 novos casos da doença.



WHO – HIV department | August 28, 2014



Figura 4. Pessoas infectadas pelo HIV no mundo e prevalência em adultos. Modificada de “Global epidemic (Powerpoint slides)” (<http://www.who.int/hiv/data/en/>) em dezembro de 2013.

Dois tipos de HIV são descritos, o tipo 1 e o tipo 2 (HIV-1 e HIV-2), que são classificados em grupos e subtipos, com distribuição geográfica distinta, de acordo com suas origens (Essex M., 1999). O HIV-1 foi isolado por primeira vez em 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983) e sua distribuição é irrestrita pelo mundo. O HIV-2 foi isolado por primeira vez em 1986 (Clavel *et al.*, 1986) na África Ocidental.

Após o isolamento, clonagem molecular, e a classificação inicial do HIV-1, foram descobertos vários *Lentivirus* geneticamente diferentes que infectavam primatas, e foram determinadas suas relações filogenéticas com o HIV-1. A inoculação de espécies de macacos asiáticos (por exemplo, os macacos *Rhesus*) com estes agentes recém descobertos induziu uma doença semelhante à AIDS (Daniel *et al.*, 1985), deste modo esses vírus foram nomeados vírus da imunodeficiência símia (SIV) para distingui-los dos vírus humanos, o HIV-1 e HIV-2. Filogeneticamente o HIV-2 é mais estreitamente relacionado com o SIV_{smm} (vírus selvagem isolado de macacos *sooty mangabey*) do que o HIV-1 (Hirsch *et al.*, 1989). Do mesmo modo o HIV-1 é mais estreitamente relacionado com o SIV_{cpz} (vírus selvagem isolado de chimpanzé) (Peeters *et al.*, 1989, Huet *et al.*, 1990). Devido ao contato próximo entre humanos e macacos, que eram caçados para alimentação ou mantidos como animais de estimação na África Ocidental, pensa-se atualmente que o HIV representa uma transmissão zoonótica de SIV aos seres humanos (Sharp *et al.*, 2010).

As primeiras análises filogenéticas de isolados do HIV-1 foram realizadas em amostras provenientes da Europa, América do Norte e África. A partir destas foram definidos grupos genéticos ou “clades” do HIV-1, os quais podem ser classificados em: M (*major*); O (*outlier*), N (não-M, não-O) e P (*putative*). O grupo M do HIV-1, que inclui mais dos 95% dos vírus isolados, consiste em pelo menos nove subtipos ou subgrupos distintos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e 72 formas recombinantes circulantes (CRF), as quais possuem segmentos genômicos derivados de mais de um subtipo de HIV-1 (Figura 5) (Hemelaar *et al.*, 2011).

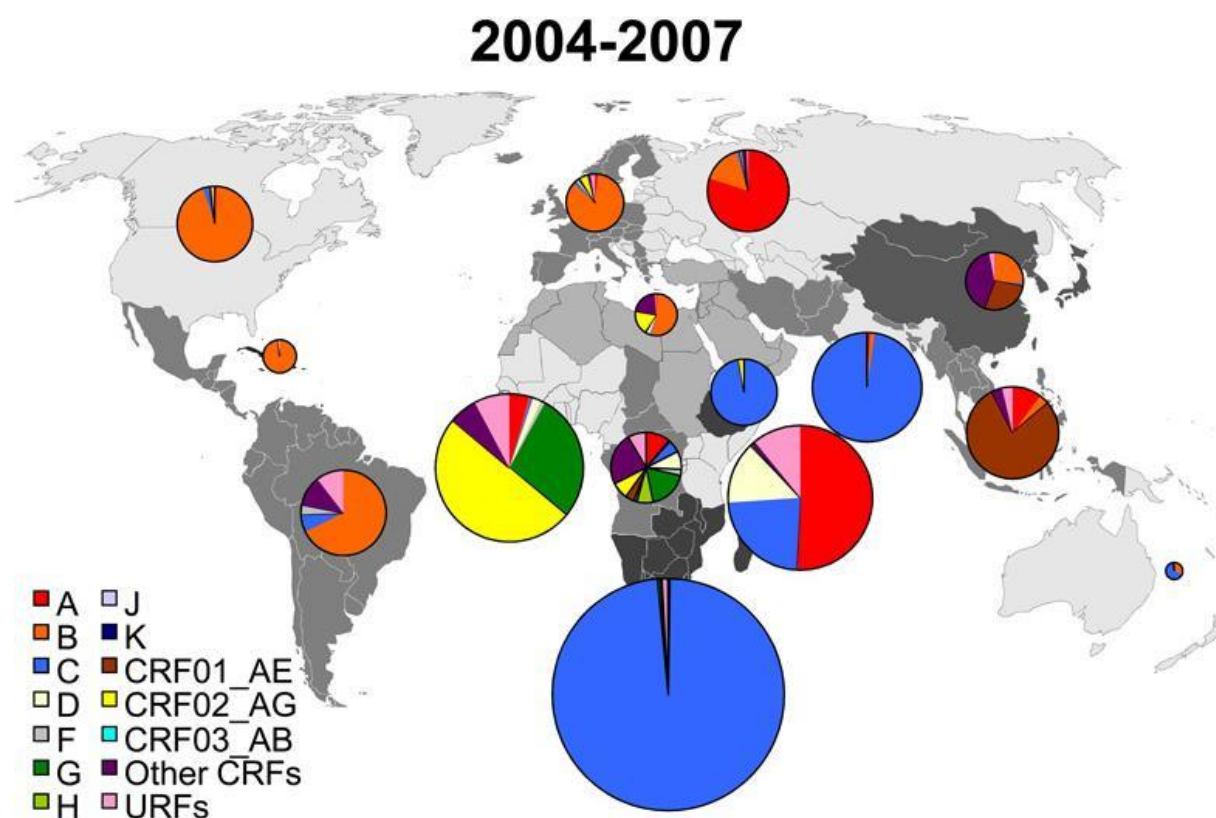


Figura 5. Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1. Adaptado de Hemelaar *et al.*, 2011)

Vários fatores contribuem para a imensa heterogeneidade genética do HIV-1: (a) a propensão a erros da enzima transcriptase reversa, que ocorrem durante a síntese do cDNA viral por esta enzima, a partir do RNA genômico do HIV; (b) altas taxas de recombinação, a qual acontece durante a transcrição reversa e integração; (c) os elevados níveis de produção de vírus *in vivo* (10^9 partículas/dia, 150 a 300 ciclos de replicação/ano), e (d) um grande número de indivíduos infectados (Preston *et al.*, 1988; Perelson *et al.*, 1996; Jetzt *et al.*, 2000), o que permite que os eventos probabilísticos de mutação ocorram com maior facilidade. Estima-se que em uma pessoa infectada pelo HIV-1 a diversidade genética viral

umenta 1% por ano a partir da cepa do primeiro vírus, durante a fase sintomática da infecção, na ausência de tratamento (Shankarappa *et al.*, 1999).

ASPECTOS GENÔMICOS E ESTRUTURAIS DO HIV-1

O HIV é um vírus pertencente à família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*. Os Retrovírus se distinguem por apresentar uma ou mais fitas simples de ácido ribonucleico (RNA) de senso positivo como material genético e uma enzima DNA (ácido desoxirribonucleico) polimerase dependente de RNA conhecida como Transcriptase reversa (Chiu *et al.*, 1985; Vogt *et al.*, 1997). Essa enzima é a responsável por converter o RNA de fita simples em cDNA de fita dupla para a integração do genoma viral ao da célula hospedeira. Os *Lentivirus* são principalmente caracterizados por permanecerem latentes, podendo manter-se “silenciosos” por anos na célula infectada antes de iniciarem o processo de replicação propriamente dito (Vogt *et al.*, 1997).

O vírion do HIV é constituído por um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo proteico que carrega o genoma viral, proteínas acessórias e enzimas (Figura 6). O envelope lipoprotéico é formado por uma bicamada fosfolipídica na qual ficam inseridas as proteínas do envelope (gp120 e gp41) responsáveis pela ligação do vírus com a célula-alvo. O envelope viral é derivado da própria membrana da célula na qual o vírion é gerado, levando inclusive consigo proteínas celulares, tais como antígenos leucocitários humanos de classe 1 e 2. Internamente se encontra uma matriz proteica constituída pela proteína viral p17. O nucleocapsídeo, uma estrutura cônica proteica formada pela proteína p24, contém duas cópias de RNA fita simples e proteínas; Protease, Transcriptase reversa e Integrase (Vogt *et al.*, 1997).

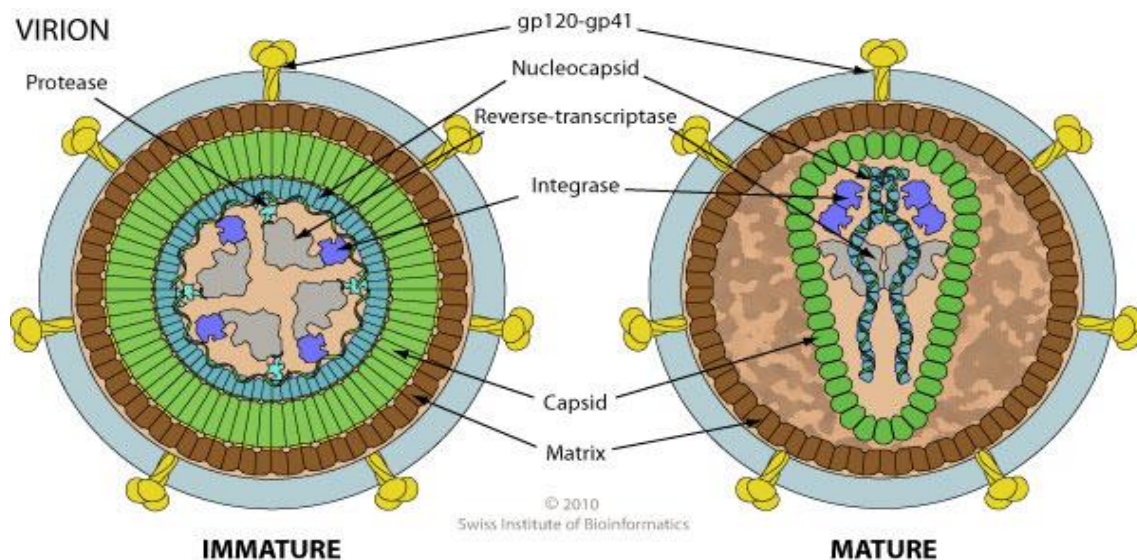


Figura 6. Estrutura do vírion do HIV-1. Extraída do Portal ViralZone do SIB Swiss Institute of Bioinformatics (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/7.html) em outubro de 2013.

O genoma do HIV-1 possui três fases de leitura que codificam nove genes, i.e. gag, pol, env, tat, rev, nef, vif, vpr, vpu. Os genes gag, pol e env, que codificam proteínas estruturais do vírion, são os maiores genes do genoma do HIV e são compartilhados com os outros membros da família Retroviridae. Gag (antígeno específico do grupo) codifica uma proteína precursora, p55, que após o processamento pela protease viral dá origem às proteínas do capsídeo: p17 (matriz), p24 (Capsídeo), p7 (núcleo capsídeo) e p6. Pol é a região genômica que codifica para as enzimas virais Protease, Transcriptase reversa e Integrase. Essas enzimas são produzidas pela proteína precursora Gag-Pol que é processada pela protease viral. Env codifica as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41, a partir de um precursor gp160 que é clivado por proteases celulares. As glicoproteínas são encontradas no envelope viral derivado da membrana celular, elas estão ligadas não covalentemente e se arrumam de maneira a formar trímeros que são as estruturas que se ligam ao CD4 celular e aos co-receptores para promover a fusão e entrada do vírion na célula. Os outros seis genes codificam proteínas com propriedades regulatórias que controlam a habilidade do HIV de infectar as células, estimulam a replicação e combatem fatores endógenos que inibem a produção de novos vírions. Outro elemento importante dentro do genoma proviral integrado são os LTRs (*long terminal repeats*, ou repetições terminais longas) que flanqueiam o genoma e possuem regiões regulatórias, especialmente controlando a iniciação da transcrição e a poliadenilação (Figura 7).

I-6 Genome maps

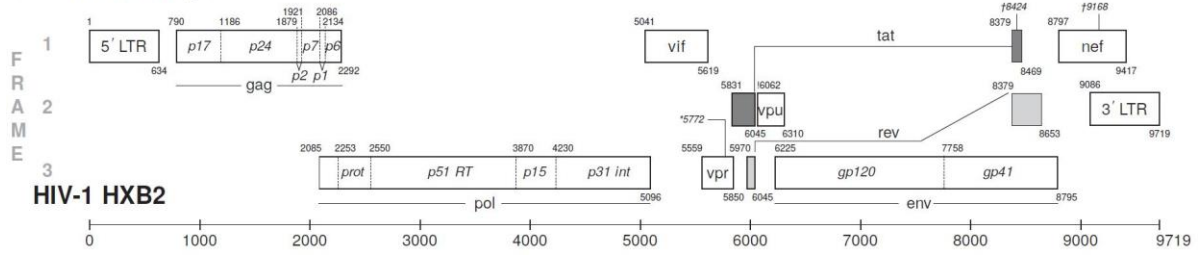


Figura 7. Representação esquemática da organização genômica do HIV-1. Extraída do portal HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2011/frontmatter.pdf>)

CICLO REPLICATIVO E A INFECÇÃO PELO HIV-1

O HIV-1 infecta linfócitos T CD4+, macrófagos, células dendríticas e, no sistema nervoso central, a microglia (Gartner *et al.*, 1986; Stevenson, 2003), células que expressam a glicoproteína CD4 que serve como receptor para a entrada do HIV-1 e HIV-2. Essa via clássica começa com a adsorção das glicoproteínas da superfície do envelope viral com o receptor CD4 na membrana das células alvo, assim como aos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4. Inicialmente, a gp120 se liga ao receptor CD4, tal ligação promove uma mudança conformacional na gp120 que permite que ela se ligue aos correceptores (CCR5 ou CXCR4). Essa segunda ligação desencadeia uma mudança conformacional ainda mais profunda que expõe a porção chamada *heptad repeat 1* (HR1) da gp41 que penetra na membrana. Posteriormente a porção *heptad repeat 2* passa pelo último rearranjo estrutural formando uma estrutura semelhante a um grampo que aproxima o envelope da membrana forçando a fusão e permitindo a passagem do capsídeo para o citoplasma (Chan e Kim, 1998; Wyatt e Sodroski, 1998).

