

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Victor Barreto de Souza Brasil Silva*

**Co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos: efeito da infecção pelo HIV-1 e da proteína Tat do HIV-1 sobre a replicação parasitária.**

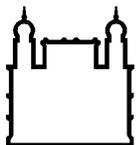
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia

**Orientador (es):** Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Prof. Dra. Elvira Maria Saraiva

**RIO DE JANEIRO**

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***Victor Barreto de Souza Brasil Silva***

Co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos: efeito da infecção pelo HIV-1 e da proteína Tat do HIV-1 sobre a replicação parasitária.

**ORIENTADOR (ES):** Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Prof. Dra. Elvira Maria Saraiva

**Aprovada em: 27/08/2009**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Sérgio Coutinho Furtado de Mendonça – Presidente (IOC - FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Esper Georges Kallás (USP)**

**Prof. Dra. Adriana Cesar Bonomo (INCa/UFRJ)**

**Prof. Dr. Alexandre Morrot (UFRJ)**

**Prof. Dra. Vera Bongertz (IOC – FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2009

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

S586

Silva, Victor Barreto de Souza Brasil.

Co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos :  
efeito da infecção pela HIV-1 e proteína Tat do HIV-1 sobre a replicação  
parasitária / Victor Barreto de Souza Brasil Silva. – Rio de Janeiro, 2009.

xvii, 137 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 106-129

1. HIV. 2. AIDS. 3. Tat. 4. Leishmania. 5. Blastocithidia. 6. TGF-beta.  
7. Ciclo-oxigenase. I. Título.

CDD 614 5993

À minha mãe Izabel Barreto  
quem me ensinou a erguer a cabeça e seguir em frente

## Agradecimentos

Tenho consciência que é impossível trilhar um caminho sozinho e, por esta razão, sempre temi por este momento/seção: Temo em esquecer pessoas essenciais neste longo e “doloroso” processo e também receio em não “agradecer de forma justa” à quem me ajudou arduamente. De ante mão, peço desculpas a quem for esquecido. Prefiro a redação informal e emotiva quando demonstro gratidão.

Ao Dumith Bou-Habib, o orientador desta tese (e também um bom amigo). O Dumith possui duas características importantes na área científica: escutar e incentivar, o que propicia um espaço democrático e engrandecedor profissionalmente. Cabe ressaltar seu imenso esforço para suprir todas as carências materiais (e financeiras) que a política científica brasileira nos prega. E, sem nenhuma dúvida, as qualidades pessoais do Dumith não caberiam nesta tese: seu caráter é marcante e soma-se a vontade de ajudar sempre. Muito obrigado e espero continuar contando com o seu apoio pessoal e profissional.

À Elvira Saraiva, co-orientadora desta tese. Minha amizade com a Elvira (carinhosamente chamada de Elvirex) está completando 14 anos. A longa permanência de nossa amizade já demonstra o imenso respeito que sinto pela Elvirex. Elvira também participou ativamente desta tese, com sugestões valiosas e um grande esforço para suprir com os materiais necessários. Que nossa amizade pessoal e profissional ainda permaneça até o final de nossas vidas...

À Sharon Wahl do National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR) / National Institutes of Health - EUA. Sharon sempre trabalhou em projetos cativantes, seja na patogênese do HIV-1 quanto em linhas de pesquisa envolvendo imunologia básica. Iniciamos uma colaboração que eu acredito ser duradora. Sharon é uma pessoa cativante e muito tranqüila. Devo incluir um agradecimento à equipe do laboratório e do NIDCR (incluindo a administração). Despedi-me de todos com uma imensa festa (com direito a bolo, pizza e cartão), presentes (os quais servirão como lembranças eternas de meu breve momento por lá) e, logicamente, com fotos. Um agradecimento especial à Nancy Vazquez (Nanciiiiiiiiiiiita), Teresa Wild (Tereeeeeeesa), Kaska Wloka (minha companheira em experimentos noturnos), Delma Tyler (a secretária), Wenwen e Larry Wahl. Guardo a lembrança de momentos inesquecíveis.

À Renata Meirelles, a grande responsável pelos experimentos sobre translocação de NF- $\kappa$ B na presença de Tat. Devo mencionar as valiosas sugestões científicas, pela amizade, momentos de descontração e pela cachaça que continuo esperando até hoje. Renata é uma pessoa muito simpática e sempre alegre. Num futuro próximo, espero continuar desenvolvendo diversos projetos em colaboração (quem sabe possamos publicar muito). Cabe notar o auxílio da Teresa para a leitura de luminescência e pela sua grande simpatia. Logicamente o agradecimento estende-se ao Ulisses Lopes, chefe do laboratório e orientador do doutorado da Renata.

À Talita Pagani, pelo amor, carinho e incentivo. Sua ajuda psicológica foi fundamental para a realização dos últimos passos desta tese. Seu companheirismo nos momentos bons e ruins sempre permitiu manter meu astral elevado. Com sua ajuda, fica a minha certeza de que conseguirei superar os momentos delicados de uma pós-tese. Te amo de montão...

À todos os colaboradores dos trabalhos dessa tese: Patrícia Bozza, Hugo Caire, Cristina Motta, Adriana Silva, Graziela Pacheco e Thalyta Medeiros (minha queridíssima amiga). A contribuição científica de todos foi indispensável para a realização desta tese em todos os aspectos.

Aos companheiros da lab pelos momentos de alegria, de discussões científicas e pela divisão de responsabilidades. São eles: Rosângela, Claudio, Joanna Paes, Joana Monteiro, Haynna, Thalyta, Alessandro, Diego (Diegão), Thiago Moreno e Jairo. Um agradecimento especial à Livia Gobbo e ao Eduardo Regis pelos grandes momentos de conversa e apoio pessoal/profissional. Estes amigos foram fundamentais para a realização dessa tese. Também cabe ressaltar o maravilhoso convívio com todos os integrantes do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT) e do Laboratório de Imunologia Clínica, em particular ao Wellington Seguins. Cabe mencionar o auxílio de membros de outros laboratórios do IOC, como Caroline Passaes cujo auxílio para a PCR da 1G5 foi fundamental, e Talita Pagani pela ajuda na correção tipográfica desta tese. Minha irmã Natascha Brasil fez a impressão final desta tese e, portanto, segue meu agradecimento recheado de muito carinho.

À Nitza Gomes que incentivou esta minha carreira e sempre me fez acreditar que eu poderia progredir (pelo menos eu tentei progredir). Mesmo afastada da área científica e também longe espacialmente, os nossos momentos de conversa (cada vez mais remotos) foram marcantes e decisivos para que eu pudesse abraçar a pesquisa biomédica. Não posso esquecer do excepcional pesquisador George dos Reis, pois foi com ele que comecei (ainda na Iniciação Científica) a trilhar este caminho longo.

À Meives Andrade que, embora não tenha participado diretamente na elaboração da tese, sempre me incentivou através de palavras confortantes. Faz 5 anos que a conheço e sei que Meives sempre rezou pelo meu sucesso pessoal/profissional e acredito que ainda continuará torcendo por outros tantos anos. Também aproveito o momento para agradecer ao entusiasmo e apoio da Ingrid Ferreira. Muito obrigado a vocês...

Aos amigos do Colégio Estadual Presidente Bernardes (PB) pelo carinho e força, em especial aos professores Valter, Marilane, Carlinha e Saulo...

À minha tia Astrid Brasil (Tide) pelas longas discussões pessoais as quais sempre abrangiam aspectos profissionais também. Nossas conversas, regadas por sessões de cinema, engrandeceram meu respeito (que já era grande) que cativo por ela. Tenho admiração pois Tide é uma mulher batalhadora (uma característica marcante das mulheres de nossa família) e sinto conforto quando ela demonstra que a recíproca é verdadeira. Devo constar que contei com o abrigo e carinho de sua casa logo após o meu retorno ao Brasil.

À minha mãe, Izabel Barreto. Esta mulher guerreira (de personalidade forte) e obstinada nunca negou uma ajuda a ninguém. O que falar de uma mãe? Com certeza foi você que enxugou minhas lágrimas quando estas correram sobre o meu rosto, assim como foi você quem me fez voltar a sorrir. Só espero nunca te decepcionar. Minha eterna gratidão...

Ao meu pai pelo apoio moral.

À muitos membros da minha família, em especial às minhas irmãs e à minha tia Julieta. Já que diversos parentes e amigos auxiliaram com apoio moral e \$\$\$ (principalmente pós-tese), meu agradecimento será coletivo. Valeu e muitíssimo obrigado. Amo vocês!!!

Agradeço, com antecedência, aos membros da banca pelas valiosas sugestões. Devo enfatizar o trabalho minucioso da Dra Vera Bongertz na revisão desta tese. Muitíssimo obrigado...

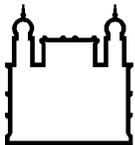
Ao NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, MD, EUA, pela doação da proteína recombinante Tat e soro anti-Tat (além de outros materiais importantes para a realização de outros trabalhos científicos). Devo mencionar que as células primárias foram obtidas do Serviço de Hemoterapia do Hospital Clementino Fraga Filho, UFRJ. Por esta razão, meu sincero obrigado à todos do setor, em especial à Carmen Nogueira (chefe do setor). Agradeço carinhosamente aos fomentadores dos estudos da tese, sem os quais esse trabalho não seria possível: CNPq, PAPES/FIOCRUZ, POM/FIOCRUZ, FAPERJ.

Um agradecimento muito especial aos órgãos que me financiaram com bolsas e auxílios: IOC (pelo período de 3 anos), FAPERJ (bolsa nota 10 por 1 ano), CAPES (bolsa e passagem para o Doutorado Sanduíche, 6 meses), NIDCR/NIH (pelo suplemento da bolsa CAPES, plano de saúde e auxílio-transporte, 6 meses). Esforcei-me para demonstrar que o dinheiro público foi bem empregado (e espero não ter decepcionado). Também agradeço à comissão científica do AIDS Vaccine 06 e 09; International AIDS Society; Sidaction, pelo auxílio (*scholarship*) para participação em congressos internacionais.

## Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	x
Abstract .....	xi
Lista de abreviaturas .....	xii
Introdução .....	1
O Vírus da Imunodeficiência Humana e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida .....	1
Figura 1: Classificações Filogenéticas do HIV-1 .....	3
Figura 2: Representação esquemática de uma partícula viral madura do HIV-1 .....	7
Figura 3: Esquema representando o ciclo replicativo do HIV-1 em linfócito T CD4 <sup>+</sup> .....	13
A infecção de Macrófagos pelo HIV-1 .....	21
Figura 4: Replicação do HIV em Macrófagos .....	28
A Co-Infecção HIV/ <i>Leishmania</i> .....	28
A Co-Infecção HIV/Protozoários monoxênicos .....	35
A Proteína Trans-ativadora do HIV e seus efeitos biológicos .....	39
Objetivos .....	46
Resultados .....	48
Capítulo 1, Artigo 1 .....	48
Figura Suplementar 1.1 (Fig S1.1) .....	58
Figura Suplementar 1.2 (Fig S1.2) .....	59
Figura Suplementar 1.3 (Fig S1.3) .....	60
Figura Suplementar 1.4 (Fig S1.4) .....	61
Capítulo 2, Artigo 2 .....	62
Figura Suplementar 2.1 (Fig S2.1) .....	71
Discussão .....	72

Figura 6: Esquema da ação do Tat na replicação do HIV-1 e da <i>Leishmania</i> .....	89
Conclusões .....	100
Perspectivas .....	102
Referências Bibliográficas .....	106
Apêndice .....	130



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

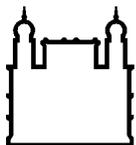
Co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos: efeito da infecção pelo HIV-1 e da proteína Tat do HIV-1 sobre a replicação parasitária

### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

Victor Barreto de Souza Brasil Silva

Protozoários parasitos aparecem como co-patógenos em infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1, resultando em um aumento mútuo na replicação viral e parasitária, e facilitando a progressão clínica de ambas as doenças. Os mecanismos pelos quais o HIV-1 induz um aumento na replicação do protozoário são desconhecidos. Neste trabalho, nós investigamos o papel do HIV-1 e da proteína trans-ativadora (Tat) do HIV-1 no aumento da replicação parasitária em macrófagos humanos primários co-infectados ou não com HIV-1 e *Leishmania amazonensis* ou com HIV-1 e *Blastocrithidia culicis*. Em alguns experimentos, macrófagos foram infectados somente com *L. amazonensis* ou *B. culicis* e expostos à proteína Tat recombinante do HIV-1. As replicações dos protozoários e do HIV-1 foram analisadas por índice endocítico ou ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) para p24, respectivamente. A infecção pelo HIV-1 dobrou a replicação da *Leishmania* em macrófagos, e soro contra o Tat do HIV-1 reduziu significativamente a replicação exacerbada do protozoário, indicando uma importante função desta proteína, a qual é liberada pelas células infectadas com HIV-1, neste processo. Corroborando estes resultados, a exposição de macrófagos infectados somente por *Leishmania* ao Tat recombinante (100 ng/mL) mimetizou a infecção pelo HIV-1. A multiplicação do protozoário diminuiu quando células infectadas por *Leishmania* foram tratadas com Tat na presença de anticorpos neutralizantes contra o Fator de Crescimento e Transformação (TGF)- $\beta$ 1, demonstrando a participação desta citocina no aumento da replicação da *L. amazonensis* em macrófagos. O tratamento com Tat induziu a expressão da enzima Ciclo-oxigenase (COX)-2 e a secreção de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e o bloqueio da produção de PGE<sub>2</sub> aboliu o aumento da replicação da *Leishmania* induzida por Tat. Adição exógena de PGE<sub>2</sub> estimulou o crescimento da *Leishmania* em macrófagos, e a neutralização imune de TGF- $\beta$ 1 abrandou este efeito. Analisados em conjunto, nós concluímos que Tat estimula a replicação da *Leishmania* via indução da síntese de PGE<sub>2</sub> e conseqüentemente secreção de TGF- $\beta$ 1. Para avaliar se a infecção pelo HIV-1 desativa a atividade microbicida do macrófago, células infectadas com HIV-1 foram co-infectadas com um protozoário não patogênico (*Blastocrithidia culicis*), e nós observamos que a infecção pelo HIV-1 favoreceu a sobrevivência deste tripanossomatídeo. Por microscopia eletrônica, nós verificamos que tanto o HIV-1 quanto a *B. culicis* co-habitavam um mesmo macrófago, e que formas em divisão do protozoário podiam ser observadas no interior de macrófagos. De forma similar aos encontrados nos experimentos com *Leishmania*, o Tat ou o TGF- $\beta$ 1 dobraram o crescimento do protozoário em macrófagos infectados somente por *Blastocrithidia*. Em conclusão, nós identificamos, pela primeira vez, uma molécula do HIV-1 que promove a multiplicação de um protozoário patogênico (*Leishmania*), e permite a sobrevivência/crescimento em macrófagos humanos primários de um protozoário habitualmente não patogênico. Uma vez que a neutralização imune do Tat tem sido estudada como uma estratégia de vacinação contra o HIV-1, nossos resultados sugerem que a neutralização desta proteína também pode ser salutar no combate ao protozoário em casos de co-infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos: efeito da infecção pelo HIV-1 e da proteína Tat do HIV-1 sobre a replicação parasitária

### ABSTRACT

#### DOCTORAL THESIS

Victor Barreto de Souza Brasil Silva

Protozoan parasites appear as human immunodeficiency virus (HIV)-1 co-pathogens, resulting in a mutual enhancement of viral and parasite replication, and facilitating the clinical progression of both diseases. The mechanisms by which HIV-1 induces up-modulation of protozoan replication are unknown. In this work, we investigated the role of HIV-1 and HIV-1 transcriptional transactivator (Tat) protein in the enhancement of parasite replication in primary human macrophages co-infected or not with HIV-1. Human macrophages were co-infected with HIV-1 and either with *Leishmania amazonensis* or *Blastocrithidia culicis*. In selected assays, macrophages were infected only with *L. amazonensis* or *B. culicis* and exposed to recombinant HIV-1 Tat protein. Protozoan and HIV-1 replication were analyzed by endocytic index or p24 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), respectively. HIV-1 infection doubled the *Leishmania* replication in macrophages, and Tat antiserum significantly reduced the exacerbated parasite replication, pointing to a direct role of Tat protein released from HIV-1-infected cells in this process. Corroborating this finding, exposure of *Leishmania*-infected macrophages to recombinant Tat (100 ng/mL) mimicked HIV-1 infection. Protozoan replication diminished when *Leishmania*-infected cells were treated with Tat in the presence of neutralizing anti-Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 antibodies, showing a participation of this cytokine in the augmentation of *L. amazonensis* multiplication in macrophages. Interestingly, Tat induced the expression of the enzyme Cyclooxygenase (COX-2) and Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) secretion, and blockage of PGE<sub>2</sub> production abrogated the increased *Leishmania* replication induced by Tat. Exogenous addition of PGE<sub>2</sub> elicited *Leishmania* replication in macrophages, and immunoneutralization of TGF- $\beta$ 1 blunted this effect. Taken together, we deciphered that Tat stimulates *Leishmania* replication via induction of PGE<sub>2</sub> synthesis and consequently TGF- $\beta$ 1 secretion. To evaluate whether HIV-1 infection deactivates the microbicidal activity of macrophages, HIV-1-infected cells were co-infected with a non-pathogenic protozoan (*Blastocrithidia culicis*), and we found that HIV-1 infection favors the survival of this trypanosomatid. By electron microscopy, we verify that both HIV-1 and *B. culicis* co-habited the same macrophage, and that dividing forms of the protozoan can be observed inside the macrophage. Similarly, Tat or TGF- $\beta$ 1 doubled the protozoan growth in *Blastocrithidia*-infected macrophages. In conclusion, we identified, for the first time, an HIV-1 molecule that promotes multiplication of a pathogenic protozoan (*Leishmania*) and permit survival of an otherwise non-pathogenic protozoan in primary human macrophages. Because immunoneutralization of HIV-1 Tat has been studied as a vaccination strategy against HIV-1, our results suggest that neutralization of this protein could be salutary in the combat against the protozoan in the cases of co-infection.

## Lista de Abreviaturas

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- ALK5 – Cinase semelhante ao receptor de Activina 5 (*Activin receptor-Like Kinase 5*)
- AP – Proteína Ativadora (*Activator Protein*)
- APOBEC – Enzima Catalítica da edição de RNA mensageiro para Apolipoproteína B (*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide*)
- Bcl-2 – Linfoma de célula B-2 (*B-cell lymphoma-2*)
- bFGF – Fator básico para crescimento de fibroblasto (*basic Fibroblast Growth Factor*)
- BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*)
- CCR – Receptores de Quimiocina do tipo CC
- CD – Grupo de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)
- CDK – cinase dependente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase*)
- cDNA - Ácido Desoxi-Ribonucléico complementar (*complementary Deoxyribonucleic Acid*)
- COX – Ciclo-oxigenase (*Cyclooxygenase*)
- CPP – Peptídeo Penetrante de Célula (*Cell-Penetrating Peptides*)
- CRF – Formas recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Forms*)
- CTD - Domínio carboxi-terminal (*Carboxi-Terminal Domain*)
- CTL – Linfócito T Citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte*)
- CTLA-4 – Antígeno de Linfócito T Citotóxico-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*)
- CXCR – Receptor para quimiocina do tipo CXC
- CYCT1 – ciclina T1 (*Cyclin T1*)
- D – aminoácido Aspartato

DC – Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)

DC-SIGN – Não-integrina de captura Intercelular específica de Célula Dendrítica (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Grabbing Non-integrin*)

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DNA – Ácido Desoxi-Ribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)

ELISA - ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Env – Envelope

ESCRT- Complexo para separação do endossoma requerido para transporte (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*)

FAK – Cinase de adesão focal (*Focal Adhesion Kinase*)

Fas – Molécula de superfície celular associada ao Fibroblasto (*Fibroblast-Associated cell-Surface*)

FasL – Ligante da molécula Fas

g – grama

G - Gravidade

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Intestino (*Gut Associated Lymphoid Tissue*)

gp – Glicoproteína

HAART – Terapia anti-retroviral altamente ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfônico (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)

HMM – Alta massa molecular (*High Molecular Mass*)

ICAM – Molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida (*inducible Nitric Oxide Synthase*)

IP-10 – Proteína de 10 kDa indutora de Interferon (*interferon inducible protein of 10 kDa*)

IRF – Fator regulador do Interferon (*Interferon Regulatory Factor*)

JAK – Cinase Janus (*Janus Kinase*)

K – aminoácido Lisina

kDa – Kilo Dalton

L – litro

LAL – Lisados de Amebócitos do *Limulus* (*Limulus amoebocyte lysate*)

LAP - Peptídeo Associada à Latência (*Latency-Associated Peptide*)

LE – Endossoma Tardio (*Late Endosome*)

LMM – Baixa massa molecular (*Low Molecular Mass*)

LPG – Lipofosfoglicana

LPS – Lipopolissacarídeo

LTR – Repetição terminal longa (*Long Terminal Repeat*)

MØ - Macrófago

M – Molar

MALT – Tecido Linfóide Associado à Mucosa (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)

MCP - Proteína quimioatraente para monócitos (*Monocyte Chemoattractant Protein*)

M-CSF – Fator estimulante de colônias de macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

mg – miligrama

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MIF – Fator Inibidor da Migração de Macrófago (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*)

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófago (*Macrophage Inflammatory Protein*)

mL – mililitro

mM – milimolar

MMP – Metaloprotease ou Metaloproteinase (*Metalloproteinase*)

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro (*messenger Ribonucleic Acid*)

MVP – Corpúsculo Multivesicular (*Multivesicular Body*)

Nef – Fator efetor negativo (*Negative effector factor*)

NFAT – Fator Nuclear de células T ativadas (*Nuclear Factor of Activated T-cells*)

NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear Kappa B (*Nuclear Factor Kappa B*)

ng – nanograma

NK – Células Assassinas Naturais (*Natural Killer*)

NO – Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

NP-40 – Nonil fenoxil-polietoxiletanol 40 (*Nonyl Phenoxy polyethoxyethanol- 40*)

N-TEF – Fator Negativo para Elongação da Transcrição (*Negative Transcription Elongation Factor*)

ODC – Ornitina descarboxilase

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – proteína

PBMC – Célula mononuclear do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS – Salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR – Reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PD – Molécula de morte programada (*Programed Death*)

PDL – Ligante da molécula PD

PG – Prostaglandina (*Prostaglandin*)

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGG<sub>2</sub> – Prostaglandina G<sub>2</sub>

PGD<sub>2</sub> – Prostaglandina D<sub>2</sub>

pH – Potencial hidrogeniônico

PIC – Complexo de Pré-integração (*Pre-Integration Complex*)

PKR – Proteína Cinase R (*Protein Kinase R*)

PMSF – Fluoreto de Fenil-metilsulfonil (*phenylmethylsulphonyl Fluoride*)

P-TEFb – Fator Positivo para Elongação da Transcrição (*Positive-Transcription Elongation Factor b*)

Q – aminoácido Glutamina

R – aminoácido Arginina

RANTES – Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*)

Rev – Regulador da expressão de gene do vírion (*Regulator of virion gene expression*)

RNA – Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

RRE – Elemento de resposta ao Rev (*Rev response element*)

SEM – Erro Padrão da Média (*Standard Error of the Mean*)

siRNA – Ácido Ribonucléico pequeno de interferência (*Small Interfering Ribonucleic Acid*)

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SOCS – Supressor da Sinalização de Citocina (*Suppressor Of Cytokine Signaling*)

STAT – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

TAR – Resposta à Transativação (*Transactivation Response*)

Tat – Transativador de Transcrição (*Transcriptional transactivator*)

TGF – Fator de crescimento e transformação (*Transforming Growth Factor*)

TLR – Receptor do Tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)

TNF – Fator de Necrose de Tumor (*Tumor Necrosis Factor*)

TPA – Éster de forbol 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol

TRAIL - Ligante que Induz Apoptose Relacionada ao TNF (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand*)

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

tRNA – Ácido Ribonucléico de transferência (*transfer Ribonucleic Acid*)

Vif – Fator de infectividade viral (*Viral infectivity factor*)

VnR – Receptor de Vitronectina (*Vitronectin Receptor*)

Vpr - Proteína viral r (*Viral protein r*)

VPS – Proteína vacuolar de separação (*Vacuolar Protein Sorting*)

Vpu – Proteína viral u (*Viral protein u*)

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

## Introdução

### **O Vírus da Imunodeficiência Humana e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida**

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 (Dybul *et al.*, 2003; Pantaleo & Fauci, 1995). Nas mais de duas décadas após o aparecimento dos primeiros casos de AIDS, o número de indivíduos acometidos pela infecção pelo HIV alcançou proporções pandêmicas. Em 2007, estimou-se que aproximadamente 33 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV em todos os locais do mundo, sendo que houve a ocorrência de 2,7 milhões de novas infecções e dois milhões de óbitos relacionados a presença do vírus no último ano (UNAIDS, 2008).

O HIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, caracterizado por possuir uma enzima denominada transcriptase reversa. Dois tipos de HIV são hoje identificados, 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, 1999; Freed & Martin, 2007). O HIV-1 foi isolado em 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983) e sua distribuição é irrestrita pelo mundo. O HIV-2 foi isolado em 1986 (Clavel *et al.*, 1986) e é encontrado na África Ocidental e em algumas regiões da Europa e, menos frequentemente, em outras regiões do mundo, como Índia e Estados Unidos (Freed & Martin, 2007). Na América do Sul, o Brasil é o epicentro da epidemia de HIV (com 474 mil casos acumulados em 2007), respondendo por aproximadamente um terço de pessoas infectadas por este vírus em nosso continente, e a incidência da infecção ainda permanece elevada, com 19,5 casos por 100 mil habitantes (Ministério-da-Saúde/Brasil, 2008)

O HIV-2 e o HIV-1 são vírus similares, ainda assim o HIV-2 é menos patogênico do que o HIV-1 (Freed & Martin, 2007). A transmissão sexual do HIV-2 é menos freqüente do que a do HIV-1 e a sua transmissão vertical é rara (Freed & Martin, 2007). Em alguns estudos, a grande maioria dos pacientes infectados pelo HIV-2 (95% ou mais) que foram acompanhados por mais de 8 anos se encaixaram na definição clínica de pacientes não-progressores, ou seja, não foi detectado qualquer sinal de progressão para a doença AIDS nesses indivíduos (Freed & Martin, 2007)

Análises filogenéticas de seqüências provirais do HIV-1 revelaram dois grandes grupos genéticos, o M (*main*) e o O (*outlier*). O raro grupo O está concentrado no leste Africano. No grupo M, variantes do HIV-1 são classificadas como subtipos, os quais são denominados com letras (atualmente designados de A à K) de acordo com o seu grau de similaridade genética (Dybul *et al.*, 2003; Freed & Martin, 2007). Os subtipos também podem ser subdivididos em sub-subtipos, representados por numerais (e.g. A1; A2; A3; F1; F2) (Taylor *et al.*, 2008). Em 1998, Simon e colaboradores demonstraram a existência de um isolado viral do HIV-1 não pertencente nem ao grupo M, nem ao grupo O (Simon *et al.*, 1998). O isolamento dessa cepa altamente divergente das demais indica que o aparecimento de Lentivírus em humanos continua acontecendo e cria um terceiro grupo genético do HIV-1, o grupo N (*non-M/non-O - new*). O grupo M é o mais prevalente dos três grupos e todos seus subtipos se originaram na África central (Dybul *et al.*, 2003). O subtipo B é o mais prevalente nas Américas (>80%), Europa e Austrália, ao passo que as formas F (8%) e C (1,5%) estão em menor proporção nestas populações. Também ocorrem formas recombinantes circulantes (CRFs), as quais possuem segmentos genômicos derivados de mais de um subtipo de HIV-1 (e.g. a forma recombinante B/F e B/C. As CRFs foram inicialmente originadas a partir de co-infecções de um mesmo indivíduo com diferentes subtipos de HIV-1, e as formas recombinantes devem ser transmitidas entre pessoas para que seja definida como CRF) (Taylor *et al.*, 2008). A incidência do subtipo C vem crescendo rapidamente no Brasil, África e Ásia oriental, já atingindo perto de 8% dos casos de pacientes infectados por HIV-1 em nosso país (Bello *et al.*, 2008; Dybul *et al.*, 2003a; Freed & Martin, 2007).

### Classificações Filogenéticas do HIV-1

<u>Classificação</u>	<u>Definição</u>	<u>Exemplos</u>
Subtipos	Cepas de HIV-1 geneticamente relacionadas que são essencialmente eqüidistantes filogeneticamente	Subtipos A, B, C, D F, G, H, J, K
Sub-subtipos	Linhagens distintas dentro de um subtipo	A1, A2, A3, A4, F1, F2
Formas Recombinantes Circulantes (CRFs)	Cepas mosaicas com segmentos genômicos de diferentes subtipos. Resultado de recombinação entre subtipos de HIV-1 em um mesmo indivíduo co-infectado por subtipos distintos	43 formas descritas: CRF01_AE, CRF02_AG Os recombinantes devem ser descritos em pelo menos 3 pessoas sem ligação epidemiológica direta e precisam ser transmitidos entre pessoas

**Figura 1.** *Classificações Filogenéticas do HIV-1.* Tabela modificada a partir da original em (Taylor *et al.*, 2008)

O HIV-1, assim como o HIV-2, é transmitido através de fluidos corporais, particularmente sêmen e leite materno, ou por sangue/derivados contaminados com o vírus (Galvin & Cohen, 2004). Atualmente a transmissão sexual responde pela maior

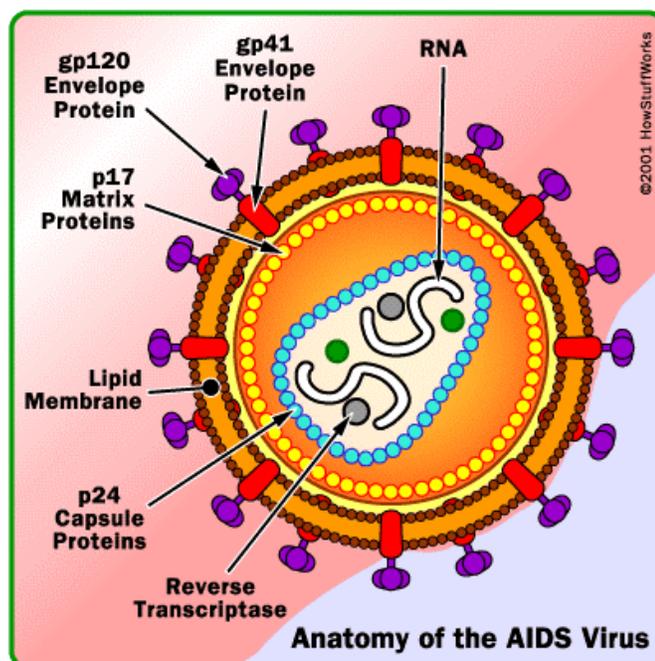
parte dos casos de novas infecções e aproximadamente 30-40% de novos casos de infecção em mulheres ocorre através do coito vaginal (Hladik & McElrath, 2008). Neste aspecto, a quantidade de vírus no sangue (viremia) do indivíduo infectado parece ser altamente relevante para a chance de transmissão do HIV-1 (Galvin & Cohen, 2004). Estima-se, por modelos matemáticos e frequência de casos, que a chance de transmissão de um homem infectado para uma mulher é de 0,5%, porém este valor pode aumentar em cerca de dez vezes se a carga viral estiver elevada (Galvin & Cohen, 2004). Baseado nestas evidências, o tratamento anti-retroviral também é importante para reduzir a transmissão do vírus, uma vez que os medicamentos utilizados reduzem drasticamente a quantidade de vírus circulante (Galvin & Cohen, 2004). Por exemplo, a transmissão heterossexual do HIV-1 não foi observada quando a viremia era menor do que 1.500 cópias por mililitro (Galvin & Cohen, 2004). Na transmissão sexual para mulheres, o HIV atinge a mucosa cervical e pode atravessar o epitélio por diferentes formas: endocitose com posterior exocitose ou mesmo penetrando através dos interstícios entre as células epiteliais (Hladik & McElrath, 2008). A mucosa cervico-vaginal contém um grande número de células  $CD4^+/CCR5^+$  que podem ser diretamente infectadas pelo HIV (Veazey *et al.*, 2001). Diversos aspectos da infecção por HIV-1 podem ser inferidos por analogia com o modelo de símio infectado experimentalmente com o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). Foram encontradas células produtivamente infectadas na mucosa vaginal de macacos rhesus expostos ao Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) por via vaginal, sugerindo que o HIV-1 pode expandir-se durante três dias ainda na mucosa endocervical, antes de atingir outros sítios no corpo (Miller *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1999). Também utilizando este modelo experimental, verificou-se que o SIV atingia as células dendríticas da mucosa vaginal após inoculação do vírus neste sítio, o que indica um importante papel das células dendríticas (DC) no estabelecimento da infecção (Hu *et al.*, 2000). Diversas evidências sugerem que o HIV é carregado para diferentes tecidos corpóreos através das células dendríticas. Um estudo *in vitro* demonstrou que células de Langerhans (uma subpopulação de células dendríticas) presentes em explantes de epitélio vaginal escamoso podem capturar o HIV-1 e migrar com o vírus para fora do tecido (Hladik *et al.*, 2007). Diversos estudos demonstram que células dendríticas (DC) podem transferir o HIV-1

diretamente para linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante a apresentação antigênica ou mesmo na interação inespecífica entre estas células, demonstrando que a célula dendrítica pode transportar o HIV-1 para outros tecidos e promover infecção *in trans* de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Cavrois *et al.*, 2008; Hladik & McElrath, 2008). Desta forma o HIV pode atingir um dos principais sítios de replicação, os linfonodos. Diferentes estudos sugeriram duas formas diferentes pelas quais as DCs são capazes de infectar linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Alguns relatam que as DCs são capazes de endocitar o HIV-1 via ligação da gp120 com moléculas DC-SIGN, permanecer com os vírions intactos no interior de vesículas endossomais e transmiti-los (via exocitose do vírion) a linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante a sinapse entre DC e estas células. Outros relatos indicam que o HIV permanece aderido a DC-SIGN membranar e é transmitido para T CD4<sup>+</sup> sem a necessidade de internalização do vírus (Cavrois *et al.*, 2008). Algumas evidências também suportam uma infecção produtiva de DCs com o HIV-1, porém ainda existe uma grande dificuldade em demonstrar que estas células podem ser infectadas *in vitro* (Granelli-Piperno *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2003). Recentemente, Münch e colaboradores parcialmente elucidaram como a transmissão do HIV-1 pode ser favorecida pelo sêmen: os autores demonstraram que fibrilas amielóides, presentes no sêmem humano, podem capturar o HIV e prendê-los em células alvo, facilitando em 5 ordens de magnitude o processo de infecção ou de captura do vírus por células dendríticas (Munch *et al.*, 2007). Levando-se em consideração que apenas uma partícula viral em 1.000-100.000 é infectiva *in vitro* (Rusert *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2007), esta “ponte protéica”, que permite ao HIV alcançar a célula-alvo, pode desvendar o mecanismo pelo qual este vírus consegue infectar células *in vivo* após a relação sexual (Roan & Greene, 2007).