Após a entrada, o material genético e as enzimas virais são liberados do capsídeo, e inicia-se o processo de transcrição reversa, que consiste da ligação da enzima viral transcriptase reversa à fita simples positiva de RNA (genoma viral), transcrevendo reversamente uma fita complementar de DNA (cDNA). A transcriptase reversa possui também atividade de ribonuclease, degradando o RNA original durante a síntese do cDNA, e atividade DNA polimerase dependente de DNA, que promove a criação da fita senso a partir do cDNA antisense. Ambas as fitas se ligam formando um cDNA dupla fita viral, que é transportado até o núcleo da célula onde será incorporado ao genoma celular por meio da atividade da enzima viral integrase. O cDNA viral integrado passa a ser chamado então de provírus (Zheng *et al.*, 2005).

O provírus pode permanecer silencioso e, para ser ativado, necessita do auxílio de certos fatores de transcrição da célula, sendo o NF- κ B o mais conhecido e estudado, que é regulado positivamente em células ativadas. Esse fator se liga na região promotora do LTR viral induzindo a transcrição do provírus em RNA mensageiro (mRNA), que passa pelo processo de “splicing” que o edita em fragmentos menores. Esses fragmentos são transportados para o citoplasma e produzem as proteínas regulatórias Tat (que amplifica a replicação) e Rev. As partículas de Rev então se acumulam no núcleo onde se ligam ao mRNA não editado, promovendo sua saída do núcleo, de onde eles não sairiam até serem editados. Nesse ponto, as proteínas estruturais Gag e Env são traduzidas no citoplasma na

forma de poliproteínas a partir desses mRNAs não editados. Esse mRNA é, na verdade, o RNA genômico que vai se associar à proteína Gag para ser empacotado nas novas partículas virais (Zheng *et al.*, 2005; Pollard e Malim, 1998; Hiscott *et al.*, 2001).

A formação de novas partículas virais ocorre na membrana celular através de uma organização autônoma das poliproteínas estruturais precursoras Gag e Gag/Pol (Pr55 gag, Pr155 Gag-Pol) junto com o RNA genômico. Após a formação desta ribonucleoproteína (RNP), os novos vírions ainda imaturos são liberados da célula. Essas partículas ainda passam por uma maturação morfológica e funcional devido à ação da protease viral, consequência da clivagem protéica das proteínas precursoras. Essa clivagem ocorre durante a montagem do vírion ou logo após a liberação da partícula imatura. Na figura 8 podemos observar todas as etapas do ciclo replicativo.

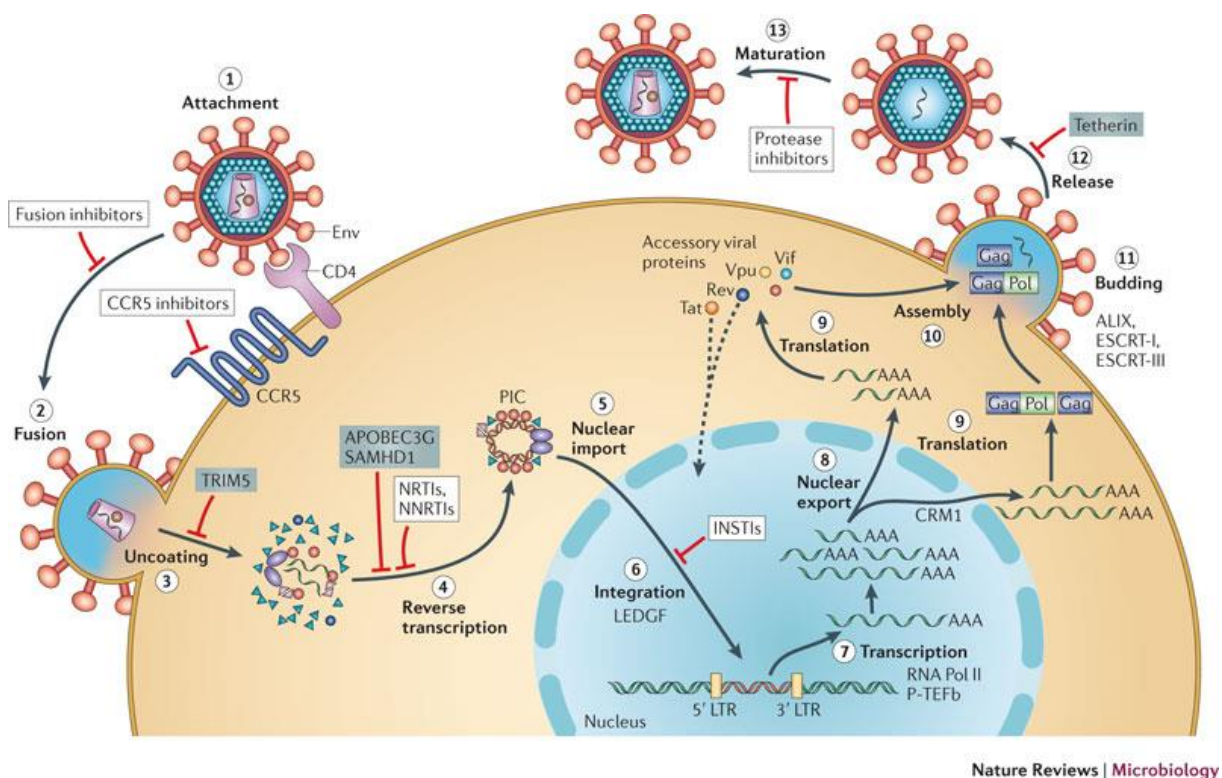


Figura 8. Ciclo replicativo do HIV-1. Extraído de Alan Engelman e Peter Cherepanov, 2012 – Nature Reviews Microbiology.

IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1

A infecção pelo HIV-1 apresenta 3 fases: aguda, crônica e sintomática. A infecção aguda ou primária é definida como o período inicial da infecção, determinada entre a detecção do RNA viral no plasma de pacientes infectados pelo HIV, até a formação de anticorpos específicos para o HIV, 3 a 4 semanas após a infecção. Quando a infecção pelo HIV ocorre por transmissão sexual, existe uma fase inicial, antes da detecção de RNA viral no plasma do paciente, que se caracteriza pela replicação do HIV no tecido linfóide associado à mucosa vaginal ou retal (McMichael *et al.*, 2010).

Durante a infecção primária, a viremia aumenta atingindo seu ponto máximo após 21-28 dias de infecção, juntamente com a diminuição do número de células T CD4⁺ (Figura 9). Embora a quantidade de células T circulantes retorne a um valor próximo ao normal, o número de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) permanece reduzido (Guadalupe *et al.*, 2003). Essa perda é em grande parte irreversível e tem importantes consequências imunológicas, como falha do sistema imune e progressão para a AIDS durante o transcurso da infecção (Picker e Watkins, 2005). No momento do pico da viremia, os pacientes desenvolvem sintomas gerais, incluindo síndrome semelhante à gripe, com febre, dor de garganta, linfadenopatias, e exantema (Kahn e Walker, 1998).

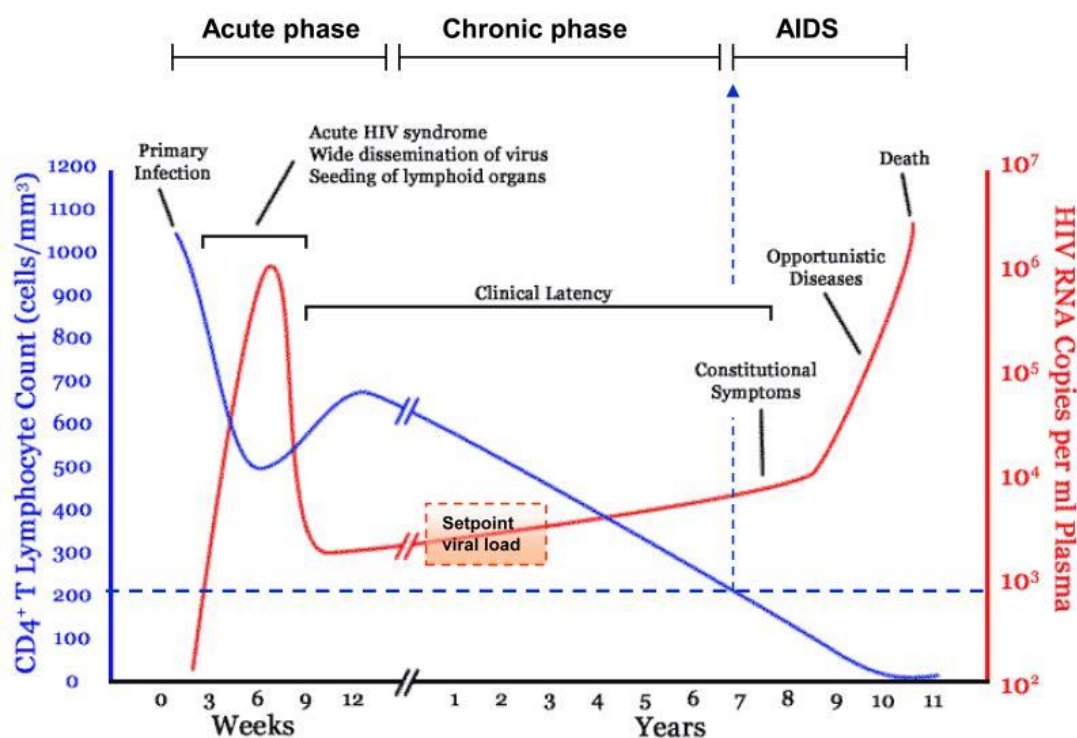


Figura 9. Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1. Extraído An e Winkler, 2010.

Durante a fase crônica da infecção pelo HIV-1, respostas imunes celulares e humorais são desencadeadas, mas podem não ser suficientes para conter a propagação viral e o estabelecimento, mais tarde, do quadro de imunossupressão. Esta fase crônica da infecção também se associa com uma severa depleção de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado a mucosas (MALT), principalmente as células T CD4⁺CCR5⁺ que residem na lâmina própria. A homeostase das células T CD4⁺ de memória efetoras residentes nas mucosas depende da proliferação e migração de novas células; deste modo, uma diminuição a nível sistêmico das células T CD4⁺ de memória central resulta no déficit de células T de memória efetoras; este processo está associado à progressão para a AIDS (Paiardini *et al.*, 2008).

A ativação crônica do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV-1 é uma característica da progressão para AIDS. Neste contexto é observado um “turnover” aumentado de células T, elevado número de células T ativadas, e níveis elevados de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no soro (Brenchley *et al.*, 2004). O grau de ativação do sistema imune é considerado por alguns pesquisadores como melhor prognóstico da progressão da doença (Brenchley *et al.*, 2006a; Brenchley *et al.*, 2006b).

A ativação imune na infecção pelo HIV-1 pode resultar em efeitos benéficos ou nocivos para o paciente. Podemos mencionar algumas consequências benéficas, como a restituição parcial (principalmente nas mucosas) do *pool* de células T CD4⁺ de memória depletado, e reestabelecimento transitório da competência imune (Grossman *et al.* 2002; Douek *et al.*, 2001). Porém, a longo prazo, a ativação imune é deletéria. Alguns dos efeitos nocivos incluem a perpetuação da replicação do HIV, e consequente destruição da arquitetura dos linfonodos e fibrose (Schacker *et al.*, 2002; Estes *et al.*, 2008), retenção de células T efetoras nos linfonodos, perda da função tímica, drenagem de células virgens para a circulação (Brenchley *et al.*, 2006a; Hellerstein *et al.*, 1999; Dion *et al.*, 2004), dentre outros.

A ativação imune causa depleção de células T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV, e contribui com a morbidade relacionada à infecção, determinando a progressão para AIDS (Giorgi *et al.*, 1999; Moanna *et al.*, 2005). A ativação imune pode estar diretamente relacionada à replicação viral ou não, no entanto presume-se que um dos principais responsáveis pela ativação imune é o próprio vírus (Alter *et al.*, 2007a; Meier *et al.*, 2007; Alter *et al.*, 2007b; Nazli *et al.*, 2010). A Terapia Anti-Retroviral Altamente Ativa (HAART) diminui a carga viral e a ativação do sistema imune (Guadalupe *et al.*, 2003; Benito *et al.*, 2002). Também contribui para a persistente ativação do sistema imune a passagem de produtos microbianos do lúmen do intestino para a circulação, processo conhecido como

translocação microbiana, que ocorre durante o curso clínico da infecção (Brenchley *et al.*, 2006a; Jiang *et al.*, 2009).

O aumento dos níveis séricos de citocinas próinflamatórias, liberadas pelo sistema imune quando ativado pelas proteínas virais, ou pelo próprio vírion, é tanto uma causa quanto uma consequência do processo da ativação imune crônica (Chang e Altfeld, 2010). Além disso, a infecção das células T CD4⁺ reguladoras leva à sua própria depleção e pode agravar o estado de ativação imune (Eggena *et al.*, 2005, Moreno-Fernandez *et al.*, 2009). À exceção destes efeitos relacionados diretamente com o vírus, também existem causas indiretas como, por exemplo, a acentuada destruição do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT), a qual induz uma translocação aumentada da flora intestinal para a circulação e uma subsequente ativação imune (Brenchley *et al.*, 2006a, Jiang *et al.*, 2009, Brenchley *et al.*, 2008).

Estudos recentes mostram as consequências imunológicas da infecção pelo HIV-1 e SIV nos tecidos linfóides associados às mucosas, os quais foram realizados principalmente em macacos rhesus infectados com SIV. A principal conclusão destes estudos é que a infecção aguda pelo HIV ou SIV é associada a uma rápida, pronunciada e irreversível depleção de células T de memória na mucosa, principalmente aquelas que expressam o co-receptor viral CCR5. Assim, a grande população de células T de memória/ativadas CD4⁺ CCR5⁺ que residem nas mucosas (principalmente na lâmina própria) representa um alvo importante para a replicação viral. Este fenômeno não é observado no sangue periférico nem nos linfonodos, onde as células T residentes são majoritariamente negativas para o co-receptor CCR5, com fenótipo de células em repouso, *naïve* ou de memória central. A depleção de células T CD4⁺ do trato gastrointestinal é um processo multifatorial, tendo em conta que a perda inicial de células T (após alguns dias de infecção) é provocada diretamente pela infecção viral, e a subsequente perda das células T é causada pela morte induzida pela própria resposta celular citotóxica do indivíduo (Paiardini *et al.*, 2008).

Um fator adicional para a amplificação da replicação do HIV-1 e manutenção de carga viral elevada é a alta taxa de expressão membranar do receptor de morte programada (PD-1). Tais receptores, quando ativados pela ligação com o seu ligante PD-L1, induzem diminuição da função celular, relacionada ao declínio da atividade citotóxica, baixa capacidade de proliferar e de produzir citocinas (Barber *et al.*, 2006). Assim, viu-se, em pacientes infectados pelo HIV-1, que a expressão do receptor PD-1 está elevada em células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para este vírus, e que este aumento está associado com o deficiente funcionamento

destas células, alta carga viral, baixo número de células T CD4+, e mais rápido progresso para AIDS (Day *et al.*, 2006). Este mesmo grupo verificou que a expressão do marcador CTLA-4, uma molécula com propriedades inibitórias sobre a resposta imune, está elevada em células T CD4+ específicas para o HIV-1, e que este aumento também se correlaciona com o funcionamento celular deficiente e acelerado progresso da doença (Kaufmann *et al.*, 2007).

RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO HIV-1

A resposta imune contra o HIV-1 envolve diferentes mecanismos efetores, entre estes a produção de anticorpos neutralizantes e a resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) (Alter *et al.*, 2007, Letvin *et al.*, 2003). A resposta imune humoral tem um papel fundamental em muitas infecções virais, porém não é sempre capaz de eliminar definitivamente o vírus. Foi observado que os anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo HIV-1 têm uma capacidade de neutralização (*in vitro*) insuficiente para isolados primários de HIV-1 (Bou-Habib *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Moog *et al.*, 1997a; Moog *et al.*, 1997b). Os primeiros anticorpos neutralizantes encontrados em indivíduos infectados pelo HIV-1 são específicos para a região hipervariável V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral (“V3 loop”) (Javaherian *et al.*, 1989). Diversos estudos sugerem que em pacientes nos quais a infecção está bem estabelecida, os anticorpos neutralizantes têm uma contribuição mínima no controle da replicação do HIV-1, pois são dirigidos principalmente para epítomos que não são expostos na partícula viral (Bou-Habib *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Richman *et al.*, 2003).

Em relação à resposta imune celular, reconhece-se a participação fundamental dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTCs) no controle da replicação do HIV-1 (Saksena *et al.*, 2008). Tanto nos pacientes infectados pelo HIV-1 quanto em macacos infectados pelo SIV, demonstrou-se a existência de LTCs em número variado e em diversos compartimentos anatômicos, como por exemplo, no sangue, espaço brônquio-alveolar, linfonodos, baço, pele, fluido cerebrospinal, sêmen e tecidos de mucosa vaginal e gastrointestinal (Letvin e Walker, 2003).

Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (LTCs) inibem a replicação do HIV-1 *in vitro*, e muitos mecanismos, tanto citotóxicos como não citotóxicos, têm sido associados com este efeito antiviral (Saksena *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 1991; Killian *et al.*, 2011). Os LTCs lisam as células infectadas pelo HIV-1 *in vitro* bloqueando assim a propagação da infecção (Koup *et al.*, 1994). Do mesmo modo estas células efetoras também produzem fatores solúveis como,

por exemplo, as β -quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) que medeiam esse efeito (Verani *et al.*, 1997; Cocchi *et al.*, 1995; Nasr *et al.*, 2012). Durante os primeiros dias após a infecção pelo HIV-1 há um controle da replicação viral que se correlaciona com o aparecimento de uma resposta de LTCs específicos contra o HIV-1 (Alter *et al.*, 2007). Este fenômeno foi demonstrado pela associação entre o aparecimento de populações celulares efetoras capazes de lisar células-alvo que expressam proteínas virais, e a diminuição do RNA viral plasmático numa infecção primária pelo HIV-1 (Koup *et al.* 1994; Borrow *et al.* 1994).

Apesar das respostas imunes celulares e humorais serem induzidas após a infecção pelo HIV-1, a replicação viral não é contida como um todo, e, como consequência, é observada uma progressiva supressão do sistema imune. Uma das causas do chamado “escape imune” são as mutações nos epítomos virais, que são alvos das repostas celulares e humorais (Lee *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos de escape para evadir a resposta humoral pode ser mencionada a mudança nos carboidratos do envelope viral que protegem os sítios de ligação dos anticorpos, que ocorrem com o curso da infecção (Wei *et al.*, 2003). Um dos mecanismos de escape para evadir a resposta dos LTCs são mutações de epítomos em sítios essenciais para o reconhecimento do MHC de classe I ou do receptor da célula T (TCR), ou mutações nas regiões que as flanqueiam, afetando o processamento e apresentação antigênico (Lee *et al.*, 2004, Brackenridge *et al.*, 2011). Além disso, a própria replicação viral, indiretamente pode favorecer o escape imune, por ocasionar a destruição e exaustão dos linfócitos T CD4⁺ que poderiam responder a infecção.

IMUNOMODULAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1

Os principais alvos da infecção do HIV-1 são as células que expressam moléculas de CD4 em suas membranas. Essas células também expressam os co-receptores para a entrada do HIV-1, os receptores de quimiocinas. Em 1995, Cocchi e colaboradores identificaram as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 como fatores supressores do HIV-1. Esse fato foi sucedido de uma série de publicações que demonstravam que essas quimiocinas eram antagonistas do HIV-1 R5 trópico que competiam pelo seu co-receptor CCR5 (Stevenson, 2003). Em 1996, Bleul e colaboradores demonstraram que CXCL12, ligante de CXCR4, bloqueava a entrada de uma variante T-trópica de HIV-1 (Bleul *et al.*, 1996). Desde então o papel inibitório dessas quimiocinas sobre a entrada do HIV-1 em suas células alvo foi bem estabelecido. Contudo, outros estudos vieram a demonstrar que as quimiocinas ligantes também podem atuar em macrófagos e monócitos infectados, induzindo um aumento da replicação viral. Este

fenômeno está relacionado à ativação da proteína G associada ao CCR5, que induz mecanismos intracelulares que estão relacionados com a ativação celular e acabam por aumentar a replicação viral (Kedzierska *et al.*, 2003).

Assim como as quimiocinas, as citocinas também possuem uma ampla influência sobre a modulação da replicação do HIV-1. Seus efeitos podem ser inibitórios, estimulatórios ou ambos (Kedzierska *et al.*, 2003). Dentre as citocinas capazes de favorecer a replicação do HIV-1 encontram-se: M-CSF, que estimula um aumento da expressão de CD4 e CCR5 em macrófagos favorecendo sua infecção pelo HIV-1 (Wang *et al.*, 1998); TNF- α , que estimula a transcrição de mRNA viral, efeito parcialmente mediado por IFN- γ (Griffin *et al.*, 1991); IL-1, induz aumento da replicação viral mesmo em células cronicamente infectadas (Poli *et al.*, 1994a); IL-6, que potencializa o efeito do TNF- α sobre a replicação do HIV por estimular a indução de NF- κ B (Poli *et al.*, 1990). Dados publicados pelo nosso grupo também mostram o potencial de inibição viral de MIF (Regis *et al.*, 2010), NGF (Souza *et al.*, 2011), TGF- β (Lima *et al.*, 2002), bem como o dos neuropeptídeos VIP e PACAP (Temerozo *et al.*, 2013).

As citocinas classicamente descritas por inibirem a replicação do HIV-1 são: interferons do tipo 1, IFN- α e IFN- β , que possuem uma grande atividade inibitória da replicação viral. IFN- α é capaz de inibir a transcrição reversa assim como a transcrição de provirus integrados (Shirazi e Pitha, 1992; Poli *et al.*, 1994b), e o bloqueio de IFN- β com anticorpos neutralizantes em células infectadas permite um aumento da produção de p24 (Gessani *et al.*, 1994); IL-10 inibe a replicação viral mesmo em estágios precoces da infecção, inibe a expressão de mRNA viral, e tem seu efeito relacionado a sua capacidade de modular negativamente IL-6 e TNF- α (Weissman *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, 1994; Naif *et al.*, 1996); IL-13 possui efeito anti-HIV relacionado a diminuição da expressão de CD4, CCR5 e CXCR4 (Bailer *et al.*, 2000); IL-16 é um ligante natural de CD4 que compete pela ligação do receptor viral impedindo a entrada do HIV (Truong *et al.*, 1999).

Vários fatores celulares de restrição ao HIV-1, induzidos por Interferon, já foram descritos atuando em diferentes etapas do processo de replicação viral, como o APOBEC3G/3F (“*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*”), BST2/CD317 (“*tetherin/bone marrow stromal cell antigen 2*”), TRIM5- α (“*tripartite-motif-containing 5 α* ”), e outros mais recentes (Neil e Bieniasz, 2009; Strebel *et al.*, 2009; Goujon *et al.*, 2013). A proteína BST-2 restringe o brotamento das partículas maduras do HIV-1 mediante a retenção das mesmas na superfície da célula infectada, efeito este que é contrabalanceado pela proteína viral Vpu (Neil e Bieniasz, 2009). TRIM5 α é uma proteína que,

mediante a formação de multímeros, tem a capacidade tanto de bloquear o acúmulo de cDNA na célula infectada, como de impedir o transporte de cDNA ao núcleo da mesma (Strebel *et al.*, 2009; Nakayama e Shioda, 2010). Vários membros da família de enzimas citidinas-deaminases, APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3A, têm sido descritos como potentes inibidores da replicação do HIV-1. As proteínas APOBEC3G/3F são incorporadas à partícula viral em brotamento, e provocam um grande número de mutações hiper-somáticas no DNA pró-viral durante o processo de transcrição reversa, através da desaminação da desoxi-citosina, com conseqüente formação da desoxi-uracila. Este acúmulo de mutações G→A gera vírions não-infectivos, impedindo com isso novos ciclos de infecção. A proteína viral Vif possibilita ao HIV-1 o escape deste mecanismo celular, marcando a APOBEC3A, 3F e 3G para a degradação nos proteassomas via ubiquitinação (Strebel *et al.*, 2009; Romani *et al.*, 2009). Recentemente, outros fatores de restrição ao HIV-1 com potente capacidade inibitória vêm sendo estudados, como por exemplo o SAMHD1, que inibe a ação da transcriptase reversa ao depletar os níveis intracelulares de nucleotídeos (Ryoo *et al.*, 2014), e outros como MX2, IFITM e Viperin (Zahoor *et al.*, 2014).

Justificativa e Hipótese

Os receptores tipo *Toll* estão presentes em linfócitos, células apresentadoras de antígenos e outros tipos celulares e possuem função importante no sistema imune inato, pela sua capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e de induzir ativação celular que culmina com a produção de mediadores inflamatórios.

Dentre as citocinas secretadas após a ativação de alguns receptores do tipo *Toll* inclui-se a IL-27, uma molécula com propriedades tanto anti quanto pró-inflamatória. A IL-27 é dotada de atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1 (Fakruddin *et al.*, 2007), a qual é dependente da via de Interferon (Wahl *et al.*, 2009).

Estudos realizados no nosso laboratório demonstraram que macrófagos primários humanos, obtidos de doadores saudáveis, apresentam maior resistência à infecção pelo HIV-1 quando expostos a ligantes de TLR2 (Victoria *et al.*, 2013). No mesmo trabalho, mostramos que a citocina IL-10 e as β -quimiocinas CCL3 e CCL5 são fatores solúveis que medeiam a redução da replicação viral nas células tratadas com ligantes de TLR2.

Considerando a ampla variedade de fatores solúveis secretados pelas células estimuladas com ligantes de TLR2, e a partir do conhecimento da ação inibitória do HIV-1 exercida pela IL-27, achamos interessante investigar se esta citocina também participa, associada à IL-10 e às β -quimiocinas, na atividade anti-HIV-1 induzida mediada por TLR2. Assim, o presente estudo foi realizado para avaliar se a IL-27 é produzida por macrófagos estimulados com ligantes de TLR2, e se esta citocina participa do efeito anti-HIV-1 resultante da ativação de TLR2.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar se IL-27 participa da atividade anti-HIV-1 resultante da ativação de TLR2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se macrófagos expostos a ligantes de TLR2 produzem IL-27;
- Verificar se a inibição da replicação do HIV-1 em células tratadas com ligantes de TLR2 é dependente de IL-27;
- Investigar se a ativação de TLR2 em macrófagos aumenta a expressão de Interferon e de APOBEC3G, fator endógeno de restrição ao crescimento do HIV-1 estimulado por Interferon;
- Analisar se a via da proteína adaptadora MyD88 está envolvida na atividade inibitória anti-HIV-1 induzida por ligantes de TLR2.

Material e métodos

REAGENTES

Os ligantes de TLRs, Pam2CSK4 (ativador do dímero TLR2/TLR6) e Pam3CSK4 (que se liga ao dímero TLR1/TLR2) foram adquiridos da InvivoGen (San Diego, CA, USA). O LPS de *E. coli* (ligante de TLR4) foi comprado da SIGMA Aldrich (St. Louis, MO, USA). A molécula Pam3CSK4 (N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]- (R)-cysteine) (Pam3CysSerLys4) é uma lipoproteína triacilada sintética. O LPS é uma preparação de lipopolissacarídeo obtido a partir de *E. coli*. O conteúdo de endotoxina (LPS) nas amostras dos ligantes de TLR2 utilizados neste estudo foi avaliado pelo método LAL (BioWhittaker, Maryland, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as amostras analisadas a concentração de LPS foi menor a 80 pg/mL.

OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS

Macrófagos derivados de monócitos foram obtidos após 7 dias de cultivo (a 37°C/5%CO₂) de PBMCs em placas de plástico contendo 48 poços (Nalge-Nunc). Os PBMCs foram isolados por centrifugação (20 minutos, a 400G) em gradiente de densidade Ficoll (d=1,077 g/mL; Histopaque®, Sigma Chemical Co.), a partir de concentrados celulares (*buffy coats*) oriundos de doadores de sangue saudáveis (Regis *et al.*, 2010). Após o recolhimento do anel (contendo os PBMCs), as células foram lavadas com PBS e alíquotas foram diluídas em 0,1% de Azul de Tripán (Sigma Chemical Co.) e contadas em hemocitômetro. Assim, PBMCs foram distribuídos em placas de cultura de 48 poços (2 x 10⁶ células/poço/500µL) e cultivados em meio Dulbecco (DMEM, Hyclone) suplementado 10% de soro humano (SH, Sigma Chemical Co), penicilina (100u/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), durante 8 dias. Em seguida, foram removidas as células não-aderentes, e meio DMEM suplementado com 5% de soro humano, foi readicionado à camada de macrófagos maduros remanescentes. A pureza da preparação de macrófagos foi analisada por citometria de fluxo, usando-se anticorpos monoclonais anti-CD68 (Santa Cruz) (Souza *et al.*, 2011). A pureza de macrófagos foi superior a 94%.