O HIV-1 só infecta seres humanos e tem como importante característica se manter por longo período replicando-se nos tecidos linfóides sem induzir as típicas manifestações clínicas associadas à AIDS. A partícula viral infectiva (vírion) é esférica e apresenta um envelope lipoprotéico formado por uma bicamada lipídica, obtido da membrana celular da célula hospedeira ou de membranas endossomais, dependendo de qual célula produziu o HIV-1 (Carter & Ehrlich, 2008; Freed & Martin, 2007)(Figura

1). No envelope estão inseridas as glicoproteínas organizadas em trimeros. Cada monômero glicoprotéico é formado por duas subunidades, uma glicoproteína de 41KDa (gp 41), transmembranar, e uma glicoproteína solúvel de 120 KDa (gp 120), que está ancorada à gp 41 e localizada externamente à partícula viral (Freed & Martin, 2007). Ambas são originadas de um precursor comum, a glicoproteína gp 160, de 160 KDa, que é clivada durante a maturação viral (Freed & Martin, 2007). Em sua porção interna o vírion possui um core cônico, composto pela proteína do capsídeo (p24). O capsídeo alberga o genoma do HIV, que está associado a proteínas do nucleocapsídeo (p7), e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Freed & Martin, 2007). Em torno dessa estrutura encontra-se uma matriz protéica formada pela proteína p17 (Freed & Martin, 2007). Com o uso de ensaios de ELISA (imunoabsorventes ligados à enzima) comercial, é possível medir a produção de HIV-1 por células, através da quantificação da concentração das proteínas p24 oriundas dos vírus presentes no sobrenadante de culturas celulares (ou mesmo no soro de pacientes).

Um dímero de Ácido Ribonucléico (RNA) compõe o genoma do HIV-1 (Freed, 2001). O Ácido Desoxi-Ribonucléico (DNA) proviral é formado após a transcrição reversa do RNA genômico viral e apresenta, em suas extremidades, seqüências chamadas Repetições Terminais Longas (LTR) -3' e LTR-5' (Freed, 2001; Freed & Martin, 2007). Entre as extremidades 5' e 3' do genoma são encontrados três genes comuns aos retrovírus: *gag* (antígeno específico do grupo) que codifica uma poli-proteína precursora Pr55Gag, que é clivada pela protease viral dando origem às proteínas p17, p24, p7 e p6; *pol* (polimerase) que codifica também uma poli-proteína precursora, a Pr 160 GagPol, que é clivada pela protease dando origem às enzimas transcriptase reversa, protease e integrase; e *env* (envelope) que codifica a proteína do envelope gp160 (Freed, 2001; Freed & Martin, 2007). Além desses genes, há mais seis outros: *tat* (transativador de transcrição), *rev* (regulador do vírion), *nef* (efetor negativo), *vpu* (proteína u viral), *vpr* (proteína r viral) e *vif* (fator de infectividade viral) (Peterlin & Trono, 2003). Uma representação esquemática da partícula viral madura está representada na figura 1.



**Figura 2:** Representação esquemática de uma partícula viral madura do HIV-1. A partícula viral é cercada por uma bicamada de membrana lipídica oriunda de membranas celulares da célula-hospedeira. No caso dos vírus oriundos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o envoltório viral é derivado da membrana plasmática, através do brotamento dos vírions. Em macrófagos, ainda não está bem definido qual é a origem do envoltório viral. No envoltório viral encontramos o complexo protéico gp160, o qual é formado por trimeros de gp120 ancorados por proteínas gp41. Este complexo protéico é comumente chamado de envelope viral ou Env. No interior da partícula madura, podemos visualizar a matriz formada por proteínas p17. Na região mais interior encontra-se o capsídeo viral, o qual é formado primariamente por proteínas p24. No interior do capsídeo encontramos o material genético do vírus, composto por duas fitas de RNA e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. Esquema reproduzido a partir da Internet:

<http://www.teenaid.org/Educators/Facts/tabid/71/Default.aspx>

A proteína Tat é crítica para uma eficiente produção de transcritos virais a partir dos LTRs do HIV-1, e é uma das primeiras a ser sintetizada (Li *et al.*, 2005b; Malim & Emerman, 2008; Peterlin & Trono, 2003). O Rev possui um papel fundamental no transporte (do núcleo para o citoplasma) de RNAs virais que sofreram poucos ou nenhum processamento (*splicing*), o que permite a tradução de várias proteínas do vírus (Li *et al.*, 2005b; Malim & Emerman, 2008). A Vpu aumenta a liberação de partículas virais durante a replicação viral, promove a degradação da molécula CD4 no retículo endoplasmático da célula hospedeira e reduz a expressão dos Complexos Principais de Histocompatibilidade (MHCs) classes I e II na superfície celular. Essa degradação contribui para liberação da gp 160 de complexos Env-CD4 no retículo endoplasmático, aumentando a disponibilidade da glicoproteína Env para transporte à

superfície celular, além de atenuar a resposta imune através da redução de MHC membranar (Li *et al.*, 2005b; Malim & Emerman, 2008; Peterlin & Trono, 2003). Recentemente foi proposto que a proteína Vpu promove a liberação do vírus da superfície celular de células T CD4<sup>+</sup> ao neutralizar o efeito de retenção da partícula viral na membrana exercido pela proteína Teterina (CD317) (Malim & Emerman, 2008; Neil *et al.*, 2008). O gene *vpr* codifica uma proteína que é incorporada à partícula viral e, após a transcrição reversa, auxilia no direcionamento do complexo pré-integração (PIC) para o núcleo através da interação da proteína Vpr com microtúbulos do citoesqueleto. A proteína Vpr também parece mediar uma etapa que permite a entrada do complexo pré-integração (PIC) no núcleo, além desta proteína provocar uma interrupção na fase G2 do ciclo celular (Li *et al.*, 2005b). Ainda não está claro se existe alguma vantagem neste processo de interferência no ciclo celular, mas um estudo sugere que a transcrição do HIV-1 pode ser mais ativa na fase G2 (Goh *et al.*, 1998). A proteína Vif aumenta a transcrição reversa e é essencial para a replicação do HIV-1 em PBMCs, macrófagos e algumas linhagens de células T (Malim & Emerman, 2008). Vírus mutantes para *vif* não se replicam em células contendo uma citidina deaminase chamada Enzima Catalítica da edição de RNA mensageiro para Apolipoproteína B 3G (APOBEC3G), a qual funciona como um fator celular anti-retroviral inato pois induz mutações pontuais no genoma do HIV (Chiu & Greene, 2008; Malim & Emerman, 2008). A proteína Nef é uma das primeiras a ser detectada pós-infecção da célula hospedeira. A proteína Nef aumenta a infectividade viral, além de promover a redução da expressão da molécula CD4 na superfície celular (permitindo a incorporação de env e o brotamento da partícula viral, uma vez que CD4 inibe esse processo). Esta proteína também é capaz de reduzir a expressão membranar de MHC de classe I e CD28, contribuindo para a evasão do vírus à resposta imune do hospedeiro (Li *et al.*, 2005b; Malim & Emerman, 2008).

No início da epidemia da AIDS foi observado que as células contendo CD4 eram suscetíveis à infecção pelo vírus (Fauci *et al.*, 1984; Nicholson *et al.*, 1985; Popovic *et al.*, 1984). Em meados dos anos 80 verificou-se que o CD4 era o receptor celular principal para o HIV, tendo sido o primeiro receptor para retrovírus identificado

(Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; Maddon *et al.*, 1986). Logo após a identificação da molécula CD4 como o receptor para a entrada do HIV na célula, estudos posteriores reportaram que somente este receptor não respondia por todo o processo de fusão e entrada do vírus. Essa conclusão baseou-se em parte na observação de que certos isolados virais apresentavam tropismo variado por células contendo CD4. Alguns isolados se replicavam eficientemente em macrófagos e outros em linhagens de células T CD4<sup>+</sup>. Em comum, no entanto, estes isolados replicavam-se bem em Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs). Uma busca de quase uma década revelou que os receptores de quimionas CXCR4 e CCR5 eram co-receptores do HIV-1 e responsáveis pelo tropismo diferencial de certos isolados virais (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996). Desde então, vírus com tropismo para CCR5 ficaram conhecidos como vírus R5-trópicos (ou simplesmente R5), e os com tropismo para CXCR4, X4-trópicos (ou simplesmente X4). Isolados que tenham tropismo para os dois co-receptores são chamados de duplo-trópicos ou R5X4-trópicos. A identificação dos co-receptores do HIV-1 foi antecedida pelo achado de que as beta-quimiocinas RANTES, Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  bloqueavam a infecção por isolados monocitotrópicos (Cocchi *et al.*, 1995). A importância dos co-receptores *in vivo* é ilustrada por estudos demonstrando que indivíduos homozigotos para o alelo mutante de CCR5, CCR5/delta 32 (*ccr5* $\Delta$ 32), o qual codifica a proteína truncada e não expressa na membrana plasmática, são altamente resistentes à infecção por isolados R5-trópicos (Dean *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996).

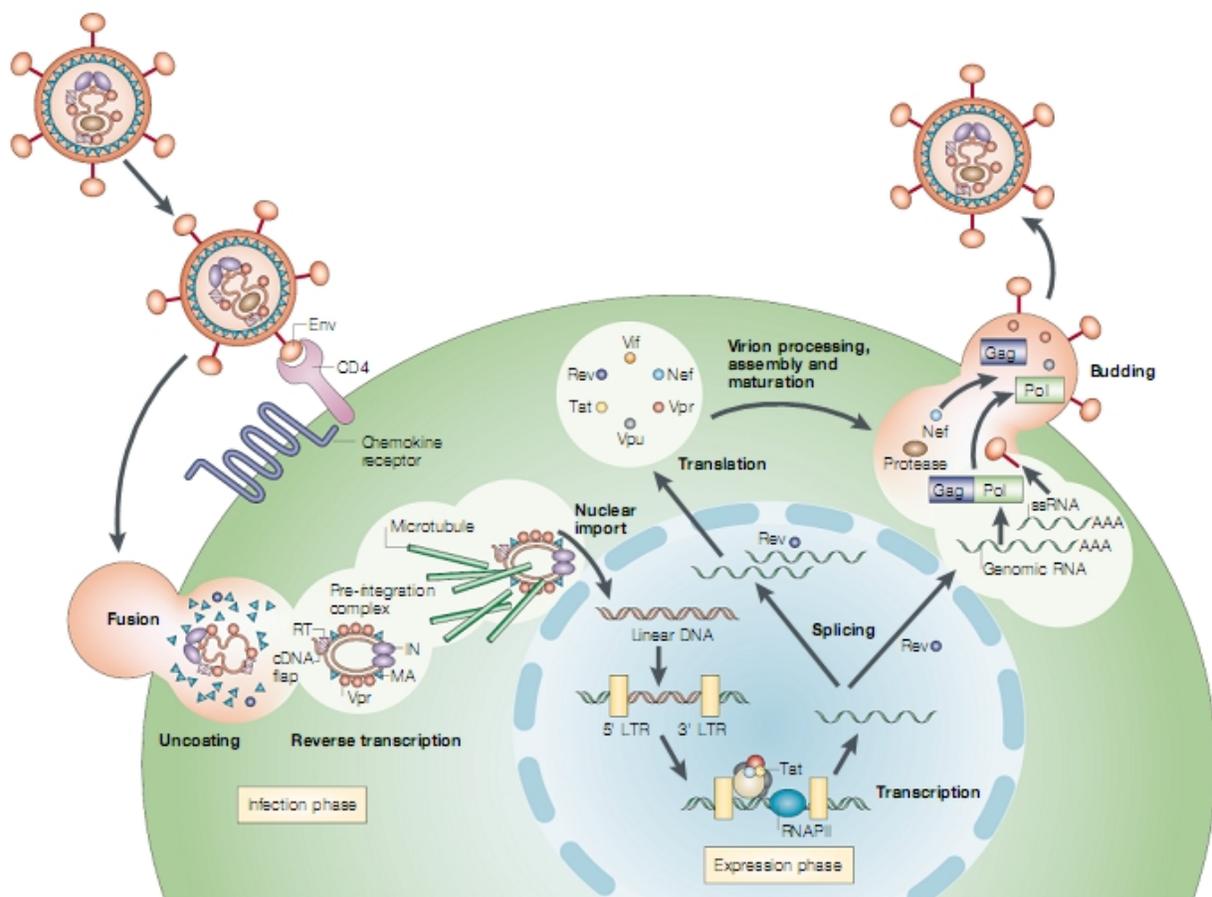
O ciclo replicativo do HIV-1 é bastante complexo e envolve a participação de diversas proteínas da célula hospedeira. Para termos idéia da complexidade das proteínas celulares envolvidas neste ciclo, recentemente dois estudos independentes reportaram mais de 250 genes participantes do processo de replicação do HIV-1 na célula: utilizando técnicas de silenciamento gênico (através de pequenos RNAs de interferência – siRNA), Brass e colaboradores (2008) relataram mais de 250 fatores celulares envolvidos na replicação do HIV-1, enquanto König *et al.* (2008) demonstraram o efeito de 213 genes atuando somente nos processos iniciais da

infecção viral (Brass *et al.*, 2008; Goff, 2008; König *et al.*, 2008). A infecção inicia-se pela ligação da gp120 viral ao CD4 de células-alvo suscetíveis, o que promove uma mudança da conformação estrutural da gp120, com conseqüente aumento da afinidade pelo co-receptor CCR5 (no caso dos vírus R5) ou CXCR4 (no caso dos X4). Resumidamente, o processo de ligação do vírus à célula e a entrada na mesma seguem as seguintes etapas: primeiro, a gp120 viral liga-se ao CD4 na superfície celular; esta ligação permite a exposição de sítios que estavam crípticos os quais são fundamentais para ligação ao co-receptor. Este complexo formado por CD4-gp120-co-receptor sofre uma alteração conformacional, o que acarreta a exposição da gp41. A gp41 insere-se na membrana plasmática, levando à fusão do envelope viral com a membrana celular (Freed, 2001; Greene & Peterlin, 2002; Peterlin & Trono, 2003). É essa fusão que permite o acesso do capsídeo viral ao citoplasma, sendo a gp41, portanto, vital ao processo infeccioso. As primeiras descrições da entrada do HIV na célula são datadas de mais de 20 anos atrás, porém alguns processos da fusão do envelope viral com a membrana plasmática são ainda questionados (Uchil & Mothes, 2009). Neste ano, Miyauchi e colaboradores sugeriram que o HIV-1 entra na célula primordialmente por endocitose mediada pela ligação da gp120 viral com o CD4 da célula-alvo (Miyauchi *et al.*, 2009). Ao contrário dos postulados que sugerem a fusão env-membrana plasmática, Miyauchi *et al.* demonstraram que a fusão do envelope viral ocorre no endossoma, através da fusão env-membrana endossomal, e com a conseqüente liberação do capsídeo no interior do citoplasma (Miyauchi *et al.*, 2009; Uchil & Mothes, 2009). Em 2001, Maréchal e colaboradores já tinham sugerido que o HIV-1 se ligava à membrana plasmática de macrófagos, porém a entrada ocorria primordialmente por endocitose (Marechal *et al.*, 2001). Independentemente do local onde ocorre a fusão viral, após essa etapa acontece o desnudamento do capsídeo e formação de um complexo chamado de complexo de transcrição reversa, composto por proteínas do capsídeo, proteínas acessórias do HIV, fatores celulares do hospedeiro, RNA viral e a transcriptase reversa do vírus. A transcrição reversa é uma das características que definem os retrovírus. Em resumo, é a capacidade de converter os genomas de RNA em DNA dupla-fita utilizando pequenos oligonucleotídeos moldes (*primers*) da própria célula infectada. No caso do HIV-1, *primers* de RNA de

transferência (tRNAs) reconhecem seqüências complementares no RNA viral, formando um complexo RNA-RNA. A reação de transcrição reversa é complexa, envolve mudanças conformacionais no RNA e é catalisada pela enzima transcriptase reversa (Abbink & Berkhout, 2008). Durante esse processo o DNA viral complementar (cDNA) recém-formado fica associado ao complexo de transcrição reversa. O cDNA é depois transportado para o núcleo através do citoesqueleto como parte do complexo de pré-integração. A transcrição reversa pode introduzir erros no genoma viral a cada ciclo de replicação, resultando em uma progênie viral geneticamente variada (Abbink & Berkhout, 2008; Hottiger & Hubscher, 1996). O complexo de pré-integração interage com várias enzimas presentes no citoplasma e no envoltório nuclear, o que permite que o cDNA seja catapultado para o interior do núcleo celular. A enzima integrase cataliza a integração do DNA viral (DNA dupla fita linear) no cromossoma da célula hospedeira, através de um complexo protéico multimérico que envolve a interação da enzima viral com co-fatores celulares (Delelis *et al.*, 2008). No interior do núcleo, os DNAs não integrados circularizam-se (chamados de DNA episomal) e são posteriormente degradados pelas enzimas celulares (Sharkey *et al.*, 2005). O DNA integrado, chamado de provírus, se comporta essencialmente como um gene celular. Atualmente sabe-se que a integração do HIV-1 no genoma hospedeiro não ocorre ao acaso e exibe um determinado perfil: ocorre maior integração em regiões consideradas *exon* de genes, ou seja, nas regiões que vão ser codificadas em proteínas (Ciuffi, 2008). Após a integração, o provírus serve como molde para a síntese de RNAs mensageiros (mRNAs) virais, que codificam as proteínas estruturais, regulatórias e acessórias usadas na replicação viral. Essa síntese ocorre pela ação da RNA polimerase II celular auxiliada por fatores de transcrição celulares e pela proteína viral Tat (Peterlin & Trono, 2003). Como qualquer RNA eucariótico, a tradução para proteína ocorre no citoplasma. Os primeiros mRNAs formados são completamente processados, sofrendo os *splicings* habituais de um RNA eucariótico qualquer. As primeiras proteínas regulatórias virais a serem produzidas são Tat, Rev e Nef, e isto ocorre porque códon para início de tradução são expostos no RNA a montante da região codificante destas três proteínas, caso o RNA viral sofra todos os *splicings* habituais (Freed & Martin, 2007; Peterlin & Trono, 2003). Em seguida, com o auxílio da proteína Rev viral, os mRNAs não

completamente processados são exportados para o citoplasma, pois o Rev reconhece uma seqüência no RNA viral chamada de elemento de resposta ao Rev (RRE) que só está exposto no RNA não processado (*non-spliced*) ou parcialmente processado (Strebel, 2003). Esse processo todo é importante, pois o RNA do HIV é policistrônico, ou seja, uma única fita do RNA contém a informação para codificação de uma poliproteína. O processamento diferencial deste RNA, com as respectivas clivagens, é que permite que todas as informações sejam traduzidas para proteínas. Os mRNAs para Env são traduzidos no ribossomo associado ao retículo endoplasmático, formando a gp160 a qual é clivada por uma protease celular durante o tráfego para a superfície (Adamson & Freed, 2007). A clivagem da gp160 gera a glicoproteína gp120 e a gp41. O precursor da poliproteína Gag, conhecido como Pr55<sup>Gag</sup> é fundamental para a formação da partícula viral. O Pr55<sup>Gag</sup> é traduzido por ribossomos no citoplasma a partir do mRNA viral e codifica para componentes internos e estruturais do vírion: Matriz, Capsídeo e Núcleocapsídeo. A montagem do vírion, com a formação da estrutura esférica, ocorre próximo ao local do brotamento (membrana plasmática quando em T CD4<sup>+</sup>) através da multimerização de monômeros de Pr55<sup>Gag</sup>. O domínio da Matriz no Pr55<sup>Gag</sup> é fundamental para ligação do Gag na membrana plasmática. Na formação da partícula viral ainda ocorre a migração de duas fitas simples de mRNA viral não traduzidos, e o processo de montagem culmina no brotamento do vírus com liberação de partículas virais imaturas (não infectivas) (Adamson & Freed, 2007; Greene & Peterlin, 2002). O brotamento é catalisado por componentes do endossoma celular, incluindo o Complexo para Separação do Endossoma Requerido para o Transporte (ESCRT)-I. Na infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as novas partículas virais liberadas tornam-se infectivas (maduras) extracelularmente após a clivagem das proteínas precursoras Gag e Gag-Pol pela protease viral (Adamson & Freed, 2007; Greene & Peterlin, 2002). Ao capturar a membrana da célula hospedeira, o HIV-1 pode conter diversas moléculas inseridas em seu envelope viral. Por exemplo, diversos estudos relataram a presença de várias proteínas na superfície do vírus, tais como ICAM-3, CD28, CD36, CD44, CD55, CD62, CD86 (Wahl *et al.*, 2006). Ao se ligar com seus respectivos receptores na célula-alvo, estas moléculas poderiam aumentar a avidéz da

interação vírus-célula durante a adsorção viral (Wahl *et al.*, 2006). A figura 2 representa o ciclo replicativo do HIV-1 no interior de um linfócito T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 3:** Esquema representando o ciclo replicativo do HIV-1 em linfócito T CD4<sup>+</sup>. A infecção inicia-se quando as proteínas do envelope viral (gp120; representada por Env) ligam-se à molécula CD4 na superfície da célula-alvo. Ocorre uma alteração conformacional que permite a ligação à um dos co-receptores, os quais podem ser o receptor de quimiocina CCR5 ou o receptor de quimiocina CXCR4, dependendo do tropismo viral (determinado pela própria seqüência da gp120). Uma nova mudança na conformação da gp120 permite a exposição da gp41, a qual se insere na membrana da célula-alvo, permitindo a fusão do vírus com a membrana plasmática ou endossomal. O capsídeo atinge o citoplasma e desnuda-se, formando um complexo para a transcrição reversa a partir da atividade da transcriptase reversa viral. Após a formação da dupla fita de DNA complementar, um novo complexo protéico é originado e denominado complexo de pré-integração. Este complexo de pré-integração (contendo o DNA e proteínas virais, além de proteínas celulares) migra para o núcleo através dos microtúbulos e atinge o interior do núcleo com o auxílio da interação de proteínas deste complexo com proteínas presentes nos nucleoporos da membrana nuclear. Então ocorre a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, através das regiões LTR e com auxílio da enzima integrase viral. A transcrição para formação do RNA viral ocorre a partir do LTR 5', onde os transcritos iniciais são inteiramente processados no núcleo (*splicing*). Ocorre a exportação do RNA processado para o citoplasma onde ocorre a tradução das proteínas virais. Após a formação da proteína viral Rev, alguns transcritos não processados são transportados para o citoplasma. As proteínas virais são direcionadas para a membrana plasmática, assim como RNAs não processados (RNA do genoma viral), onde o vírus brota e é liberado. Após a liberação do HIV, as proteínas do capsídeo são formadas a partir da clivagem Gag-Pol pela Protease viral, formando a partícula viral madura e infectiva. Esquema extraído de (Peterlin & Trono, 2003).

Desde a identificação da AIDS, em 1981, sabe-se que a queda no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é uma característica marcante da progressão clínica da enfermidade (Fauci *et al.*, 1984). Sendo assim, grandes esforços têm sido voltados para o entendimento dos mecanismos pelos quais o HIV-1 causa a doença e a apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A redução de células T CD4<sup>+</sup> pode ser desencadeada diretamente pela infecção viral ou pela presença crônica do vírus, via distúrbio na homeostase da resposta imune. Em cultura, a infecção de T CD4<sup>+</sup> pelo HIV-1 é citopática, e este efeito pode ocorrer pela alteração da permeabilidade da membrana plasmática dos linfócitos infectados, ou mesmo pela indução de apoptose por proteínas virais (Costin, 2007). Dentre as hipóteses que procuram explicar a linfopenia de T CD4<sup>+</sup> por mecanismos indiretos, podemos destacar a auto-imunidade; apoptose via ligante de Fas (FasL); ativação crônica do sistema imune pelo vírus ou produtos bacterianos; redução na produção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pelo timo e alteração na dinâmica de circulação dos linfócitos (Costin, 2007; Douek, 2003; Douek *et al.*, 2009; Dybul *et al.*, 2003; Picker, 2006). Para exemplificar, já foi descrito que a presença contínua do vírus no corpo induz ativação crônica de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> o que pode levar à apoptose induzida pela ligação Fas-FasL, sendo que FasL solúvel já foi descrito em elevadas concentrações no soro de pacientes com alta viremia (Bahr *et al.*, 1997; Sabri *et al.*, 2001).

O quadro clínico da infecção por HIV-1 pode ser dividido didaticamente em três fases: Uma fase aguda, durando normalmente um a dois meses, com um pico de viremia (podendo chegar a 10<sup>7</sup> cópias de RNA/mL) seguido de posterior declínio da viremia, e sintomatologias características de uma virose; após esse período, inicia-se uma fase de latência caracterizada por apresentar uma viremia constante e não elevada (chamado de *set point*), podendo persistir por até dez anos (com viremia entre 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> cópias de RNA/mL); e a última fase onde presenciamos um colapso das células T CD4<sup>+</sup> sanguíneas, com subsequente imunossupressão e elevação abrupta da viremia (Dybul *et al.*, 2003; Ribeiro, 2007). Nesta última fase, a AIDS é caracterizada pela contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes inferior a 200 células por microlitro de plasma (Dybul *et al.*, 2003; Ribeiro, 2007). Curiosamente, as três fases da infecção

pelo HIV-1 parecem ser distintas em relação ao conjunto de genes expressos pelas células de linfonodos dos pacientes infectados pelo vírus: neste ano, Li e colaboradores analisaram 47.000 transcritos por microarranjo, e os autores observaram que havia alteração na expressão de 766 genes em linfonodos inguinais de indivíduos infectados pelo HIV-1, sendo que destes, 73% eram característicos de apenas uma fase (Li *et al.*, 2009). Em relação à AIDS, por longos anos acreditou-se que a grave imunossupressão que somente os pacientes com AIDS apresentam resultava de uma crônica e gradual depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> com redução na produção destas células pelo timo, o que acarretava na alteração da homeostase/funcionamento do sistema imune (Bonyhadi *et al.*, 1993; Douek, 2003; Ribeiro, 2007). Consistente com esse conceito, alguns estudos sugerem que a queda progressiva de T CD4<sup>+</sup> deve-se a mecanismos de ativação celular associados à proliferação permanente do vírus (Douek, 2003). Cabe ressaltar que a depleção desta população celular pode não estar associada a altas viremias, mas parece ser diretamente influenciada pela produção contínua de partículas virais (Douek, 2003).

No entanto, trabalhos recentes em modelos animais vêm demonstrando que a chave para o entendimento da gênese da AIDS pode estar nas primeiras semanas que seguem à infecção. Nos primeiros dias após a infecção, os vírus e células infectadas pelo HIV-1 atravessam a barreira da mucosa intestinal e promovem a infecção da célula-alvo mais abundante na *lamina propria*, as células T CD4<sup>+</sup> de memória/efetoras (CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup>) (Brenchley *et al.*, 2006a; Douek, 2003; Mehandru *et al.*, 2004). A subpopulação de T CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> pode variar de 52 a 80% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em Tecido Linfóide Associado a Mucosas (MALT), como o Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT) e os tecidos linfóides da mucosa vaginal (Brenchley *et al.*, 2004; Veazey & Lackner, 2003; Veazey *et al.*, 2001). Em símios infectados com o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), esta infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> na *lamina propria* parece independe da rota de inoculação do vírus: Inoculação intravaginal ou intravenosa promove uma infecção de CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> em todas as superfícies de mucosas examinadas, com ênfase no GALT (Li *et al.*, 2005c; Mattapallil *et al.*, 2005). Após o estabelecimento do HIV-1 nos tecidos linfóides, um grande número de células T

CD4<sup>+</sup> co-expressando CCR5 é infectado. Ainda na fase aguda (primeiras três semanas pós-infecção) ocorre uma explosão na produção viral, o que resulta em uma drástica morte de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória em todos os tecidos linfóides (Haase, 2005). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> do GALT são extremamente afetados pela infecção viral, sendo que a redução desta população celular pode chegar a 90% em pacientes HIV-1+ (Brenchley *et al.*, 2004). Ainda na fase aguda, símios inoculados com SIV apresentam 60% das células T CD4<sup>+</sup> de mucosas infectadas no pico da viremia, sendo que 80% destas células infectadas morrem ainda nos quatro primeiros dias da infecção (Mattapallil *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que a grande maioria de linfócitos do corpo estão presentes em Tecidos Linfóides Associados a Mucosas (MALT), um dos principais locais da replicação do HIV-1 (Douek *et al.*, 2009). Um estudo realizado com símios infectados com SIV sugere que o vírus pode alcançar o GALT, baço e linfonodos periféricos ao final da primeira semana pós-inoculação viral na vagina (Miller *et al.*, 2005). No GALT, a infecção com SIV provoca uma queda de 80% nos níveis de T CD4<sup>+</sup> no 14º dia após a entrada do vírus (Veazey *et al.*, 1998). Ainda não há consenso sobre a razão desta elevada perda de células CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup>, sendo que alguns autores sugerem que pode ser consequência direta da infecção viral ou devido a apoptose desencadeada pela interação FasL-Fas (Douek, 2003; Haase, 2005; Veazey *et al.*, 2001). Vários estudos já haviam demonstrado que pacientes infectados pelo HIV-1 apresentavam anormalidades estruturais no trato gastro-intestinal, bem caracterizado pela observação de enteropatia (Brenchley & Douek, 2008; Haase, 2005). Posteriormente, Brenchley e colaboradores observaram a presença de bactérias e produtos bacterianos no sangue de pacientes com HIV-1, ou de macacos *rhesus* infectados experimentalmente com SIV (Brenchley *et al.*, 2006b). Os autores então sugeriram que a redução drástica nas células T CD4<sup>+</sup> do GALT compromete a impermeabilidade da mucosa a bactérias que habitam o lúmen intestinal, promovendo um influxo de procaríotos/produtos bacterianos (como o LPS) para a circulação e para o tecido linfóide (Brenchley *et al.*, 2006a; Brenchley *et al.*, 2006b; Brenchley & Douek, 2008). O reconhecimento de patógenos/componentes microbianos por células do sistema imune proporciona um ambiente pró-inflamatório no tecido linfóide onde o HIV-1 está replicando. Ocorre então uma ativação maciça de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e indução de

apoptose via Fas-FasL (Brenchley *et al.*, 2006a; Douek *et al.*, 2009). As células T CD4<sup>+</sup> de memória (co-expressando CCR5<sup>+</sup>) são ativadas, proliferam e diferenciam-se em linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores (sem perda de CCR5), o que decorre normalmente em GALT, devido à presença de antígenos alimentares e produtos de alguns microorganismos (Veazey *et al.*, 2001). É bem aceito que a propagação sistêmica do HIV ocorre principalmente por transmissão de uma célula a outra(s), num processo denominado sinapse infecciosa (Cavrois *et al.*, 2008). Logicamente, os tecidos inflamados apresentam maior quantidade de células, o que pode favorecer a transferência viral entre células. Na fase aguda, a elevada morte de células T CD4<sup>+</sup> ocorre em três modelos distintos de infecção com SIV: infecção patogênica, infecção persistente/não progressiva e infecção transitória/controlada (Pandrea *et al.*, 2007). Para os autores desse artigo, a fase aguda da infecção não deve ser utilizada como um padrão preditivo para o desenvolvimento da AIDS, uma vez que todos os três grupos experimentais apresentaram depleção marcante de linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante esta fase (Pandrea *et al.*, 2007).

Ainda nos primeiros dias de infecção (fase aguda), um controle parcial dos vírions circulantes correlaciona-se temporalmente com a emergência de Linfócitos T Citotóxicos (CTLs) específicos contra o HIV-1 (Letvin & Walker, 2003). A importância real da resposta das CTLs contra células-alvo que expressam antígenos do HIV-1 foi claramente elucidada em símio infectado com SIV: a depleção *in vivo* de células T CD8<sup>+</sup> promove uma rápida e acentuada elevação na viremia, além de uma pronunciada depleção de T CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> em comparação com os animais controles (Letvin & Walker, 2003; Schmitz *et al.*, 1999; Veazey *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que elevadas percentagens de células T CD8<sup>+</sup> específicas para o HIV-1 são encontradas em diversos compartimentos anatômicos na infecção tanto por HIV-1 quanto por SIV, incluindo sangue, espaços brônquio-alveolares, linfonodos, baço, pele, fluido cérebro-espinhal, sêmen, vagina e MALT (Letvin & Walker, 2003). *In vitro*, células T CD8<sup>+</sup> podem inibir a replicação viral através da lise de células infectadas pelo HIV-1 (Tsubota *et al.*, 1989). Outros estudos também ressaltam o papel destacado das T CD8<sup>+</sup> no controle do HIV-1: a ativação crônica do sistema imune correlaciona-se com a alta viremia, e pacientes

apresentando esse quadro possuem percentagens elevadas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> incapazes de responder a antígenos do HIV-1, fenômeno que pode ser parcialmente revertido pelo bloqueio da ligação da molécula PD-1 (*Programmed Death-1*) com seus ligantes (PD-L1 ou PD-L2) (Day *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006). Assim como o PD-1 na membrana das células T CD8<sup>+</sup>, o bloqueio da ligação da molécula CTLA-4 presente em linfócitos T CD4<sup>+</sup> também pode reverter o quadro de anergia deste subtipo celular, aumentando as funções das células T CD4<sup>+</sup> específicas para o HIV-1 (Kaufmann *et al.*, 2007). Porém o bloqueio da ligação de CTLA-4 favorece a ativação plena e replicação das células T CD4<sup>+</sup>, promovendo expansão clonal destas populações com conseqüente favorecimento da replicação do vírus, uma vez que as células T CD4<sup>+</sup> ativadas permitem uma excelente replicação viral (Cecchinato *et al.*, 2008). Em 2008, Migueles *et al.* reforçaram a relevância das T CD8<sup>+</sup> no controle da infecção: os autores compararam controladores de elite (pacientes que controlam a replicação viral, com viremia média indetectável mesmo após dez anos de infecção) com progressores normais da doença e verificaram que controladores de elite apresentam mais células T CD8<sup>+</sup> ativadas e específicas para o HIV-1, além destas células apresentarem maior capacidade individual para destruir linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados (Blankson & Siliciano, 2008; Migueles *et al.*, 2008). Esta premissa pode ser fortalecida pela evidência de que existe HIV-1 plenamente infectivo em controladores de elite (controladores de elite representam 0,5% da população infectada pelo HIV-1) (Blankson *et al.*, 2007; Blankson & Siliciano, 2008). Além disso, células T CD8<sup>+</sup> também podem inibir a replicação do HIV-1 através da secreção de fatores solúveis, como RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , um fenômeno independente da citotoxicidade (DeVico & Gallo, 2004). Acredita-se que este primeiro momento da infecção seja decisivo na progressão da doença (Pilcher *et al.*, 2004). Em parte, essa teoria é sustentada pela idéia de que em dois dias o HIV pode estabelecer a infecção na mucosa, em três dias o vírion pode chegar aos linfonodos drenantes e circulação sanguínea, e em vinte e cinco dias atingir diversos tecidos, tais como baço, GALT, diversos linfonodos, tratos genito-urinários e cérebro (Pilcher *et al.*, 2004). Nesse curto período de tempo diversos vírus geneticamente distintos são produzidos, tanto por erros no processo de transcrição reversa quanto por recombinação entre vírus distintos (Letvin & Walker, 2003). A

formação de diversos vírions geneticamente distintos através do tempo (*quasispecie*) é uma característica da infecção pelo HIV-1, e este fenômeno torna ainda mais difícil a produção de vacinas (Letvin, 2006). Vários dos vírions mutantes são resistentes à ação de anticorpos neutralizantes, e outros à atividade de células T citotóxicas, o que foi claramente reforçado por alguns testes com vacinas para SIV em símios, no qual o desafio viral em símios vacinados contra SIV demonstrou a aquisição de uma mutação no vírus capaz de promover um escape das CTL, permitindo a replicação descontrolada do vírion e a subsequente predominância da *quasispecie* resistente no macaco infectado (Letvin & Walker, 2003; Letvin, 2006). A dificuldade para neutralização do vírus por anticorpos deve-se ao fato do sítio de ligação da gp120 com o CD4 ser protegido por regiões glicosiladas, além de também incluir alças protéicas (alças V) altamente variáveis entre subtipos virais (Letvin & Walker, 2003; Letvin, 2006).