ISOLADOS VIRAIS, REAGENTES E “KITS”

Utilizamos o isolado de HIV-1 Ba-L, trópico para CCR5, o qual foi doado ao nosso laboratório pelo *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program* (NIH, Bethesda, EUA; Bou-Habib DC, inscrição # BR060106.01). Os estoques virais foram expandidos em PBMCs de indivíduos saudáveis, e mantidos a -70 °C.

INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

Estas células foram infectadas pelo HIV-1 como descrito por nós (Souza *et al* 2011). Em resumo, os macrófagos foram expostos ao HIV-1 (18 h, 37°C, 5% de CO₂) e, em seguida, foram lavados, realimentados com meio de cultura fresco e cultivados a 37°C e 5% CO₂. Sobrenadantes de cultura foram colhidos após 12-14 dias para avaliação da replicação viral pela detecção do antígeno p24 do HIV-1, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) em kits comerciais (ZeptoMetrix), de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos com HIV-1 foram realizados no laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) do Pavilhão Leônidas Deane.

ANÁLISE DA SÍNTESE DE IL-27 E IL-27P28

Macrófagos foram tratados com ligantes de TLR e, após 24 a 48 horas, sobrenadantes das culturas foram coletados para avaliação da síntese de IL-27 ou IL-27p28, que foram quantificadas por kits comerciais de ELISA. O kit da empresa eBioscience foi utilizado para quantificar IL-27, enquanto que a IL-27p28 foi dosada com o kit da empresa R&D. O kit eBioscience utiliza anticorpos anti-p28 e anti-EBI3 para captura e detecção, respectivamente, e o fornecido por R&D usa anticorpos anti-p28 para ambas as atividades.

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE IL-27 NA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL

Macrófagos infectados com HIV-1 (como descrito acima) foram tratados com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4 na presença ou ausência do anticorpo bloqueador da IL-27 (R&D Systems) após cinco dias de infecção. No décimo quarto dia de infecção, os sobrenadantes das culturas foram colhidos para avaliação da replicação viral pela detecção do antígeno p24 do HIV-1, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) em kits comerciais (ZeptoMetrix), de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos com HIV-1 foram realizados no laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) do Pavilhão Leônidas Deane.

PCR EM TEMPO REAL (QPCR) PARA AVALIAR A MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE INTERESSE

Macrófagos foram expostos à ligantes de TLR e mantidos em cultura por 4 ou 24 horas. Então, o RNA total foi extraído utilizando-se um kit para extração de RNA (Qiagen) e posteriormente foi retrotranscrito utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen). O cDNA obtido foi amplificado por PCR em tempo real utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix, ao qual foram adicionados os *primers* específicos para genes analisados. Os *primers* foram adquiridos da Invitrogen, e as suas sequências estão descritas na tabela 1. Os genes β -actina, HPRT1 ou RPL13a foram utilizado como controle endógeno, e as análises dos resultados foram feitas pelo método de $\Delta\Delta CT$.

ESTATÍSTICA

A coleção de dados foi analisada pelo método do teste *t* de “Student” pareado, e os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.1 (GraphPad software). As inferências estatísticas foram realizadas no intervalo de confiança de 95%, sendo $p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; e $p \leq 0,001 = ***$.

Primer	Sequência	Sentido
p28	CCTGGTTCAAGCTGGTGTCT	Forward
	TGGAAGGTCAGGGAAACATC	Reverse
EBI3	TGTTCTCCATGGCTCCCTAC	Forward
	AGAAGATCTCTGGGAAGGGCC	Reverse
p35	CCAGAAGGCCAGACAAACTC	Forward
	CCAGGCAACTCCCATTAGTT	Reverse
p40	ATTGAGGTCATGGTGGATGC	Forward
	GGTGGGTCAGGTTTGATGAT	Reverse
CLF-1	CTGGATGCAGAAGTCGCAC	Forward
	TATCTGGCAGGACCTCTCGC	Reverse
APOBEC3G	GGCTCCACATAAACACGGTTTC	Forward
	AAGGGAATCACGTCCAGGAA	Reverse
APOBEC3F	TGGAAGTTGTAAAGCACTCA	Forward
	AGCACCTTTCTGCATGACAATG	Reverse
IFN- β	CAG CAG TTC CAG AAG GAG GA	Forward
	AGC CAG GAG GTT CTC AAC AA	Reverse
β -Actina	GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	Forward
	GACTTCCTGTAACAACGCATCTC	Reverse
HPRT1	CCTGGCGTTCGTGATTAGTG	Forward
	TCGAGCAAGACGTTCACTCC	Reverse
RPL13a	CGGACCGTGCAGGTATGCT	Forward
	AGCAGGAACCACCATCCGCT	Reverse

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados no estudo.

Resultados

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DE IL-27 APÓS TRATAMENTO COM LIGANTES DE TLR2

Com o intuito de verificar se a ativação de TLR2 induz a síntese de IL-27, realizamos, inicialmente, ensaios de PCR quantitativo (qPCR) para avaliar a expressão de ambas as subunidades que compõem a estrutura desta citocina. Assim, macrófagos foram tratados com Pam2CSK4 ou com Pam3CSK4 (que ligam, respectivamente, os dímeros TLR2/6 e TLR2/1), e a modulação de *EBI3* e de *p28* foi analisada como descrito. Nossos resultados sugerem que o tratamento com o ligante Pam3CSK4 induziu o aumento da expressão de ambas as subunidades (figura 10), enquanto que o tratamento com Pam2CSK4 induziu apenas o aumento da expressão da subunidade EBI3. No entanto, é importante ressaltar que a análise da expressão de *p28* em células expostas ao ligante Pam2CSK4 limitou-se a apenas uma amostra, o que não confere solidez ao resultado obtido. Portanto, novos experimentos deverão ser realizados para confirmar esses achados.

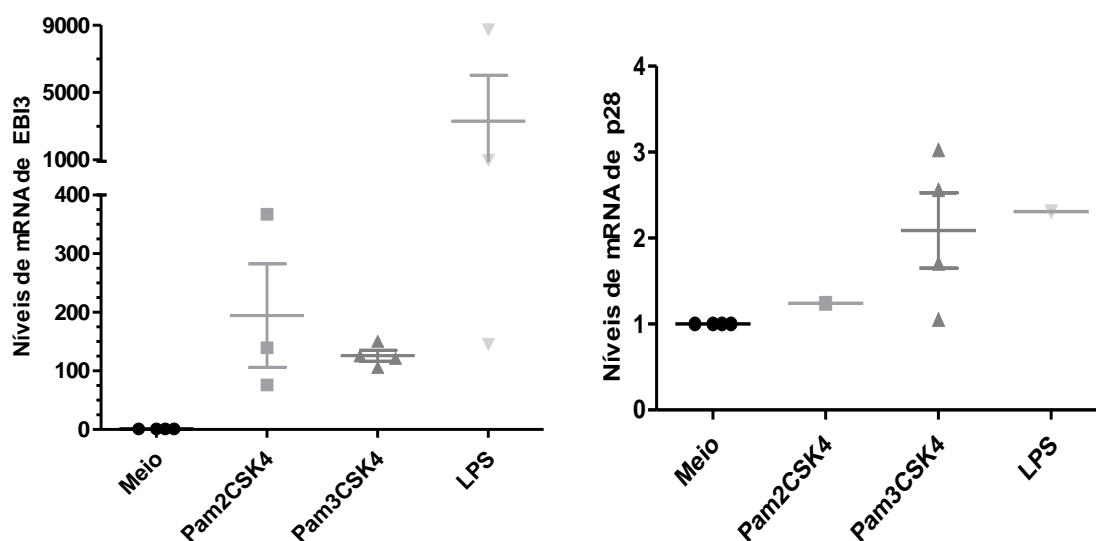


Figura 10. Análise da modulação da expressão das subunidades da IL-27. Macrófagos foram mantidos em meio de cultura (n = 4) ou tratados com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4 (ligantes de TLR2; 1 μ g/mL; n = 4) ou com LPS (agonista de TLR4; 10ng/mL; n = 3 ou 1) durante quatro horas. As células foram, então, lisadas para a extração de RNA total e a expressão das subunidades EBI3 e p28 foi analisada por qPCR, como descrito em Material e Métodos. A análise dos resultados foi realizada pelo cálculo do $\Delta\Delta$ ct das amostras.

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE IL-27 POR MACRÓFAGOS APÓS ESTÍMULO COM LIGANTES DE TLR2

A partir dos resultados descritos acima, nós verificamos se a ativação de TLR2 induziria a produção de IL-27. Para tanto, macrófagos humanos primários, obtidos de doadores saudáveis, foram tratados com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4, e os níveis desta citocina foram medidos nos sobrenadantes das culturas 24 ou 48 horas após o estímulo, pelo método ELISA. Inicialmente, esta quantificação foi realizada com o “kit” ELISA fornecido pela companhia R&D Systems, cujos anticorpos para captura e detecção são dirigidos apenas para a subunidade p28 da IL-27 (IL27p28). Nós vimos que ambos os ligantes são capazes de induzir uma expressiva produção de IL-27p28 por macrófagos 24 horas após o tratamento (figura 11). No entanto, apenas o estímulo com Pam3CSK4 resultou em diferença significativa na produção de IL27p28 48 horas após o estímulo (figura 11). Nós acreditamos que a variada capacidade de macrófagos de diferentes doadores de responder ao ligante Pam2CSK4 pode ter contribuído para ausência de significado estatístico para a produção de IL-27p28 48 horas após o estímulo com este ligante, a despeito da substancial produção da citocina observada.

Tendo em vista que a expressão de mRNA para a subunidade EBI3 foi quase 200 ou 100 vezes mais alta que a de p28 quando as células foram estimuladas com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4, respectivamente (figura 10), entendemos que seria importante medir a concentração da proteína IL-27 nos sobrenadantes destas mesmas culturas com um kit ELISA capaz de detectar a citocina em sua composição integral. Sendo assim, optamos por utilizar o “kit” ELISA da companhia eBioscience, que usa anticorpo de captura e de detecção específicos para p28 e para EBI3, respectivamente. De acordo com este fabricante, o uso destes anticorpos garante a especificidade do “kit” para a citocina IL-27. Para nossa surpresa, não detectamos níveis significativos de IL-27 nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com ambos os ligantes de TLR2 (figura 12), o que sugere que, considerando os “kits” ELISA que utilizamos, o fator solúvel produzido por estas células nestas condições limita-se à subunidade p28 da IL27 (em monômeros ou homopolímeros), ou a outro mediador do qual a subunidade p28 seja um componente estrutural conjugado a outra molécula que ainda não identificamos (sabe-se que as cadeias p28 e EBI3 podem se conjugar a outras subunidades proteicas para formar diferentes citocinas). Resultados semelhantes a estes, isto é, detecção de p28 (kit R&D) e ausência de IL-27 (kit eBioscience) foram obtidos em sobrenadantes de 7 outros doadores (não mostrados).

Importante ressaltar que a citocina IL-27 não foi detectada também nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com LPS e Poli (I:C), ligantes de TLR4 e 3, respectivamente, os quais, de acordo com alguns autores, são capazes de estimular a síntese desta citocina (Johnson *et al.*, 2011). É possível que estes ligantes sejam indutores da síntese de outros fatores solúveis que não a IL-27 propriamente dita (Este tópico está melhor apresentado na seção Discussão deste volume). Tendo em vista baixo número de amostras testadas, esta nossa hipótese carece de futuros estudos confirmatórios, com um “n” amostral mais elevado.

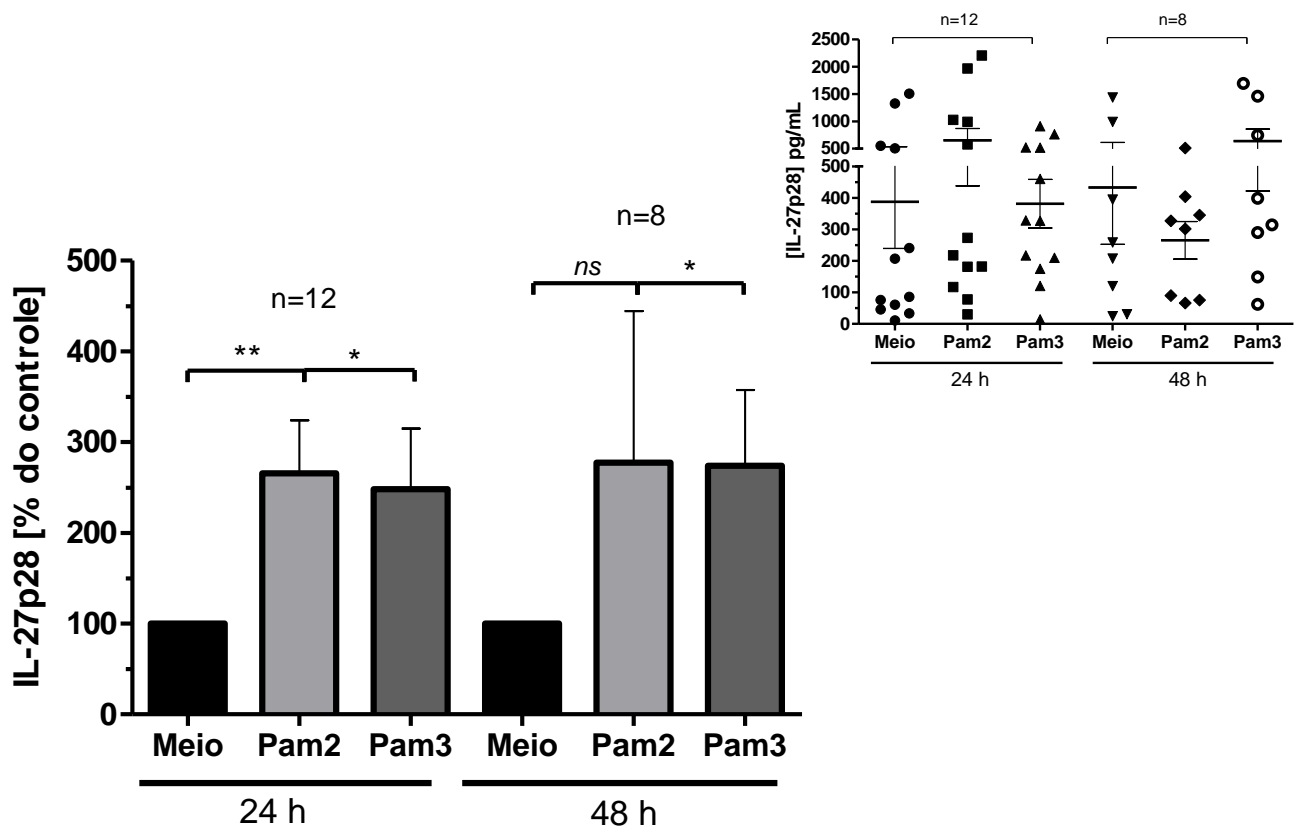


Figura 11. Produção de IL-27p28 por macrófagos humanos tratados com ligantes de TLR2. Macrófagos foram tratados com Pam2CSK4 (ligante do dímero TLR2/TLR6; 1µg/mL) ou Pam3CSK4 (ligante do dímero TLR2/TLR1; 1µg/mL) por 24 ou 48 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos para avaliação da produção de IL-27p28 por ELISA (fabricante do kit: R&D Systems), e os níveis de IL-27p28 são mostrados em relação à produção por células mantidas em meio de cultura (figura no detalhe: a produção de IL-27p28 é mostrada em números absolutos).