Já na fase crônica da infecção verificamos ativação generalizada de células do sistema imune, com freqüências elevadas de células T expressando marcadores de ativação, produção aumentada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ativação policlonal de células B, células T e Assassinas Naturais (NK), além de falha na hematopoiese (Appay & Sauce, 2008; Douek *et al.*, 2008; Dybul *et al.*, 2003). Essa ativação não ocorre apenas em células específicas contra o HIV, ou o SIV em símios, e sim em diversas células com as mais diferentes especificidades. Porém em infecções não patogênicas com SIV em hospedeiros naturais, os símios *Sooty mangabeys*, a ativação imunológica crônica observada na fase aguda é rapidamente atenuada na fase crônica, sugerindo que a ativação sistêmica de células do sistema imune pode ser crítica na progressão para a doença AIDS (Douek *et al.*, 2008). Vários autores sugerem que essa ativação generalizada se dê por uma recorrente estimulação antigênica associada à resposta inflamatória, além da presença já discutida de componentes microbianos (Appay & Sauce, 2008; Douek *et al.*, 2008; Dybul *et al.*, 2003; Picker, 2006). Essa ativação sistêmica e crônica levaria à regeneração insuficiente de células T de memória central; morte das células associadas à infecção e destruição da arquitetura dos linfonodos devido à inflamação crônica; perda de células T virgens pela excessiva diferenciação em células de memória e perda da função tímica (Douek *et al.*,

2008; Dybul *et al.*, 2003; Picker, 2006). Porém ainda é preciso descortinar o papel exato desses fatores individualmente, ou em combinação, na patogênese da AIDS.

Como todos os retrovírus, o HIV-1 precisa integrar-se ao genoma da célula hospedeira (Ciuffi, 2008). Como consequência, o provírus é influenciado pelo estado metabólico e de ativação celular (Pierson *et al.*, 2000). Em uma célula T CD4<sup>+</sup> ativada, a replicação é rápida, eficiente e citopática (Stevenson, 2003). Os LTRs virais possuem sítios de ligação para fatores celulares, os quais podem regular positivamente a transcrição do HIV-1, como o fator de transcrição NF-κB (Stevenson, 2003). Neste contexto, o efeito de citocinas na replicação do HIV-1 torna-se evidente, tanto favorecendo quanto inibindo, pois as sinalizações celulares conferidas por estas moléculas culminam na ativação de diversos fatores de transcrição.

A situação é diferente em células T CD4<sup>+</sup> quiescentes (virgens ou de memória). Essas células são refratárias à produção do HIV-1 *in vitro*, embora sejam permissivas à entrada do vírus e possam manter a infecção em estágio latente (Pierson *et al.*, 2000). De fato, provirus integrado e latente já foi detectado *in vivo* em células T CD4<sup>+</sup> em repouso (Chun *et al.*, 1995). Há nove anos sabe-se que este quadro de latência viral em T CD4<sup>+</sup> quiescentes pode ser parcialmente revertido pela adição de IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 (Pierson *et al.*, 2000). Achados de quatro anos atrás indicam que as células T CD4<sup>+</sup> virgens, ou em repouso, não permitem a replicação viral devido à alta expressão da forma ativa da *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3G* (APOBEC3G), também chamada de baixa massa molecular (LMM) (Chiu *et al.*, 2005; Chiu & Greene, 2008). Entretanto, a adição de IL-2, IL-7 e IL-15 às células T virgens induzem uma alteração do LMM para o complexo de alto peso molecular (HMM) contendo moléculas de APOBEC3G incapazes de restringir a replicação viral (Stopak *et al.*, 2007). Curiosamente, as citocinas IL-2 e IL-15 estão elevadas em linfonodos infectados por HIV-1 (Lederman & Margolis, 2008), e talvez a expressão elevada destas citocinas, juntamente com seus efeitos na conversão para a forma inativa HMM, possa explicar um estudo sugerindo a replicação de HIV-1 em células T CD4<sup>+</sup> virgens presentes em explantes de tecidos linfóides (Eckstein *et al.*, 2001). Porém este estudo merece maiores análises uma vez que a própria infecção pelo HIV-1 gera um ambiente

permissivo para ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em tecidos linfóides, e a produção do vírus ocorre basicamente pelas células T CD4<sup>+</sup> ativadas nestes tecidos (Biancotto *et al.*, 2008; Lederman & Margolis, 2008). De fato o estado de latência celular viral sempre ganhou enfoque nos estudos da patogênese do HIV-1, uma vez que este quadro pode comprometer a terapêutica da infecção, pois as células latentes permanecem vivas mesmo após uma replicação viral reduzida por uso de terapia com drogas combinadas (Han *et al.*, 2007). Um fato marcante é o decréscimo lento dos reservatórios virais em células T CD4<sup>+</sup> quiescentes: Estas células possuem meia vida de 44 meses e podem ser encontradas em pacientes sob tratamento intenso com anti-retroviral, substanciando estudos comprovando que o HIV-1 pode permanecer no organismo mesmo em indivíduos respondendo satisfatoriamente à terapia (Finzi *et al.*, 1999; Siliciano *et al.*, 2003). Surpreendentemente, a interrupção do tratamento com anti-retrovirais ocasiona um ressalto da carga viral, com níveis similares aos encontrados antes do tratamento (Han *et al.*, 2007; Ho & Zhang, 2000). Após a interrupção da administração dos fármacos, este retorno para os valores da viremia pré-terapia (terapêutica) pode refletir a reativação dos provirus latentes nas células outrora quiescentes (Joos *et al.*, 2008).

## **A Infecção de Macrófagos pelo HIV-1**

A replicação do HIV-1 ocorre basicamente em linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e em fagócitos mononucleares tissulares, particularmente em tecidos linfóides secundários como linfonodos e Tecido Linfóide Associado ao intestino (GALT). *In vitro*, a infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados resulta em elevada produção viral mesmo sendo este subtipo celular altamente susceptível aos efeitos citopáticos induzidos diretamente pelo HIV-1 (Cossarizza, 2008; Hoxie *et al.*, 1986). *In vivo*, a infecção pelo HIV-1 promove uma redução nos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes e de linfonodos periféricos, sendo que a subpopulação T CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> de tecidos linfóides do trato gastrointestinal pode sofrer decréscimo superior a 90% (Brenchley *et al.*, 2004). Ao contrário dos

linfócitos T CD4<sup>+</sup>, macrófagos são altamente resistentes aos efeitos citopáticos induzidos pela infecção viral *in vitro*, embora possam produzir um número elevado de partículas virais por até dois meses pós-infecção (Brown *et al.*, 2006; Cassol *et al.*, 2006). Em pacientes, o HIV-1 pode ser detectado em diferentes populações de macrófagos em fases iniciais e avançadas da infecção (Embretson *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1998). Macrófagos são células mononucleares distribuídas em todos os tecidos e órgãos, incluindo cérebro e testículos (Gordon, 2003; van Furth, 1989). A maior parte destas células é originada da diferenciação de monócitos produzidos na medula óssea e liberados na circulação sanguínea (Gordon, 2003; van Furth, 1989). A meia-vida de um monócito circulante é de aproximadamente 71 horas em humanos e um aumento da percentagem de macrófagos tissulares é diretamente acompanhado por um acréscimo de monócitos circulantes (van Furth, 1989; Whitelaw, 1972). Macrófagos podem sobreviver por longos períodos e alguns estudos sugerem que estas células podem ser produtivamente infectadas por HIV em diferentes tecidos (Cassol *et al.*, 2006; Dybul *et al.*, 2003; Igarashi *et al.*, 2001). Por exemplo, macrófagos alveolares infectados com HIV-1 podem sobreviver por até dois meses enquanto microglia infectada pode sobreviver por alguns anos (Cassol *et al.*, 2006). Os macrófagos também são reconhecidos como reservatórios do HIV-1, pois partículas virais podem ser acumuladas em vesículas intracelulares sem perda da infectividade, mesmo em pacientes recebendo terapia anti-retroviral combinada (HAART) (Sharova *et al.*, 2005). Não existem evidências de uma depleção significativa de macrófagos tissulares em pacientes infectados com o HIV. Recentemente, Hasegawa e colaboradores (2009) relataram que o número de macrófagos que migraram para o linfonodo de animal infectado pelo SIV é quinze vezes maior do que o número em animais controles (Hasegawa *et al.*, 2009). Além disso, monócitos provenientes de indivíduos infectados apresentam aumento na transcrição de genes anti-apoptóticos e são mais resistentes à indução de apoptose mediada por FasL, o que sugere que estas células podem sobreviver mais tempo num indivíduo infectado (Giri *et al.*, 2009).

Na inoculação intravenosa de símios com SIV, a presença do vírus já foi relatada em macrófagos da *lamina propria* intestinal após sete dias de infecção, sugerindo uma infecção bem precoce deste tipo celular (Veazey *et al.*, 1998). Porém,

uma clara elucidação do papel de macrófagos como reservatórios do HIV-1 *in vivo* só foi possível quando em 1997 Shibata e colaboradores construíram um vírus quimérico altamente citopático para linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Shibata *et al.*, 1997). Esta quimera, denominada de SHIV, contém os genes do envelope viral de um vírus HIV-1 duplo-trópico inserido no genoma do SIV (Shibata *et al.*, 1997). Após infecção de símios com o SHIV, Igarashi *et al.* (2001) observaram que ocorria produção de partículas virais mesmo nos animais onde os linfócitos T CD4<sup>+</sup> tinham sido completamente eliminados pela presença viral (Igarashi *et al.*, 2001). Neste modelo, os estudos com hibridização *in situ* provaram que os macrófagos tissulares (linfonodo, pulmão, cerebelo e fígado) eram os grandes responsáveis pela produção continuada do SHIV (Igarashi *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 2003). Esta fase de replicação do vírus na ausência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, denominada de fase MØ pelo grupo de autores, caracterizava-se pela presença de deleções em aminoácidos da região 164 e 165 da alça V2 da gp120, e estes vírus eram capazes de infectar macrófagos alveolares do macaco, fato que não ocorria com os vírus isolados da fase de replicação em linfócitos T (Igarashi *et al.*, 2003). Analisados em conjunto, os resultados obtidos por Igarashi *et al.* sugerem uma grande produção viral por macrófagos *in vivo*, e que os vírus da fase MØ apresentam maior infectividade para macrófagos quando comparados aos vírus inoculados no animal. Apesar de não ocorrer expressiva alteração de receptores envolvidos em migração de macrófagos durante a infecção *in vitro* pelo HIV-1, Westhorpe e colaboradores reportaram uma redução na emigração trans-endotelial (do tecido para o sangue) de macrófagos infectados *in vitro* com o vírus por sete dias, ao passo que a migração de monócitos não infectados permanecia inalterada nos dois sentidos (tanto a imigração quanto a emigração), o que sugere que monócitos infectados podem entrar no tecido, diferenciar-se em macrófagos e ficar retidos no ambiente, servindo de reservatórios e aumentando a propagação do vírus em células vizinhas (Westhorpe *et al.*, 2009). Em 2001, Ruibal-Ares e colaboradores obtiveram PBMCs de pacientes em diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1, e analisaram a produção de HIV-1 por linfócitos e macrófagos *ex vivo* (Ruibal-Ares *et al.*, 2001). Após o cultivo destes PBMCs em placas de cultura, os autores observaram que a maior parte da produção de HIV-1 (mensurada por p24 intracelular ou no sobrenadante) provinha de macrófagos,

principalmente quando a detecção do HIV-1 no sobrenadante era tardia (após 15 dias em cultura). Os autores também verificaram que somente os macrófagos estavam replicando o HIV-1 em 44% dos pacientes, sendo que a percentagem de macrófagos produtores de HIV-1 (CD64+/p24+) variava de 55 a 70%, o que indica que grande parcela de macrófagos é capaz de replicar o HIV-1 em culturas *ex vivo* de PBMCs de paciente positivo para o HIV-1 (Ruibal-Ares *et al.*, 2001). Devido à dificuldade em se obter macrófagos isolados de tecidos humanos, os estudos envolvendo infecções destas células com HIV-1 são, em sua maior parte, realizados *in vitro* utilizando-se Macrófagos Derivados de Monócitos do sangue periférico (MDM). Estes modelos com MDM *in vitro* permitem dissecar peculiaridades morfológicas e funcionais da infecção produtiva e latente do HIV nesta população celular.

A infecção de macrófagos humanos ocorre por vírus R5, embora existam raríssimos artigos relatando a infecção por vírus X4 ou mesmo a infecção de macrófagos em indivíduos cujas células não expressam CCR5 na superfície (*ccr5Δ32*) (Mikulak *et al.*, 2009; Samson *et al.*, 1996; Verani *et al.*, 1998). Embora a infecção de monócitos CD16<sup>+</sup> circulante já tenha sido relatada *in vivo*, estas células apresentam características fenotípicas e funcionais semelhantes a macrófagos tissulares, o que sugere um estágio mais avançado na diferenciação destas células (Crowe *et al.*, 2003). Por exemplo, mais de 85% dos monócitos circulantes apresentam baixíssima expressão de CCR5 e elevada presença de CD14, ao passo que monócitos CD16<sup>+</sup> (5-15% da população de monócitos periféricos) caracterizam-se por possuir altas percentagens da molécula membrana CCR5 (Crowe *et al.*, 2003). Durante o processo de diferenciação de monócitos para macrófagos *in vitro*, a expressão de CD16 aumenta acompanhando a expressão de CCR5, enquanto ocorre redução da expressão de CD14 (Crowe *et al.*, 2003). Embora a percentagem de monócitos circulantes CD16<sup>+</sup> seja maior em pacientes portadores do HIV-1 quando comparados a indivíduos normais, esta subpopulação encontra-se pouco infectada (<1%) *in vivo* (Crowe *et al.*, 2003; McElrath *et al.*, 1989). A migração de monócitos infectados para outros tecidos (*e.g.* cérebro) parece influenciar a distribuição corpórea do vírion (Crowe *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). Quando cultivados *in vitro*, a replicação do HIV-1 em macrófagos pode ser modulada por diversos fatores endógenos e exógenos: Interleucina -1 $\beta$ , IL-6,

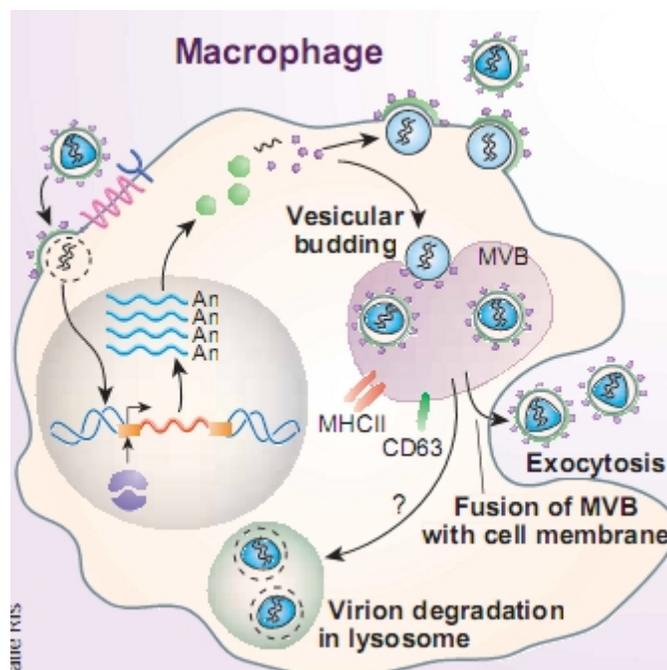
IL-8, IL-10, IL-12, Fator de Necrose de Tumor (TNF)- $\alpha$ , Fator estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF) e Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) estimulam a replicação viral, ao passo que Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), IL-27, Interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , inibem a produção (Alfano *et al.*, 2008; Kedzierska & Crowe, 2001).

Células que suportam infecção e replicação produtiva do HIV-1 (como macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados) contêm baixos níveis de APOBEC3G intracelular, e a proteína Vif do HIV-1 é capaz de ubiquitinar estas baixas concentrações de APOBEC3G, direcionando-o para degradação pelos proteassomas celulares (Chiu & Greene, 2008). O APOBEC3G pode ser modulado por diversas citocinas e vários estudos que utilizam silenciamento gênico específico para esta enzima (com o uso de RNA de interferência) comprovam a importância deste fator na restrição do crescimento viral. O APOBEC3G quando em altas concentrações citoplasmáticas, ou na ausência de Vif, se incorpora à partícula viral e causa hipermutação somática no genoma do HIV-1 (troca de Guanosina por Adenosina) durante o processo de transcrição reversa, reduzindo a capacidade de integrar-se no genoma da célula ou, no caso da integração ocorrer, a produção viral é menor e os vírus produzidos possuem menor infectividade (Chiu & Greene, 2008). O mecanismo de ação mais conhecido do APOBEC3G na restrição do HIV-1 é através de sua atividade enzimática (ligação da fita do RNA e deaminação da citidina, levando à formação de Uracila), porém sabe-se que esta proteína também pode funcionar quando a atividade enzimática é perdida, provavelmente pelo fato da proteína ligar-se com alta afinidade ao RNA e, conseqüentemente, dificultar a ação da Transcriptase Reversa do HIV-1 (Chiu & Greene, 2008). Em macrófagos há baixíssima expressão do APOBEC3G, sendo que grande parte desta enzima está sob a forma do complexo inativo (HMM) (Chiu *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007). Já em monócitos, os quais não produzem partículas de HIV-1, podemos detectar a proteína APOBEC3G e o complexo ativo da enzima (LMM) (Chiu *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007).

As etapas de infecção dos macrófagos são semelhantes às dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Em macrófagos infectados com HIV-1 *in vitro*, a intensidade da produção de partículas virais varia entre culturas celulares de diferentes indivíduos (Bol *et al.*, 2009;

Eisert *et al.*, 2001; Fouchier *et al.*, 1994; Naif *et al.*, 1999). Recentemente, Bol e colaboradores compararam a produção viral entre macrófagos de 429 indivíduos infectados *in vitro*, e reportaram que a produção de HIV-1 por estas células variava em até três unidades logarítmicas em valores de p24 normalizados (Bol *et al.*, 2009). A intensidade da replicação do HIV-1 parece ser uma característica genética de cada doador, e Bol e colaboradores observaram que este fato parece não estar envolvido com a entrada do HIV-1 na célula, pois continua ocorrendo variação na replicação do vírus mesmo quando a sua gp120 é substituída pela glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (chamado de HIV-1 pseudotipado com o envelope do VSV; este vírus entra na célula por endocitose e independe de CD4 e CCR5) (Bol *et al.*, 2009; Loeuillet *et al.*, 2008; Naif *et al.*, 1999). Neste aspecto, cabe ressaltar que a produção de partículas virais também é heterogênea entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados de diferentes doadores, o que nos obriga a normalizar os valores de p24 (Al-Jabri *et al.*, 2008; Ciuffi *et al.*, 2004). Porém existe uma diferença concernente à formação do HIV-1 entre linfócitos e macrófagos. Em linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, a organização das proteínas virais ocorre perto da membrana plasmática, são empacotadas em um pré-capsídeo e as partículas imaturas brotam da membrana plasmática num processo chamado brotamento plasmalemal (Adamson & Freed, 2007). Nestes casos, o amadurecimento completo da partícula viral ocorre extracelularmente, quando o capsídeo viral é completamente formado por ação das proteases virais (Adamson & Freed, 2007). Contrariamente aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em macrófagos as partículas já maduras do HIV-1 acumulam-se em vacúolos citoplasmáticos chamadas de endossomas tardios/corpos multivesiculares (LEs/MVBs) cuja origem parece ser do retículo endoplasmático (Carter & Ehrlich, 2008). Estes LEs/MVBs podem trafegar até a superfície celular, fusionar-se com a membrana plasmática e liberar o conteúdo no exterior celular, em uma via denominada exossomal (Carter & Ehrlich, 2008). Por esta razão, a expressão de proteínas no HIV-1 difere entre vírus produzidos por macrófagos e os produzidos por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Através de uma análise proteômica e bioquímica, Chertova *et al.* identificaram 253 proteínas celulares que estavam presentes no HIV-1 produzido por macrófagos, sendo que muitas destas proteínas são tipicamente encontradas em retículo ou fazendo parte do complexo de transporte de vesículas,

como Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classe II, CD9, CD53, CD81, CD82, Anexina 2, Proteína Vacuolar de Separação (VPS) 28, Vps29, Vps35 e CD63 (Chertova *et al.*, 2006). Várias das proteínas observadas nos vírus originados de macrófagos não estão presentes nos vírus originados de linfócitos (Carter & Ehrlich, 2008; Chertova *et al.*, 2006). Recentemente foi sugerido que estas vesículas não são endossomais, e sim um domínio seqüestrado da membrana plasmática. Deneka e colaboradores (2007) observaram que o HIV-1 é acumulado em compartimentos internos contendo membranas, porém este compartimento foi marcado com um corante incapaz de atravessar membrana, o que sugere que este compartimento está ligado ou foi originado da membrana plasmática (Deneka *et al.*, 2007). Considerando-se que resultados semelhantes também foram descritos por outro grupo (Welsch *et al.*, 2007), nós podemos concluir que novos estudos ainda são necessários para elucidar se o HIV-1 brota da membrana plasmática em macrófagos ou se brota já no interior do endossoma. O fato é que o HIV-1 em macrófagos pode ser sempre visualizado em vesículas intracelulares cercadas de membrana. Como macrófagos e células dendríticas são capazes de transferir diretamente o HIV-1 a um outro macrófago ou mesmo a um linfócito T CD4<sup>+</sup> através da exocitose de vírions infectivos, vários autores formularam o conceito de Cavalo de Tróia para a transmissão do HIV-1 entre células (Cavrois *et al.*, 2008; Gousset *et al.*, 2008). Este conceito baseia-se no fato dos macrófagos (ou mesmo células dendríticas) “esconderem” o HIV-1 no interior da célula, e quando a interação com as células T CD4<sup>+</sup> ocorre, o vírus “emerge” do interior celular diretamente para a superfície do linfócito-alvo.



**Figura 4:** Replicação do HIV em Macrófagos. A infecção dos macrófagos pelo HIV ocorre de maneira semelhante à infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Porém, durante a produção do HIV, partículas virais maduras acumulam-se em vesículas intracelulares, denominadas corpúsculos Multivesiculares (MVB). Os MVBs não são observados na infecção de linfócitos por HIV e parecem ser característicos de infecção de macrófagos. Adaptado de Stevenson (Stevenson, 2003)

## A co-infecção HIV-1/*Leishmania*

Devido ao comprometimento do sistema imune e a um progresso clínico crônico da infecção, indivíduos portadores do HIV-1 podem ser acometidos por infecções com uma plethora de microorganismos oportunistas ou não, particularmente em regiões tropicais do planeta, onde a variedade de patógenos é maior (Karp & Neva, 1999). Dentre estes patógenos, a co-infecção com *Leishmania* vem atingindo relevância devido à grande incidência de casos, sendo recentemente classificada como a segunda co-infecção HIV/protozoários com maior ocorrência no mundo (Karp & Auwaerter, 2007b). A sobreposição de áreas endêmicas para *Leishmania* e HIV tem aumentado principalmente devido à migração de indivíduos infectados pelo HIV para regiões com elevada incidência de *Leishmania*, e também pela urbanização da leishmaniose

(Desjeux, 2001). Em 1998, um estudo conduzido por Kubar e colaboradores indicou que aproximadamente 10% dos indivíduos portadores do HIV-1 contêm infecções assintomáticas por *Leishmania* em uma área epidêmica no sul da França (Kubar *et al.*, 1998). Infelizmente, a frequência desta co-infecção ainda é subestimada devido à escassez de notificações clínicas para os órgãos responsáveis pela vigilância (Cruz *et al.*, 2006). De acordo com notificações oficiais, em 2006 estimou-se a existência de 465 casos no Brasil (incluindo as cutâneas e viscerais), centenas na África (em particular Etiópia, Kenia, Uganda, Somália, Burquina Faso e Sudão) e na Ásia, enquanto na Europa já foram descritos casos clínicos em países Mediterrâneos, como Portugal (257 casos), Espanha (1229 casos), França (347 casos), assim como relatos esporádicos na Grécia, Reino Unido, Suíça e Alemanha (Alvar *et al.*, 2008).

A leishmaniose é um espectro de doenças causadas pela infecção de um hospedeiro vertebrado por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae* (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004; Liese *et al.*, 2008). No ciclo natural da doença, este patógeno somente é transmitido se dípteros pertencentes à subfamília *Phlebotominae* estiverem infectados com o protozoário e forem capaz de picar um hospedeiro vertebrado (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004). Existem aproximadamente 30 espécies já identificadas como vetores no Novo e Velho Mundo, sendo as do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004). No interior do hospedeiro vertebrado, o protozoário replica-se obrigatoriamente no interior dos macrófagos, sob a forma amastigota (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004; Liese *et al.*, 2008). À medida que as formas amastigotas vão multiplicando-se intracelularmente, os macrófagos rompem-se e liberam parasitos, os quais serão fagocitados por macrófagos vizinhos (Chappuis *et al.*, 2007). A leishmaniose foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo uma das mais importantes doenças negligenciadas em países tropicais, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas com este protozoário, dois milhões de novos casos reportados a cada ano, e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de transmissão ativa do protozoário (Alvar *et al.*, 2008; WHO, 2007). Embora não usual em pacientes imunocompetentes, a ocorrência da forma amastigota no sangue periférico já

foi relatada em diversos casos de co-infecção HIV/*Leishmania* na Europa, onde a maior incidência desta co-infecção ocorre entre usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas (Cruz *et al.*, 2006). Além disso, amastigotas já foram encontrados no interior de agulhas oriundas de seringas compartilhadas por usuários de drogas injetáveis, sugerindo uma via de transmissão entre indivíduos, a qual também é chamada de antroponótica (Cruz *et al.*, 2002). Também cabe mencionar que Molina e colaboradores (2003) relataram que havia maior transmissão de protozoários para o flebótomo vetor quando estes dípteros eram expostos ao sangue de pacientes co-infectados por HIV-1 e *L. infantum* (Molina *et al.*, 2003). Mais de 25 espécies de *Leishmania* são capazes de provocar doenças em seres humanos, e as principais formas clínicas da leishmaniose (cutânea, muco-cutânea, visceral e difusa) dependem basicamente da espécie do parasito envolvida na infecção, uma vez que existem diferenças em relação ao tropismo tissular entre as espécies do protozoário (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004; Liese *et al.*, 2008). A quantidade de óbitos por leishmaniose visceral atinge cerca de 59.000 por ano, um valor que só é ultrapassado pela malária (Chappuis *et al.*, 2007). Enquanto na Europa a forma viscerotrópica predomina sobre as demais em casos de co-infecção HIV/*Leishmania*, no Brasil já foram descritas todas as quatro formas clínicas da leishmaniose associadas ao HIV-1, provavelmente devido à elevada ocorrência de diferentes espécies de *Leishmania* e de seus respectivos flebotomíneos vetores em diversas áreas do nosso território (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006). Nos dias atuais, o uso da terapia anti-retroviral combinada (HAART) alterou drasticamente o curso clínico da infecção pelo HIV e, conseqüentemente, diminuiu a susceptibilidade à patógenos oportunistas. Entretanto, vários enigmas envolvendo este tipo de co-infecção permanecem por ser elucidados, e a interação entre estes dois patógenos no interior do organismo, ou mesmo no interior da mesma célula (macrófago), merece investigações minuciosas.

O primeiro caso de co-infecção HIV/*Leishmania* foi reportado em 1985 por um grupo espanhol (de la Loma *et al.*, 1985). Até o momento, análises moleculares de iso-enzimas revelaram 1037 cepas de *Leishmania* em pacientes co-infectados, sendo que destas, 695 isolados foram caracterizados como sendo da espécie visceralizante

*Leishmania infantum*, principalmente oriundos de pacientes da Espanha, França, Itália e Portugal (Alvar *et al.*, 2008). Na Europa, o maior número de casos desta co-infecção foi detectado na Espanha e pode estar relacionado à reativação da leishmaniose em um organismo previamente infectado por este tripanossomatídeo (Alvar *et al.*, 2008). Por exemplo, investigações moleculares em pacientes espanhóis co-infectados com a forma visceralizante da *Leishmania* apontam para uma grande ocorrência de recidivas da infecção (aproximadamente 90% dos casos), sugerindo que a infecção pelo HIV promove a replicação acentuada da *Leishmania* que já infectava o indivíduo (Alvar *et al.*, 2008). A recidiva deve-se ao fato deste protozoário persistir em determinados sítios do organismo hospedeiro, mesmo após o tratamento adequado e diagnóstico clínico de cura (Bogdan, 2008). Entretanto, num modelo matemático simplificado onde eram inseridos casos clínicos de co-infecção HIV-1/*Leishmania* reportados na Sicília (Itália), a hipótese de novas infecções pelo protozoário *Leishmania* prevalecia sobre a hipótese da recidiva de infecções latentes deste tripanossomatídeo (Molina *et al.*, 2003). Além das reativações da infecção por *Leishmania*, pacientes co-infectados por espécies viscerotrópicas apresentam manifestações clínicas não usuais, como ulcerações disseminadas ou ulcerações cutâneas e muco-cutâneas (Alvar *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que o tratamento de indivíduos portadores de HIV-1 com a terapia anti-retroviral combinada (HAART) promoveu uma drástica redução da epidemia de leishmaniose entre os indivíduos infectados com o HIV-1, pois a manutenção do número de células T CD4<sup>+</sup> contribuiu para inibir o crescimento do protozoário (Cruz *et al.*, 2006; Lopez-Velez *et al.*, 2001). Porém, o diagnóstico de casos desta co-infecção ainda permanece difícil porque algumas manifestações clínicas classicamente associadas à leishmaniose não estão sempre presentes (Deniau *et al.*, 2003). Por exemplo, esplenomegalia, associada à leishmaniose visceral, é menos freqüente em pacientes co-infectados, e 50% destes pacientes normalmente apresentam outras infecções oportunistas, com sintomatologia semelhante à leishmaniose (Deniau *et al.*, 2003; Pintado *et al.*, 2001). Os exames utilizados para o diagnóstico parasitológico da co-infecção ainda são os rotineiros, como análise microscópica do aspirado da medula óssea nos casos de suspeita de co-infecção; análise sorológica; detecção de antígenos de *Leishmania* na urina; além de técnicas moleculares como as baseadas em Reação

em Cadeia da Polimerase (PCR) (Alvar *et al.*, 2008; Deniau *et al.*, 2003; Piarroux *et al.*, 1994; Pintado & Lopez-Velez, 2001). As manifestações clínicas da co-infecção variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, mas, em geral, caracterizam-se por febre, perda de peso, hepato-esplenomegalia e pancitopenia (Pintado & Lopez-Velez, 2001). A terapia contra a *Leishmania* é baseada em antimoniais pentavalentes, fungicidas e antibióticos, mas tanto as formas cutâneas quanto as viscerais são mais difíceis de serem tratadas nos pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania* (Alvar *et al.*, 2008; Pintado & Lopez-Velez, 2001). Além disso, Mira e colaboradores (2004) relataram uma elevada frequência de recidivas da leishmaniose em indivíduos co-infectados recebendo HAART (Mira *et al.*, 2004). Uma revisão detalhada de casos clínicos desta co-infecção sugere que os tratamentos terapêuticos para leishmaniose frequentemente apresentam falhas nos pacientes co-infectados pelo HIV-1 e *Leishmania* (Laguna, 2003). Em conjunto, os resultados sugerem que a presença do HIV e/ou a imunossupressão decorrente da infecção viral pode reativar a replicação de *Leishmanias* latentes em indivíduos co-infectados, promovendo um crescimento não controlado do protozoário com subsequente disseminação pelo organismo.

Análises da viremia em pacientes com HIV sugerem uma maior quantidade de partículas virais em pacientes co-infectados por HIV e *Leishmania*, quando comparados a pacientes infectados somente pelo HIV (Olivier *et al.*, 2003; Preiser *et al.*, 1996). O aumento na viremia pode ser conseqüência da ativação imunológica crônica desencadeada pela presença de ambos os patógenos. Por exemplo, na infecção por HIV-1 é possível verificar um aumento de marcadores de ativação em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, assim como a presença no plasma e no linfonodo das citocinas IL-2, IL-6 e IL-1 $\beta$ , e das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (Appay & Sauce, 2008). A infecção por *Leishmania* também é capaz de induzir uma ativação do sistema imunológico, e pacientes infectados somente com este protozoário apresentam níveis séricos elevados de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 e TNF- $\alpha$  (Nylen & Sacks, 2007). Curiosamente, na co-infecção com HIV/*Leishmania infantum* podemos constatar níveis séricos reduzidos da citocina IL-10, e níveis séricos aumentados da citocina interferon (IFN)- $\gamma$ , sugerindo um desequilíbrio na polarização Th1/Th2. A influência do padrão

Th1/Th2 no crescimento do HIV-1 *in vivo* ainda é controversa, mas a predominância de um destes subtipos de T CD4<sup>+</sup> é fundamental para o desfecho da leishmaniose: a polarização da resposta para linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1 confere resistência contra este tripanossomatídeo em indivíduos imunocompetentes, enquanto que a predominância de Th2 normalmente está associada à susceptibilidade e desenvolvimento da doença. Neste aspecto, células Th1 desempenham papel leishmanicida principalmente pela síntese de IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , ao passo que a resposta Th2 favorece a *Leishmania* pela síntese de IL-4/IL-10/IL-1 $\beta$  (Kidd, 2003; Saha *et al.*, 2006). Níveis elevados da citocina TNF- $\alpha$ , um potente estimulador da produção de HIV-1, também já foram observados em soros de pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania*, correlacionando-se com o aumento da viremia no plasma destes pacientes (Olivier *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que a detecção da co-infecção HIV-1/*Leishmania* é mais freqüente na fase de imunossupressão, quando a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é baixa (Alvar *et al.*, 2008). É coerente especular que a morte destas células em decorrência da infecção pelo HIV-1 contribua para a replicação da *Leishmania*, uma vez que o linfócito T CD4<sup>+</sup> é um importante maestro na orquestra da resposta imune contra este tripanossomatídeo.

Como tanto o HIV quanto a *Leishmania* infectam as mesmas células (os macrófagos), os estudos *in vitro* de interação entre os patógenos são muito atraentes. Conforme anteriormente mencionado, durante o progresso da infecção pelo HIV-1, a percentagem de macrófagos não é alterada, contrariamente ao que ocorre com a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e diversos estudos sugerem que macrófagos podem servir como reservatórios virais (Brown *et al.*, 2006; Verani *et al.*, 2005). Quando culturas de macrófagos são co-infectadas *in vitro*, podemos observar aumento na replicação tanto do HIV-1 quanto da *Leishmania*, um fenômeno semelhante ao que constatamos *in vivo* (Alvar *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2006). A modulação do crescimento da *Leishmania* pode ser explicada pela inibição de citocinas com potencial leishmanicida (produzidas por Th1) ou pela indução de citocinas promotoras da replicação do protozoário (produzidas por Th2). Por exemplo, Wolday e colaboradores descreveram que a adição de HIV e *Leishmania* às culturas de PBMCs resulta em uma menor produção de IFN- $\gamma$  (padrão Th1) quando comparada à produção pelas células

estimuladas somente com *Leishmania* ou somente com mitógeno (Wolday *et al.*, 2000). Além disso, a análise da produção de citocinas *ex vivo* por PBMCs, oriundos de pacientes co-infectados, revelou maiores níveis de IL-4 e IL-10 (padrão Th2) (Nigro *et al.*, 1999). Uma vez que a infecção pelo HIV induz uma maciça morte de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por apoptose, é provável que o reconhecimento destas células apoptóticas por macrófagos também atue no aumento da replicação da *Leishmania* e do HIV-1. De fato, a exposição de macrófagos a células apoptóticas contribui para o aumento da replicação do protozoário e do vírus (Afonso *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2002).

Nos modelos *in vitro*, a replicação de ambos os patógenos parece ser dependente da produção de fatores solúveis liberados pelos macrófagos. Assim como para *Leishmania*, o crescimento do HIV-1 também pode ser alterado por citocinas presentes no ambiente onde o vírus está sendo produzido. Dentre os clássicos mediadores solúveis que favorecem a produção do vírus por células infectadas *in vitro* podemos destacar IL-1 $\beta$ , IL-7, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ao passo que IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-23 e IL-27 estão associadas à redução viral (Alfano *et al.*, 2008). Na presença do HIV-1, macrófagos primários infectados por *Leishmania infantum* produzem maior quantidade de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6, e o bloqueio das citocina IL-1 $\alpha$  e IL-6 resulta em menor produção de HIV-1 pelos macrófagos co-infectados, sugerindo uma participação direta das citocinas na modulação da replicação do HIV-1, provavelmente via indução da transcrição viral (Zhao *et al.*, 2004). Outro fator que pode contribuir para a replicação viral, também através da indução de mediadores solúveis, é a molécula Lipofosfoglicana (LPG) oriunda de promastigotas de *Leishmania*. Bernier e colaboradores demonstraram que a adição de LPG de *L. donovani*, ou do componente intramembrana do LPG (*core-PI*), é capaz de aumentar a replicação de HIV-1 em linhagens de monócitos e em linfócitos T CD4<sup>+</sup> via um processo dependente da translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo (Bernier *et al.*, 1995; Bernier *et al.*, 1998). Curiosamente, se macrófagos forem expostos à molécula LPG ou à *Leishmania infantum* antes da infecção com HIV-1, a entrada do vírus na célula é reduzida e o aumento da replicação do vírus só é observado a partir do sexto dia de co-infecção, embora os autores deste estudo não tenham testado o efeito do LPG em células já

infectadas, conforme o estudo de Bernier e colaboradores (Garg *et al.*, 2008). A fisiologia de células dendríticas (DC) também parece ser influenciada pela *Leishmania* e HIV-1: amastigotas de *Leishmania* podem se ligar a moléculas membranares DC-SIGN, as quais também podem ser utilizadas na captura do HIV-1 por células dendríticas (Zhao *et al.*, 2005). Células dendríticas transferem HIV-1 para linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante o processo de apresentação antigênica e, a ligação das moléculas DC-SIGN pelos amastigotas pode interferir na captura de partículas virais e, conseqüentemente, reduzir a transferência do HIV-1 para linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Garg *et al.*, 2007; Wu & KewalRamani, 2006). Levando-se em consideração que as DCs são fundamentais para a ativação de linfócitos T e muito importantes na patogênese da infecção pelo HIV-1 e pela *Leishmania*, a perturbação das atividades deste tipo celular pode alterar a resposta efetora a ambos os patógenos.

## **A Co-Infecção HIV/Protozoários monoxênicos**

Quando o indivíduo HIV-1-positivo progride para o quadro de imunossupressão, a infecção com microorganismos não patogênicos pode ocorrer devido à dificuldade que estes pacientes apresentam no controle do crescimento destes microorganismos oportunistas (Karp & Auwaerter, 2007a; Karp & Auwaerter, 2007b). Dentre estes microorganismos oportunistas podemos encontrar infecções com tripanossomatídeos inferiores, também denominados monoxênicos ou monogenéticos (Chicharro & Alvar, 2003). Os tripanossomatídeos monoxênicos, também chamados de inferiores, caracterizam-se por possuir todo o seu ciclo de vida em um único hospedeiro invertebrado (normalmente insetos e aracnídeos), e pertencem a esta categoria os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* (Chicharro & Alvar, 2003). A presença de *Leptomonas*, *Herpetomonas* e, possivelmente, *Crithidia*, já foi relatada em pacientes imunossuprimidos em decorrência da infecção pelo HIV-1, porém ainda não está claro como a infecção com estes protozoários pode ter ocorrido. Os dixênicos ou digenéticos possuem um ciclo de vida alternado entre dois

hospedeiros (normalmente em um vertebrado e em um invertebrado), e os melhores exemplos são os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (Chicharro & Alvar, 2003).

Um fato marcante, concernente a este tipo de co-infecção com monoxênicos, tange à identificação de qual espécie está envolvida nos pacientes com AIDS. A identificação é complicada e normalmente não se consegue chegar à espécie. Isto ocorre pois os testes baseiam-se em exclusão de alguns gêneros de protozoários que poderiam estar envolvidos. Por exemplo, Dedet *et al.* (1995) reportaram um caso de um paciente da Martinica infectado pelo HIV que apresentava ulcerações cutâneas características de infecção por tripanossomatídeo, porém a análise iso-enzimática só pôde descartar as infecções por *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Sauroleishmania* (Dedet *et al.*, 1995). Neste caso, a aparência microscópica revelou ser um monoxênico, mas a possibilidade de ser *Crithidia* ou *Blastocrithidia* foi descartada por não possuir cistos flagelares, citofaringe e formas epimastigotas e coanomastigotas. Posteriormente o mesmo grupo sugeriu tratar-se de *Leptomonas* ou *Herpetomonas* (Dedet & Pratlong, 2000). Em 2000, Boisseau-Garsaud e colaboradores causaram espanto ao reportar um novo caso de infecção com monoxênico (também na Martinica) em pacientes portadores de HIV porém não imunocomprometidos (Boisseau-Garsaud *et al.*, 2000). Em 1996, Jiménez e colaboradores também reportaram a co-infecção HIV-1/monoxênico em uma mulher usuária de drogas injetáveis vivendo em Madrid-Espanha, todavia a identificação do protozoário não foi possível e os promastigotas não eram capazes de infectar hamsters sírios ou camundongos Balb/c (Jimenez *et al.*, 1996). Diversos outros casos de co-infecção entre HIV e flagelados monoxênicos, na maioria das vezes associada a pacientes com quadro de AIDS, já foram reportados em outras partes do Mundo, como Estados Unidos, Guiné-Bissau, Espanha e Brasil (Chicharro & Alvar, 2003).

Ainda permanece uma incógnita como os indivíduos contraem estes monoxênicos. Normalmente os invertebrados carreadores destes protozoários infectam-se ao ingerirem parasitos excretados nas fezes de outros invertebrados (Chicharro & Alvar, 2003). Um caso de co-infecção contendo monoxênico que pode

habitar glândula salivar de pulgas já foi relatado aqui no Brasil em um paciente com AIDS (Pacheco *et al.*, 1998). Em outra investigação, Jiménez também relatou que uma espécie de monoxênico não identificada pode habitar o intestino de *Rhodnius prolixus* (Jimenez *et al.*, 1996). Estas observações podem reforçar a hipótese de infecção através da picada de pulga canina e triatomíneo em pacientes imunocomprometidos. Em laboratório é possível colonizar o trato digestivo de *Aedes aegypti* (vetor da Dengue e Febre Amarela) por 38 dias com *Blastocrithidia culicis*, o que pode sugerir uma possível via de transmissão por meio da picada deste mosquito infectado (Correa-da-Silva *et al.*, 2006). Em pacientes imunossuprimidos, Dedet também especula sobre uma possível infecção através de inalação acidental de inseto parasitado por tripanossomatídeo monoxênico, ou mesmo através de inoculação transcutânea (Dedet, 1996).

O inóculo de dois gêneros de monoxênicos (ou monogenéticos), extraídos de indivíduos imunocompetentes e pacientes infectados com HIV, em camundongos BALB/c demonstrou que esses protozoários podem adaptar-se a um mamífero (Garin *et al.*, 2001). Nos primeiros dias pós-injeção, o camundongo elimina uma grande percentagem de protozoários, mas após 100 dias é possível verificar ocorrência dos tripanossomatídeos no baço e linfonodos. Os monoxênicos isolados de indivíduos imunocompetentes demonstraram menor capacidade de crescer no interior dos camundongos, mas ambas as cepas de tripanossomatídeos foram capazes de infectar macrófagos murinos *in vitro*. Porém os animais inoculados não apresentaram sinais clínicos de infecção por protozoário, assim como nenhuma lesão tecidual, sugerindo que estes hospedeiros vertebrados foram capazes de tolerar a presença do patógeno (Garin *et al.*, 2001). Porém deve-se enfatizar que a quantidade de parasitos ( $10^7$ ) injetados nestes animais pode ser considerada bem elevada se compararmos à quantidade utilizada para estabelecer infecção com outros tripanossomatídeos patogênicos, como *Leishmania* e *Trypanosoma*. Outro relato clínico também sugere uma possível infecção de mamíferos com protozoários inferiores: tripanossomatídeo monoxênico foi encontrado em um rato e em um cachorro no Egito (Morsy *et al.*, 1988). Baseados nestas evidências sobre a possível infecção de vertebrados com

monoxênicos, Pacheco e colaboradores reportaram não ser possível infectar hamsters com monoxênico extraído de paciente infectado com HIV, o que demonstrou a baixa virulência do protozoário isolado (Pacheco *et al.*, 1998). *In vitro* já foi possível infectar fibroblastos dérmicos de murino com *Crithidia deanei* e *Herpetomonas roitmani* (Santos *et al.*, 2004). Entretanto sabe-se que fibroblastos de camundongo possuem atividade microbiciada reduzida e são capazes de permitir a sobrevivência intracelular de *Leishmania major in vivo* e *in vitro* (Bogdan *et al.*, 2000). Não obstante a estes fatos, cabe enfatizar que os estudos acima mencionados foram realizados com uma cepa de camundongo (cepa BALB/c) a qual é altamente suscetível às infecções com vários tipos de protozoários dixênicos, dentre os quais *Leishmania* (Gumy *et al.*, 2004). O estabelecimento, ou não, de uma infecção oportunista (como a infecção por monoxênico) ocorre em função do *status* imunológico do paciente, aliado ao grau de ativação/permisividade da célula hospedeira do parasito.

A *Blastocrithidia culicis* (ordem *Kinetoplastida*; família *Trypanosomatidae*) é um tripanossomatídeo de inseto que contém uma bactéria endossimbionte em seu citoplasma (Chang, 1974). O protozoário *Blastocrithidia culicis* foi inicialmente isolado de intestino de *Triatomona infestans* e descrito como um protozoário contendo uma entidade auto-reprodutora denominada de diplossoma (mais tarde verificou-se que os diplossomas eram os endossimbiontes) (Novey *et al.*, 1907). Nos últimos anos, os endossimbiontes intracelulares de alguns tripanossomatídeos despertaram atenção devido à sua relevância na origem de mitocôndrias e cloroplastos (Gray, 1988). A *Blastocrithidia culicis* possui apenas uma bactéria endossimbionte por protozoário e a eliminação do endossimbionte (referido como *Blastocrithidia curada*) compromete significativamente o crescimento destes protozoários. Por exemplo, *B. culicis* normais crescem normalmente em certos meios de cultura com baixos nutrientes, ao passo que as cepas curadas com Cloranfenicol tornam-se nutricionalmente exigentes e param de crescer nestes mesmos meios (Chang & Trager, 1974). Além disso, cepas normais não necessitam da adição de ornitina, arginina e citrulina no meio de cultura, pois os endossimbiontes possuem enzimas capazes de formar esses aminoácidos através da inter-conversão de outros aminoácidos (Camargo & Freymuller, 1977). Em suma, as

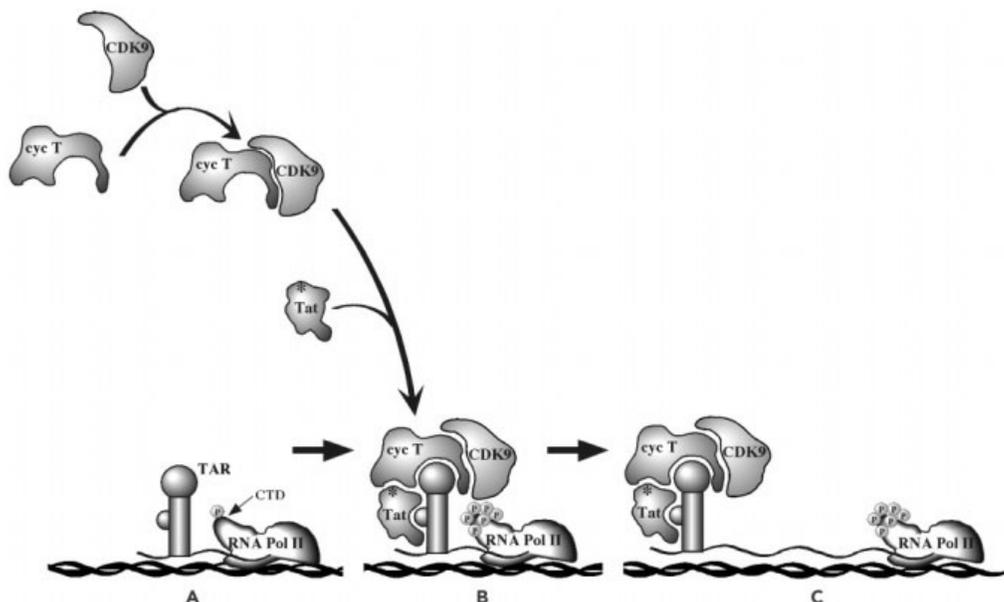
bactérias endossimbiônticas são fundamentais para o protozoário portador, pois estas fornecem fatores de crescimento, como, por exemplo, heme, purinas, aminoácidos e vitaminas (Menezes & Roitmanz, 1991). No caso da *B. culicis*, a bactéria endossimbiôntica foi denominada *Kinetoplastibacterium blastocrithidi* e divide-se sincronicamente com os protozoários (de Souza & Motta, 1999). O endossimbionte está localizado perto do núcleo da *Blastocrithidia* e seu tamanho é de aproximadamente 1,3-2,3  $\mu\text{m}$  (de Souza & Motta, 1999). Como toda relação simbiôntica, a bactéria intracelular também se favorece do metabolismo do protozoário hospedeiro. Em *Crithidia*, análises citoquímicas sugerem que o endossimbionte contém uma cadeia respiratória inativa, porém pode utilizar o ATP gerado na mitocôndria do hospedeiro para a sua própria sobrevivência (Motta *et al.*, 1997).

## **A Proteína Trans-ativadora do HIV e seus efeitos biológicos**

A produção de transcritos do HIV-1 parece ser altamente dependente de sua proteína trans-ativadora viral (Tat). Este fato pôde ser claramente ilustrado quando foi observado que vírions defectivos de Tat, ou com a expressão de Tat altamente controlada, tinham uma replicação deficiente em células infectadas, possuindo apenas poucos transcritos produzidos (Jones & Peterlin, 1994; Kiselyeva *et al.*, 2004; Verhoef *et al.*, 2001). A proteína Tat do HIV-1 é pequena (101 aminoácidos), codificada por dois *exons*, imunogênica e conservada entre os grupos M do HIV-1 (Ensoli *et al.*, 2006; Jeang *et al.*, 1999). Usualmente a proteína Tat utilizada em experimentos contém 86 aminoácidos, e acredita-se que esta isoforma truncada tenha se originado de sucessivas passagens do HIV-1 em cultura (Neuveut & Jeang, 1996). O resíduo do aminoácido 87 ao 101 existe em HIV-1 replicando *in vivo*, porém a proteína truncada (Tat com 86 aminoácidos) não altera a replicação do HIV-1 *ex vivo* e parece não modificar nenhuma outra propriedades do Tat (Jeang *et al.*, 1999). A imunogenicidade natural do Tat pôde ser indiretamente comprovada através da detecção de anticorpos contra Tat em pacientes HIV-1+ e assintomáticos (Ensoli *et al.*, 2006).

Sabe-se que a transcrição dos genes do HIV-1 pode iniciar-se na ausência de Tat, porém esta proteína é fundamental na elongação da transcrição (Jones & Peterlin, 1994). A região *long terminal repeat* (LTR) do HIV-1 contém seqüências promotoras e *enhancers* onde se ligam vários fatores de transcrição intracelulares (Peterlin & Trono, 2003). O promotor do HIV-1 encontra-se em uma região anterior do início da transcrição (Inr) e apresenta um sítio chamado *TATA box*, o qual possui três motivos de ligação ao SP1. Já nos *enhancers* podemos encontrar sítios capazes de interagir com o Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), com o Fator Nuclear de células T Ativadas (NFAT) e com AP1 (Jones & Peterlin, 1994). A transcrição de provírus do HIV-1 é caracterizada por uma fase precoce (independente de Tat) e por uma fase tardia (dependente de Tat). Como toda síntese de RNA em eucariotos, a transcrição é dependente de fatores que permitam uma maior e mais longa interação da holoenzima RNA Polimerase II com o DNA. Uma característica importante do promotor do HIV-1 é a presença de um elemento regulador localizado logo após o sítio de início da transcrição (Brady & Kashanchi, 2005; Peterlin & Price, 2006). Esta região é chamada de Elemento de Resposta à Transativação (TAR) e, quando transcrito, induz a formação de uma alça de RNA (Brady & Kashanchi, 2005; Peterlin & Price, 2006; Strebel, 2003). Nesta alça formada no RNA viral nascente liga-se a proteína Tat, a qual, ao interagir, altera a conformação do TAR, o que permite uma melhor associação de outras proteínas nesta região. Para a atividade do Tat ser completa e propiciar uma transcrição eficiente dos genes do HIV-1, o fator positivo na elongação da transcrição  $\kappa$  (P-TEFb) precisa ligar-se ao TAR presente no LTR (Peterlin & Price, 2006; Strebel, 2003). O P-TEFb é formado por um complexo protéico contendo dois componentes: ciclina T1 (CYCT1) e cinase dependente de ciclina 9 (CDK9) (Brady & Kashanchi, 2005; Peterlin & Price, 2006; Strebel, 2003). O Tat é que permite uma interação estável do complexo P-TEFb com o TAR, pois a CYCT1 contém uma região que interage com o Tat, um sítio que se liga ao TAR e a região que prende a CDK9. Quando presente nos RNAs virais nascentes, o complexo Tat-PTEFb pode fosforilar o domínio carboxi-terminal (CTD) através da CDK9, o que permite uma maior processividade da RNA Polimerase II (Brady & Kashanchi, 2005; Peterlin & Price, 2006; Strebel, 2003). Esta hiperfosforilação também promove a desassociação do complexo negativo de elongação (N-

TEF) e converte o complexo de iniciação da transcrição em um complexo de alongação da transcrição (Peterlin & Price, 2006; Strebel, 2003). Contrariamente ao seu efeito recrutador no P-TEFb, o Tat do HIV-1 não é capaz de recrutar a RNA Polimerase II, indicando a provável razão pela qual podemos verificar início da transcrição do HIV-1 na ausência de Tat (Brady & Kashanchi, 2005; Peterlin & Price, 2006). Todo esse processo de alongação de transcritos virais é favorecido pelo fato do Tat ser uma das primeiras proteínas produzidas pela célula infectada. Para que exista a produção do Tat, o RNA viral deve sofrer todos os *splicings* possíveis, o que tradicionalmente ocorre em todos os RNAs eucarióticos (Peterlin & Trono, 2003). Após a formação das proteínas Tat, estas podem retornar ao núcleo celular e auxiliar na formação de diversos transcritos do HIV-1 (Goldstein, 1996). Como a produção de muitos transcritos do HIV-1 depende de Tat, não se observa a produção de partículas virais por células infectadas quando a proteína Tat está reprimida (Kiselyeva *et al.*, 2004). O funcionamento do Tat na alongação da transcrição do HIV-1 está representado na figura 5.



**Figura 5:** Representação resumida do mecanismo de ação do Tat na produção de mRNA do HIV-1. O início da transcrição do RNA do HIV-1 ocorre ainda no LTR 5'. Logo após o começo da transcrição, uma alça de RNA é formada (TAR) onde podemos encontrar sítios de interação com a proteína Tat e com a proteína Cyc T. Quando o domínio de ativação do Tat interage com o complexo Cyc T-CDK9 (também chamado de p-TEFb), a conformação do Tat altera, o que leva a um aumento de afinidade pelo TAR. Com o recrutamento deste complexo para perto da RNA Polimerase II, o Tat medeia a hiperfosforilação do domínio carboxi-terminal (CTD) através da cinase CDK9. A hiperfosforilação da RNA Pol II permite uma maior processividade desta enzima, com conseqüente elongação da transcrição e maior síntese de mRNA viral. Esquema extraído de Freed & Martin (Freed & Martin, 2007).

Em culturas de células infectadas produtivamente com o HIV-1 *in vitro*, pode-se observar a presença do Tat no sobrenadante, um fato que também pode ser detectado no soro de pacientes portadores do HIV-1 (Ensoli *et al.*, 2006). Estes fenômenos ocorrem porque o Tat do HIV-1 pode ser liberado por células infectadas vivas e com membranas celulares íntegras (Chang *et al.*, 1997). A saída de Tat da célula não pode ser bloqueada por Brefeldina A ou por Metilamina, sugerindo que a liberação do Tat independe das vias clássicas de secreção de proteínas formadas no Retículo Endoplasmático, ou mesmo das vias de exocitose (Chang *et al.*, 1997). Quando células não infectadas pelo HIV-1 são pulsadas com Tat exógeno, podemos verificar a incorporação desta proteína, sugerindo que o Tat liberado pode retornar à célula que o exocitou (Ensoli *et al.*, 2006; Frankel & Pabo, 1988; Goldstein, 1996). Substanciando

estes achados, a neutralização de Tat com anticorpos específicos diminui a captura destas proteínas que foram naturalmente liberadas pelas células infectadas. Quando a recaptura deste Tat é bloqueada, observa-se menor produção de vírions, indicando que o Tat extracelular pode retornar ao interior da célula infectada e contribuir para a formação de novas partículas virais (Goldstein, 1996; Steinaa *et al.*, 1994). Em pacientes, alguns estudos indicam uma forte associação entre a presença de anticorpos anti-Tat e uma progressão retardada para a doença AIDS, tanto em infecções com HIV-1 quanto com o HIV-2 (Rezza *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2006). Em 2003, Lin e colaboradores construíram um camundongo transgênico contendo Tat do HIV-1 fusionado à proteína verde fluorescente (GFP), e sob controle do promotor da insulina. Neste sistema, o Tat era liberado na circulação sanguínea (similar à insulina) e alcançava diversos tecidos do animal, como o cerebelo, timo, baço e coração (Lin *et al.*, 2003). Conforme citado anteriormente, é possível detectar Tat no soro de pacientes infectados tanto com o HIV-1 quanto com o HIV-2, e os resultados com esses animais geneticamente modificados sugerem que o Tat pode atingir diversos tecidos de um indivíduo infectado pelo vírus. Também nestes camundongos, os autores observaram que o Tat extracelular alcançava os núcleos de monócitos, linfócitos e neutrófilos, e que não havia diferença nas percentagens das populações tímicas, nem tampouco diferenças nos perfis basais de apoptose (Lin *et al.*, 2003). De fato, uma propriedade marcante é a habilidade desta proteína em atravessar a membrana plasmática através de um domínio rico em aminoácido arginina (RKKRRQRRR) nas posições 49 a 57 (Chang *et al.*, 1995). Este domínio também confere o direcionamento do Tat para o núcleo celular e também participa na interação com a região TAR (Jeang *et al.*, 1999). Duas regiões básicas (GRKKR) presentes na proteína Tat demonstram alta afinidade pelo núcleo celular, e, por esta razão, esta região vem sendo utilizada com intuito de direcionar proteínas para o compartimento nuclear e nucleolar (Dang & Lee, 1989)

A proteína Tat altera funções fisiológicas de várias células, independentemente da infecção pelo HIV-1. Embora restrito a alguns tipos celulares, o tratamento com Tat pode induzir apoptose em linfócitos T não infectados pelo vírus (Li *et al.*, 1995). A indução da apoptose nestas células pode ocorrer pela liberação de citocromo C devido à polimerização de microtúbulos (de Mareuil *et al.*, 2005). Ainda neste contexto, a

expressão do Tat em células hematopoiéticas resulta em diminuição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 e aumenta a expressão do fator pró-apoptótico Bax (Sastry *et al.*, 1996). É oportuno lembrar que apenas alguns tipos celulares sofrem apoptose quando expostos ao Tat do HIV-1.

Uma característica que ocorre em aproximadamente 10% das pessoas infectadas com HIV-1 nos Estados Unidos é a presença de doenças neurológicas (como demência e encefalite) associadas à alta carga viral no Sistema Nervoso Central (SNC) (Albright *et al.*, 2003). Quando o HIV-1 atinge o cérebro, o vírus é capaz de infectar macrófagos neurais e microglia (King *et al.*, 2006). A histopatologia das doenças neurais em pacientes HIV-1+ é caracterizada pela infiltração de macrófagos no cérebro, astrogliose e por danos neuronais (Albright *et al.*, 2003). Em pacientes apresentando esse quadro clínico, a proteína Tat já foi relatada em fluidos cérebro-espinhais e no cérebro (Hudson *et al.*, 2000). Em neurônios fetais humanos, o tratamento com a proteína Tat é capaz de induzir altos níveis de apoptose via ativação por receptores N-metil D-aspartato (NMDAR) (King *et al.*, 2006). Todavia, em contraste à indução de apoptose, Tat também pode aumentar a proliferação celular em diversas células, incluindo neurônios (Peruzzi, 2006). Tratamento com baixíssimas concentrações de Tat (0,05 ng/mL) é capaz de aumentar a proliferação celular de linhagem tumoral proveniente de Sarcoma de Kaposi (Ensoli *et al.*, 1993). A proteína Tat também pode sinergizar com o Fator básico para Crescimento de Fibroblastos (bFGF) e levar à indução de lesões semelhantes a Sarcoma de Kaposi em camundongos (Ensoli *et al.*, 1994). Dois outros estudos também observaram desenvolvimento de hiperplasia linfóide quando o gene para Tat foi introduzido em células germinativas de camundongo (Kundu *et al.*, 1999; Vellutini *et al.*, 1995). Entretanto ainda não está claro como a proteína Tat pode induzir fenômenos tão distantes como a proliferação e a morte celular, e acredita-se que pode ser devido às condições experimentais com diferentes concentrações da proteína Tat (Barillari & Ensoli, 2002).

O tratamento com a proteína Tat, ou mesmo a transfecção com plasmídeo contendo o gene para Tat, induz a secreção de diferentes fatores solúveis por diversos

tipos celulares. Adição exógena de Tat promove a secreção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 por macrófagos (Leghmari *et al.*, 2008; Mayne *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 1999; Reinhold *et al.*, 1999; Zagury *et al.*, 1998a). Surpreendentemente, a exposição de macrófagos humanos ao Tat por 5 minutos já é suficiente para induzir a secreção máxima de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, o que indica uma rápida sinalização intracelular desencadeada pela presença de Tat do HIV-1 (Nath *et al.*, 1999). A proteína Tat também estimula a secreção de citocinas por células dendríticas humanas imaturas: por exemplo, Izmailova e colaboradores (2003) demonstraram que a transfecção com Tat induzia a expressão de 33 genes em células dendríticas imaturas, sendo quatro destes genes envolvidos na produção de quimiocinas e outras moléculas envolvidas em quimiotaxia (Izmailova *et al.*, 2003). Em vários modelos de estudo, o tratamento/transfecção com Tat promove a ativação/expressão de fatores importantes envolvidos na transcrição de diversas citocinas: e.g. em baixas doses (10 ng/mL), o Tat exógeno é capaz de levar à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em células dendríticas e macrófagos (Hsieh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 1999) ou mesmo ativação de PKR em monócitos (Li *et al.*, 2005a); enquanto a transfecção com Tat pode induzir a expressão do PKR, STAT-1 e IRF-7 em células dendríticas (Izmailova *et al.*, 2003). Um aspecto interessante a ser ressaltado é o fato do Tat poder mimetizar a sinalização bioquímica produzida pela incubação de monócitos com uma citocina. Albini *et al.* (1998) demonstraram que 100 ng/mL de Tat é capaz de promover sinalizações intracelulares semelhantes às produzidas por citocinas, caracterizado por um rápido influxo de cálcio em macrófagos (Albini *et al.*, 1998). Os autores também observaram que a região rica em cisteína da molécula Tat é capaz de induzir a migração de monócitos e disparar a mobilização de cálcio, provavelmente porque esta região é semelhante aos resíduos essenciais para sinalização de quimiocinas CC (Albini *et al.*, 1998). Devido a todas essas alterações fisiológicas induzidas por Tat, e somando-se ao seu papel na patogênese da infecção pelo HIV, acreditamos que esta molécula pode representar um alvo para investigações em modelo de co-infecção HIV-1/Tripanossomatídeos em macrófagos humanos *in vitro*.

## Objetivos

Embora relevante no contexto mundial, há poucos estudos procurando identificar a modulação da replicação da *Leishmania* e do HIV-1 nas co-infecções envolvendo estes dois patógenos. Os estudos nesta área são limitados à comparação entre indivíduos naturalmente infectados e co-infectados, normalmente com diferentes histórias clínicas, uma vez que não existe um modelo experimental adequado para investigações sobre a replicação *in vivo* destes dois agentes infecciosos em conjunto (pois o HIV só infecta seres humanos). Os modelos *in vitro* apresentam a vantagem de serem altamente controlados experimentalmente e capazes de nos informar qual é o efeito de um patógeno sobre o outro em culturas celulares co-infectadas em laboratório. Alguns trabalhos foram realizados utilizando *L. infantum* e *L. donovani* (espécies viscerotrópicas) e HIV-1 para infectar macrófagos humanos primários, e os resultados indicaram que a replicação de ambos os patógenos é aumentada em relação aos controles contendo cada patógeno isoladamente no macrófago (Wolday *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006). Todavia, os trabalhos não abordaram os mecanismos pelos quais a replicação do protozoário é exacerbada, restringindo-se a analisar os efeitos do tripanossomatídeo sobre a produção viral (Zhao *et al.*, 2004). Nesta tese, nós procuramos investigar o efeito do HIV-1 na replicação intracelular da *L. amazonensis* em macrófagos humanos primários co-infectados com o vírus e com o protozoário, procurando identificar os fatores responsáveis pela modulação da replicação parasitária. Escolhemos *L. amazonensis* pois não havia nenhum estudo *in vitro* de co-infecção do HIV-1 com esta espécie de *Leishmania*, embora ocorra co-infecção HIV-1/*Leishmania* no Brasil com todas as formas clínicas da leishmaniose (cutânea, muco-cutânea e visceral) (Cruz *et al.*, 2006). Nestes estudos, nós focalizamos nossa atenção na proteína Tat do HIV-1, pois estudos anteriores indicaram que o Tat pode ser liberado por células infectadas com o vírus; que o Tat induz a secreção do Fator de Crescimento e Transformação (TGF)- $\beta$  por macrófagos humanos; e que o Tat inibe a síntese de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos. Estes dois

últimos efeitos são classicamente conhecidos por favorecer o crescimento intracelular da *Leishmania*. Em linhas gerais, procuramos investigar se:

- a co-infecção com HIV-1 e *L. amazonensis* em macrófagos humanos primários promovia um aumento da replicação de ambos os patógenos;

- a neutralização biológica de alguma molécula do HIV-1 (a proteína Tat seria a candidata) que poderia revelar o seu efeito modulador na proliferação intracelular da *Leishmania*;

- após a identificação do fator, a sua adição exógena poderia mimetizar os efeitos observados na co-infecção HIV-1/*Leishmania in vitro*.

- algum(s) mediador(es) solúvel(is), induzido(s) pela molécula do HIV-1, poderiam atuar no crescimento da *Leishmania*.

- este(s) mediador(es) depende(m) diretamente da produção de algum outro fator/proteína celular;

- a infecção *in vitro* de macrófagos humanos primários com HIV-1 permitiria o crescimento/estabelecimento de um tripanossomatídeo que normalmente não se replica em macrófagos normais (não infectados);

- o crescimento/estabelecimento de um protozoário não patogênico também seria mediado por alguma molécula do HIV-1, e se pelos mesmos fatores solúveis que favoreceriam o crescimento da *Leishmania*;

- a infecção de macrófagos primários com HIV-1 permitiria o crescimento de um microorganismo oportunista;

- a adição de uma (ou mais) molécula(s) do HIV-1 em culturas de macrófagos primários humanos promoveria o crescimento de um patógeno oportunista.

## CAPÍTULO 1

### Artigo 1

**Título:** Increased *Leishmania* Replication in HIV-1–Infected Macrophages Is Mediated by Tat Protein through Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis

**Publicado em:** *The Journal of Infectious Diseases* 2006; **196** (6): 846-54

**Autores:** Victor Barreto de Souza, Graziela Jardim Pacheco, Adriana Ribeiro Silva, Hugo C. Castro Faria Neto, Patrícia T. Bozza, Elvira Maria Saraiva, Dumith Chequer Bou-Habib.

**Objetivos do Estudo:** Neste estudo investigamos o efeito da infecção pelo HIV-1 na replicação intracelular da *Leishmania amazonensis* em macrófagos humanos primários. Identificamos que o HIV-1 incrementa a replicação intracelular da *Leishmania* nos macrófagos, e que a neutralização da proteína Tat revertia este fenômeno. Demonstramos que a adição exógena da proteína Tat recombinante em culturas monoinfectadas por *Leishmania* mimetizava o efeito do HIV-1 na exacerbação do crescimento do protozoário. Macrófagos infectados por *Leishmania* e expostos ao Interferon-gama, em conjunto com o Tat, apresentaram atividade leishmanicida reduzida quando comparado às culturas tratadas somente com o Interferon. Verificamos que a proteína Tat recombinante induzia a expressão da enzima Ciclooxigenase-2 em macrófagos primários normais, com subsequente produção de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Através do bloqueio farmacológico da enzima COX-2, nós observamos que a biossíntese de PGE<sub>2</sub>, induzida pela exposição ao Tat, foi fundamental para o crescimento intracelular da *Leishmania*. Na presença de Tat, a exacerbação da replicação do protozoário foi dependente da indução do Fator de Transformação e Crescimento (TGF)-β1 pela secreção de PGE<sub>2</sub>.