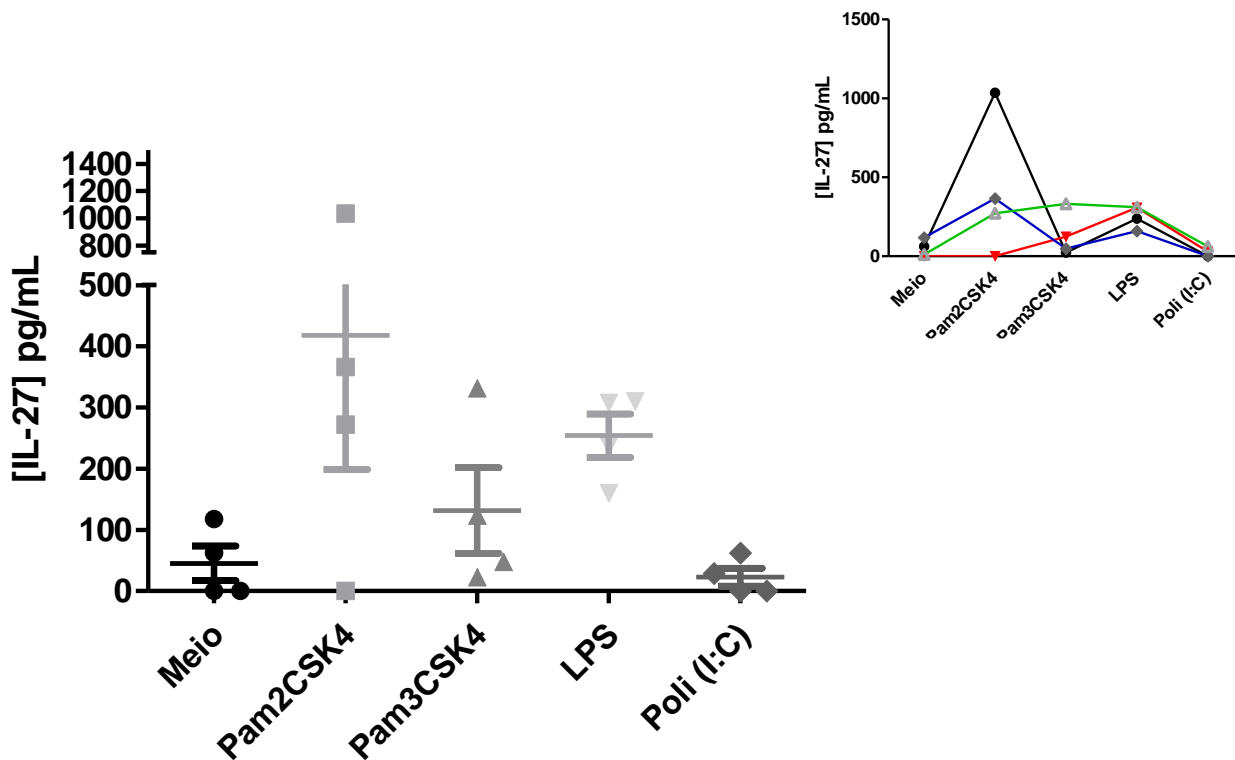


Figura 12. Produção de IL-27 por macrófagos humanos tratados com ligantes de TLR. Macrófagos foram tratados com Pam2CSK4 (ligante do dímero TLR2/TLR6; 1 μ g/mL), Pam3CSK4 (ligante do dímero TLR2/TLR1; 1 μ g/mL), LPS (ligante de TLR4; 10ng/mL) ou Poli (I:C) (ligante de TLR3; 10 μ g/mL) por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos para avaliação da produção de IL-27 por ELISA (fabricante do kit: eBioscience). Figura no detalhe: resposta de cada doador aos estímulos utilizados.

Uma vez estabelecido que macrófagos primários humanos produzem IL-27p28 quando tratados com ligantes de TLR2, resolvemos investigar se a produção dessa citocina participa da inibição da replicação do HIV-1 promovida pela ativação deste receptor. Para tanto, células infectadas com HIV-1 e tratadas com ligantes de TLR2 foram expostas a anticorpos bloqueadores de IL-27 (ou ao isotipo controle), e 14 dias após a infecção os níveis da proteína p24 do HIV no sobrenadante das culturas foram medidos. Ressaltamos que, de acordo com o fabricante, este anticorpo policlonal é capaz de reagir com tanto a molécula íntegra de IL-27 quanto as subunidades p28 ou EBI3 isoladas. De acordo com os resultados mostrados na figura 13, ambos os ligantes de TLR2 inibiram a replicação do HIV-1, como nós descrevemos em Victoria *et al.*, 2013. A adição do anticorpo neutralizante anti-IL-27 aos macrófagos infectados e tratados com os ligantes de TLR2 reverteu o efeito anti-HIV-1 de ambos os agonistas de TLR2, resultado que sugere que a IL-27 (se presente na cultura) ou uma das suas subunidades (ou ambas) participam do efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 induzida pela ativação de TLR2.

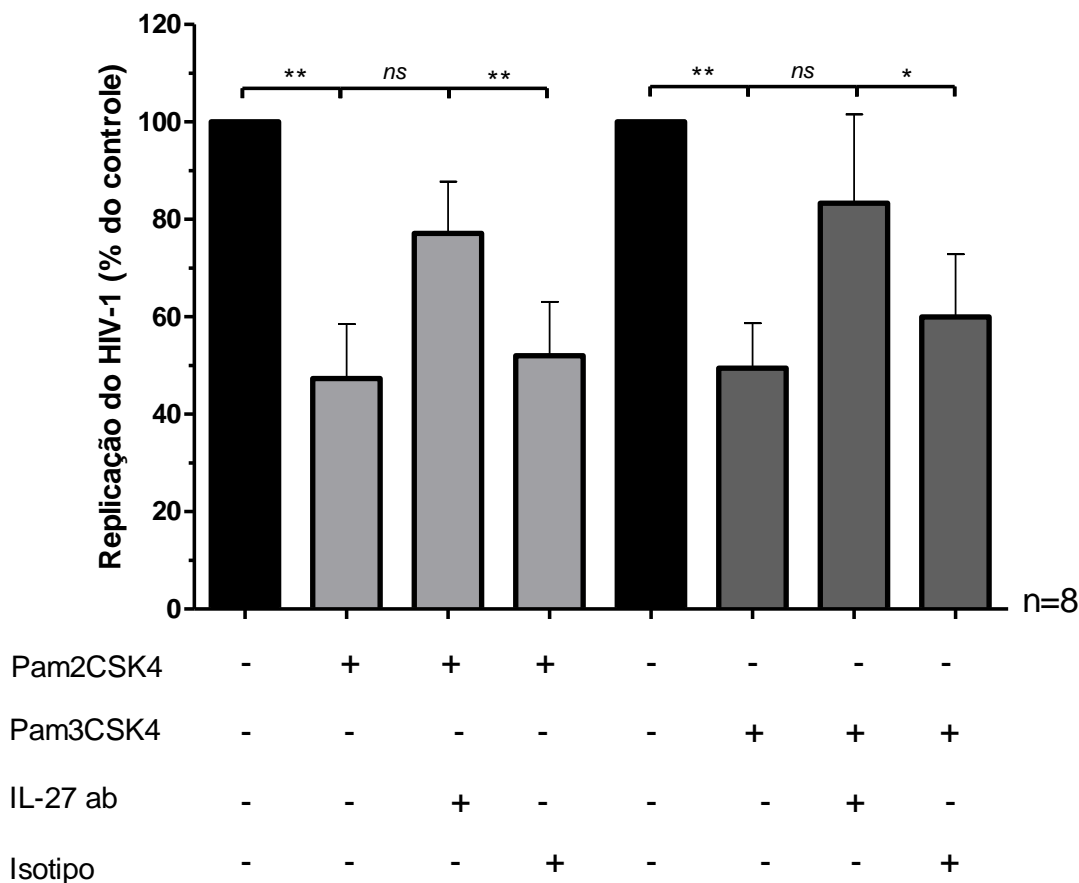


Figura 13. Atividade da IL-27 e ou das suas subunidades na inibição do HIV-1 induzida pela ativação de TLR2. Macrófagos humanos infectados com HIV-1 foram tratados com ligantes de TLR2 e expostos a anticorpos bloqueadores da IL-27 e de suas subunidades, ou ao isotipo controle, após 5 dias de infecção. O sobrenadante das culturas foi recolhido 14 dias após a infecção para avaliação dos níveis de p24 do HIV-1 por ELISA. A replicação viral é mostrada em relação à produção de HIV-1 por macrófagos mantidos apenas em meio de cultura (controle: 3447,65 pg/mL)

Como os nossos resultados mostram que a ativação de TLR2 resulta na queda da replicação do HIV-1 (Victoria *et al.*, 2013; estudos do presente trabalho), resolvemos estudar a via de sinalização dependente de MyD88, uma das mais bem descritas após a ligação de TLR2. Para tanto, macrófagos foram infectados e tratados com ligantes de TLR2 e expostos a um peptídeo inibidor de MyD88, e a replicação do HIV-1 foi avaliada 14 dias após a infecção, como descrito anteriormente. Como pode ser visto na figura 14, o tratamento com ambos ligantes de TLR2 usados no presente trabalho inibiu a replicação do HIV-1, e a inibição viral promovida por Pam2CSK4 foi quase totalmente revertida na presença do peptídeo inibidor de MyD88. No entanto, a redução do crescimento viral promovida por Pam3CSK4 não se modificou quando a molécula MyD88 foi bloqueada (figura 14). Esses achados sugerem que a sinalização induzida pela ativação de TLR2, e que resulta na inibição da replicação do HIV-1, pode, ou não, ser dependente de MyD88, de acordo com o dímero ativado, isto é, a sinalização oriunda da ativação do dímero TLR2\TLR6 seria dependente da

molécula adaptadora MyD88, enquanto a sinalização resultante da ativação do dímero TLR2\TLR1 seria independente desta molécula.

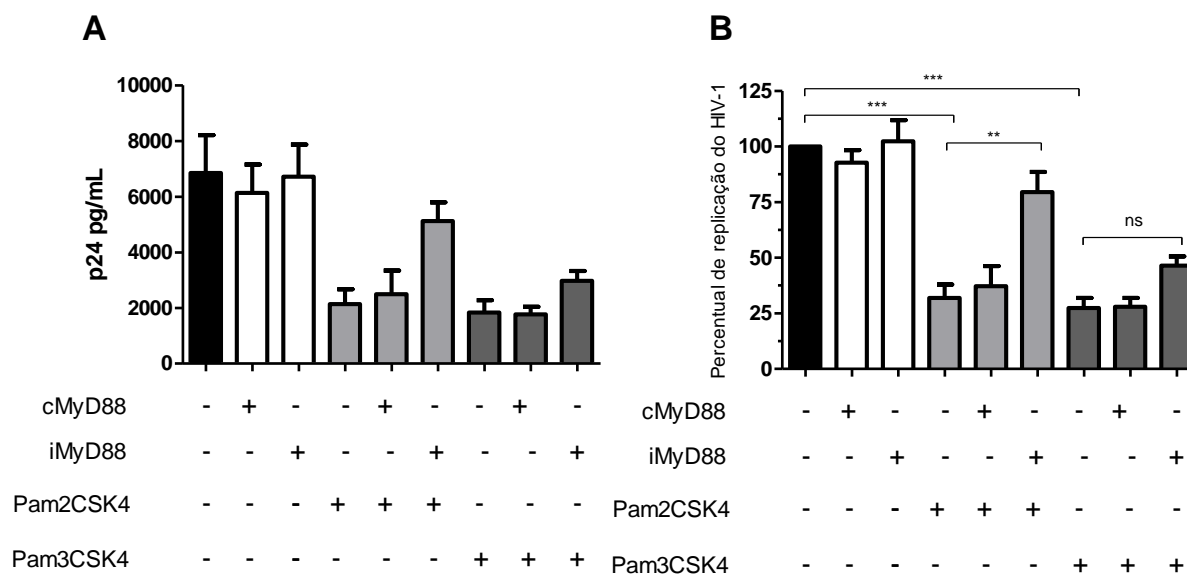


Figura 14. Participação de MyD88 na inibição do HIV-1 induzida por ativação de TLR. Macrófagos foram infectados com HIV-1 e tratados com ligantes de TLR2 e o peptídeo inibidor de MyD88 (40uM) (ou o peptídeo controle), após 5 dias de infecção. O sobrenadante das culturas foi recolhido 14 dias após para a quantificação da replicação do HIV-1, pela dosagem dos níveis do antígeno p24 do HIV-1, por ELISA. Fig. A: valores absolutos de p24; Fig. B: replicação viral em relação à produção de HIV-1 por macrófagos mantidos apenas em meio de cultura (controle = 6856,75 pg/mL)

Tendo em vista a nossa hipótese inicial de que a ativação de TLR2 poderia induzir a síntese de IL-27, a qual, por sua vez, possui um *crossstalk* com Interferon tipo 1 que resulta na ativação de fatores inatos de restrição ao HIV-1 (Wahl *et al.*, 2009), verificamos se macrófagos tratado com Pam3CSK4 produziram quantidades elevadas de Interferon- β e APOBEC3G e 3F. Contrariamente à nossa hipótese inicial e, no entanto, de acordo com os resultados que obtivemos (não produção de IL-27 após ativação de TLR2), a exposição de macrófagos a Pam3CSK4 não estimulou aumento da expressão de Interferon tipo 1, APOBEC3G nem APOBEC3F (figura 15). Como esperado, o ligante de TLR3 Poli (I:C), usado como controle positivo, foi capaz de induzir o aumento da expressão dos genes analisados.