## Increased *Leishmania* Replication in HIV-1–Infected Macrophages Is Mediated by Tat Protein through Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis

Victor Barreto-de-Souza,<sup>1</sup> Graziela J. Pacheco,<sup>2</sup> Adriana R. Silva,<sup>2</sup> Hugo C. Castro-Faria-Neto,<sup>2</sup> Patricia T. Bozza,<sup>2</sup> Elvira M. Saraiva,<sup>3,a</sup> and Dumith Chequer Bou-Habib<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Imunologia, and <sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, and <sup>3</sup>Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* frequently occur as opportunistic pathogens in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)–infected individuals, but the mechanisms underlying protozoan growth in this context are poorly understood. Here, we demonstrate that the HIV-1 Tat protein drives *Leishmania* replication in primary human macrophages. We found that *Leishmania* growth doubled in HIV-1–infected macrophages and that anti-Tat antibodies reduced the exacerbated protozoan replication by 70%. Recombinant Tat increased *Leishmania* replication and overrode the leishmanicidal effect induced by interferon- $\gamma$ , allowing *Leishmania* replication even in the presence of this cytokine. Tat induced cyclooxygenase (COX)–2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis, and a COX-2 inhibitor abolished the Tat-mediated augmentation of *Leishmania* replication. Moreover, PGE<sub>2</sub> increased *Leishmania* growth, which was abrogated by anti-transforming growth factor (TGF)– $\beta$ 1 monoclonal antibodies. Neutralization of TGF- $\beta$ 1 reduced parasite growth in *Leishmania*-infected macrophages exposed to Tat by 50%. Our findings suggest that Tat generates a milieu permissive to *Leishmania* growth in individuals infected with HIV-1.

Macrophages are productively infected by HIV-1, the etiologic agent (along with HIV-2) of AIDS. These cells appear to be resistant to the cytopathic effect of the virus in vitro [1]. During the progression of HIV-1 infection, the percentage of macrophages does not

decrease (in contrast to what occurs with lymphocytes) [1, 2], and several studies have suggested that HIV-1–infected macrophages could be a viral reservoir in vivo [2–5]. Patients with AIDS usually succumb to coinfection with opportunistic pathogens, and most such coinfections are accompanied by increases in HIV-1 production in vivo as well as in vitro [4–8]. Analyses of lymph nodes from HIV-1–positive patients coinfecting with *Pneumocystis carinii* or *Mycobacterium avium* has revealed that macrophages are a rich source of HIV-1 production [4, 5]. In these lymph nodes, where HIV-1 and opportunistic pathogens colocalize in macrophages, the frequency of HIV-1–expressing cells was found to be substantially higher than that in lymph nodes from HIV-1–only-infected individuals [4].

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* also infect macrophages and have been encountered in patients with AIDS as opportunistic pathogens [9]. *Leishmania* parasites cause a diverse group of diseases,

Received 28 December 2005; accepted 2 May 2006; electronically published 10 August 2006.

Presented in part: 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, 24–27 July 2005, Rio de Janeiro (abstract TuPe1.4C08).

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

\* E.M.S. and D.C.B.-H. contributed equally to this work.

Reprints or correspondence: Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, Dept. de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365–Manguinhos, Pav. Leônidas Deane/409, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil (dumith@ioc.fiocruz.br).

**The Journal of Infectious Diseases** 2006;194:846–54

© 2006 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
0022-1899/2006/19406-0018\$15.00

including lesions on skin, on mucosal surfaces, and in visceral organs [9]. Because geographical areas of *Leishmania* transmission overlap with areas of HIV-1 prevalence, clinical episodes of HIV-1/*Leishmania* coinfection have arisen in tropical and Mediterranean countries, defining leishmaniasis as an emerging disease, according to the World Health Organization [9, 10]. Leishmaniasis promotes an increase in serum HIV-1 load [11] and a more rapid progression to AIDS, leading to a decrease in the life expectancy of HIV-1-infected patients [12].

Visceral and cutaneous forms of leishmaniasis have been characterized in HIV-1-infected individuals [13], who can present multiple cutaneous lesions, resembling the picture of diffuse leishmaniasis more frequently found in immunosuppressed patients [14, 15]. Experiments have shown that *Leishmania* parasites multiply more efficiently in cultures of macrophages coinfecting with HIV-1, suggesting that HIV-1 infection impairs the ability of the macrophage to control protozoan growth [16].

The HIV-1 transcriptional transactivator (Tat) is a regulatory protein that acts in the elongation of viral transcripts through recruitment of cellular factors to the long terminal repeat viral promoter [17]. Tat is an essential viral gene product for HIV-1 replication, and virus that is defective for Tat function cannot replicate efficiently in tissue culture [17]. In the absence of HIV-1 Tat, viral transcription starts but is defective for elongation, and few productive transcripts are made [17].

Cells productively infected by HIV-1 release large amounts of Tat [18–22], which can be found in the serum of HIV-1-infected patients as well as in the supernatants of HIV-1-infected cells [21]. Intriguingly, Tat can disrupt the homeostasis of the immune system, because it stimulates secretion of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and TNF- $\beta$  [22, 23]. The ability of Tat to induce production of TGF- $\beta$ 1 and to inhibit interferon (IFN)- $\gamma$ -induced nitric oxide (NO) production by macrophages [24, 25] could generate a milieu that is permissive to *Leishmania* growth in macrophages [26, 27], thus favoring protozoan proliferation in *Leishmania*/HIV-1-coinfecting individuals. In the present study, we report experimental evidence for this potential role of Tat, focusing on the contribution of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), TGF- $\beta$ 1, and lowered IFN- $\gamma$ -induced leishmanicidal activity to the Tat-mediated exacerbation of *Leishmania* proliferation in human macrophages.

## MATERIALS AND METHODS

**HIV-1 isolate and *Leishmania*.** All assays of macrophage infection were performed with the monocytotropic, CCR5-dependent isolate HIV-1<sub>Ba-L</sub> [28], which was expanded in phytohemagglutinin-activated peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs). *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) promastigotes were cultivated at 26°C in Schneider's insect me-

dium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL) and 15  $\mu$ g/mL gentamycin (Schering-Plough). Promastigotes from 5–6-day stationary cultures were used for experiments throughout.

**Reagents.** The cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib was purchased from Searle Pharmaceuticals and was used at 10  $\mu$ mol/L [29] diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; LGC Bio). PGE<sub>2</sub> was obtained from Cayman Chemicals, anti-TGF- $\beta$ 1 monoclonal antibodies (MAbs; clone 9016) were obtained from R&D Systems, and IFN- $\gamma$  was obtained from Peprotech. The following reagents were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], National Institutes of Health): HIV-1 Tat protein from J. Brady (National Cancer Institute, National Institutes of Health), and rabbit antiserum to HIV-1 Tat from B. Cullen (Duke University Medical Center). Lyophilized 86-aa Tat was reconstituted in PBS containing 1 mg/mL bovine serum albumin and 0.1 mmol/L dithiothreitol (DTT). The Tat preparation, which has been shown to be biologically active, contained <0.15 EU/ $\mu$ g lipopolysaccharide, as assessed by *Limulus* amoebocyte assay (BioWhittaker). Oxidized Tat was prepared as described elsewhere [30].

**Cells.** Human monocyte-derived macrophages were obtained from PBMCs that had been isolated, by density gradient centrifugation (Hystopaque; Sigma), from buffy coat preparations of blood from healthy donors. Briefly,  $1 \times 10^6$  PBMCs were plated in 8-well Permanox chamber slides (Nalge Nunc) in DMEM containing 10% human serum (Sigma) and penicillin-streptomycin (Sigma). Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 6–7 days, for monocyte differentiation into macrophages. Nonadherent cells were washed out, and macrophages were maintained for 3 days in DMEM as described above. Macrophage purity was >90%, as determined by flow cytometric analysis (FACScalibur flow cytometer; Becton Dickinson) with anti-CD3 (Caltag Laboratories) and anti-CD16 (SouthernBiotech) MAbs.

**Macrophage infection with HIV-1 and *Leishmania*.** Macrophages were infected with the HIV-1 R5 isolate Ba-L by means of 5–10 ng/mL HIV-1 p24 antigen. After overnight incubation, excess virus was washed out, fresh medium was added, and infected macrophages were maintained under standard culture conditions. After 7–9 days of HIV-1 infection, macrophages were infected with *L. amazonensis* stationary-phase promastigotes, by means of a parasite:cell ratio of 3:1 at 34°C for 16 h. Noninternalized promastigotes were washed out, fresh medium was added, and cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 3–4 days. In some experiments, HIV-1 Tat antiserum was added to HIV-1/*Leishmania*-coinfecting macrophage cultures just after the removal of noninternalized *Leishmania* parasites. To measure HIV-1 production, supernatants were col-

lected, and the level of HIV-1 p24 antigen was assessed using a commercial ELISA (ZeptoMetrix). Slides were then fixed with methanol and stained with Giemsa. To evaluate *Leishmania* replication, amastigote forms of *Leishmania* parasites inside infected macrophages were counted by light microscopy. Results are expressed as endocytic indexes, which were calculated by multiplying the percentage of infected macrophages by the average number of parasites per macrophage. Because the endocytic index values varied between experiments, they were normalized (raw numbers are shown in the figure legends; for the sake of clarity, SEs have been omitted and values rounded to whole numbers). In other experiments, normal macrophages were infected only with *Leishmania* parasites as described above and were exposed to different reagents, such as HIV-1 Tat, anti-TGF- $\beta$ 1 MAb, IFN- $\gamma$ , PGE<sub>2</sub>, or celecoxib, according to the experimental proposal.

**Evaluation of TGF- $\beta$ 1 and PGE<sub>2</sub> concentrations.** Measurement of TGF- $\beta$ 1 and PGE<sub>2</sub> production by uninfected macrophages exposed to HIV-1 Tat protein was performed using commercial ELISA kits (from R&D Systems for TGF- $\beta$ 1 and from Cayman Chemical for PGE<sub>2</sub>), in accordance with the manufacturers' instructions. For the TGF- $\beta$ 1 ELISA, latent TGF- $\beta$ 1 was activated by treatment of samples with 1N hydrochloric acid (HCl) for 10 min, followed by neutralization with 1.2N sodium hydroxide containing 0.5 mol/L HEPES.

**Western blotting.** Uninfected macrophages were either exposed or not exposed to Tat (100 ng/mL) for 18 h, washed twice with PBS, and lysed in a buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 5 mmol/L EDTA, 30 mmol/L sodium pyrophosphate, 5% SDS, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L pepstatin A, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L benzamidine HCl, and soybean trypsin inhibitor (10 mg/mL). Cells were scraped in this buffer, and protein content was measured by the bicinchoninic acid method. Laemmli sample buffer was added to the lysate, which was subsequently incubated at 100°C for 5 min, and proteins (50  $\mu$ g/lane) were resolved by SDS-PAGE on a 9% gel. The proteins were transferred to an Immobilon-P membrane (polyvinylidene fluoride), which was blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline-Tween 20 buffer and then probed with anti-COX-2 (BD Transduction Laboratories) and anti- $\beta$ -actin (MP Biomedicals) MAbs. Antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG antibody (Biosource International) and enhanced chemiluminescence reagent (Pierce Biotechnology), using Biomax film (Eastman Kodak).

**Statistical analysis.** Each experimental condition was tested in duplicate. Results were analyzed using Prism software (version 4.0; GraphPad) and are presented as mean  $\pm$  SE values. Statistical analysis calculations were performed using the same software, and  $P < .05$  by Student's nonparametric  $t$  test was

considered to indicate statistical significance for the comparisons between values of indicated bars.

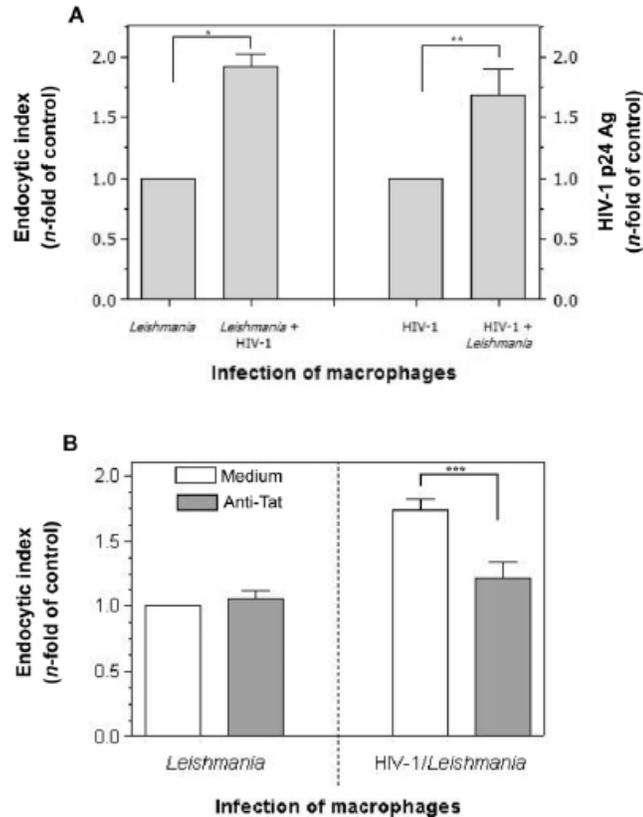
## RESULTS

That multiplication of HIV-1 and *Leishmania* parasites is augmented in cultures of coinfecting macrophages has been well characterized [8, 16]. However, the mechanisms underlying the growth enhancement of both pathogens have not been completely elucidated. In particular, how HIV-1 increases *Leishmania* replication is not known. In the present study, we demonstrate that a component of HIV-1 promotes the increase in *Leishmania* growth by analyzing the multiplication of *Leishmania* parasites in primary human macrophages coinfecting with HIV-1 or treated with the HIV-1 regulatory protein Tat.

**Increase in *Leishmania* growth in coinfecting macrophages as a result of HIV-1 infection.** Initially, we studied whether HIV-1 infection would modulate *Leishmania* replication in primary macrophages. Thus, HIV-1-infected macrophages were further infected with stationary promastigote forms of *L. amazonensis*. Of note, we confirmed that HIV-1 infection was productive at the time of *Leishmania* infection (data not shown). As depicted in figure 1A (left), *Leishmania* growth in HIV-1-infected macrophages was significantly augmented ( $P < .0001$ ), confirming that HIV-1 infection amplifies *Leishmania* replication in human macrophages [16]. As has been described previously [8], *Leishmania* infection also induced an increase in HIV-1 replication ( $P < .04$ ) (figure 1A, right). We thus asked whether this effect could be mediated by a component of the virus produced during productive HIV-1 infection. We selected the Tat protein, because it is released by HIV-1-infected cells independently of cell death, is also found in the serum of HIV-1-positive patients, and can perturb cellular physiological processes [18, 19, 21, 23].

**Diminishing of *Leishmania* multiplication in HIV-1/*Leishmania*-coinfecting macrophages as a result of HIV-1 Tat neutralization.** To first infer whether Tat can participate in the observed exacerbation of *Leishmania* replication, we added Tat antiserum to HIV-1/*Leishmania*-coinfecting macrophages. Tat antiserum significantly reduced the exacerbated *Leishmania* multiplication mediated by HIV-1 infection ( $P < .025$ ) (figure 1B), implying that secreted Tat can promote *Leishmania* growth in human macrophages. Remarkably, Tat antiserum did not affect *Leishmania* replication in macrophages free of HIV-1, showing that Tat antiserum did not exert a nonspecific effect on *Leishmania* replication.

**Increase in *Leishmania* multiplication in macrophages as a result of HIV-1 Tat.** On the basis of the preceding observation, we next addressed whether recombinant HIV-1 Tat protein could directly influence *Leishmania* replication. Therefore, HIV-1 Tat was added to macrophages infected only with *Leishmania* parasites, and protozoan growth was evaluated 3–5 days



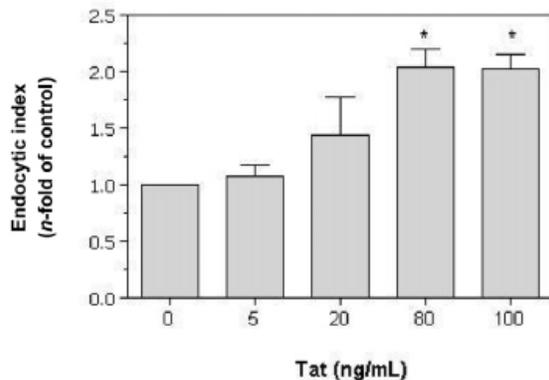
**Figure 1.** Effect that HIV-1 infection and HIV-1 Tat neutralization have on *Leishmania* growth in coinfecting macrophages. **A**, HIV-1 infection. Macrophages were infected with HIV-1 and, after 7–9 days, were also infected with *Leishmania* promastigotes. Control cells were infected only with *Leishmania* promastigotes. Cell cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 3–4 days, at which time *Leishmania* growth (left) and viral replication (right) were evaluated. Data are the mean ± SE results of 6 (left) or 3 (right) independent experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for *Leishmania*, 167; and for *Leishmania* plus HIV-1, 320. Means of p24 antigen (Ag) levels were as follows: for HIV-1, 500 pg/mL; and for HIV-1 plus *Leishmania*, 840 pg/mL. **B**, HIV-1 Tat neutralization. In some experiments, Tat antiserum (1:400) was added to macrophages infected only with *Leishmania* and to HIV-1/*Leishmania*-coinfecting macrophages. Data are the mean ± SE results of 3 experiments. Means of endocytic indexes were as follows: for medium (left), 363; for anti-Tat (left), 380; for medium (right), 660; and for anti-Tat (right), 475. \* $P < .0001$ , \*\* $P < .04$ , and \*\*\* $P < .025$ , for the indicated comparisons.

later. HIV-1 Tat doubled *Leishmania* multiplication at concentrations of 80 and 100 ng/mL, as shown in figure 2 ( $P < .001$ ). Biologically inactive Tat (oxidized Tat [30]), as well as Tat vehicle, did not alter *Leishmania* replication, compared with the control (data not shown). This indicates that exposure to soluble HIV-1 Tat increases macrophage permissiveness for *Leishmania* multiplication.

**Overriding of the IFN- $\gamma$ -induced leishmanicidal effect by HIV-1 Tat.** During the course of leishmaniasis, *Leishmania*-specific clones of activated Th1 lymphocytes secrete IFN- $\gamma$ , which induces leishmanicidal activity in macrophages [31]. We asked whether Tat can interfere with the IFN- $\gamma$ -driven leishmanicidal activity of macrophages. Thus, *Leishmania*-infected macrophages were exposed to either Tat, IFN- $\gamma$ , or Tat plus

IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  decreased *Leishmania* growth ( $P < .002$ , compared with the control) (figure 3), and HIV-1 Tat overrode the leishmanicidal effect of IFN- $\gamma$  ( $P < .035$ ) (figure 3). These data show that HIV-1 Tat has a suppressive effect on macrophage leishmanicidal activity stimulated by IFN- $\gamma$ .

**Augmentation of *Leishmania* replication by HIV-1 Tat through TGF- $\beta$ 1 induction.** HIV-1 Tat induces secretion of TGF- $\beta$ 1 in human macrophages and monocytes [24, 32], and this cytokine is a potent stimulator of *Leishmania* growth in these cells [26, 27]. Thus, we evaluated the contribution of TGF- $\beta$ 1 to increased *Leishmania* multiplication induced by HIV-1 Tat. When *Leishmania*-infected macrophages were treated with HIV-1 Tat in the presence of anti-TGF- $\beta$ 1 neutralizing MAbs, a significant decrease in *Leishmania* replication was observed relative



**Figure 2.** Effect that HIV-1 Tat protein has on *Leishmania* multiplication in macrophages. Macrophages were infected only with *L. amazonensis* and were either left untreated (0) or exposed to different concentrations of Tat, as indicated. Cell cultures were maintained for 4–5 days, at which time *Leishmania* growth was evaluated. Data are the mean  $\pm$  SE results of 4 experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for untreated macrophages, 134; for macrophages treated with 5 ng/mL, 146; for macrophages treated with 20 ng/mL, 194; for macrophages treated with 80 ng/mL, 274; and for macrophages treated with 100 ng/mL, 272. For 1-way analysis of variance comparing all groups,  $P < .002$ . \* $P < .001$ , for the comparison between untreated macrophages and those treated with 80 ng/mL and between untreated macrophages and those treated with 100 ng/mL.

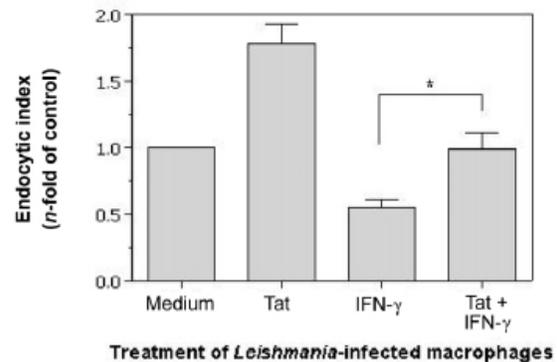
to that in infected macrophages treated only with Tat ( $P < .03$ ) (figure 4). As an internal control, *Leishmania*-infected macrophages were exposed only to anti-TGF- $\beta$ 1 MAb. This treatment did not modify protozoan replication, showing that there was no nonspecific modulation of parasite replication via macrophage Fc receptors. Similar to findings of other studies [24, 32], we observed that HIV-1 Tat induced TGF- $\beta$ 1 secretion by normal human primary macrophages (data not shown). These findings imply that increased *Leishmania* growth induced by HIV-1 Tat is at least partly mediated by TGF- $\beta$ 1.

**Participation of a cascade involving PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 in the amplification of the *Leishmania* growth induced by HIV-1 Tat.** It has been speculated that TGF- $\beta$ 1 secretion depends on upstream secretion of the prostanoid PGE<sub>2</sub> [33, 34], implying that secretion of TGF- $\beta$ 1 could be impaired when PGE<sub>2</sub> synthesis is inhibited. Furthermore, it has been reported that TGF- $\beta$ 1 and PGE<sub>2</sub> amplify *Leishmania* multiplication in macrophages [26, 27, 35]. Therefore, in the next set of experiments, we analyzed whether the participation of TGF- $\beta$ 1 in Tat-mediated amplification of *Leishmania* growth is dependent on the production of PGE<sub>2</sub>. On the basis of Western blotting, we initially found that Tat induced the expression of COX-2, an inducible isozyme that catalyzes a critical step in PGE<sub>2</sub> synthesis [29, 36]. We also found that Tat induced the production of

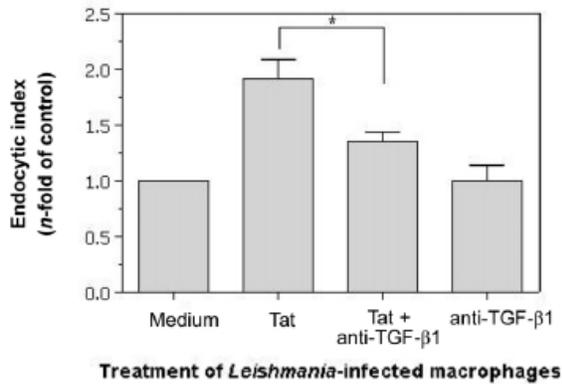
PGE<sub>2</sub> in uninfected macrophages (figure 5A). Importantly, Tat vehicle did not induce the production of either COX-2 or PGE<sub>2</sub>. Next, we found that the addition of celecoxib, a specific COX-2 isozyme inhibitor [29], completely abrogated the enhanced *Leishmania* replication induced by HIV-1 Tat ( $P < .02$ ) (figure 5B). This latter result suggests that PGE<sub>2</sub> participates in the Tat-induced augmentation of *Leishmania* multiplication. To confirm the participation of PGE<sub>2</sub> in modulating *Leishmania* growth, and to examine whether this modulation is dependent on TGF- $\beta$ 1 secretion, we simultaneously treated *Leishmania*-infected macrophages with PGE<sub>2</sub> and neutralizing anti-TGF- $\beta$ 1 MAb. We found that PGE<sub>2</sub> increased *Leishmania* replication ( $P < .025$ ) (figure 6) and that the anti-TGF- $\beta$ 1 MAb completely prevented the PGE<sub>2</sub>-induced increase in *Leishmania* proliferation. This last finding corroborates previous reports that PGE<sub>2</sub> favors *Leishmania* replication [35] and supports the concept that PGE<sub>2</sub> activity is dependent on TGF- $\beta$ 1 production. In addition, production of TGF- $\beta$ 1 decreased by 57% when macrophages were exposed to Tat plus celecoxib, relative to that in cells stimulated by Tat alone (data not shown). Taken together, these data suggest that HIV-1 Tat stimulates PGE<sub>2</sub> production, which leads to TGF- $\beta$ 1 secretion and culminates in augmentation of *Leishmania* growth.

## DISCUSSION

HIV-1 infection progressively impairs immune system function, leading to AIDS [37] and facilitating the establishment of opportunistic pathogens [13]. Moreover, recurrence of cutaneous



**Figure 3.** Overriding of the interferon (IFN)- $\gamma$ -induced leishmanicidal effect by HIV-1 Tat protein. *Leishmania*-infected macrophages were either left untreated (medium) or treated with Tat (100 ng/mL), IFN- $\gamma$  (100 U/mL), or both (at the same concentrations). Cell cultures were maintained for 4–5 days, at which time *Leishmania* growth was evaluated. Data are the mean  $\pm$  SE results of 3 experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for medium, 108; for Tat, 179; for IFN- $\gamma$ , 54; and for Tat plus IFN- $\gamma$ , 107. \* $P < .035$ , for the indicated comparison.



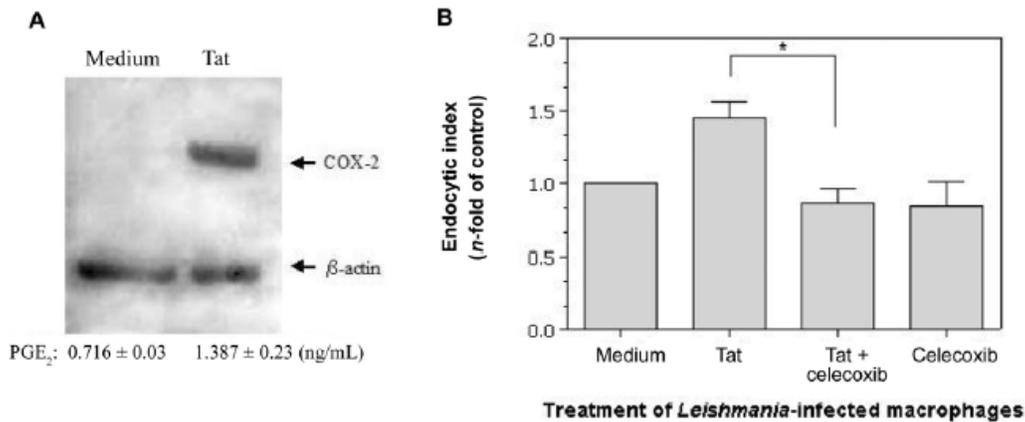
**Figure 4.** Augmentation of *Leishmania* replication by HIV-1 Tat protein through transforming growth factor (TGF)-β1 induction. *Leishmania*-infected macrophages were either left untreated (medium) or treated with Tat only (100 ng/mL), Tat plus anti-TGF-β1 monoclonal antibodies (MAbs; 10 μg/mL), or anti-TGF-β1 MAbs only. Data are the mean ± SE results of 4 experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for medium, 67; for Tat only, 128; for Tat plus anti-TGF-β1 MAbs, 83; and for anti-TGF-β1 MAbs only, 59. \**P* < .03, for the indicated comparison.

leishmaniasis has been observed in HIV-1-infected patients presenting with only moderate immunosuppression [38]. In the present study, we have shown, for the first time, that HIV-1 Tat protein up-modulates *Leishmania* growth in primary human

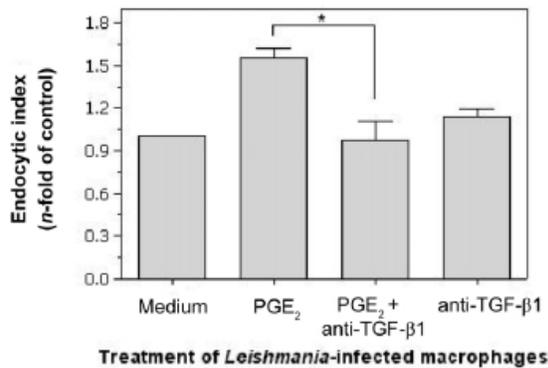
macrophages by inducing PGE<sub>2</sub> and TGF-β1 production, an effect that can override IFN-γ-induced leishmanicidal activity.

The HIV-1 Tat protein is essential in the transcription of the HIV-1 genome, and the absence of Tat compromises HIV-1 fitness and production [17]. HIV-1 Tat is precociously produced during HIV-1 infection and fosters interaction between the host transcriptional machinery and the HIV-1 genome, allowing the full transcription of viral genes [17]. Tat protein is released in large amounts from infected cells in the absence of cell death or changes in cellular membrane permeability [18, 19, 21]. Once released, Tat exerts biological effects on cells independently of HIV-1 genome transcription [23]. In this regard, Tat increases expression of the antiapoptotic Bcl-2 gene in human macrophages, augments expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4, up-regulates macrophage production of TNF-α and TGF-β1, and suppresses IFN-γ-induced inducible NO synthase (iNOS) in a murine macrophage cell line [39].

The ability of *Leishmania* parasites and HIV-1 to replicate in the same cell (i.e., macrophages) should be emphasized. This means that both pathogens coexist in the same tissue milieu, such as lymph nodes. In fact, it was recently found that *Leishmania* parasites amplify HIV-1 replication in ex vivo tonsil tissue from healthy donors [40]. In addition, previous reports have shown that common opportunistic pathogens and HIV-1 can grow in the lymph nodes of coinfecting patients and can cohabit inside macrophages [4, 5]. Furthermore, expressive amounts of HIV-1 Tat can be found in the lymph nodes of



**Figure 5.** Induction of cyclooxygenase (COX)-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis by HIV-1 Tat protein and their effects on *Leishmania* multiplication. **A**, Western blotting. Uninfected macrophages were either left untreated (medium) or exposed to Tat (100 ng/mL) for 18 h. Cells were lysed, and extracts were analyzed for human COX-2 enzyme or for β-actin (as a control). The Western blot shown is representative of 3 with similar results. PGE<sub>2</sub> production was assessed in cell supernatants by ELISA; the values shown are mean ± SE results from 3 experiments (*P* < .05). Means of picograms of PGE<sub>2</sub> production per microgram of cell protein were as follows: for medium, 0.368; and for Tat, 0.693. **B**, COX-2 inhibition. *Leishmania*-infected macrophages were either left untreated (medium) or treated with Tat only (100 ng/mL), Tat plus celecoxib (10 μmol/L), or celecoxib only. Data are the mean ± SE results of 3 experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for medium, 178; for Tat only, 250; for Tat plus celecoxib, 151; and for celecoxib only, 151. \**P* < .02, for the indicated comparison.



**Figure 6.** Prevention of the prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-induced increase in *Leishmania* replication by immune neutralization of transforming growth factor (TGF)-β1. *Leishmania*-infected macrophages were either left untreated (medium) or treated with PGE<sub>2</sub> only (5 μmol/L), PGE<sub>2</sub> plus anti-TGF-β1 monoclonal antibodies (MAbs; 10 μg/mL), or anti-TGF-β1 MAbs only. Data are the mean ± SE results of 3 experiments. Means of endocytic indexes (calculated as described in Materials and Methods) were as follows: for medium, 75; for PGE<sub>2</sub> only, 109; for PGE<sub>2</sub> plus anti-TGF-β1 MAbs, 62; and for anti-TGF-β1 MAbs only, 85. \**P* < .03, for the indicated comparison.

HIV-1-infected individuals [41]. These findings strengthen our hypothesis that Tat released by HIV-1-infected cells can influence *Leishmania* growth in an autocrine and/or paracrine fashion in tissues in which both microorganisms are actively replicating.

Initially, we found that *Leishmania* replication was significantly amplified in macrophages coinfecting with HIV-1 and that the exacerbated *Leishmania* growth was significantly neutralized by HIV-1 Tat antiserum. Importantly, Tat antiserum did not affect *Leishmania* growth in macrophages infected with this parasite in the absence of HIV-1, indicating that the antiserum does not nonspecifically interfere with *Leishmania* growth. Thus, immune neutralization of HIV-1 Tat molecules points directly to a key contribution of secreted Tat protein in the augmentation of *Leishmania* growth in macrophages.

It has been demonstrated that antibodies to Tat attenuate HIV-1 replication [21], raising the possibility that lowered HIV-1 production subsequent to Tat neutralization would ultimately control *Leishmania* growth. However, we noted an increase in *Leishmania* multiplication when macrophages infected only with *Leishmania* were exposed to recombinant HIV-1 Tat protein, indicating that the effect that Tat has on parasite growth occurs in the absence of HIV-1 infection.

Tat induces TGF-β1 production in primary human macrophages [24], and TGF-β1 is well known as a cytokine that increases the replication of a variety of *Leishmania* species in

macrophages [27]. Therefore, it is plausible that Tat induces increased *Leishmania* replication via TGF-β1 secretion. In fact, our results confirm this hypothesis, because we found that neutralization of TGF-β1 partially inhibited the growth-promoting effect that Tat has on *Leishmania* replication.

Macrophage leishmanicidal effects strongly depend on production of NO via iNOS [42], and expression of this enzyme can be triggered by soluble IFN-γ produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells [42]. On the basis of the present results, it is tempting to conclude that Tat-induced TGF-β1 secretion suppresses NO production by down-regulating the IFN-γ-mediated expression and activity of iNOS [43], thus favoring *Leishmania* replication inside macrophages. In our system, addition of HIV-1 Tat to IFN-γ-treated *Leishmania*-infected macrophages overrode the leishmanicidal effect of IFN-γ, permitting a rate of *Leishmania* multiplication similar to that in non-IFN-γ-treated macrophages. We speculate that this mechanism may be active in HIV-1/*Leishmania*-coinfecting individuals. Thus, Tat released by HIV-1-infected cells would govern the down-modulation of the effect that IFN-γ has on *Leishmania*-infected macrophages in an autocrine or paracrine manner. This would result in uncontrolled parasite growth and a more severe disease outcome. In addition, this mechanism could contribute to the reemergence of quiescent parasite reservoirs or to the enhancement of parasite load in HIV-1/*Leishmania*-coinfecting patients.

Further evidence that Tat enhances *Leishmania* growth via interconnected mechanisms is suggested by our findings that show that this HIV-1 protein induces COX-2 expression followed by PGE<sub>2</sub> synthesis and TGF-β1 production. We specifically found that Tat induces COX-2 expression and the consequent secretion of PGE<sub>2</sub>, and we conjecture that PGE<sub>2</sub> precedes the secretion of TGF-β1 in macrophages treated with Tat. Actually, we found that blockade of Tat-induced PGE<sub>2</sub> production by means of celecoxib, a COX-2 inhibitor, decreased TGF-β1 secretion by 57%. Furthermore, 2 other independent studies have uncovered the role played by PGE<sub>2</sub> in the induction of TGF-β1 secretion [33, 34]. It has been described that exogenous PGE<sub>2</sub> increases *Leishmania* replication in murine macrophages [35]. Likewise, we detected the same phenomenon in human macrophages by indirect and direct methods—first, we found that the Tat-induced enhancement of *Leishmania* growth was ablated when COX-2 was inhibited; and second, we found that addition of PGE<sub>2</sub> to *Leishmania*-infected macrophages augmented parasite growth. Consistent with these observations, we found that the effect that PGE<sub>2</sub> has on *Leishmania* growth was abolished by TGF-β1 neutralization, indicating that PGE<sub>2</sub>-induced *Leishmania* growth is mediated by TGF-β1. Given that TGF-β1 signaling prevails over the effects of IFN-γ [43], we speculate that the Tat-mediated decrease in the ability of macrophages to control *Leishmania* growth could be explained by those sequential events that culminate in the deactivation of

macrophages, which confers an advantage for *Leishmania* survival and replication.

Finally, we envisage an in vivo circuit in which the exacerbated replication of HIV-1 induced by *Leishmania* parasites in coinfecting patients would result in an overproduction of HIV-1 Tat that would, in turn, augment *Leishmania* growth. Amplified protozoan multiplication would induce new rounds of HIV-1 replication and Tat release, maintaining the circuit and worsening both infections. However, the actual clinical relevance of our present findings remains to be determined.

### Acknowledgments

We thank the hemotherapy service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil), for providing buffy coats; the AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health), for providing HIV-1 Tat protein and rabbit antiserum to Tat; Dr. Manoel Barral-Netto (Federal University of Bahia, Brazil), for helpful discussions; and Dr. Eric Y. Denkers (College of Veterinary Medicine, Cornell University), for carefully reviewing the manuscript.

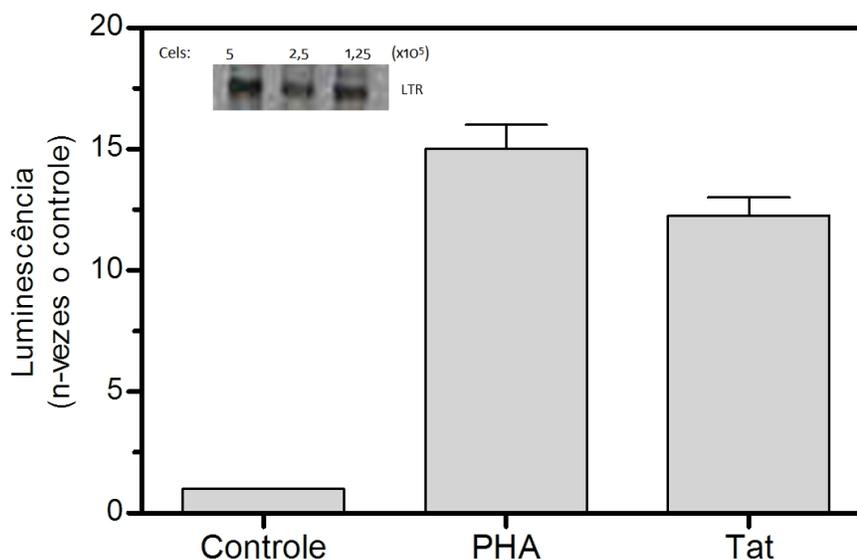
### References

- Verani A, Gras G, Pancino G. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 2005;42:195–212.
- Aquaro S, Calio R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral Res* 2002;55:209–25.
- Igarashi T, Brown CR, Endo Y, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:658–63.
- Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 1997;276:1857–61.
- Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, et al. *Mycobacterium avium* complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12574–9.
- Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* 1997;176:766–70.
- Goletti D, Weissman D, Jackson RW, et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication: role of immune activation. *J Immunol* 1996;157:1271–8.
- Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol* 2004;113:81–8.
- Desjeux P, Alvar J. *Leishmania/HIV* co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97:3–15.
- Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97:29–45.
- Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, et al. Immunological findings in HIV-*Leishmania* coinfection. *Intervirology* 1996;39:285–8.
- Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998;56:1009–18.
- Karp CL, Neva FA. Tropical infectious diseases in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1999;28:947–63.
- Gillis D, Klaus S, Schnur LF, et al. Diffusely disseminated cutaneous *Leishmania major* infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:247–9.
- Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:537–42.
- Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valentine A, Britton S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand J Infect Dis* 1998;30:29–34.
- Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 2003;3:97–107.
- Ensolì B, Buonaguro L, Barillari G, et al. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 1993;67:277–87.
- Chang HC, Samaniego F, Nair BC, Buonaguro L, Ensolì B. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 1997;11:1421–31.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995;375:497–500.
- Goldstein G. HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nat Med* 1996;2:960–4.
- Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8324–6.
- Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR. HIV-1 Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 1998;19:543–5.
- Zauli G, Davis BR, Re MC, Visani G, Furlini G, La Placa M. tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression. *Blood* 1992;80:3036–43.
- Barton CH, Biggs TE, Mee TR, Mann DA. The human immunodeficiency virus type 1 regulatory protein Tat inhibits interferon-induced iNOS activity in a murine macrophage cell line. *J Gen Virol* 1996;77:1643–7.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992;257:545–8.
- Reed SG. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1999;1:1313–25.
- 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;185:1561–6.
- Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J* 1999;339:607–14.
- Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, Bahraoui E. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J Virol* 2000;74:10551–62.
- Vanloubbeek Y, Jones DE. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann NY Acad Sci* 2004;1026:267–72.
- Gibellini D, Zauli G, Re MC, et al. Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein sequentially up-regulates IL-6 and TGF-beta 1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. *Br J Haematol* 1994;88:261–7.
- Fadok VA, Bratton DL, Konow A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890–8.
- Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000;403:199–203.

35. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* **2004**; 172:4454–62.
36. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **2000**; 69:145–82.
37. Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol* **2005**; 6:430–2.
38. Couppie P, Clyti E, Sobesky M, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol* **2004**; 151:1165–71.
39. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Ma G, Orenstein JM, Vazquez N. Viral and host cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages. *J Leukoc Biol* **2003**; 74:726–35.
40. Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *J Immunol* **2004**; 172:3086–93.
41. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **1993**; 362:355–8.
42. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2001**; 2:907–16.
43. Vodovotz Y. Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide* **1997**; 1:3–17.

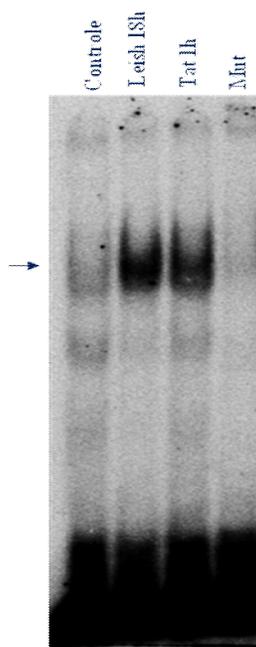
## Figuras Suplementares

Figura Suplementar 1.1



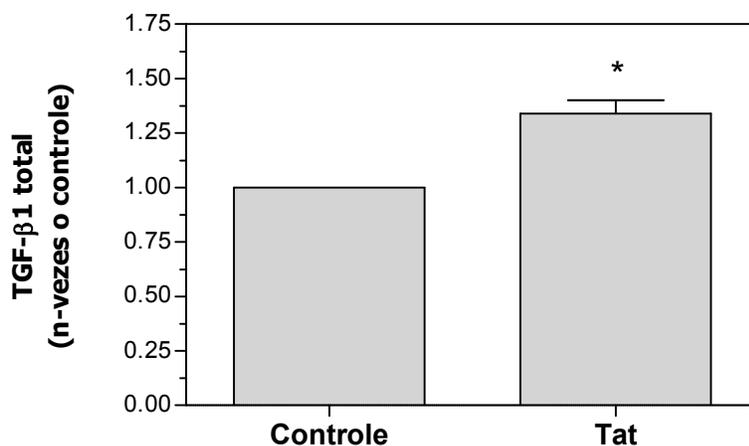
**Fig S1.1.** A proteína Tat recombinante induz transcrição a partir do LTR do HIV-1. Células 1G5 (gentilmente doadas pelo programa de reagentes para pesquisa em HIV (NIH, Bethesda), derivadas da linhagem T CD4<sup>+</sup> Jurkat, contêm uma transfecção estável do gene para a Luciferase sob o controle do LTR do HIV-1. As células foram cultivadas em meio RPMI (LGC) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone), a 37° C/ 5% CO<sub>2</sub>. Para o ensaio da expressão da Luciferase, as células foram semeadas em placas de 12 poços (1 X 10<sup>6</sup>/poço) na presença de apenas meio de cultura (controle); meio de cultura contendo 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA; Sigma-Aldrich) ou meio contendo 100 ng/mL de Tat recombinante (Tat) por 18 horas, a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram centrifugadas (450 g) e lavadas por 2X em salina tamponada (PBS). Após a centrifugação, o sedimento celular foi lisado em 150 µL de tampão de lise fornecido conjuntamente com o kit para detecção da Luciferase (Sigma-Aldrich). A leitura foi realizada em luminômetro TD-20/20 (Turner Designs) imediatamente após misturar 10µl do lisado com 100 µL do substrato presente no kit para detecção de Luciferase (Sigma-Aldrich). O resultado foi normalizado, e expressa o aumento em relação ao controle (calculado através da divisão dos valores absolutos pelos dos controles). As barras representam média ± erro padrão da média (SEM) de 2 experimentos independentes. O detalhe (inserto) representa um PCR representativo para o LTR do HIV-1. O DNA celular foi purificado com uso de um kit comercial (Quiagen) a partir de diferentes concentrações da célula 1G5 (primeira linha: 5 X 10<sup>5</sup>; segunda linha: 2,5 X 10<sup>5</sup>; terceira linha: 1,25 x 10<sup>5</sup> células). Os primers para o LTR do HIV-1, assim como os reagentes para o PCR, foram obtidos comercialmente (Invitrogen), e a técnica foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. A PCR foi executado em um termociclador BioRad e o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, seguido por coloração com de Brometo de Etídeo (5 µg/mL).

## Figura Suplementar 1.2



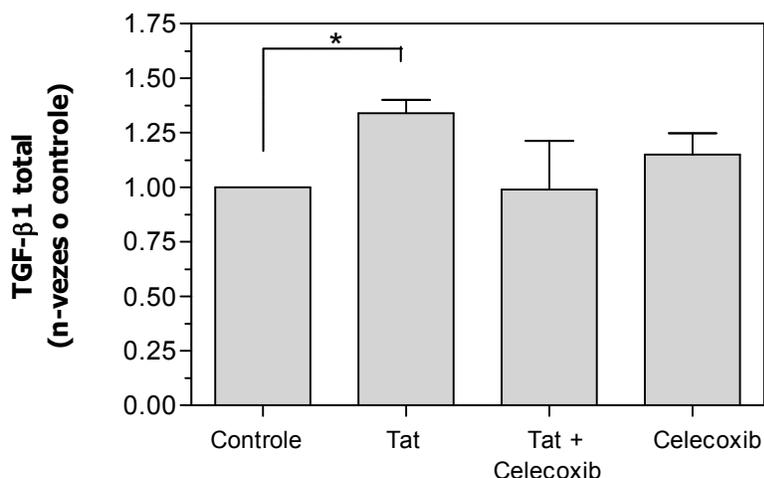
**Fig S1.2.** Tratamento com Tat induz a ativação de NF- $\kappa$ B. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis foram obtidas através de centrifugação (400G) em gradiente de Ficoll (Hystopaque, Sigma-Aldrich) a partir de *buffy coats* provenientes de doação sanguínea. Após a contagem das células em hemocítmetro, as mesmas foram suspensas em meio DMEM (LGC) suplementado com 10% de soro humano (Sigma), semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (50 X 10<sup>6</sup>/garrafa) e mantidas à 37° C/5% CO<sub>2</sub> por 6-8 dias. Após este período para a diferenciação em macrófagos humanos, as células não aderentes foram removidas por lavagem com salina PBS, e meio de cultura fresco (com 10% de soro humano) foi re-adicionado. Após 3 dias em estufa nas condições supra citadas, macrófagos foram tratados, ou não (Controle), com Tat recombinante por 1 hora, ou infectados com *L. amazonensis* a 37° C/5% CO<sub>2</sub>. Após 18 horas de infecção com *L. amazonensis* (Leish 18h), ou após 1 hora de tratamento com Tat (Tat 1h), as células foram lavadas em salina tamponada (PBS) e os *pellets* lisados com 100  $\mu$ L de tampão de lise (10 mM Tris – pH 8; 60 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,1% do detergente NP-40) durante 5 minutos em gelo. Os núcleos celulares foram sedimentados por centrifugação a 3000G por 10 minutos e ressuspensos no tampão descrito (porém sem o detergente NP-40). Os extratos nucleares foram produzidos por congelamento e descongelamento (3X) seguidos de homogeneização em *vortex*. A concentração de proteínas nucleares foi determinada por um kit de quantificação protéica (BioRad) seguindo instruções do fabricante. Então, 5  $\mu$ g de proteína do extrato nuclear foi incubada com oligonucleotídeos (dupla-fita) marcados com <sup>32</sup>P, os quais contêm a região consenso de ligação ao NF- $\kappa$ B (Santa Cruz Biotechnologies). O tampão de ligação (10mM HEPES - pH 7,9; 4% glycerol; 1mM DTT; 1mM EDTA; 0,1 $\mu$ g BSA) também continha 1  $\mu$ g de Poli (dI-dC): Poli (dI-dC). Extratos nucleares do tratamento com Tat, ou da infecção com *Leishmania*, também foram incubados com oligonucleotídeos marcados contendo uma mutação (Mut), o que os tornam incapazes de ligar-se ao NF- $\kappa$ B. Para o ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA), o complexo DNA-proteína foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, secados e visualizados pelo analisador PhosphorImage (Molecular Dynamics). A seta indica o complexo Proteína-DNA radioativo, e os oligonucleotídeos não ligados podem ser visualizados, como manchas, no final do gel.

## Figura Suplementar 1.3



**Fig S1.3.** Produção de TGF-β1 por macrófagos não infectados expostos ao Tat. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis foram obtidas através de centrifugação (400g) em gradiente de Ficoll (Hystopaque, Sigma-Aldrich) a partir de *buffy coats* provenientes de doação sanguínea. Após a contagem das células em hemocitômetro, as mesmas foram suspensas em meio DMEM (LGC) suplementado com 10% de soro humano (Sigma), semeadas em placas de 12 poços ( $2,5 \times 10^6$ /poço) e mantidas à 37° C/5% CO<sub>2</sub> por 6-8 dias. Após este período para a diferenciação em macrófagos humanos, as células não aderentes foram removidas por lavagem com salina PBS, e meio de cultura fresco (com 10% de soro humano) foi re-adicionado. Após 3 dias em estufa nas condições supra citadas, macrófagos humanos primários foram expostos, ou não (controle), à 100 ng/mL de Tat recombinante (Tat) por 48 horas. Ao término deste período, sobrenadantes foram recolhidos e o TGF-β1 latente foi ativado por tratamento dos sobrenadantes com HCl 1N por 10 minutos, seguido de neutralização com 1,2N de NaOH. A concentração da citocina TGF-β1 foi determinada por ELISA comercial (R&D Systems) seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando um espectrofotômetro para leitura de placas (Molecular Devices). O resultado foi normalizado, e expressa o aumento em relação ao controle (calculado através da divisão dos valores absolutos pelos dos controles). As barras representam média ± erro padrão da média (SEM) de 4 doadores (\* p<0,002).

Figura Suplementar 1.4



**Fig S1.4.** Produção de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos não infectados expostos ao Tat, Celecoxib ou Tat na presença de Celecoxib. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis foram obtidas através de centrifugação (400G) em gradiente de Ficoll (Hystopaque, Sigma-Aldrich) a partir de *buffy coats* provenientes de doação sanguínea. Após a contagem das células em hemocítmetro, as mesmas foram suspensas em meio DMEM (LGC) suplementado com 10% de soro humano (Sigma), semeadas em placas de 12 poços ( $2,5 \times 10^6$ /poço) e mantidas à  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  por 6-8 dias. Após este período para a diferenciação em macrófagos humanos, as células não aderentes foram removidas por lavagem com salina PBS, e meio de cultura fresco (com 10% de soro humano) foi re-adicionado. Após 3 dias em estufa nas condições supra citadas, macrófagos humanos primários não infectados foram tratados, ou não (controle), com 100 ng/mL de Tat recombinante (Tat), Tat na presença de  $10\mu\text{M}$  de Celecoxib (Tat + Celecoxib) ou somente  $10\mu\text{M}$  de Celecoxib (Celecoxib), por 48 horas à  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Após o término deste período, sobrenadantes foram coletados e tratados com 1N de HCl por 10 minutos seguido de neutralização com 1,2N NaOH. A concentração da citocina TGF- $\beta$ 1 foi determinada por ELISA comercial (R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante, e utilizando um espectrofotômetro para leitura de placas (Molecular Devices). O resultado foi normalizado, e expressa o aumento em relação ao controle (calculado através da divisão dos valores absolutos pelos dos controles). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de 4 doadores (\*  $p < 0,002$ ).

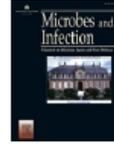
## CAPÍTULO 2

**Artigo 2:** HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF- $\beta$  1 production

**Autores:** Victor Barreto de Souza, Thalyta Xavier Medeiros, Maria Cristina Machado Motta, Dumith Chequer Bou-Habib, Elvira Maria Saraiva

**Publicado em:** *Microbes and Infection* 2008 **10**(6):642-40

**Objetivos do estudo:** Neste trabalho, nós investigamos se a infecção pelo HIV-1, ou se a exposição à proteína Tat do HIV-1, permitiria o estabelecimento/crescimento intracelular de um protozoário não patogênico em macrófagos humanos primários. Contrariamente ao que ocorre em macrófagos primários normais, observamos que a *Blastocrithidia culicis* crescia em macrófagos infectados pelo vírus. A sobrevivência/replicação intracelular do protozoário era reduzida quando culturas co-infectadas eram tratadas com anticorpos contra a proteína Tat, sugerindo que o Tat poderia desempenhar um importante papel neste fenômeno. Corroboramos estes resultados em culturas de macrófagos mono-infectados por *B. culicis*, utilizando somente a proteína recombinante Tat do HIV-1. Por microscopia eletrônica de transmissão, nós verificamos que tanto o HIV-1 quanto a *B. culicis* poderiam co-habitar um mesmo macrófago, e que formas em divisão do protozoário podiam ser visualizadas no interior de macrófagos. Em culturas de macrófagos infectados somente com *B. culicis*, a exposição à citocina TGF- $\beta$ 1 aumentou a replicação intracelular do protozoário, ao passo que o uso de anticorpos neutralizantes para esta mesma citocina também reduziu o incremento replicativo induzido pelo Tat.



## Original article

## HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF- $\beta$ 1 production

Victor Barreto-de-Souza<sup>a</sup>, Thalyta Xavier Medeiros<sup>a</sup>, Maria Cristina Machado Motta<sup>b</sup>,  
Dumith Chequer Bou-Habib<sup>a,1</sup>, Elvira M. Saraiva<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia Clínica, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Bloco I, sala 12-052, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 27 November 2007; accepted 28 February 2008

Available online 10 March 2008

### Abstract

Monoxenic trypanosomatids, which usually are non-pathogenic in humans, have been detected in AIDS patients, but the mechanisms underlying the establishment of these protozoa in HIV-1-infected individuals are poorly understood. Here we addressed the role of HIV-1 and the HIV-1 Tat protein in the replication of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* in HIV-1-infected primary human macrophages. We found that HIV-1 and *B. culicis* replication augmented almost three times in co-infected macrophages, and that Tat antiserum significantly reduced the exacerbated protozoan growth. Exposure of *B. culicis* only infected macrophages to Tat protein also resulted in enhanced protozoan proliferation, reaching a twofold increase at 100 ng/mL. Electron microscopy analysis revealed that *B. culicis* and HIV-1 co-habit the same cells, and showed protozoan dividing forms inside macrophages. Protozoan replication diminished when *B. culicis* only infected macrophages were treated with Tat protein in the presence of anti-TGF- $\beta$ 1 antibodies, suggesting a participation of this cytokine in the augmentation of protozoan multiplication. In fact, exogenous TGF- $\beta$ 1 promoted the trypanosomatid replication in macrophages. Overall, our results suggest that HIV-1 infection deactivates the macrophage microbicidal activity, permitting the survival and multiplication of an otherwise non-pathogenic protozoan in these cells, a process partially mediated by Tat protein, via TGF- $\beta$ 1 secretion.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Monoxenic trypanosomatid; HIV-1; HIV-1 Tat protein; *Blastocrithidia culicis*; HIV-1/non-pathogenic trypanosomatid co-infection; TGF- $\beta$ 1

### 1. Introduction

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), the etiological agent of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), infects CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocyte/macrophages, using the CD4 molecule and the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 to enter the target cells [1]. HIV-1 persistently replicates in the lymphoid tissue, compromising

the integrity and function of the immune system, particularly by inducing the demise of CD4<sup>+</sup> T cells, leading to a severe immunosuppression [2]. In contrast to what occurs with lymphocytes, macrophage percentage does not decline; they are resistant to the virus cytopathic effects, survive for longer periods and sustain productive viral replication [3]. Thus, macrophages have been considered a rich source of viral production, functioning as an important reservoir for HIV-1 persistence and replication [3]. For instance, it has been shown that macrophages from macaques infected with simian immunodeficiency virus/HIV-1 (SHIV) chimeric virus sustain high plasma virus loads even in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells [4]. A number of conditions, including concomitant infections

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6747; fax: +55 21 2560 8344/2560 8028.

E-mail address: esaraiva@micro.ufrj.br (E.M. Saraiva).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

with other pathogens, have been associated with increased permissiveness of macrophages to HIV-1 infection and higher numbers of HIV-1-producing macrophages [5–7].

Individuals infected by HIV-1 are susceptible to co-infections with a plethora of microbes [8]. In this regard, in the event of opportunistic infections, HIV-1 and the co-pathogen can actively replicate in the same human tissue. In fact, macrophages can be found simultaneously infected with HIV-1 and the co-pathogen in the lymph nodes, as described for *Pneumocystis carinii* or *Mycobacterium avium* [6,7]. In some clinical episodes of co-infection, the growth of both, HIV-1 and of the co-pathogen is mutually enhanced, leading both diseases to a more severe clinical status [9,10]. This *in vivo* finding of HIV/co-pathogen dual interference in the growth has been reproduced in some experimental models [10–12].

Pathogenic protozoa of the Trypanosomatidae family, such as *Leishmania* and *Trypanosoma* species, can be encountered as co-pathogens in HIV-1 positive individuals [8]. Whereas members of this family undergo cyclical development in both vertebrate and invertebrate hosts (referred to as heteroxenic trypanosomatids), other trypanosomatids develop their entire life cycle only in invertebrate hosts, and are referred to as monoxenic trypanosomatids [13]. Although the pathogenicity of monoxenic protozoa to healthy human beings has not yet been clearly demonstrated, there have been some reports of AIDS patients that present *Leishmania*-like ulcers caused by these otherwise non-pathogenic trypanosomatids [13,14]. In fact, *Leptomonas*, *Herpetomonas* and *Crithidia* genetically related protozoa, as well as other monoxenous trypanosomatids not yet fully characterized, have been found in immunocompromised HIV-1-infected patients [13].

The HIV-1 transcriptional transactivator (Tat) is a regulatory protein that participates in the elongation of viral transcripts through facilitating the interaction of cellular factors with the long terminal repeat (LTR) viral promoter [15]. Tat is an essential viral gene product for HIV-1 replication, and Tat-defective virus does not replicate efficiently in tissue culture [15]. In the absence of HIV-1 Tat, viral transcription starts but is defective for elongation, and few productive transcripts are generated [15]. Cells productively infected by HIV-1 release expressive amounts of Tat [16–18], which can be found in the serum of HIV-1-infected patients, as well as in the supernatants of HIV-1-infected cells [17]. Intriguingly, Tat can modify the homeostasis of the immune system, because it stimulates secretion of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and TNF- $\beta$  [19–21]. In addition, we recently described that Tat also induces the expression of the enzyme cyclooxygenase (COX)-2 and the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [11]. Immunization of mice with soluble Tat induces a pronounced immunosuppression, characterized by T cell proliferative defects and a depressed antibody response [22]. Based on Tat properties to imbalance the orchestration of the immune system and to impair the immune function, we believe that Tat can influence the replication of HIV-1 co-pathogens in experimental models. Indeed, we recently reported that Tat released by HIV-1-infected macrophages,

as well as recombinant Tat protein (rTat), increase *Leishmania* replication in macrophages through induction of PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 [11]. In this current study, we describe that HIV-1 infection, or treatment with rTat, deactivate the microbicidal activity of macrophages, permitting the survival and multiplication of a non-pathogenic trypanosomatid in these cells, a phenomenon partially mediated by Tat-induced TGF- $\beta$ 1 secretion. In the present model, we used the monoxenic and endosymbiont-bearing trypanosomatid, *Blastocrithidia culicis*, which was isolated from several insects [23], and is able to colonize the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue and yellow fever [24].

## 2. Materials and methods

### 2.1. HIV-1 isolate and *B. culicis*

All assays of macrophage infection were performed with the monocytotropic, CCR5-dependent isolate HIV-1<sub>BAL</sub> [25], which was expanded in phytohemagglutinin-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *B. culicis* (ATCC30257) epimastigote forms were cultivated at 26 °C in Brain Heart infusion, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HI-FCS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and 15  $\mu$ g/mL of gentamycin (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Epimastigotes from 3-day-stationary cultures were used for experiments throughout.

### 2.2. Reagents

The cytokine TGF- $\beta$ 1 and the anti-TGF- $\beta$ 1 monoclonal antibodies (clone 9016) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (Bethesda, MD): HIV-1 Tat protein from Dr. John Brady and DAIDS, NIAID, and rabbit antiserum to HIV-1 Tat from Dr. Bryan Cullen. Lyophilized 86-amino acid Tat protein was reconstituted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 0.1 mM dithiothreitol (DTT). The Tat preparation has been shown to be biologically active, and contained less than 0.15 EU/ $\mu$ g of lipopolysaccharide (LPS), as assessed by *Limulus* amoebocyte assay (BioWhittaker, Walkersville, MD).

### 2.3. Cells

Human monocyte-derived macrophages (MDM) were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated by density gradient centrifugation (Hystopaque, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) from buffy coat preparations of healthy blood donors. Briefly, 10<sup>6</sup> PBMC were plated in 8-well Permanox chamber slides (Nalge Nunc, Naperville, IL) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, LGC Bio, São Paulo, SP, Brazil) containing 10% human serum (Sigma) and penicillin/streptomycin (Sigma). Cells were maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> during 5–6 days for monocyte differentiation into macrophages. Non-adherent cells were washed out

and macrophages were maintained for 3 days in DMEM as above. Macrophage purity was >90%, as determined by flow cytometry analysis (FACScalibur flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA), using anti-CD3 (Caltag Laboratories Inc., Burlingame, CA) and anti-CD16 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) monoclonal antibodies (MAbs).

#### 2.4. Macrophage infection with HIV-1 and *B. culicis*

Macrophages were infected with HIV-1, using 5–10 ng/mL HIV-1 p24 antigen. After incubation overnight, excess virus was washed out, fresh medium was added back and infected macrophages were maintained under standard culture conditions. After 7 days of HIV-1 infection, macrophages were infected with 3-day-stationary phase *B. culicis*, using 10:1 epimastigotes/cell at 35 °C for 4 h. Cultures were washed twice, and recalcitrant non-internalized protozoa were removed by complement lysis [26]; fresh medium was added back and cultures were maintained at 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 3–4 days. In some experiments, HIV-1 Tat antiserum was added to HIV-1/*B. culicis* co-infected macrophage cultures just after removal of non-internalized *B. culicis*. To measure HIV-1 production, supernatants were collected and HIV-1 p24 antigen was assessed using commercial ELISA (ZeptoMetrix Co., Buffalo, NY). To evaluate *B. culicis* replication, slides were fixed with methanol and stained with Giemsa. Epimastigote forms of *Blastocrithidia* inside macrophages were counted by light microscopy. Results are expressed as endocytic index, which was calculated by multiplying the percentage of infected macrophages by the average number of protozoa per macrophage. Since endocytic index values varied between experiments, they were normalized. In another set of experiments, normal macrophages were treated with HIV-1 rTat protein, TGF-β1 or anti-TGF-β1 MAbs during 16–24 h. Then, culture media were harvested (conditioned media) and kept at 4 °C; macrophages were infected by *B. culicis* as described above and, after parasite removal, the conditioned media were added back to the original wells.

#### 2.5. Transmission electron microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h. After fixation, cells were washed in cacodylate buffer and post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide containing 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M cacodylate buffer. Then, samples were washed in cacodylate buffer, dehydrated in acetone and embedded in Epon. Ultrathin sections were mounted on 300-mesh grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope.

#### 2.6. Statistical analysis

Results were analyzed using the Graphpad Prism v4.0 software (San Diego, CA) and are presented as mean value ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis calculation

was performed using the same software, and the comparisons between means of indicated bars were considered significantly different when the *p* value was less than 0.05 using Student's *t* test.

### 3. Results

HIV-1 infection impairs the function of the cells of the immune system, allowing the growth of co-pathogens *in vivo*, as well as *in vitro* [8]. Indeed, experimental studies have shown that the growth of several infectious agents is favored in HIV-1-infected cell cultures [8,10,11]. Here, we show that macrophages infected by and harboring HIV-1 were permissive and allowed the multiplication of the non-pathogenic trypanosomatid *B. culicis*, which is controlled by HIV-1-uninfected macrophages over time.

In previous experiments, we detected that normal primary human macrophages control *B. culicis* growth over time, killing 75% of the initial input of the protozoan after 6 days of infection (data not shown). Then, we analyzed whether *B. culicis* could survive inside macrophages infected with HIV-1. For this purpose, macrophages infected with an R5-tropic HIV-1 isolate for 7–9 days, were exposed to *B. culicis* epimastigote forms. After removing non-internalized protozoa by complement lysis, dual infected macrophage cultures were maintained for more 4–5 days, when the growth of both agents was measured. As shown in Fig. 1 (left side), the growth of *B. culicis* is enhanced almost three times in cultures of macrophages with replicating HIV-1, relative to protozoan multiplication in HIV-1 uninfected cells, suggesting that HIV-1 allows the survival of this trypanosomatid inside macrophages. In addition, *B. culicis* also induced an amplification of approximately three times in HIV-1 replication (Fig. 1, right side) in co-infected cultures, reflecting a mutual interference in the growth of both agents. At this point, the ultrastructure of co-infected macrophages was analyzed by TEM in order to verify whether both agents could co-habit and replicate in

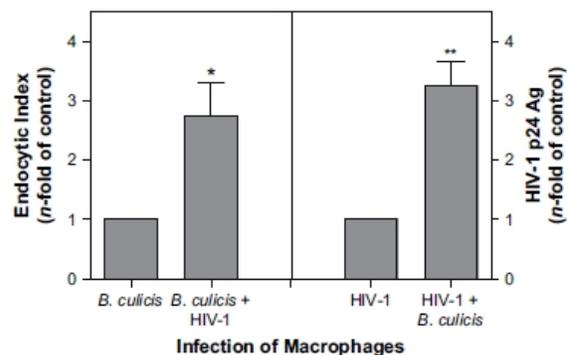


Fig. 1. Effect of HIV-1 infection on *B. culicis* growth. Macrophages were infected with HIV-1 and, after 7 days, were also infected with *B. culicis*. Cell cultures were maintained at 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 4–5 days, when *B. culicis* growth (left) and viral replication (right) were evaluated. Data represent means ± SEM of 5 (left) or 3 (right) independent experiments, and asterisks show statistical significance (\**p* < 0.04; \*\**p* < 0.01). p24 values for HIV-1 replication: HIV only = 0.955 ± 0.17 ng/mL; HIV + *B. culicis* = 3.27 ± 0.18 ng/mL.

the same cell. As depicted in Fig. 2A and B, HIV-1 and *B. culicis* were found co-existing in the same macrophage. Importantly, dividing forms of *B. culicis* inside productive HIV-1-infected macrophages were frequently detected (Fig. 2C and D). Of note, dividing forms of the *B. culicis* were defined either by the detection of two flagella, two endosymbionts, and protozoa in cytokinesis (Fig. 2D), as well as the presence of more than one protozoan in the same macrophage vacuole (Fig. 2E). These findings clearly show that this trypanosomatid can survive and multiply inside HIV-1-producing human

macrophages. Curiously, *B. culicis* remained in the epimastigote form inside macrophages, infected or not by HIV-1 (Fig. 2C), which is not observed in the heteroxenic trypanosomatids of the *Trypanosoma* genera. Taken together, our results indicate that HIV-1 infection promotes the survival and multiplication of a non-pathogenic trypanosomatid inside human macrophages.

We recently described that HIV-1 Tat protein, which is released by HIV-1-infected human macrophages, up modulates the *Leishmania* growth in *Leishmania*/HIV-1 co-infected

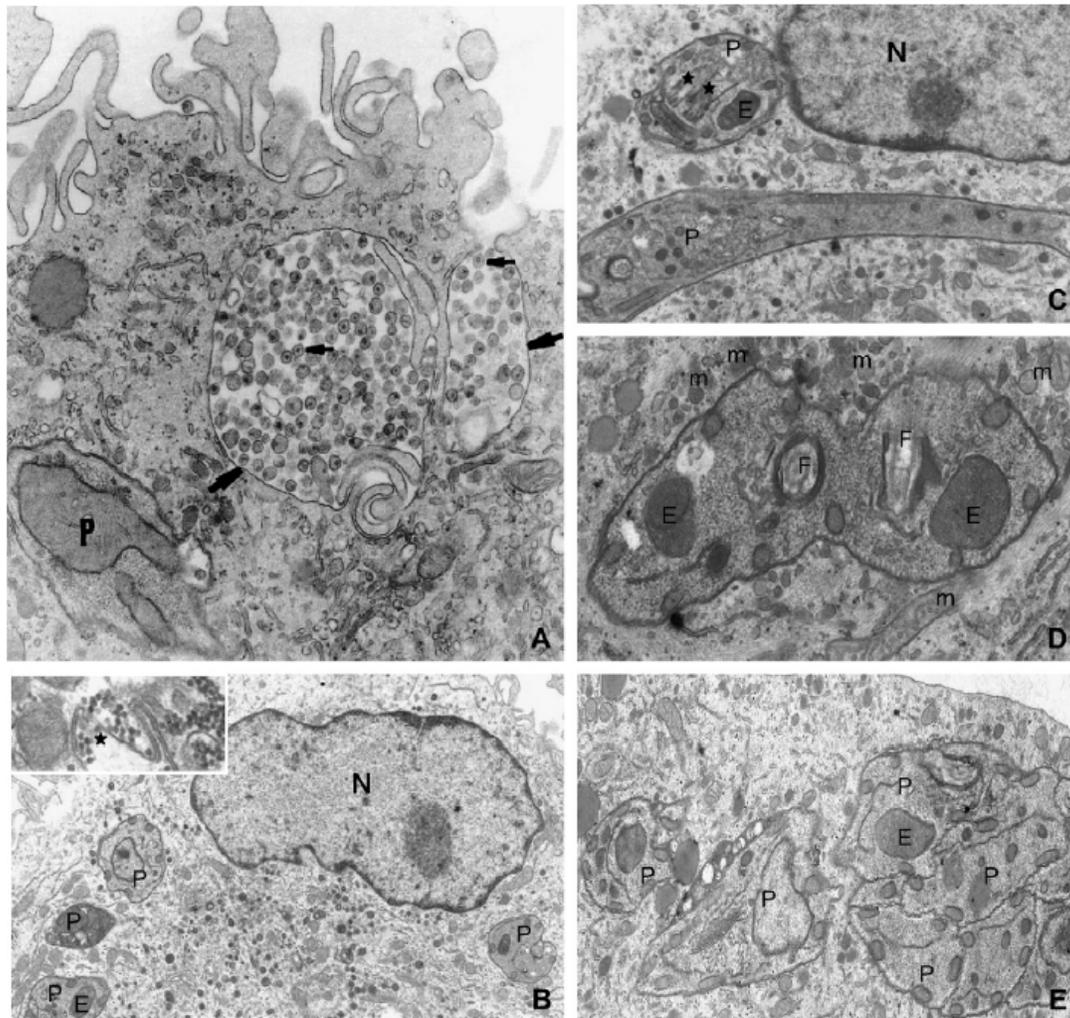


Fig. 2. Transmission electron microscopy of human macrophages co-infected with HIV-1 and the trypanosomatid protozoan *B. culicis*. Macrophages were infected with HIV-1 and, after 7 days were also infected with *B. culicis* and maintained at 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 4–5 days. Cell cultures were fixed and processed for TEM as described in Materials and Methods. (A) Virus particles can be seen accumulated inside vacuolar structures enclosed by a membrane unit (large arrows); one vacuole is directly connected with the extracellular milieu. Virus particles present the doughnut-like core (small arrows). P – *B. culicis* protozoan.  $\times 30,000$ ; (B) Protozoa (P) are distributed through the macrophage cytoplasm; usually more than one trypanosomatid is observed per cell. Intracellular viral particle formation is seen associated with membrane profiles of the endoplasmic reticulum (inset). E – Endosymbiont bacteria; N – Macrophage nucleus.  $\times 7800$ . Inset:  $\times 30,000$ ; (C) Two protozoa (P) can be seen in a co-infected macrophage, one of them shows the typical elongated epimastigote form of *B. culicis*. The rounded protozoan form presents two flagella (\*), indicating cell division. N – Macrophage nucleus; E – Endosymbiont bacteria.  $\times 10,500$ ; (D) A dividing protozoan exhibiting two flagella (F) and two endosymbiont bacteria (E) is enclosed by a tight vacuolar membrane, surrounded by several mitochondria (M).  $\times 21,600$ ; (E) Usually, only one protozoan is observed per vacuole (B,C), but, after division, several parasites (P) can be found in a single vacuolar structure.  $\times 21,000$ .

macrophages [11]. Therefore, we studied whether Tat protein would have a similar role in the growth enhancement of a non-pathogenic trypanosomatid such as *B. culicis*, in HIV-1-co-infected macrophages. Initially, dual infected macrophages were treated with anti-Tat polyclonal antibodies to neutralize the naturally released Tat by HIV-1-infected cells, and the replication of *B. culicis* was measured. The addition of Tat antiserum reduced the growth of *B. culicis* nearly to levels found in HIV-1-uninfected macrophages (Fig. 3A, right side). This finding implies that secreted Tat contributes to *B. culicis* survival and multiplication in human macrophages. Importantly, Tat antiserum did not affect *B. culicis* replication in macrophages free of HIV-1, indicating that this serum did not exert a nonspecific effect on *B. culicis* replication (Fig. 3A, left side). Based on this result, we studied the ability of soluble Tat to directly influence *B. culicis* growth in macrophages

infected only with this protozoan. Thus, macrophages pre-treated with Tat were infected with *B. culicis*, and protozoan growth was evaluated 3 days later. HIV-1 Tat doubled *B. culicis* multiplication at concentrations equal to 50 and 100 ng/mL (Fig. 3B). Of note, biologically inactive Tat (oxidized Tat, [20], Fig. 3B), as well as Tat vehicle (data not shown), did not alter *B. culicis* replication. Overall, these results indicate that Tat protein is an important factor in the enhanced growth of *B. culicis* in HIV-1-infected macrophages, which is further demonstrated by its ability to support the *B. culicis* growth in macrophages infected only with this protozoan.