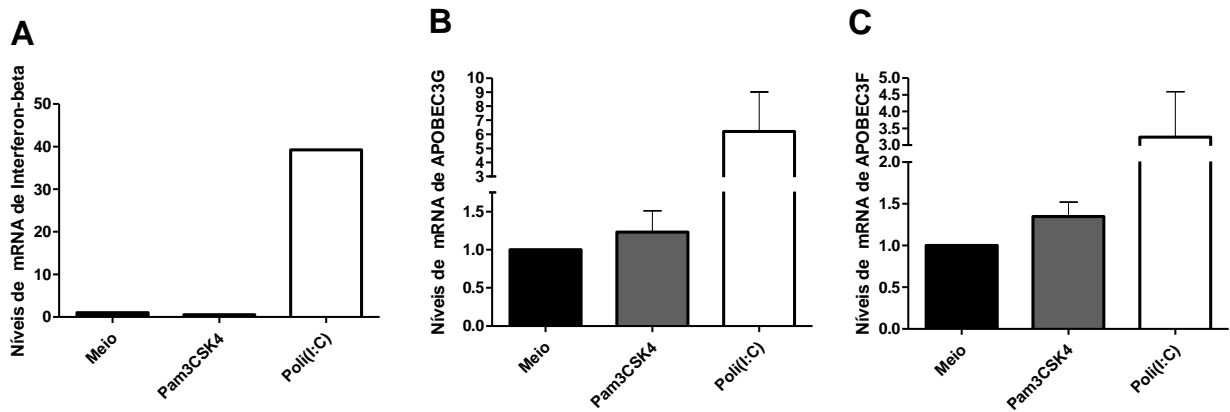


Figura 15. Expressão dos níveis de mRNA de IFN-beta e de APOBEC3G ou 3F em macrófagos tratados com agonistas de TLR2 (Pam3CSK4) e TLR3 (Poli [I:C]). Macrófagos foram mantidos em meio de cultura (n = 2) ou tratados com Pam3CSK4 (1ug/mL; n = 2) ou com LPS (10ng/mL; n =2) durante 24 horas. As células foram, então, lisadas para a extração de RNA total e a expressão dos genes IFN- β , APOBEC3G e 3F foi analisada por qPCR, como descrito em Material e Métodos. A análise dos resultados foi realizada pelo cálculo do $\Delta\Delta ct$ das amostras.

Em virtude dos resultados obtidos que mostram que a ativação de TLR2 induz o aumento da expressão do RNA de ambas as subunidades da IL-27, que, no entanto, aparentemente, não se associam para formar o dímero EBI3/p28 que constitui a IL-27, entendemos que seria importante investigar a expressão de outras subunidades que compõem demais citocinas da família da IL-12. Assim analisamos a expressão da subunidade p35, que se associa a EBI3 para formar a IL-35, e a p40, que se liga à p35 para formar a IL-12 (*veja figura ilustrativa no anexo I*), bem como o mRNA do mediador *Cytokine Like Factor 1* (clf-1), o qual se liga à subunidade p28, após os estímulos com ligantes de TLR2. Vimos que Pam3CSK4 (assim como o LPS, ligante de TLR4) induz o aumento da expressão das subunidades p35 e p40, o que não ocorre com a expressão de CLF-1. Esses resultados sugerem que macrófagos estimulados com Pam3CSK4, assim como LPS, podem produzir citocinas constituídas da associação das subunidades EBI3, p35 e p40 (figura no anexo I), isto é, IL-35 e IL-12. Ainda é possível que o único fator solúvel presente seja a IL-27p28, recentemente denominada IL-30. (Di Meo *et al.*, 2014) Pretendemos, em breve, investigar a presença dessas citocinas no sobrenadante de macrófagos estimulados pelos mesmos ligantes e, também, se estas possuem atividade anti-HIV-1.

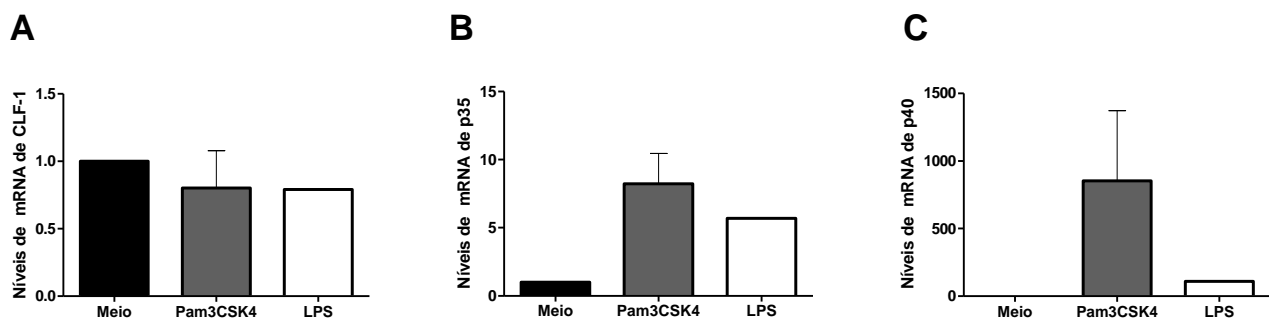


Figura 16. Expressão de CLF-1, p35 e p40 por macrófagos estimulados com ligante de TLR2 (Pam3CSK4) ou TLR4 (LPS). Macrófagos foram mantidos em meio de cultura (n = 3) ou tratados com Pam3CSK4 (1ug/mL; n = 3) ou com LPS (10ng/mL; n =1) durante quatro horas. As células foram, então, lisadas para a extração de RNA total e a expressão dos genes CLF1, p35 e p40 foi analisada por qPCR, como descrito em Material e Métodos. A análise dos resultados foi realizada pelo cálculo do $\Delta\Delta ct$ das amostras.

Discussão

Os receptores tipo *Toll* são componentes do sistema imune inato, presentes em células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos, e também em linfócitos, que respondem a componentes de uma grande variedade de patógenos como vírus, bactérias e fungos (Takeda *et al.*, 2004), assim como padrões moleculares associados ao dano tecidual (Tsai *et al.*, 2014) e regulam determinadas funções como a secreção de fatores solúveis pelas células estimuladas. Neste trabalho damos continuação a estudos prévios de nossa equipe, que demonstraram que a ativação de TLR2 em macrófagos aumenta a resistência destas células à infecção pelo HIV-1, resistência esta mediada por IL-10 e β -quimiocinas (Victoria *et al.*, 2013). No presente estudo, mostramos que a ativação de TLR2 induz a produção da molécula IL-27p28 e que esta citocina está envolvida no fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 induzida por ligantes de TLR2. Mostramos também que a via de MyD88 tem papel importante no efeito anti-HIV-1 induzido pela ativação de TLR2. Assim sendo, acreditamos que nossos estudos auxiliam a compreender o efeito de componentes da imunidade inata na replicação do HIV-1, e sobre a interação deste vírus com as células do hospedeiro, assim como a patogênese da infecção.

O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs desencadeia uma complexa cascata de sinalização intracelular, ativando as células que os expressam. Essa sinalização intracelular resultante da ativação dos TLRs requer diversas moléculas adaptadoras, como MyD88, MAL/TIRAP, TRAM, SARM e TRIF. A sinalização dependente da proteína MyD88 é compartilhada por todos os tipos de TLR, exceto o TLR3 (Takeuchi *et al.*, 2000a). Essa cascata inicia-se com a ativação do próprio MyD88, levando ao recrutamento das enzimas IRAK4, IRAK1, IRAK2 e/ou IRAK-M. Na via de ativação independente da proteína MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o fator de transcrição NF- κ B através de outras duas moléculas adaptadoras, como TRIF e TRAM. A via dependente de TRIF pode também atuar via outros fatores de transcrição (além de NF- κ B) como IRF3, IRF5 ou IRF7, que levam à ativação dos genes que codificam IFN- α / IFN- β (Doyle *et al.*, 2006; revisado por O'Neill, 2008; revisado por Kawai e Akira, 2010).

A ativação de TLR7 ou TLR9, ambos intracelulares e ligados por ácidos nucleicos, induz a produção de Interferon tipo 1 (Crow MK, 2014), citocina que possui atividade antiviral bem conhecida. Entretanto, a ativação de TLR2 não é conhecida como uma das principais formas de aumentar a produção desta citocina (Compton *et al.*, 2003; Bieback *et al.*, 2002; Ming-sheng *et al.*, 2012). Nossos dados com qPCR (figura 15) sugerem que o RNA mensageiro codificante para Interferon não é modulado após o tratamento com o ligante de

TLR2 utilizado (Pam3CSK4). Dessa forma, pensamos que para a inibição do HIV-1 resultante da ativação de TLR2 não inclui o Interferon, mas poderiam incluir a IL-27p28.

Nossos resultados mostram que macrófagos humanos estimulados com dois diferentes ligantes de TLR2 produzem elevados níveis de IL-27p28 (atualmente conhecida como IL-30 [Di Meo *et al.*, 2014]). O composto Pam3CSK4, que se liga ao dímero TLR2/TLR1, parece ter um potencial maior de induzir tal aumento do que o outro ligante usado, o Pam2CSK4, que por sua vez se liga ao dímero TLR2/TLR6. A diferença observada no potencial de indução pode ser devido a essa diferença nos dímeros ativados durante os estímulos.

Nossos estudos mostram que a adição de anticorpos bloqueadores da atividade biológica de fatores solúveis que possuem na sua estrutura as subunidades p28 ou EBI3 reverte o efeito inibitório do HIV-1 desencadeado pela ativação de TLR2. Tais citocinas poderiam ser a própria IL-27, a IL-27p28 (IL-30) ou a IL-35. Portanto, de acordo com este resultado, estas citocinas participam, isoladamente ou em conjunto, do efeito anti-HIV-1 induzido por TLR2. Tendo em vista que a citocina IL-27 não foi detectada no sobrenadante dos macrófagos estimulados por TLR2, as citocinas IL-30 e IL-35 constituem os principais candidatos para a inibição do HIV-1 observada. A definição do fator com a atividade inibitória do HIV-1 dependerá de análises para identificar e neutralizar a ação da IL-35. Dados publicados pelo nosso grupo podem complementar tais achados já que mostram que IL-10 também está envolvida na atividade anti-HIV-1 induzida por ativação de TLR2 supracitada e que a exposição à IL-27 induz a produção de IL-10 (Victoria *et al.*, 2013).

Considerando o resultado obtido com a inibição de MyD88 em nosso modelo, podemos supor que, por mais que em ambas as situações, TLR2 seja ativado, a sinalização resultante depende fortemente do dímero formado (TLR2/1, TLR2/6). Nos trabalhos clássicos sobre a via de sinalização de TLRs, MyD88 foi descrito como um fator compartilhado pelos principais TLRs descritos e como proteína-chave no processo de sinalização (Takeuchi *et al.*, 2000a). Porém, trabalhos recentes mostram que, dependendo do ligante, concentração, e tipo celular, outras moléculas adaptadoras são recrutadas concomitantemente ou no lugar de MyD88 (Stockinger *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013), as quais são recrutadas através do domínio TIR presente na região citosólica dos TLRs. Assim, até o momento são descritas MyD88, TRAM, MAL/TIRAP, TRIF e SARM como proteínas adaptadoras responsáveis pela transdução e modulação do estímulo via TLRs. TLR2, basicamente, depende de MyD88 e MAL/TIRAP e, diferentemente de TLR4, ainda não estão descritas sinalizações oriundas da ativação de TLR2 totalmente independentes de MyD88 (Li *et al.*, 2013). Porém, os principais trabalhos sobre as vias de TLR2 utilizam um ligante apenas, de forma que estudos específicos

sobre a sinalização deste receptor com ligantes diversos são necessários para melhor compreender a participação e recrutamento das moléculas adaptadoras.

A literatura mostra que não apenas TLR2, TLR1 ou TLR6 interagem após estímulo com Pam2CSK4 ou Pam3CSK4, ambos os ligantes são reconhecidos também por correceptores como MD2, CD36 e CD14, interagindo e modulando a dimerização de TLR2 com TLR1/TLR6 (Li *et al.*, 2013). Dessa forma é possível que a interação com diferentes correceptores e, por consequência, alterações espaciais na conformação dos domínios intracelulares dos dímeros de TLR2, possa resultar no recrutamento diferenciado de proteínas adaptadoras, alterando assim a respostas frente ao estímulo inicial. Tal fenômeno explicaria a diversidade de resultados encontrados por diversos autores, tal como nós, no que tange a dependência de MyD88.

Considerando que a p28 participa também na formação de outras citocinas da família da IL-12, além de existir na forma monomérica, atuando como um inibidor da própria IL-27, resolvemos avaliar novamente a produção da IL-27 em nosso modelo, utilizando um kit de detecção com especificidade exclusiva para a IL-27 *per se*, isto é, um kit com especificidade para o dímero EBI3/p28. Dessa forma, para o próximo passo, os ligantes de TLR2 descritos previamente Pam2CSK4 e Pam3CSK4, assim como o ligante de TLR4 LPS e o ligante de TLR3 Poli (I:C) foram avaliados quanto à sua capacidade de promover a produção da citocina IL-27 por macrófagos primários humanos após 24 horas de tratamento. Os dados apresentados sugerem que, nem Pam2CSK4 e nem Pam3CSK4 ou LPS foram capazes de induzir o aumento da produção de IL-27 por macrófagos após 24 horas de tratamento (figura 12).

Durante as análises da produção de IL-27 tanto pelo kit da R&D (IL-27p28), quanto pelo kit da eBioscience (IL-27p28/EBI3) nos deparamos com variações frequentes em ambos, independente do agonista utilizado, considerando o “n” total dos experimentos. Dentre as hipóteses que formulamos para explicar esse fenômeno (excluindo questões técnicas e de integridade amostral), com base na literatura existente, consideramos que a pluralidade de polimorfismos em ambos os genes das cadeia de IL-27 possa explicar tais variações, tanto na produção basal (meio) quanto nos agonistas Pam2CSK4 e Pam3CSK4, além dos controles Poli (I:C) e LPS, considerando que tais polimorfismos podem resultar em diferentes níveis de produção basal e frente a um estímulo (Zicca *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2012). Em relação a esses controles, salientamos que na época da elaboração e realização dos experimentos deste trabalho, optamos, baseados nos dados da literatura, em utilizar ambos Poli (I:C) e LPS como controles positivos da produção de IL-27. Porém, com o conhecimento de que a subunidade p28 é parte integrante de outras citocinas e é capaz de existir e atuar isoladamente, reconsideramos a escolha destas moléculas como controles, de

forma a interpretá-las como variáveis no nosso estudo; já que na maioria dos trabalhos nos quais nos baseamos, tanto Poli (I:C) quanto LPS são descritos modulando a produção da subunidade p28 apenas, fato considerado pelos autores e por nós (na época) como a evidência da modulação da própria IL-27. Dentre os trabalhos que mostram que tais ligantes modulam ambas as cadeias de IL-27, ressaltamos o de Johnson e colaboradores (2011), no qual os autores encontram quantidades elevadas de ambas as cadeias p28 e EB13, à nível de mRNA e proteína. Todavia, incluindo este estudo, os trabalhos que descrevem a indução de IL-27 (IL-27p28 apenas ou ambas as subunidades) por LPS e Poli (I:C) foram, em sua maioria, realizados em modelos murinos (células dendríticas, macrófagos, e/ou linhagens), o que também implica e justifica um possível não-parallelismo com os resultados obtidos em nosso estudo, no modelo de macrófagos humanos.

Em trabalhos prévios do nosso grupo (Victoria *et al.*, 2013) mostramos que a ativação de TLR2 em macrófagos infectados pelo HIV-1 resulta na inibição da replicação viral. Além disso, diversos autores já demonstraram também que LPS é capaz de induzir Interferon-alfa/beta via TLR4 (Sheikh *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014; Samarajiwa *et al.*, 2014). Considerando que esta molécula é um importante fator anti-viral com atividade inibitória conhecida sobre o HIV-1, nos dedicamos a avaliar se, em nosso modelo, a ativação de TLR2 poderia induzir a produção de Interferon-beta, o que poderia sugerir parte do mecanismo de inibição da replicação do HIV-1. Junto a isso, analisamos também a expressão de *interferon-stimulated genes (ISGs)* com ação anti-HIV-1 já descrita em macrófagos. Entretanto, em nosso estudo não encontramos variações significativas na expressão de Interferon-beta e dos ISGs selecionados (APOBEC3F, APOBEC3G) quando na presença de Pam3CSK4. A indução da expressão de IFN tipo 1 após a ativação de TLR2 é controversa na literatura. Por exemplo, Barbalat *et al* (2009) viram que células derivadas da medula óssea de camundongos produzem Interferon-alfa quando expostas ao vírus vaccínia, mas não quando tratadas com agonista de origem bacteriana. Coincidentemente, o agonista de origem bacteriana usado por estes autores (Pam3CSK4) foi o mesmo que nós utilizamos em nossos estudos, o que, de certa forma, corrobora os nossos resultados sobre a não expressão de IFN- β por macrófagos tratados com este ligante. Por outro lado, Dietrich *et al* (2010) relatam que macrófagos murinos derivados da medula óssea foram capazes de produzir IFN quando ativadas com Pam3CSK4, o que está em franco contraste com o nossos resultados. A diferença dos nossos resultados para aqueles descritos por Dietrich *et al* (2010) poderia ser explicada em função da distinta origem das células que foram alvo dos ligantes (humanas *versus* murinas), ou, ainda, o tempo ótimo de estimulação (Diethich *et al*, seis horas, neste estudo, 24 hs). Para dirimir pelo menos a dúvida sobre o tempo de exposição das células aos

ligantes de TLR2, realizaremos novas análises, nas quais os macrófagos serão expostos aos agonistas de TLR2 durante tempos mais precoces, mais próximos daqueles descritos por Dietrich *et al.*

Conclusão

Nossos resultados mostram que a subunidade p28 da citocina IL-27 (atualmente designada como IL-30) participa da atividade anti-HIV-1 resultante da ativação de TLR2 em macrófagos. Nossos dados nos permitem concluir, também, que a IL-27 não está implicada neste fenômeno. Entendemos, ainda, que a IL-35, formada pela associação das subunidades EB13 e p35, cuja atividade biológica pode ser neutralizada por anticorpos anti-IL-27 (como o usado neste trabalho), possa também contribuir para o efeito anti-HIV-1 de TLR2. Esta possibilidade necessita comprovação através da detecção da IL-35 nos sobrenadante de cultura de macrófagos ativados com os ligantes de TLR2 utilizados neste estudo.

Perspectivas

Nosso estudo abre perspectivas de novas investigações relacionadas ao efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 resultante da ativação de TLR2 em macrófagos infectados. Por exemplo, achamos importante avaliar se a ação inibitória do HIV-1 promovida por IL-10 é dependente de IL-27p28, tendo em vista que a síntese de IL-10 é regulada por esta última citocina. De maneira semelhante, será importante investigar se macrófagos expostos a ligantes de TLR2 também produzem IL-35, e se esta citocina também é dotada de atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1.

Referências

Akira S, Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35(9):555-62.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4):783-801.

Al-Sammak F, Kalinski T, Weinert S, Link A, Wex T, Malfertheiner P. Gastric epithelial expression of IL-12 cytokine family in *Helicobacter pylori* infection in human: is it head or tail of the coin? *PLoS One*. 2013 Sep 17;8(9):e75192. doi: 10.1371/journal.pone.0075192. eCollection 2013.

Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, *et al*. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2007a;195(10):1452-60.

Alter G, Suscovich TJ, Teigen N, Meier A, Streeck H, Brander C, *et al*. Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol*. 2007b;178(12):7658-66.

An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet*. 2010 Mar;26(3):119-31. doi: 10.1016/j.tig.2010.01.002. Epub 2010 Feb 10.

Bailer RT, Lee B, Montaner LJ. IL-13 and TNF-alpha inhibit dual-tropic HIV-1 in primary macrophages by reduction of surface expression of CD4, chemokine receptors CCR5, CXCR4 and post-entry viral gene expression. *European journal of immunology*. 2000;30(5):1340-9.

Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol*. 2009 Nov;10(11):1200-7. doi: 10.1038/ni.1792. Epub 2009 Oct 4.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, *et al*. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-7.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al*. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.

Benito JM, Lopez M, Martin JC, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, *et al*. Differences in cellular activation and apoptosis in HIV-infected patients receiving protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18(18):1379-88.

Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009; 113(7):1399-407.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, *et al*. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382(6594):829-33.

- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68(9):6103-10.
- Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol.* 1994;68(9):6006-13.
- Brackenridge S, Evans EJ, Toebes M, Goonetilleke N, Liu MK, di Gleria K, *et al.* An early HIV mutation within an HLA-B*57-restricted T cell epitope abrogates binding to the killer inhibitory receptor 3DL1. *J Virol.* 2011;85(11):5415-22.
- Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, *et al.* T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol.* 2004;78(3):1160-8.
- Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006a;7(3):235-9.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006b;12(12):1365-71.
- Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2008;3(3):356-61.
- Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 1998;93(5):681-4.
- Chang JJ, Altfeld M. Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl 2:S297-301.
- Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR, *et al.* Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature.* 1985;317(6035):366-8.
- Clavel F, Brun-Vezinet F, Guetard D, Chamaret S, Laurent A, Rouzioux C, *et al.* [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie.* 1986;302(13):485-8.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995;270(5243):1811-5.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
- Coulomb-L'Hermine A, Larousserie F, Pflanz S, Bardel E, Kastelein RA, Devergne O. Expression of interleukin-27 by human trophoblast cells. *Placenta.* 2007;28(11-12):1133-40.
- Crabe S, Guay-Giroux A, Tormo AJ, Duluc D, Lissilaa R, Guilhot F, *et al.* The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol.* 2009;183(12):7692-702.

- Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, *et al.* Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*. 1985;228(4704):1201-4.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-4.
- Di Meo S, Airoidi I, Sorrentino C, Zorzoli A, Esposito S, Di Carlo E. Interleukin-30 expression in prostate cancer and its draining lymph nodes correlates with advanced grade and stage. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 1;20(3):585-94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2240. Epub 2013 Nov 25.
- Dietrich N, Lienenklaus S, Weiss S, Gekara NO. Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLoS One*. 2010 Apr 20;5(4):e10250. doi: 10.1371/journal.pone.0010250.
- Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, *et al.* HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*. 2004;21(6):757-68.
- Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, *et al.* Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol*. 2001;167(11):6663-8.
- Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(9):1102-13.
- Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, *et al.* Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol*. 2005;174(7):4407-14.
- Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;10(4):279-90. doi:10.1038/nrmicro2747.
- Essex M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Advances in virus research*. 1999;53:71-88.
- Estes J, Baker JV, Brenchley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, *et al.* Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis*. 2008;198(4):456-64.
- Fakruddin JM, Lempicki RA, Gorelick RJ, Yang J, Adelsberger JW, Garcia-Pineres AJ, Pinto LA, Lane HC, Imamichi T. Noninfectious papilloma virus-like particles inhibit HIV-1 replication: implications for immune control of HIV-1 infection by IL-27. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1841-9. Epub 2006 Oct 26.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):865-7.

- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Betts RF, Popovic M. Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1986;256(17):2365-71.
- Gessani S, Puddu P, Varano B, Borghi P, Conti L, Fantuzzi L, *et al*. Role of endogenous interferon-beta in the restriction of HIV replication in human monocyte/macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 1994;56(3):358-61.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, *et al*. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*. 1999;179(4):859-70.
- Goujon C, Moncorge O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, *et al*. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013;502(7472):559-62.
- Greenwell-Wild T, Vázquez N, Jin W, Rangel Z, Munson PJ, Wahl SM. Interleukin-27 inhibition of HIV-1 involves an intermediate induction of type I interferon. *Blood*. 2009 Aug 27;114(9):1864-74.
- Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression. *Research in virology*. 1991;142(2-3):233-8.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med*. 2002;8(4):319-23.
- Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, *et al*. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003;77(21):11708-17.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988; 52(2):269-79.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.
- Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, *et al*. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med*. 1999;5(1):83-9.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011;25(5):679-89.
- Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989;339(6223):389-92.

Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(2):143-51.

Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 1990;345(6273):356-9.

Hwang SH¹, Cho HK², Park SH³, Lee W³, Lee HJ³, Lee DC¹, Oh JH¹, Park SH⁴, Kim TG⁵, Sohn HJ⁶, Kang JM¹, Kim SW⁴. Toll like receptor 3 & 4 responses of human turbinate derived mesenchymal stem cells: stimulation by double stranded RNA and lipopolysaccharide. *PLoS One*. 2014 Jul 8;9(7):e101558. doi: 10.1371/journal.pone.0101558. eCollection 2014.

Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, *et al*. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(17):6768-72.

Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *Journal of virology*. 2000;74(3):1234-40.

Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, *et al*. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis*. 2009;199(8):1177-85.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-82.

Jin MS, Lee JO. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008; 29(2):182-91.

Johnson J, Molle C, Aksoy E, Goldman M, Goriely S, Willems F. A conventional protein kinase C inhibitor targeting IRF-3-dependent genes differentially regulates IL-12 family members. *Mol Immunol*. 2011 Jul;48(12-13):1484-93. doi: 10.1016/j.molimm.2011.04.006. Epub 2011 May 7.

Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998;339(1):33-9.

Kanda N, Watanabe S. IL-12, IL-23, and IL-27 enhance human beta-defensin-2 production in human keratinocytes. *Eur J Immunol*. 2008 May;38(5):1287-96.

Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 2009; 31(6):873-84.

Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, *et al*. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1246-54.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5):373-84.

Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Reviews in medical virology*. 2003;13(1):39-56.

Killian MS, Johnson C, Teque F, Fujimura S, Levy JA. Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8⁺ T cells. *J Virol*. 2011;85(4):1696-705.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, *et al*. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994;68(7):4650-5.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621-5.

Lee JK, Stewart-Jones G, Dong T, Harlos K, Di Gleria K, Dorrell L, *et al*. T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J Exp Med*. 2004;200(11):1455-66.

Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med*. 2003;9(7):861-6.

Li J, Lee DS, Madrenas J. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol*. 2013 Oct 28;4:347. doi: 10.3389/fimmu.2013.00347.

Lima RG, Van Weyenbergh J, Saraiva EM, Barral-Netto M, Galvão-Castro B, Bou-Habib DC. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J Infect Dis*. 2002 Jun 1;185(11):1561-6. Epub 2002 May 17.

Liu J, Guan X, Tamura T, Ozato K, Ma X. Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(53):55609-17.

Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(1):141-52.

Maaser C, Egan LJ, Birkenbach MP, Eckmann L, Kagnoff MF. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 and other interleukin-12-related molecules by human intestinal epithelium. *Immunology*. 2004;112(3):437-45.

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):11-23.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388(6640):394-7.

- Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, *et al.* MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol.* 2007;81(15):8180-91.
- Moanna A, Dunham R, Paiardini M, Silvestri G. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire? *Curr HIV/AIDS Rep.* 2005;2(1):16-23.
- Molle C, Nguyen M, Flamand V, Renneson J, Trottein F, De Wit D, *et al.* IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J Immunol.* 2007;178(12):7607-15.
- Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *The Journal of general virology.* 1994;75 (Pt 12):3393-400.
- Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* 1997a;71(5):3734-41.
- Moog C, Spenlehauer C, Fleury H, Heshmati F, Saragosti S, Letourneur F, *et al.* Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997b;13(1):19-27
- Moore JP, Trkola A, Korber B, Boots LJ, Kessler JA, 2nd, McCutchan FE, *et al.* A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *J Virol.* 1995;69(1):122-30.
- Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chougnet CA. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol.* 2009;83(24):12925-33.
- Naif HM, Chang J, Ho-Shon M, Li S, Cunningham AL. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in differentiating monocytes by interleukin 10 occurs in parallel with inhibition of cellular RNA expression. *AIDS research and human retroviruses.* 1996;12(13):1237-45.
- Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol.* 2010;20(2):77-92.
- Nasr N, Maddocks S, Turville SG, Harman AN, Woolger N, Helbig KJ, *et al.* HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production. *Blood.* 2012;120(4):778-88.
- Nazli A, Chan O, Dobson-Belair WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, *et al.* Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000852.
- Neil S, Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(9):569-80.