Copious evidence demonstrate that HIV-1 Tat protein induces the secretion of several molecules by macrophages, including the cytokine TGF- $\beta$ 1 [21], which is widely heralded as a potent growth stimulator of several obligate intracellular microbes, such as *Leishmania* and *Trypanosoma* [27,29]. Similar to findings of other studies [21], we observed that HIV-1 Tat significantly increased TGF- $\beta$ 1 secretion by normal human primary macrophages (data not shown). This cytokine is exploited by pathogens by means of its capacity to down-modulate the microbicidal activity of human and mouse macrophages induced by the cytokine interferon (IFN)- $\gamma$  [27]. Rooted in these TGF- $\beta$ 1 properties, we evaluated whether this cytokine favors *B. culicis* replication in human macrophages. As depicted in Fig. 4A, TGF- $\beta$ 1 supported the intracellular protozoan proliferation, which reached 50% of increase at concentrations equal to 2.5 and 5.0 ng/mL, relative to non TGF- $\beta$ 1-treated cells. This result suggests that the suppressive activity of TGF- $\beta$ 1 could also be exploited by a non-pathogenic organism, as long as a TGF- $\beta$ 1 inducer is present in the cell milieu, such as HIV-1 Tat. Because exogenous HIV-1 Tat enhances *Leishmania* replication ultimately by induction of TGF- $\beta$ 1 secretion [11], we assessed the participation of this cytokine in the Tat-mediated *B. culicis* replication. As shown in Fig. 4B, immunoneutralization of the Tat-induced TGF- $\beta$ 1 secretion resulted in a noteworthy inhibition of the trypanosomatid replication, when compared to *B. culicis* growth in cultures treated only with Tat. We emphasize that anti-TGF- $\beta$ 1 antibodies did not modify the survival of the trypanosomatid in the *B. culicis* only infected macrophages treated with these antibodies, ruling out any unspecific isotype effects.

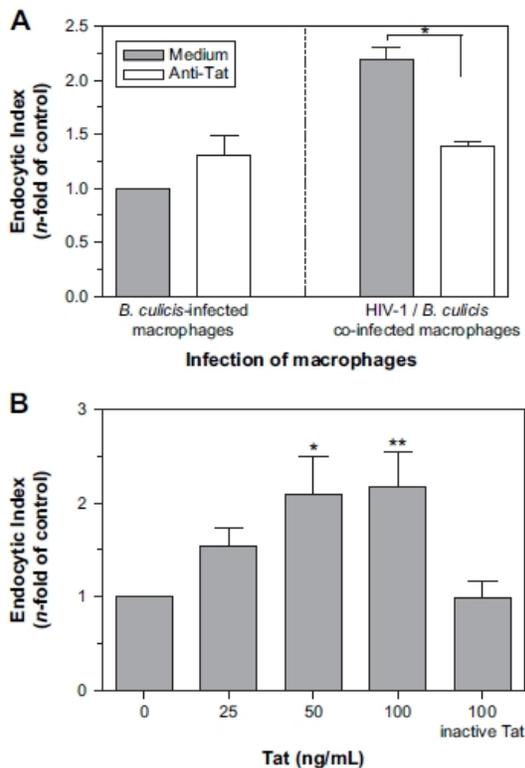


Fig. 3. Effect of HIV-1 Tat protein on *B. culicis* replication. (A) Macrophages were infected with HIV-1 and, after 7 days, were also infected with *B. culicis* (right side). Cell cultures were maintained at 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 4–5 days, when *B. culicis* growth was evaluated. Control cells were infected only with *B. culicis* (left side). Tat antiserum (1:500) was added to macrophages infected only with *B. culicis* and to HIV-1/*B. culicis*-co-infected macrophages. Data represent mean  $\pm$  SEM of three independent experiments and asterisk shows statistical significance ( $p < 0.004$ ) between indicated bars. (B) Macrophages were exposed to different concentrations of Tat or 100 ng/mL of oxidized Tat (biologically inactive) for 15–18 h. Medium was collected, macrophages were infected only with *B. culicis*, followed by re-addition of harvested medium, and *B. culicis* replication was evaluated after 3 days. Data represent mean  $\pm$  SEM of three independent experiments and asterisks show statistical significance. \* $p = 0.05$ ; \*\* $p < 0.04$  compared to control [0 ng/mL].

#### 4. Discussion

HIV-1 infection progressively deteriorates the function of the immune system, allowing the occurrence and persistence of co-pathogens [8]. In this context, diseases caused by organisms that usually do not infect healthy persons were already described in AIDS patients [13]. In the present study, we demonstrate that HIV-1 infection decreases the ability of macrophages to eliminate the non-pathogenic protozoan *B. culicis*, facilitating its replication. Our investigation also points to an important role of HIV-1 Tat protein, which would usher the enhancement of the protozoan multiplication. Together with the immunosuppression caused by HIV-1 infection, HIV-1 Tat protein could be a relevant depressant of the macrophages microbicidal activity. Indeed, we recently described that Tat drives *Leishmania* growth in human macrophages [11]. In

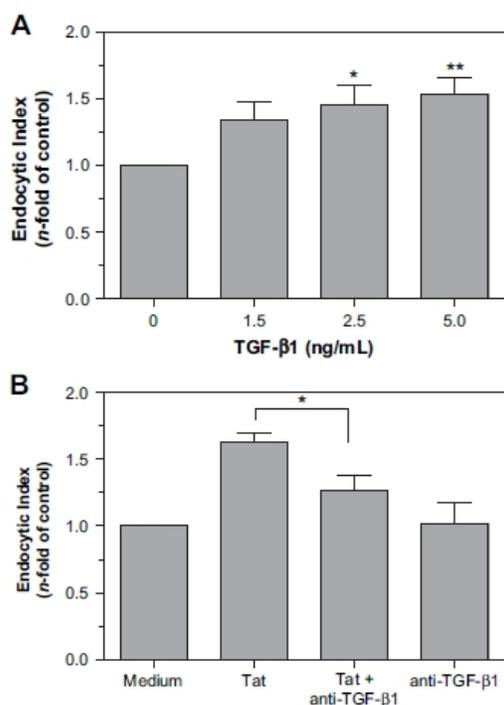


Fig. 4. Effect of TGF- $\beta$ 1 on *B. culicis* replication. (A) Macrophages were exposed to different concentrations of human TGF- $\beta$ 1 for 15–18 h. Medium was collected, macrophages were infected only with *B. culicis*, followed by re-addition of harvested medium, and *B. culicis* replication was evaluated after 3 days. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments, and asterisks show statistical significance (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.02$  related to control [0 ng/mL]). (B) Macrophages were treated with recombinant Tat (100 ng/mL), in the presence or not of neutralizing anti-TGF- $\beta$ 1 antibodies (10  $\mu$ g/mL). Then, macrophages were infected only with *B. culicis*, and protozoan growth was evaluated after 3 days. As an internal control, cells were pre-treated only with neutralizing anti-TGF- $\beta$ 1 antibodies. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments and asterisk shows statistical significance between indicated bars ( $p < 0.05$ ).

addition, it has also been shown that inoculation of recombinant HIV-1 Tat in mice induced a pronounced immunosuppressive response, blunting T- and B-cell responses [22].

Tat is a relevant protein for HIV-1 transcription and subsequent HIV-1 production [14]. It is produced early in the viral cycle and is released in large amounts by acutely HIV-1-infected cells, in the absence of cell death or changes in cellular membrane permeability [16–18]. Once in extracellular milieu, Tat can be taken up by various cells and induce alterations in gene transcription, protein expression and cytokine secretion [29,19]. In this study, we found evidences that Tat released by HIV-1-infected cells disturb the macrophage defensive maneuvers, forging a permissive cellular environment to *B. culicis* establishment and growth, via an autocrine/paracrine pathway, a phenomenon probably independent of Tat transcription activity.

We initially detected that HIV-1/*B. culicis* co-infection in macrophages mutually drives the growth of both agents in these cells (Fig. 1). Taking account that uninfected macrophages rapidly eliminate *B. culicis* over time (data not shown),

this result suggests that HIV-1 infection disengage the macrophage capacity to control the trypanosomatid infection, which is visually illustrated by the image of protozoan dividing forms inside HIV-1-productive macrophages (Fig. 2C and D). Because the growth amplification of the pathogenic trypanosomatid *Leishmania* in HIV-1 infected macrophages is partly mediated by HIV-1 Tat protein, we addressed whether this protein could also be involved in a non-pathogenic protozoan growth exacerbation. In fact, the addition of Tat antiserum to HIV-1/*B. culicis* co-infected cultures almost abolished the HIV-1-mediated enhancement of protozoan replication, proposing that naturally released Tat is involved in the protozoan replication inside macrophages.

It has been described that Tat stimulates HIV-1 production, and that anti-Tat antibodies attenuate HIV-1 replication [17]. These findings raise the possibility that lowered HIV-1 production due to Tat neutralization would ultimately control *B. culicis* growth in our model. However, addition of recombinant Tat to *B. culicis* only infected cells partially mimicked the effect observed in HIV-1/*B. culicis* co-infection, indicating that Tat exerts a direct effect on target cells, favoring the trypanosomatid replication, even in the absence of HIV-1 infection. The effective Tat doses used in this study (up to 100 ng/mL or  $\sim 7$  nM) cannot be considered excessive, since they are similar or even lower than extracellular Tat concentrations able to induce a variety of biological effects in macrophages and in T cells, such as T cell apoptosis, transactivation of the HIV-1 promoter, IL-10 secretion and FasL induction in macrophages [20,22,30,31].

Substantial evidence indicates that the cytokine TGF- $\beta$ 1 increases the intracellular replication of pathogenic trypanosomatids [27,28], and that Tat induces TGF- $\beta$ 1 in a range of cells, including human macrophages [21]. Thus, we hypothesized that the suppressive activity of TGF- $\beta$ 1 could also be exploited by a non-pathogenic trypanosomatid. In fact, neutralization of TGF- $\beta$ 1 partially inhibited the growth-promoting effect that Tat has on *B. culicis* replication, substantiating our conjecture. Consolidating the role of TGF- $\beta$ 1 in the enhancement of *B. culicis* multiplication, recombinant TGF- $\beta$ 1 induced a similar effect of Tat on the *B. culicis* replication in non HIV-1-infected macrophages. It should be emphasized that this is the first report describing that this cytokine facilitates the survival/growth of a non-pathogenic protozoan in cells usually resistant to these trypanosomatids. These findings were also observed in *B. culicis*-infected murine macrophages, in which Tat or TGF- $\beta$ 1 induced a 3–5-fold increase in the protozoan multiplication (data not shown). Because HIV-1-infected patients can present elevated levels of circulating TGF- $\beta$ 1 [32], we could speculate that this cytokine would contribute to increase the susceptibility to opportunistic infections by non-pathogenic trypanosomatids. Because it has been suggested that anti-Tat antibodies may delay disease progression in HIV-1 infected patients [28], and that HIV-1 Tat protein has been extensively studied for an anti-HIV-1 vaccine [28], we believe that a stimulus that induces anti-Tat antibodies could help to avoid a permissive milieu to the growth of non-pathogenic protozoa.

The transmission of a monoxenous trypanosomatid into a vertebrate host must have occurred many times along the evolution, but any successful transmission of this non-pathogenic trypanosomatid into a host could have opened a possibility for its parasitism. It was agreed that *Trypanosoma* and *Leishmania* surpassed this restricted access [33]. However, some reports indicate that other non-pathogenic insect trypanosomatids could be in the process of establishment in the mammalian hosts [13,14,34], possibly as a result of changes in the vertebrate immunological status. This assumption is supported by the isolation of a *Herpetomonas* from rats and dogs [34,35], a protozoan so far associated with insect hosts only, and by the experimental infection of mouse fibroblasts with monoxenous species of *Crithidia* and *Herpetomonas* [36]. Our present data strengthen the possibility of a monoxenous establishment in a mammalian host, as the result of a down-modulation of macrophage microbicidal mechanisms by a viral co-pathogen.

#### Acknowledgments

We thank the Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) for providing buffy coats, and the AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health), for providing HIV-1 Tat protein and rabbit antiserum to Tat. This study was supported by grants from PAPES/FIOCRUZ, CNPq and Faperj. VBS is a Doctoral Student at the Cellular and Molecular Post-Graduation Program of the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz (IOC, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and is supported by fellowships from IOC and CAPES.

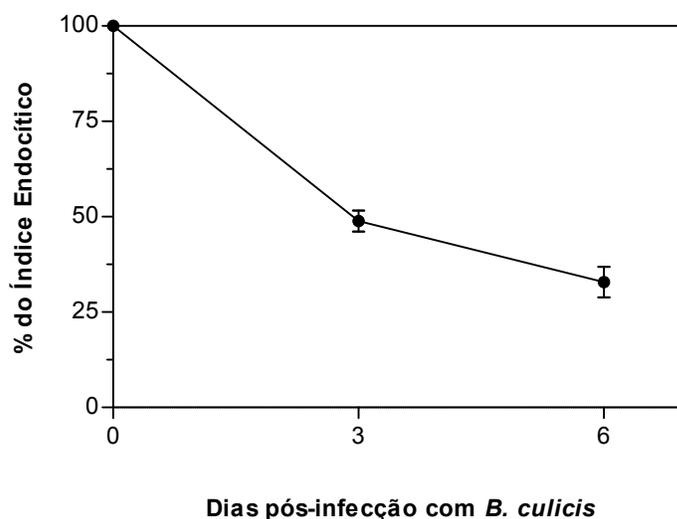
#### References

- [1] E. Berger, P. Murphy, J. Farber, Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 657–700.
- [2] G. Pantaleo, A. Fauci, New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection, *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995) 487–512.
- [3] A. Brown, H. Zhang, P. Lopez, C. Pardo, S. Gartner, In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir, *J. Leukoc. Biol.* 80 (2006) 1127–1135.
- [4] T. Igarashi, C. Brown, Y. Endo, A. Buckler-White, R. Plishka, N. Bischofberger, Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4<sup>+</sup> T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): implications for HIV-1 infections of humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (2001) 658–663.
- [5] S. Wahl, T. Greenwell-Wild, G. Peng, H. Hale-Donze, J. Orenstein, Co-infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages, *J. Infect. Dis.* 179 (Suppl. 3) (1999) S457–S460.
- [6] S. Wahl, T. Greenwell-Wild, G. Peng, H. Hale-Donze, T. Doherty, D. Mizel, J. Orenstein, *Mycobacterium avium* complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 12574–12579.
- [7] J. Orenstein, C. Fox, S. Wahl, Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections, *Science* 276 (1997) 1857–1861.
- [8] C. Karp, F. Neva, Tropical infectious diseases in human immunodeficiency virus-infected patients, *Clin. Infect. Dis.* 28 (1999) 947–963.
- [9] K. Nakata, W. Rom, Y. Honda, R. Condos, S. Kanegasaki, Y. Cao, M. Weiden, *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 155 (1997) 996–1003.
- [10] D. Goletti, D. Weissman, R. Jackson, N. Graham, D. Vlahov, R. Klein, Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation, *J. Immunol.* 157 (1996) 1271–1278.
- [11] V. Barreto-de-Souza, G. Pacheco, A. Silva, H. Castro-Faria-Neto, P. Bozza, E.M. Saraiva, D.C. Bou-Habib, Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis, *J. Infect. Dis.* 194 (2006) 846–854.
- [12] C. Zhao, B. Papadopoulou, M. Tremblay, *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network, *Clin. Immunol.* 113 (2004) 81–88.
- [13] C. Chicharro, J. Alvar, Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97 (Suppl. 1) (2003) 75–78.
- [14] R. Pacheco, M. Marzochi, M. Pires, C. Brito, F. Madeira Mde, E. Barbosa-Santos, Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (1998) 531–537.
- [15] B. Peterlin, D. Trono, Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 97–107.
- [16] H. Chang, F. Samaniego, B. Nair, L. Buonaguro, B. Ensoli, HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region, *AIDS* 11 (1997) 1421–1431.
- [17] G. Goldstein, HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine, *Nat. Med.* 2 (1996) 960–964.
- [18] B. Ensoli, L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. Morgan, Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation, *J. Virol.* 67 (1993) 277–287.
- [19] S. Wahl, T. Greenwell-Wild, G. Peng, G. Ma, J. Orenstein, N. Vazquez, Viral and host cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 726–735.
- [20] A. Badou, Y. Bennasser, M. Moreau, C. Leclerc, M. Benkirane, E. Bahraoui, Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway, *J. Virol.* 74 (2000) 10551–10562.
- [21] D. Reinhold, S. Wrenger, T. Kahne, S. Ansoerge, HIV-1 Tat: immunosuppression via TGF- $\beta$ 1 induction, *Immunol. Today* 20 (1999) 384–385.
- [22] S. Cohen, C. Li, L. Ding, Y. Cao, A. Pardee, E. Shevach, D. Cohen, Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV Tat challenge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 (1999) 10842–10847.
- [23] F. Wallace, The trypanosomatid parasites of insects and arachnids, *Exp. Parasitol.* 18 (1966) 124–193.
- [24] M.S. Correa-da-Silva, P. Fampa, L.P. Lessa, R. Silva E dos, J. dos Santos Mallet, E.M. Saraiva, M.C. Motta, Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*, *Parasitol. Res.* 99 (2006) 384–391.
- [25] R.G. Lima, J. Van Weyenbergh, E.M. Saraiva, M. Barral-Netto, B. Galvão-Castro, D.C. Bou-Habib, The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells, *J. Infect. Dis.* 181 (2002) 1561–1566.
- [26] R.S. Tuan, K.P. Chang, Isolation of intracellular symbiotes by immune lysis of flagellate protozoa and characterization of their DNA, *J. Cell Biol.* 65 (1975) 309–323.
- [27] M. Li, Y. Wan, S. Sanjabi, A. Robertson, R. Flavell, Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006) 99–146.
- [28] B. Ensoli, V. Fiorelli, F. Ensoli, A. Cafaro, F. Titti, S. Butto, Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials, *AIDS* 20 (2006) 2245–2261.
- [29] S. Reed, TGF- $\beta$  in infections and infectious diseases, *Microbes Infect.* 1 (1999) 1313–1325.

- [30] C. Li, D. Friedman, C. Wang, V. Metelev, A. Pardee, Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein, *Science* 268 (1995) 429–431.
- [31] A. Frankel, C. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell* 55 (1988) 1189–1193.
- [32] A. Wiercinska-Drapalo, R. Flisiak, J. Jaroszewicz, D. Prokopowicz, Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients, *Viral Immunol.* 17 (2004) 109–113.
- [33] A. Simpson, J. Stevens, J. Lukes, The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates, *Trends Parasitol.* 22 (2006) 168–174.
- [34] S. Podlipaev, N. Sturm, I. Fiala, O. Fernandes, S. Westenberger, M. Dollet, Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions, *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (2004) 283–290.
- [35] T. Morsy, L. Schnur, F. Feinsod, S. Michael, A. Saah, M. Salama, M. Wahba, The discovery and preliminary characterization of a novel trypanosomatid parasite from *Rattus norvegicus* and stray dogs from Alexandria, Egypt, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 82 (1988) 437–444.
- [36] D. Santos, S. Bourguignon, H. Castro, J. Silva, L. Franco, R. Hespanhol, Infection of mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*, *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (2004) 570–574.

## Figura Suplementar

## Figura Suplementar 2.1



**Fig S2.1.** Macrófagos eliminam grande percentagem de *Blastocystis culicis* intracelular através dos dias. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis foram obtidas através de centrifugação (400G) em gradiente de Ficoll (Hystopaque, Sigma-Aldrich) a partir de *buffy coats* provenientes de doação sanguínea. Após a contagem das células em hemocítmetro, as mesmas foram suspensas em meio DMEM (LGC) suplementado com 10% de soro humano (Sigma), semeadas em lâminas providas de câmaras ( $1 \times 10^6$ /câmara; Labtek, Nalge) e mantidas à  $37^\circ \text{C}/5\% \text{CO}_2$  por 6-8 dias. Após este período para a diferenciação em macrófagos humanos, as células não aderentes foram removidas por lavagem com salina PBS, e meio de cultura fresco (com 10% de soro humano) foi re-adicionado. Passados 3 dias em estufa nas condições supra citadas, macrófagos foram expostos à epimastigotas de *B. culicis* em fase estacionária, à  $35^\circ \text{C}/5\% \text{CO}_2$ , na proporção de 10 protozoários/macrófago. Após 4 horas, os protozoários não internalizados foram removidos por lavagem com PBS, seguido de tratamento com 30% de soro humano não inativado (lise por complemento), por 5 minutos. Algumas lâminas foram fixadas com metanol justamente após o término do período de infecção (dia 0). Outras foram mantidas por 3 ou 6 dias, à  $35^\circ \text{C}/5\% \text{CO}_2$ , e depois fixadas para avaliação da sobrevivência intracelular da *B. culicis*. As lâminas foram coradas por 30 minutos com Giemsa comercial e a contagem dos tripanossomatídeos foi realizada sob microscopia ótica. O resultado apresenta a percentagem de índice endocítico (= % de macrófagos infectados X média de protozoário/macrófago), considerando-se como 100% os valores determinados nos experimentos fixados logo após a infecção. Os pontos representam médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de dois doadores feitos em duplicata.

---

## Discussão

Em países tropicais, a alta incidência de patógenos possibilita que indivíduos infectados por HIV-1 possam ser acometidos por co-infecções que normalmente não seriam observadas em regiões de clima temperado (Karp & Neva, 1999). No Brasil o clima quente permite a sobrevivência de diversos insetos vetores de doença, dentre os quais flebotomíneos, triatomíneos e culicídeos (Karp & Neva, 1999). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a co-infecção HIV-1/protozoários vem emergindo progressivamente e pode prejudicar a terapêutica da infecção pelo HIV-1 (Karp & Auwaerter, 2007b; WHO, 2007). Depois da toxoplasmose, a co-infecção HIV-1/*Leishmania* representa a maior percentagem de casos relatados entre as co-infecções HIV-1/protozoários observadas no mundo (Karp & Auwaerter, 2007b). O advento da terapia anti-retroviral provocou um decréscimo marcante na frequência desta co-infecção, porém algumas complicações devem ser ressaltadas (Alvar *et al.*, 2008). Por exemplo, na co-infecção HIV-1/*Leishmania* em pacientes, a replicação de ambos os patógenos pode aumentar, o que acelera o desenvolvimento da AIDS e da leishmaniose (Alvar *et al.*, 2008). Além disso, uma resposta imune efetiva contra o protozoário requer níveis altos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o que não ocorre na AIDS (Alvar *et al.*, 2008). A imunossupressão provocada pela infecção com HIV-1 pode promover a disseminação da *Leishmania* ou mesmo reativar infecções latentes (Alvar *et al.*, 2008). Por exemplo, em seis pacientes africanos co-infectados por HIV-1/*L. major*, cinco deles apresentaram baixíssima contagem de T CD4<sup>+</sup> (<10 células/ $\mu$ l), o que resultou no aparecimento de leishmaniose cutânea difusa (Foulet *et al.*, 2006). Mais relevante é o fato do HIV-1 e a *Leishmania* poderem co-habitar a mesma célula (os macrófagos) e poderem coexistir no mesmo tecido (linfonodo). Em 1997, Orenstein e colaboradores reportaram HIV-1 e bacilos de *Mycobacterium avium* co-habitando um mesmo macrófago de linfonodo de pacientes co-infectados por estes patógenos (Orenstein *et al.*, 1997). Posteriormente, Wahl e colaboradores demonstraram que os linfonodos de pacientes co-infectados por HIV-1 e *Mycobacterium avium* apresentavam um ambiente permissivo para a replicação do HIV-1, visto que a infecção com esses bacilos induzia

TNF- $\alpha$  e aumento de co-receptores CCR5 em macrófagos do linfonodo (Wahl *et al.*, 1998). Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado que diferentes patógenos podem alterar a replicação do HIV-1 em culturas celulares e vice-versa. Por exemplo, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania infantum* podem exacerbar a replicação do HIV-1 em macrófagos co-infectados por estes agentes infecciosos (Goletti *et al.*, 1996; Nakata *et al.*, 1997; Wahl *et al.*, 1998; Wahl *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Portanto, a investigação de modelos de co-infecção *in vitro* pode ser útil quando pretendemos analisar a interferência recíproca no crescimento de dois patógenos capazes de multiplicar-se nas mesmas células. Também cabe ressaltar o fato de não existirem bons modelos experimentais que nos permitem avaliar a replicação *in vivo* de agentes infecciosos em co-infecções com HIV-1 (pois HIV-1 só infecta humanos).

Inicialmente, nós estabelecemos um modelo de co-infecção *in vitro* com HIV-1/*Leishmania amazonensis* em macrófagos primários humanos, os quais foram obtidos através da diferenciação de monócitos primários de doadores saudáveis. Infectamos macrófagos com o HIV-1, isolado BaL (um vírus R5, subtipo B) e aguardamos sete dias antes de proceder com a infecção por *Leishmania*, uma vez que neste intervalo de tempo podem ser detectadas concentrações bem significativas do vírus no sobrenadante das culturas (Brown *et al.*, 2006). Após esse período, nós co-infectamos estes macrófagos com *Leishmania amazonensis*, na proporção de três parasitos por macrófago e a avaliação da produção de HIV-1 e da *Leishmania* foi feita cinco dias após esta segunda infecção. Já foi claramente reportado que a co-infecção *in vitro* com HIV-1/*Leishmania infantum* promove um aumento na replicação tanto do HIV-1 quanto da *L. infantum* (Zhao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006). Embora as espécies viscerotrópicas predominem nos casos de co-infecções HIV-1/*Leishmania* reportados nos países europeus, cabe destacar que as dermatrópicas também já foram relatadas em nosso país, sendo 43% de casos envolvendo HIV-1 e leishmaniose muco-cutânea (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006). A análise da literatura sobre o progresso clínico da co-infecção HIV-1 com leishmaniose cutânea e muco-cutânea aponta a presença de ulcerações e lesões não usuais nestes pacientes, assim como visceralização do tripanossomatídeo (Alvar *et al.*, 2008). Por esta razão, muitas vezes o diagnóstico

clínico é prejudicado, principalmente os baseados em patognomonias. Todavia, não há nenhum estudo investigando se a co-infecção *in vitro* de macrófagos por HIV-1 com a forma dermatrópica *Leishmania amazonensis* pode modular reciprocamente os dois patógenos. A *L. amazonensis* é endêmica em vários países da América do Sul e Central, e está presente principalmente em florestas tropicais da Bacia Amazônica (Osorio y Fortea *et al.*, 2007). Esta espécie de *Leishmania* causa formas cutâneas da leishmaniose, porém pode agravar em um vasto espectro de doenças, oscilando entre manifestações tegumentares, lesões cutâneas e muco-cutâneas difusas, ou mesmo visceralização (Barral *et al.*, 1991). Como observado na figura 1A do primeiro artigo (capítulo 1), a co-infecção HIV-1/*L. amazonensis* promoveu um aumento tanto na replicação do vírus quanto do tripanossomatídeo, quando comparados com a replicação nas infecções com os patógenos isoladamente. Esses resultados corroboram os achados descritos com *L. infantum*, porém demonstram que uma espécie diferente de *Leishmania* também é capaz de produzir efeitos similares aos anteriormente descritos (Zhao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006). Assim como para a *L. infantum*, a multiplicação da *L. amazonensis* também parece ser beneficiada pela presença do vírus na cultura. Uma vez que a replicação viral também é aumentada, podemos pensar que os dois patógenos beneficiam-se quando estão co-existindo no ambiente. Neste ponto, nós nos perguntamos se bastaria o vírus no sobrenadante, ou/ou se um componente viral (por vias diretas ou indiretas) poderia ser responsável por esta exacerbação no crescimento do flagelado.

A infecção produtiva de células pelo HIV-1 acarreta em liberação ativa da proteína Tat do HIV-1, independente de morte celular ou alteração na permeabilidade de membrana (Chang *et al.*, 1997). Em células transfectadas com Tat, a liberação da proteína só ocorre em células viáveis e o bloqueio de vias secretórias através de tratamento com Brefeldina A e Metilamina não inibem a saída do Tat, o que indica uma via de egresso independente de endossomas (Chang *et al.*, 1997). Uma vez no exterior da célula, a molécula Tat pode atingir a circulação sanguínea e distribuir-se por diversos tecidos. Este fato pôde ser exemplificado quando Lin *et al.* observaram um alcance sistêmico do Tat em camundongo transgênico que liberava esta proteína diretamente na circulação sanguínea. Nestes animais, Tat foi detectado em diversos

tecidos, incluindo Pâncreas, Cerebelo, Timo, Baço e Coração (Lin *et al.*, 2003). É provável que este modelo murino possa ser comparado ao que ocorre em pacientes infectados com HIV, uma vez que estes indivíduos também apresentam Tat circulante (Ensoli *et al.*, 2006; Goldstein, 1996). Além disso, a presença de anticorpos contra Tat parece exercer um papel protetor contra a replicação viral. Estes anticorpos podem ser encontrados em altas concentrações em pacientes infectados pelo HIV e assintomáticos, se comparados aos progressores para a doença AIDS (Re *et al.*, 1995; Re *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2006; Zagury *et al.*, 1998b). Diversos estudos têm enfatizado que o Tat exógeno pode exercer uma série de efeitos na fisiologia celular, mesmo na ausência do HIV-1. Em particular, macrófagos não infectados e expostos ao Tat podem secretar TGF- $\beta$ , ter a produção de Óxido Nítrico inibida, e liberar IL-10 (Barton *et al.*, 1996; Leghmari *et al.*, 2008; Reinhold *et al.*, 1999). Curiosamente, todos esses efeitos fisiológicos sobre os macrófagos podem favorecer a replicação intracelular de protozoários, o que nos levou a criar uma hipótese sobre um possível papel da proteína Tat na exacerbação da replicação de tripanossomatídeos no interior de macrófagos. Conforme demonstrado na figura 1B do artigo 1 (capítulo 1), a adição de soro anti-Tat em culturas co-infectadas reduziu o crescimento da *Leishmania* (região direita do gráfico) que normalmente acontece na ausência do antissoro, ao passo que o anti-Tat não alterou a replicação do protozoário na cultura monoinfectada (região esquerda do gráfico). Em conjunto, esses resultados sugerem que o Tat do HIV-1 influencia a replicação da *Leishmania* no interior de macrófagos primários humanos. No entanto, até este momento, era impossível discriminar se o efeito do Tat poderia ser direto ou indireto, pois a neutralização desta molécula também reduz a replicação viral. Para elucidar esta questão, procedemos aos estudos com macrófagos infectados somente por *Leishmania* e expostos à molécula Tat recombinante do HIV-1<sub>BaL</sub> (vírus trópico para CCR5, subtipo B)

Como demonstrado na figura 2, a exposição ao Tat mimetiza o efeito da infecção viral na replicação da *L. amazonensis* em macrófagos infectados somente com este protozoário. Baseado neste resultado, nós podemos inferir que o Tat amplifica a replicação da *L. amazonensis* independentemente da presença do HIV-1. Escolhemos fazer uma curva com o limite superior de 100 ng/mL, pois essa

concentração é suficiente para induzir alguns efeitos biológicos, incluindo secreção de citocinas (Chen *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1999; Zauli *et al.*, 1992). Nossa próxima etapa foi verificar se a concentração de 100 ng/mL de Tat seria capaz de favorecer a produção de mRNA a partir do LTR do HIV-1. Com este intuito, nós utilizamos uma linhagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Jurkat) transfectada estavelmente com o LTR do HIV-1 na presença do gene repórter Luciferase. Estas células contendo a construção LTR-Luciferase foram denominadas de 1G5 e selecionadas para uma elevada resposta ao Tat e à excitação de receptores de células T (Aguilar-Cordova *et al.*, 1994). Como podemos verificar na figura suplementar S1.1, a adição de Tat (100 ng/mL) ou PHA (2 µg/mL) permitiu a síntese da luciferase a partir do LTR do HIV-1. Este fato sugere que, em uma mesma concentração, o Tat poderia amplificar a replicação do HIV-1 e da *Leishmania*, permitindo um agravamento de ambas as infecções. Curiosamente, o Tat pode ser endocitado rapidamente pelas células, uma vez que a proteína apresenta uma região capaz de atravessar a membrana plasmática (Ensoli *et al.*, 2006). Por exemplo, baixas concentrações de Tat extracelular (0,1 ng/mL) podem ser endocitadas por células dendríticas humanas em apenas cinco minutos de tratamento (Fanales-Belasio *et al.*, 2002). Em apenas 5 minutos, o tratamento com Tat também dispara sinalizações intracelulares: por exemplo, a exposição de monócitos humanos a 100 ng/mL de Tat neste curto período de tempo culminou na produção de IL-1β, IL-6, e de TNF-α após 3 horas (Nath *et al.*, 1999). Portanto, acreditamos ser possível que o Tat estimule o crescimento da *Leishmania* e a produção do HIV-1 pela entrada direta na célula, com conseqüente desfecho de uma sinalização bioquímica. Nós também observamos que o Tat pode induzir a ativação precoce de NF-κB em macrófagos (apenas uma hora; figura suplementar S1.2, capítulo 1) e a relevância deste efeito será discutida posteriormente no texto.