Oliveira LS, de Queiroz NM, Veloso LV, Moreira TG, Oliveira FS, Carneiro MB, Faria AM, Vieira LQ, Oliveira SC, Horta MF. A defective TLR4 signaling for IFN- β expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to C57BL/6. *PLoS One*. 2014 Jun 9;9(6):e98913. doi: 10.1371/journal.pone.0098913. eCollection 2014.

O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of Toll-like receptor signal transduction. *Immunity*. 2008; 29(1):12-20.

Paiardini M, Frank I, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Rev*. 2008;10(1):36-46.

Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annual review of immunology*. 1995;13:487-512.

Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, Bussi P, *et al*. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS*. 1989;3(10):625-30.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271(5255):1582-6.

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, *et al*. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*. 2002;16(6):779-90.

Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*. 6. United States 2005. p. 430-2.

Pirhonen J, Sirén J, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007 Nov;82(5):1185-92. Epub 2007 Aug 7.

Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, *et al*. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(1):151-8.

Poli G, Kinter AL, Fauci AS. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994a;91(1):108-12.

Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral research*. 1994b;24(2-3):221-33.

Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology*. 1998;52:491-532.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science*. 1998; 282(5396):2085-8.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1988;242(4882):1168-71.
- Quesniaux V, Quesniaux C, Fremond M, Jacobs S, Parida D, Nicolle V, Yermeev F, Bihl F, Erard T, Botha M, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*. 2004; 6(10):946-59.
- Roport C, Gazzinelli RT. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin Res*. 2004; 10(6):425-30.
- Regis EG, Barreto-de-Souza V, Morgado MG, Bozza MT, Leng L, Bucala R, Bou-Habib DC. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology*. 2010 Mar 30;399(1):31-8. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.018. Epub 2010 Jan 20.
- Remoli ME, Gafa V, Giacomini E, Severa M, Lande R, Coccia EM. IFN-beta modulates the response to TLR stimulation in human DC: involvement of IFN regulatory factor-1 (IRF-1) in IL-27 gene expression. *European journal of immunology*. 2007;37(12):3499-508.
- Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4144-9.
- Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Arch Virol*. 2009;154(10):1579-88.
- Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, Seo D, Kim J, White TE, Brandariz-Nuñez A, Diaz-Griffero F, Yun CH, Hollenbaugh JA, Kim B, Baek D, Ahn K. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med*. 2014 Aug;20(8):936-41. doi: 10.1038/nm.3626. Epub 2014 Jul 20.
- Saksena NK, Wu JQ, Potter SJ, Wilkinson J, Wang B. Human immunodeficiency virus interactions with CD8+ T lymphocytes. *Curr HIV Res*. 2008;6(1):1-9.
- Samarajiwa SA, Mangan NE, Hardy MP, Najdovska M, Dubach D, Braniff SJ, Owczarek CM, Hertzog PJ. Soluble IFN receptor potentiates in vivo type I IFN signaling and exacerbates TLR4-mediated septic shock. *J Immunol*. 2014 May 1;192(9):4425-35. doi: 10.4049/jimmunol.1302388. Epub 2014 Apr 2.
- Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, *et al*. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1133-9.
- Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg MA, Alber G, Straubinger RK. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *International immunology*. 2005;17(5):649-59.

Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood*. 2005;105(4):1582-9.; Wirtz *et al.* 2005; Greenwell-Wild *et al.* 2009).

Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, *et al.* Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*. 1999;73(12):10489-502.

Sharp PM, Hahn BH. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1552):2487-94.

Sheikh F, Dickensheets H, Gamero AM, Vogel SN, Donnelly RP. An essential role for IFN- β in the induction of IFN-stimulated gene expression by LPS in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2014 Oct;96(4):591-600. doi: 10.1189/jlb.2A0414-191R. Epub 2014 Jul 14.

Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, Asakawa M, Fujita K, Kudo M, Iwakura Y, Takeda Y, Luster AD, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J Immunol*. 2006 Jun 15;176(12):7317-24.

Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *Journal of virology*. 1992;66(3):1321-8.

Souza TM, Rodrigues DQ, Passaes CP, Barreto-de-Souza V, Aguiar RS, Temerozo JR, Morgado MG, Fontes CF, Araujo EG, Bou-Habib DC. The nerve growth factor reduces APOBEC3G synthesis and enhances HIV-1 transcription and replication in human primary macrophages. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2944-52. doi: 10.1182/blood-2010-05-287193. Epub 2011 Jan 7.

Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nature medicine*. 2003;9(7):853-60.

Stockinger S, Duerr CU, Fulde M, Dolowschiak T, Pott J, Yang I, Eibach D, Bäckhed F, Akira S, Suerbaum S, Brugman M, Hornef MW. TRIF Signaling Drives Homeostatic Intestinal Epithelial Antimicrobial Peptide Expression. *J Immunol*. 2014 Oct 15;193(8):4223-34. doi: 10.4049/jimmunol.1302708. Epub 2014 Sep 10.

Strebel K, Luban J, Jeang KT. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med*. 2009;7:48.

Takeda K, Takeuchi O, Akira S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2002; 8(6):459-63.

Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, *et al.* Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol*. 2003;170(10):4886-90.

Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*. 2004; 34(2):73-82.

- Takeuchi, O., Hoshino, K. and Akira, S., TLR-2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 2000a; 165: 5392–5396.
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.* 2000b; 12(1):113-7.
- Tang YJ¹, Wang JL, Nong LG, Lan CG, Zha ZG, Liao PH. Associations of IL-27 polymorphisms and serum IL-27p28 levels with osteosarcoma risk. *Medicine (Baltimore).* 2014 Aug;93(10):e56. doi: 10.1097/MD.0000000000000056.
- Tao YP, Wang WL, Li SY, Zhang J, Shi QZ, Zhao F, Zhao BS. Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12R β 1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Nov;138(11):1891-900. doi: 10.1007/s00432-012-1269-0. Epub 2012 Jun 28.
- Temerozo JR, Joaquim R, Regis EG, Savino W, Bou-Habib DC. Macrophage Resistance to HIV-1 Infection Is Enhanced by the Neuropeptides VIP and PACAP. *PLoS One.* 2013 Jun 20;8(6):e67701. doi: 10.1371/journal.pone.0067701.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003 Nov;19(5):641-4.
- Truong MJ, Darcissac EC, Hermann E, Dewulf J, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in macrophages and in dendritic cells. *Journal of virology.* 1999;73(8):7008-13.
- Tsai SY, Segovia JA, Chang TH, Morris IR, Berton MT, Tessier PA, Tardif MR, Cesaro A, Bose S. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway. *PLoS Pathog.* 2014 Jan;10(1):e1003848. doi: 10.1371/journal.ppat.1003848.
- Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res.* 2003; 9(3):176-80.
- UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Geneva: World Health Organization (WHO), 2013 Contract No.: ISBN 978-92-9173-996-7.
- Verani A, Scarlatti G, Comar M, Tresoldi E, Polo S, Giacca M, *et al.* C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med.* 1997;185(5):805-16.
- Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol.* 2004 Jul 15;173(2):715-20.
- Vogt PK. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY)1997.
- Walker CM, Thomson-Honniebier GA, Hsueh FC, Erickson AL, Pan LZ, Levy JA. CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals inhibit acute infection by human and primate immunodeficiency viruses. *Cell Immunol.* 1991;137(2):420-8.

- Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *Journal of virology*. 1998;72(9):7642-7.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al*. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422(6929):307-12.
- Weissman D, Poli G, Fauci AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS research and human retroviruses*. 1994;10(10):1199-206.
- Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, *et al*. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol*. 2005;174(5):2814-24.
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280(5371):1884-8.
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*. 2004; 40(12):861-8.
- Zhang Z¹, Zhou B, Wu Y, Gao Q, Zhang K, Song Y, Zhang L, Xi M. Prognostic value of IL-27 polymorphisms and the susceptibility to epithelial ovarian cancer in a Chinese population. *Immunogenetics*. 2014 Feb;66(2):85-92. doi: 10.1007/s00251-013-0753-2. Epub 2013 Dec 19.
- Zahoor MA, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima SN, Aida Y. HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8):e106418. doi: 10.1371/journal.pone.0106418. eCollection 2014.
- Zheng YH, Lovsin N, Peterlin BM. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunology letters*. 2005;97(2):225-34.
- Zicca E, Quirino A, Marascio N, Nucara S, Fabiani F, Trapasso F, Perrotti N, Strazzulla A, Torti C, Liberto MC, Focà A. Interleukin 27 polymorphisms in HCV RNA positive patients: is there an impact on response to interferon therapy? *BMC Infect Dis*. 2014;14 Suppl 5:S5. doi: 10.1186/1471-2334-14-S5-S5. Epub 2014 Sep 5.

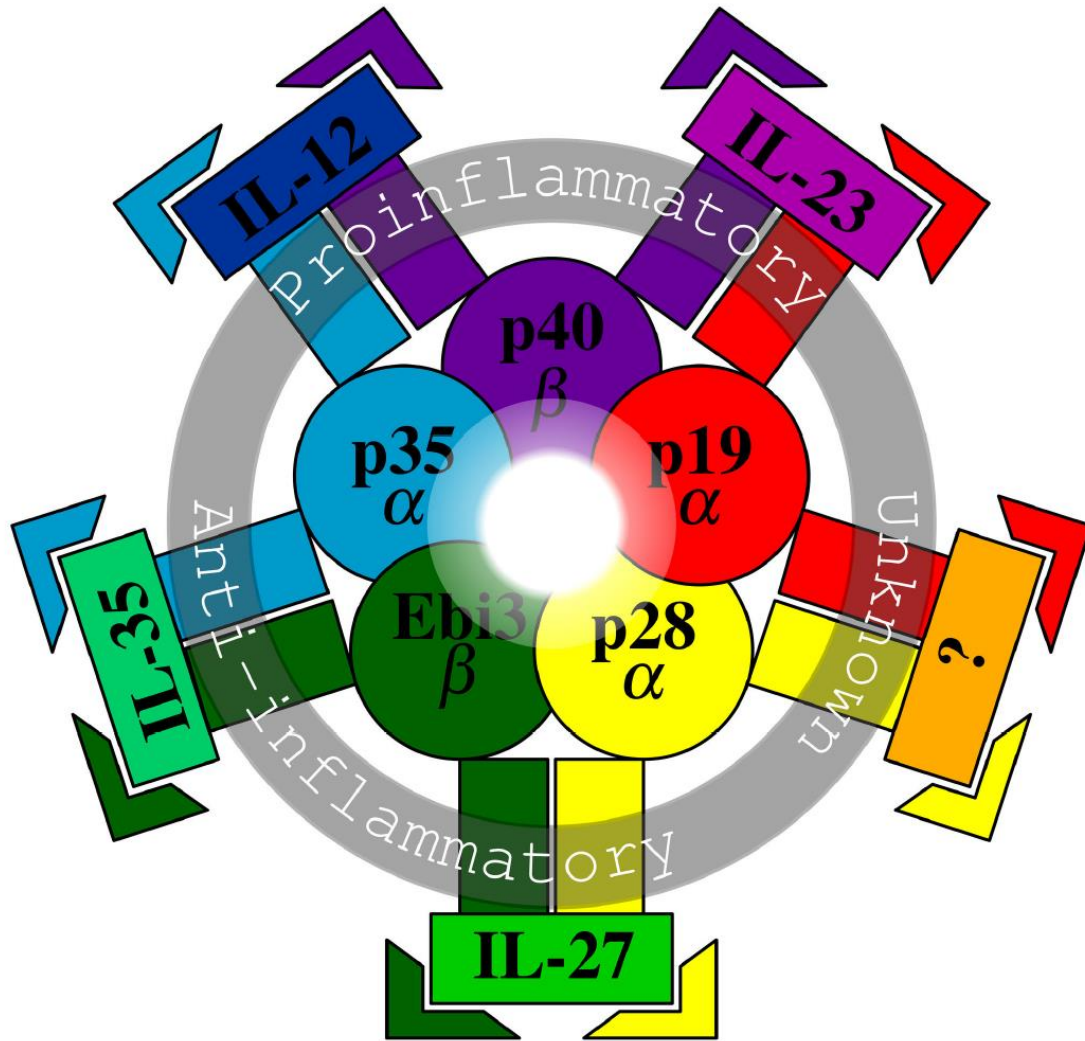


Figure 1. Schematic diagram of IL-12 family. The diagram illustrates the currently known 5 chains (the innermost zone), composite cytokines with their proposed functions (the middle zone), and their receptors (the outermost zone). The five color-coded chains are either α chains (p19, p35, and p28) or β chains (p40 and Ebi3). Each functional cytokine is made of one α and one β chain. IL-12 (p35/p40) is a proinflammatory Th1 activator and stabilizer. Similarly, IL-23 (p19/p40) is a proinflammatory Th1 activator and Th17 stabilizer. On the other hand, IL-27 (p28/Ebi3) is an immunoregulatory cytokine mainly with an anti-inflammatory capacity. IL-35 (p35/Ebi3) is again anti-inflammatory and secreted by Treg cells. Therefore, the four cytokines with their divergent functions can promote a representative model of the immunological spectrum ranging from inflammation to tolerance. The unknown cytokine is a theoretical one and symbolizes the possibility of unraveling other unknown family members in the future. Each chain (p19, p40, p35, Ebi3, p28) binds to its specific receptor (IL23R, IL12RB1, IL12RB2, IL6ST, and IL27RA, respectively) and is coded with the same color of the corresponding chain (receptor names are not shown). Typically, a composite cytokine would require a β chain receptor for high affinity binding and an α chain receptor for signal transduction. For alternative terminology of IL-12 family members refer to Table 1.

Anexo 1. Subunidades das citocinas da família da IL-12 e suas possíveis combinações. Extraído de Al Sammak *et al.*, 2013