Alguns estudos relatam que o Tat exógeno desencadeia apoptose em neurônios e linfócitos T (Peruzzi, 2006), e que o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos favorece a replicação intracelular do próprio HIV-1 (Lima *et al.*, 2002), assim como de diversos protozoários, incluindo *Leishmania* (Afonso *et al.*, 2008; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Por esta razão, decidimos avaliar se a exposição de macrófagos

ao Tat é capaz de promover a apoptose nestas culturas. Por citometria de fluxo, observamos que o tratamento com 100 ng/mL de Tat por 16 horas não alterou significativamente a percentagem basal de células expressando Anexina V (Controle: 2%; Tat 100 ng/mL: 2,4%). Portanto, nós não acreditamos que o reconhecimento de macrófagos, que eventualmente tenham sofrido apoptose, pelas células vivas remanescentes seja o motivo do aumento na replicação da *Leishmania*. Dois estudos anteriores sugerem um efeito anti-apoptótico induzido por Tat adicionado à cultura de macrófagos primários. Por exemplo, Zhang e colaboradores demonstraram que o Tat poderia proteger macrófagos primários humanos da apoptose através da expressão de mRNA e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2002). Neste mesmo estudo, quando macrófagos eram infectados com HIV-1<sub>BaL</sub>, também ocorria aumento protéico de Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2002). Resultado similar foi observado em um estudo conduzido por Zheng, no qual o tratamento com Tat reverteu a apoptose de monócitos em 70% quando esta foi induzida por estimulação do Ligante que Induz Apoptose Relacionada ao TNF (TRAIL) (Zheng *et al.*, 2007). Os autores também demonstraram que o tratamento com Tat por pouco tempo (2h) suscita a produção de mRNA para a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Zheng *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que monócitos e macrófagos podem ser resistentes à apoptose em decorrência da interação do envelope viral com receptores presentes na superfície desta célula. Dentro deste argumento, Swingler e colaboradores (2007) observaram que o envelope viral era capaz de induzir o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF), o qual protegia macrófagos infectados da apoptose induzida por TRAIL (Swingler *et al.*, 2007). Recentemente, Giri *et al.* demonstraram que monócitos oriundos de pacientes com HIV-1 eram resistentes à apoptose induzida por estimulação de FasL, e que a proteção da apoptose também passava por uma interação do envelope viral com receptores expressos nos monócitos (Giri *et al.*, 2009). Em conjunto, esses resultados sugerem que proteínas do HIV-1 (proteínas do Envelope e o Tat) exercem atividades anti-apoptóticas em macrófagos, infectados ou não. Em nosso modelo, a avaliação de apoptose por citometria de fluxo confirmou que a proteína Tat não tem atividade pró-apoptótica em macrófagos primários humanos.

Na próxima etapa analisamos se a ação do Tat poderia reverter o efeito leishmanicida induzido pelo tratamento dos macrófagos com IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  produzido por clones específicos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 ativados exerce importante papel no combate natural à *Leishmania* e aos outros patógenos intracelulares. Este fato é melhor exemplificado em camundongos e humanos deficientes do gene para esta citocina ou para o receptor desta citocina: humanos são altamente susceptíveis a doenças oriundas de infecção por micobactérias pouco virulentas, enquanto camundongos deficientes apresentam resistência natural reduzida a infecções virais, bacterianas e parasíticas, incluindo a *Leishmania* (Schroder *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). O IFN- $\gamma$  também pode ser liberado por células *Natural Killers* (NK) quando ocorre produção local de IL-12, o que pode ocorrer na presença de patógenos ou moléculas de patógenos (Schroder *et al.*, 2004). Exposição de macrófagos ao IFN- $\gamma$  induz a síntese da enzima Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS ou NOS2), levando a produção de radicais reativos de oxigênio, o que culmina na eliminação parcial do parasita intracelular (Bogdan, 2001). Utilizando IFN- $\gamma$  em uma dose capaz de matar 50% das *Leishmanias* intracelulares, verificamos que o Tat anulou o efeito leishmanicida estimulado pela adição do IFN- $\gamma$ . Em 1996, Barton *et al* reportaram que ocorria inibição da expressão de iNOS por IFN- $\gamma$  em uma linhagem de macrófagos murinos (linhagem RAW264.7) transfectadas estavelmente com Tat do HIV-1 (Barton *et al.*, 1996). Entretanto os autores não demonstraram os mecanismos deste efeito. Neste ano, Cheng e colaboradores reportaram que o Tat extracelular (10 nM ou ~143ng/mL) interfere na sinalização do receptor para IFN- $\gamma$  em monócitos primários humanos, através da indução da atividade do Supressor da Sinalização de Citocina-2 (SOCS-2) (Cheng *et al.*, 2009). Em relação a este estudo, os autores verificaram uma redução da fosforilação de STAT-1, a qual é fundamental para a transcrição de genes induzidos pelo tratamento com IFN- $\gamma$  (Cheng *et al.*, 2009). Curiosamente, as proteínas da família SOCS são caracterizadas por inibir a atividade de fosforilação das Cinases Janus (JAK), o que normalmente acarreta uma atenuação das sinalizações bioquímicas induzidas por diversas citocinas (Yoshimura *et al.*, 2007). O fato do tratamento com Tat induzir SOCS-2 indica que esta proteína do HIV-1 poderia neutralizar diretamente o efeito do IFN- $\gamma$ , dificultando a eliminação do protozoário *in vivo*. É importante ressaltar

que tanto a concentração de Tat (143ng/mL) quanto a de IFN- $\gamma$  (100 U/mL) são iguais ou bem próximas à utilizada em nosso trabalho, o que sugere que a indução de SOCS-2 possa estar ocorrendo em nosso modelo. Uma vez que o desfecho do tratamento com IFN- $\gamma$  é a destruição do protozoário pela indução da Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO), acreditamos ser coerente especular que a exposição ao Tat iniba a produção macrófagica de NO induzida pelo IFN- $\gamma$ . Portanto, em nosso modelo, é bem provável que o Tat esteja favorecendo o crescimento da *Leishmania* através da inibição da sinalização desencadeada pelo IFN- $\gamma$ . A indução da proteína SOCS pelo Tat parece ser uma boa estratégia para que o HIV-1 evada os mecanismos anti-virais. Os IFNs do tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) reduzem drasticamente a replicação do HIV-1 e o SOCS-1 é um importante inibidor da sinalização elicitada por IFN dos tipos I e II (Kedzierska & Crowe, 2001; Yoshimura *et al.*, 2007). Logo, a presença de Tat durante a infecção pelo HIV-1 pode abolir a sinalização estimulada pelos IFNs do tipo I, favorecendo a produção viral. Também é importante mencionar que o *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Mycobacterium avium*, todos patógenos intracelulares, estimulam a produção de SOCS por macrófagos, o que permite uma maior sobrevivência destes parasitos quando as células hospedeiras são elicitadas pelo IFN- $\gamma$  (Bertholet *et al.*, 2003; Vazquez *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2006). Interessante mencionar que Vazquez e colaboradores (2006) reportaram que ocorre maior expressão de SOCS em macrófagos de linfonodos de pacientes co-infectados com *M. avium* e HIV-1 (Vazquez *et al.*, 2006), o que suscita o pensamento deste mesmo efeito em linfonodos de pacientes co-infectados por HIV-1 e *Leishmania*. Para verificar a inibição da sinalização promovida por IFN- $\gamma$ , uma estratégia é verificar a atividade de iNOS, uma vez que essa enzima é induzida por IFN- $\gamma$ . Tentamos avaliar a síntese de NO (produto da iNOS) em nossos macrófagos normais expostos ao IFN- $\gamma$  sozinho ou combinado ao Tat, porém não obtivemos sucesso. Em macrófagos primários humanos, a avaliação da produção de radicais reativos de oxigênio é complexa (Fang & Vazquez-Torres, 2002; Panaro *et al.*, 2003). Alguns autores já falharam ao tentarem detectar Óxido Nítrico em macrófagos primários humanos

tratados com IFN- $\gamma$  na presença de LPS, embora a enzima NOS2 (também conhecida como iNOS) tenha sido detectada (Fang & Vazquez-Torres, 2002).

A indução do Fator de Crescimento e Transformação (TGF)- $\beta$ 1 não deve ser descartada como explicação plausível para a reversão da ação do IFN- $\gamma$  quando na presença do Tat. Sabe-se que Tat recombinante induz a secreção de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos humanos, e que a produção de óxido nítrico (NO), em resposta ao IFN- $\gamma$ , pode ser suprimida quando o TGF- $\beta$ 1 encontra-se presente (Vodovotz, 1997; Zauli *et al.*, 1992). Diversos estudos dissecaram os mecanismos pelos quais o TGF- $\beta$  inibe a síntese celular de NO desencadeada por IFN- $\gamma$ . A ação ocorre em múltiplas etapas e envolve o decréscimo da transcrição do gene para iNOS, assim como redução da estabilidade do mRNA para esta enzima, acarretando baixa síntese protéica deste que é o principal fator responsável pela produção de radicais reativos de oxigênio (Vodovotz, 1997). Em macrófagos murinos, a produção de NO é instigada por IFN- $\gamma$  e reduz após atingir uma determinada concentração, porém este fenômeno não é observado em camundongos deficientes para os alelos de TGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup>) (Vodovotz, 1997). Entretanto há redução da produção de NO quando o TGF- $\beta$ 1 é adicionado nestas culturas de macrófagos oriundos dos camundongos TGF- $\beta$ 1<sup>-/-</sup>, corroborando a importância desta citocina no decréscimo da produção deste radical reativo de oxigênio (Vodovotz, 1997). Portanto é admissível pensarmos que a presença do TGF- $\beta$  pode reduzir o efeito leishmanicida promovido pelo IFN- $\gamma$ . Logo, nossa próxima etapa foi comprovar a secreção da citocina TGF- $\beta$ 1 por macrófagos estimulados com Tat recombinante, e analisar se o efeito do Tat na replicação do protozoário deve-se à secreção desta citocina.

Para verificar a secreção de TGF- $\beta$ 1, nós expusemos macrófagos não infectados ao Tat recombinante por 48 horas, onde os sobrenadantes foram recolhidos e a citocina total foi quantificada por ELISA comercial. Pudemos notar um aumento significativo, porém não elevado, na concentração do TGF- $\beta$ 1 nos sobrenadantes dos macrófagos tratados com o Tat, quando comparados aos sobrenadantes dos controles não expostos à proteína (figura suplementar S1.3). O TGF- $\beta$  pertence a uma família de

citocinas reguladoras as quais possuem funções pleiotrópicas em uma variedade de células (Li *et al.*, 2006). Em mamíferos três isoformas da molécula já foram identificadas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, codificadas por diferentes genes e sendo predominante a forma TGF- $\beta$ 1 em células do sistema imune (Li *et al.*, 2006). O TGF- $\beta$  é secretado como um complexo formado por um homodímero da citocina madura não-covalentemente associado a outro homodímero de uma proteína denominada Peptídeo Associado à Latência (LAP) (Li *et al.*, 2006). No exterior celular, este complexo (também chamado de TGF- $\beta$  latente) deve dissociar-se da LAP para que a citocina ativa interaja com o seu respectivo receptor (Li *et al.*, 2006). Este processo pode ser obtido *in vitro* pela acidificação do meio onde a citocina está presente ou por aumento de temperatura, enquanto os mecanismos *in vivo* ainda não estão muito claros, mas parecem envolver proteólise da LAP ou mudança conformacional que permita a dissociação da LAP (Li *et al.*, 2006). Neste aspecto, duas proteínas fisiológicas podem remover o LAP com conseqüente ativação do TGF- $\beta$ 1: trombospondina 1 secretada (Schultz-Cherry & Murphy-Ullrich, 1993) assim como integrinas  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  em células que expressam estas moléculas (Munger *et al.*, 1999; Sheppard, 2005). Em algumas infecções, certos parasitos também possuem a habilidade de induzir a ativação de TGF- $\beta$ , particularmente através de proteases de membrana ou mesmo secretadas (Li *et al.*, 2006). Depois de ativo, esta citocina pode ligar-se basicamente a dois receptores transmembranares (TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII) e a sinalização celular ocorre quando dímeros de TGF- $\beta$  ativo ligam-se principalmente a um complexo tetramérico contendo o receptor do tipo II (TGF $\beta$ RII) associado a uma Cinase Semelhante ao Receptor de Activina 5 (ALK5) (Li *et al.*, 2006; Shi & Massagué, 2003). A presença desta citocina no tecido pode alterar a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celulares, de acordo com o tipo celular envolvido e as condições do ambiente (Li *et al.*, 2006). Em contrapartida, a ausência total de TGF- $\beta$  pode comprometer o desenvolvimento embriogênico e de alguns tipos celulares; alterar drasticamente respostas imunológicas e mecanismos de cicatrização; desencadear fibrose, doenças autoimunes e câncer (Li *et al.*, 2006; Shi & Massagué, 2003). Os estímulos para secreção de TGF- $\beta$  são variáveis: Em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as principais células produtoras de TGF- $\beta$ , ocorre

liberação espontânea por células morrendo por apoptose além da estimulação de CD69 e do Antígeno Associado ao Linfócito T Citotóxico 4 (CTLA-4) também poderem induzir a secreção em situações particulares (Li *et al.*, 2006; Shi & Massagué, 2003). Já em Linfócitos B, verifica-se a produção da citocina após estímulos policlonais como anti-IgM ou LPS e, em células *Natural Killer* (NK) a secreção pode ser mediada por estimulação de CD2 ou de CD69, embora já ocorra uma produção basal tanto da forma ativa quanto da inativa (Li *et al.*, 2006).

Já está bem descrito que o TGF- $\beta$ 1 promove o crescimento intracelular de vários patógenos, inclusive alguns protozoários (Li *et al.*, 2006; Reed, 1999). *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma* são exemplos de protozoários cujo crescimento em macrófagos é favorecido pelo tratamento com o TGF- $\beta$ 1 (Li *et al.*, 2006; Reed, 1999). Assim sendo, resolvemos investigar se a imuno-neutralização do TGF- $\beta$ 1 poderia reverter o efeito do Tat no crescimento intracelular da *Leishmania*. O bloqueio do TGF- $\beta$ 1 extracelular reduziu em 50% o efeito do Tat no crescimento da *Leishmania*, em relação à cultura tratada somente com o Tat recombinante (figura 4 do artigo 1, capítulo 1). Em macrófagos humanos e murinos, alguns autores observaram que cepas virulentas de *Leishmania* são capazes de estimular a produção de TGF- $\beta$ 1 ativo, o que favoreceria o crescimento intracelular deste patógeno (Li *et al.*, 2006; Reed, 1999). Quando macrófagos infectados com *Leishmania* foram tratados com o anticorpo neutralizante anti-TGF- $\beta$ 1, nós não verificamos nenhuma alteração no crescimento da *Leishmania* (última barra da figura 4 do artigo 1, capítulo 1). Este resultado indica que se tiver ocorrido produção do TGF- $\beta$ 1, este não foi capaz de promover o crescimento do parasito. Também é possível inferir que a presença do anticorpo não modifica o crescimento intracelular do tripanossomatídeo. Após a interpretação deste resultado, nós nos questionamos se o Tat poderia estimular a secreção de algum fator solúvel que favoreceria a liberação do TGF- $\beta$ 1. Neste ponto, nós tínhamos confirmado alguns estudos demonstrando que o Tat do HIV-1 pode ativar o NF- $\kappa$ B em macrófagos humanos primários (figura suplementar S1.2). Uma vez ativado, este fator pode estimular a síntese da Ciclo-oxigenase 2 (COX-2) com subsequente produção da Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Smith *et al.*, 2000). Anteriormente, alguns estudos sugeriram

que a PGE<sub>2</sub> poderia atuar como um mediador da produção de TGF-β1 por macrófagos humanos ou murinos (Fadok *et al.*, 1998; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Portanto, nós decidimos avaliar se o Tat seria capaz de induzir a expressão de COX-2; síntese de PGE<sub>2</sub>; e se este fator lipídico estaria estimulando a secreção de TGF-β1 nos macrófagos infectados somente com *L. amazonensis*.

Ciclo-oxigenase (COX) é a nomenclatura genérica para a enzima Prostaglandina Endoperóxido H Sintase (PGHS) cuja função é a catálise de uma etapa fundamental na síntese de prostanóides (Rao & Knaus, 2008; Smith *et al.*, 2000). Os prostanóides pertencem a um grupo coletivamente chamados de eicosanóides os quais possuem ácidos graxos oxigenados nos carbonos C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> e C<sub>22</sub> de sua estrutura molecular (Rao & Knaus, 2008; Smith *et al.*, 2000). O principal precursor para a síntese de prostanóides é o ácido aracdônico oriundo da hidrólise de glicerofosfolipídeos pela ação de fosfolipases A<sub>2</sub> secretadas ou citosólicas. Os principais prostanóides são prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A<sub>2</sub>. A biossíntese das prostaglandinas (PGs) segue didaticamente essa ordem: 1º) ação das COXs no ácido aracdônico gerando a PGG<sub>2</sub>; 2º) COX converte a PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>; 3º) atuação de diferentes enzimas sintases na PGH<sub>2</sub> com conseqüente formação das diversas classes de PGs (e.g. PGE Sintase, para formação da PGE<sub>2</sub>) (Narumiya *et al.*, 1999). Todas as PGs possuem um anel ciclopentano, no qual são encontradas modificações de acordo com o tipo de PG (são classificadas de A ao I; e.g. PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>. Os tipos A, B e C não ocorrem naturalmente) (Narumiya *et al.*, 1999). O número 2 subscrito significa que estas prostaglandinas possuem duas ligações duplas nas duas cadeias laterais da molécula (uma dupla em cada cadeia). As prostaglandinas oriundas do ácido aracdônico sempre apresentarão duas cadeias laterais com duas ligações duplas (logo estas PGs sempre terão o 2 subscrito) (Narumiya *et al.*, 1999). Como as enzimas ciclo-oxigenases (COX) são fundamentais para as moléculas precursoras de todas as PGs, a expressão destas enzimas sempre repercute na formação das PGs. As COXs podem ser divididas em duas isoformas: COX-1, as quais são constitutivamente expressas, ou COX-2, a forma induzida (Rao & Knaus, 2008; Smith *et al.*, 2000). As diferenças são muito pequenas, particularmente no sítio catalítico, e ambas podem participar da produção de PGE<sub>2</sub> (Rao & Knaus, 2008; Smith *et al.*, 2000). Os receptores para

prostaglandinas recebem uma denominação particular: o nome do receptor é precedido pela letra inicial do ligante agonista, e depois representa-se a letra P (e.g. receptor EP, para a prostaglandina E, ou DP para a prostaglandina D) (Narumiya *et al.*, 1999). Existem quatro subtipos de receptores EP para a PGE<sub>2</sub>, e são chamados de EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>. Receptores para PGs são distribuídos por todos os tecidos do corpo, embora a expressão membranar seja variada entre diferentes células (Narumiya *et al.*, 1999). Em murinos, receptores EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> estão disseminados em todos os tecidos examinados, sendo que esta expressão pode ser aumentada quando células são expostas a estímulos (Narumiya *et al.*, 1999). Por exemplo, a quantidade de receptores EP<sub>2</sub> membranares pode aumentar em macrófagos após estimulação com Lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Narumiya *et al.*, 1999). Em relação à expressão das enzimas COX, a COX-1 é constitutivamente expressa em vários tecidos enquanto a síntese de COX-2 é induzida por diversos estímulos, sendo os principais: Interleucina-1, Fator de Necrose de Tumor (TNF)- $\alpha$ , LPS e o éster de forbol 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Rao & Knaus, 2008; Smith *et al.*, 2000). Todas as duas isoformas de COX dependem do heme como cofator, apresentam pesos moleculares semelhantes (70 KDa), porém os genes possuem tamanhos distintos e estão localizados em cromossomos diferentes (Rao & Knaus, 2008). A COX-1 está relacionada a citoproteção do estômago e agregação plaquetária, ao passo que a COX-2 está envolvida em processos patológicos como estados inflamatórios agudos e crônicos (Rao & Knaus, 2008). Uma terceira isoforma, denominada COX-3, já foi descrita em roedores e cães, porém a presença desta variante em humanos continua sendo questionada (Rao & Knaus, 2008). É importante ressaltar que, contrariamente ao que ocorre com a expressão de COX-2, os níveis de COX-1 não são alterados durante a inflamação, e que inibidores específicos de alta afinidade para COX-2 foram desenvolvidos ao longo dos anos com o objetivo de interromper a síntese de prostaglandinas decorrentes destes processos inflamatórios. Dois desses inibidores específicos para COX-2, Celecoxib e Rofecoxib, foram farmacologicamente utilizados com intuito analgésico durante a inflamação, pois as prostaglandinas inflamatórias desencadeiam uma hiperalgesia central (Barro-Traore *et al.*, 2008). Atualmente a comercialização de vários inibidores da COX-2 foi proibida em diversos países uma vez

que o bloqueio catalítico da enzima inibe a síntese de prostaciclina, a qual é importante para efeitos vaso-protetores no endotélio (Barro-Traore *et al.*, 2008).

A incubação de macrófagos primários normais (não infectados) com Tat por 18 horas revelou a presença da enzima COX-2 e aumento da produção de PGE<sub>2</sub> (figura 5A, artigo 1). Em conjunto, esses resultados indicam que a proteína Tat do HIV-1 é capaz de induzir a expressão de COX-2 e PGE<sub>2</sub>. Até onde sabemos, este foi o primeiro relato demonstrando a indução de COX-2 e PGE<sub>2</sub> pelo Tat. No mesmo mês da publicação do nosso artigo, um outro estudo conduzido por Flora e colaboradores (2006) também demonstrou que Tat é capaz de promover a transcrição de COX-2 quando inoculado no hipocampo de camundongos C57BL/6 (Flora *et al.*, 2006). No mesmo estudo, os autores reportaram que a proteína COX-2 localizava-se em uma subpopulação de macrófagos, as células microgliais (Flora *et al.*, 2006). Outros dois estudos apontam para uma indução de COX-2 mediada pelo Tat solúvel: Pu e colaboradores em 2007 demonstraram que a injeção de 25 µg de Tat solúvel na veia caudal de camundongos C57BL/6 pode induzir a expressão do mRNA para COX-2, assim como a expressão da própria proteína, em tecidos do cérebro (Pu *et al.*, 2007); em 2008, Blanco *et al.* reportaram que o tratamento da linhagem U-87, um astrocitoma humano, com 50 ng/mL de Tat extracelular por 16 horas também induz mRNA e a proteína COX-2, com subsequente secreção de PGE<sub>2</sub>, um fenômeno que parece depender do envolvimento dos fatores de transcrição NFAT e AP-1 (Blanco *et al.*, 2008). Em conjunto, esses três últimos trabalhos acima mencionados fortalecem nossos resultados de que o Tat recombinante induz diretamente a expressão de COX-2 e PGE<sub>2</sub>. É fundamental ressaltarmos que nós descartamos a indução de COX-2 e PGE<sub>2</sub> por uma contaminação da proteína Tat com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. O teste comercial com lisado de amebócitos do *Limulus* (LAL) demonstrou níveis menores do que 0,015 ng de LPS por µg de Tat, o qual pode ser considerado como um valor negativo para LPS. Nós observamos valores basais na produção de PGE<sub>2</sub> (embora tenhamos verificado que nenhum dos reagentes estavam contaminados por LPS). Uma razão para esta presença de PGE<sub>2</sub> basal nos sobrenadantes dos controles experimentais (“macrófagos em repouso”) pode ser o fato de macrófagos humanos já expressarem constitutivamente a COX-1. Algumas investigações relatam que a PGE<sub>2</sub>

pode contribuir para a replicação de *Leishmania* no interior de macrófagos, ou mesmo agravar as lesões decorrentes da infecção por este protozoário (Farrell & Kirkpatrick, 1987; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Desta forma, nossa próxima etapa foi avaliar o efeito da PGE<sub>2</sub> na ação do Tat sobre a replicação parasitária.

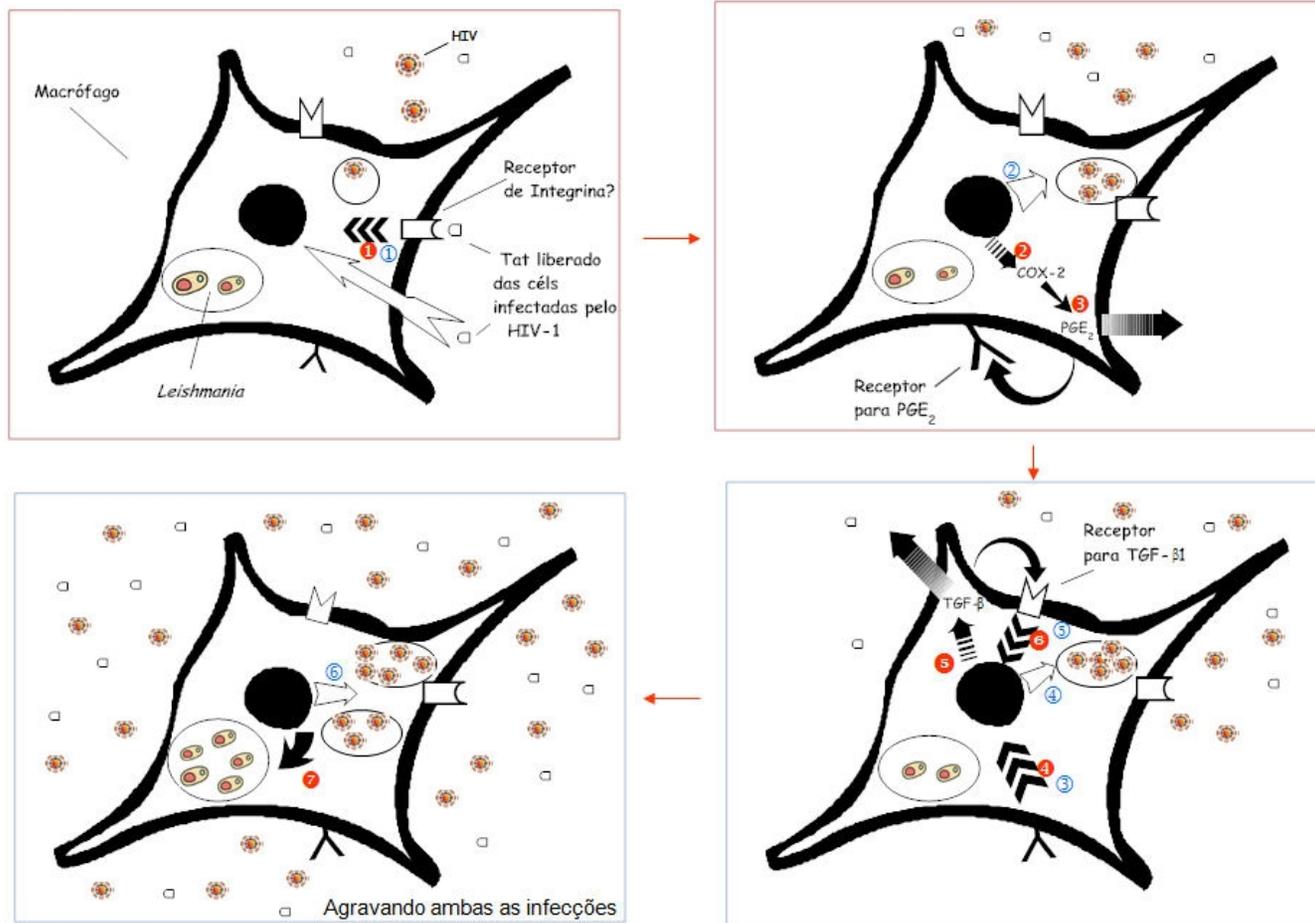
Quando incubamos macrófagos infectados somente com *Leishmania* na presença de Tat e Celecoxib (um inibidor farmacológico específico para a COX-2), nós observamos a abolição do efeito do Tat sobre a multiplicação protozoária, indicando que a atividade da enzima COX-2 desempenha elevada importância para o efeito que o Tat desempenha na amplificação do crescimento do tripanossomatídeo no interior da célula hospedeira (figura 5B, artigo 1). Portanto, nós conseguimos desvendar um importante fator que instiga a multiplicação do protozoário em macrófagos expostos ao Tat do HIV-1. Já está bem relatado que a concentração de Celecoxib utilizada em nosso estudo é capaz de inibir em 100% a produção de PGE<sub>2</sub> em vários tipos celulares (Rao & Knaus, 2008), o que nos motivou a avaliar o efeito da PGE<sub>2</sub> na replicação da *Leishmania*. Para complementar, decidimos investigar se a ação da PGE<sub>2</sub> dependeria de uma prévia secreção de TGF-β1, conforme especulamos a partir de estudos já publicados sobre reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos (Fadok *et al.*, 1998; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Conforme observado na figura 6, a adição de PGE<sub>2</sub> favoreceu o crescimento da *Leishmania*, ao passo que este resultado foi abolido quando anti-TGF-β1 estava presente. A análise deste resultado indica que a amplificação da replicação parasitária, decorrente da adição da PGE<sub>2</sub>, deve-se à secreção de TGF-β1. Se interpretarmos em conjunto os resultados das figuras 5 e 6, é coerente supor que o Tat induz TGF-β1 via uma indução prévia de COX-2 e PGE<sub>2</sub>. O promotor para COX-2 humano contém dois acentuadores (*enhancers*) de ligação ao NF-κB, e corroboramos investigações anteriores que demonstravam ativação deste fator pelo Tat (Flora *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Neste aspecto, dois estudos contrastantes com Tat recombinante sugerem que a síntese de COX-2 pode ou não ser dependente de NF-κB. Flora *et al.* (2006) observaram a expressão da sub-unidade p65 do NF-κB em núcleos celulares de tecidos de cérebros inoculados com Tat (Flora *et al.*, 2006). O NF-κB contém múltiplas sub-unidades e a p65 é a

responsável pela regulação da transcrição de genes inflamatórios (Flora *et al.*, 2006). Como nos animais controles (injetados somente com BSA) a subunidade p65 aparecia somente na região perinuclear (extranuclear), os autores sugerem que a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo foi induzida pelo Tat do HIV-1 (Flora *et al.*, 2006). Para comprovar se o NF- $\kappa$ B seria o responsável pela indução da COX-2 nos animais inoculados com o Tat, os autores usaram um inibidor de NF- $\kappa$ B na presença do Tat e constataram uma redução nos níveis do mRNA e da proteína COX-2 (Flora *et al.*, 2006). Contudo, Blanco e colaboradores relataram que NF- $\kappa$ B é dispensável para a indução de COX-2 pelo Tat extracelular (Blanco *et al.*, 2008). No estudo, os autores avaliaram as regiões promotoras da COX-2 responsáveis pela inducibilidade do Tat e observaram que continuava ocorrendo indução de COX-2 em células transfectadas com um promotor da COX-2 onde as regiões de ligação ao NF- $\kappa$ B estavam ausentes (Blanco *et al.*, 2008). Este resultado indica que a região de ligação ao NF- $\kappa$ B é dispensável para a produção da COX-2 no sistema experimental destes autores. Quando a depleção ocorria nas regiões de ligação ao NFAT ou AP-1 do promotor para a COX-2, a síntese protéica era reduzida, indicando que a presença das regiões de ligação ao NFAT e AP-1 é fundamental para a produção da COX-2 promovida pelo Tat exógeno (Blanco *et al.*, 2008). Curiosamente, as células utilizadas nos dois estudos provêm da glia, embora os resultados sejam contrastantes em relação ao fator responsável pela transcrição da COX-2. Em nossos estudos, nós não investigamos se a síntese da COX-2 instigada pelo Tat pode ser dependente de NF- $\kappa$ B ou não. Em relação a PGE<sub>2</sub>, cabe mencionar que dois estudos independentes já relataram níveis aumentados de PGE<sub>2</sub> em diversos pacientes portadores do HIV-1 (Chougnnet *et al.*, 1996; Griffin *et al.*, 1994). Todavia ainda não existem investigações correlacionando os níveis de Tat circulante com os níveis de PGE<sub>2</sub> em tecidos, o que seria interessante para especularmos sobre a contribuição do Tat na produção de PGE<sub>2</sub> em pacientes infectados pelo vírus.

A cascata de eventos biológicos, cujo desfecho é o aumento da replicação da *Leishmania* e do HIV-1 pelo Tat, foi didaticamente ilustrada na figura a seguir. As sinalizações bioquímicas intracelulares podem ser interconectadas em uma seqüência

lógica, e parecem depender do estímulo inicial provido pela proteína Tat do HIV-1. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que alguns fatores induzidos pelo Tat, como a PGE<sub>2</sub> e o TGF-β1, podem aumentar a replicação do HIV-1. Por exemplo, adição de TGF-β1 ou PGE<sub>2</sub> aumenta a produção de HIV-1 por macrófagos infectados por este vírus (Lima *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2006). Logo, podemos construir um modelo no qual a produção do HIV-1 seja favorecida diretamente pelo Tat ou indiretamente pela liberação de TGF-β1 e PGE<sub>2</sub>. Em nosso estudo, a seqüência de sinalizações desencadeadas pelo Tat culmina na liberação de TGF-β1 e este aparece como o último fator na promoção do crescimento intracelular do tripanossomatídeo, pelo menos em nosso modelo. Em macrófagos, a liberação de TGF-β pode ocorrer após o reconhecimento de células apoptóticas; através da infecção por certos patógenos; estimulação do receptor de Vitronectina (VnR); ou mesmo por IL-9 atuando em conjunto com LPS (Freire-de-Lima *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2002). Em 1993, Vogel *et al.* foram os primeiros a relatar que a região RGD do Tat era capaz de se ligar a receptores de vitronectina presentes em uma linhagem celular proveniente de músculo esquelético de rato (Vogel *et al.*, 1993). Em 2005, Urbinati e colaboradores descreveram que o Tat poderia se ligar com alta afinidade ao Receptor de Vitronectina α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> em células endoteliais, resultando em sinalização bioquímica intracelular (Urbinati *et al.*, 2005). Neste referido estudo, os autores verificaram que o Tat promovia a ativação de células endoteliais através do domínio RGD, e que este efeito dependia da ativação da Cinase de Adesão Focal (FAK) e do NF-κB (Urbinati *et al.*, 2005). Uma vez que a ligação do receptor de Vitronectina pode induzir TGF-β, e que o Tat pode interagir com este receptor acarretando a ativação de NF-κB, não podemos descartar que o aumento da replicação do protozoário seja dependente da interação Tat-VnR na superfície dos macrófagos. É consenso que o Tat penetre na célula e elicite sinalizações bioquímicas, todavia ainda é contraditório se a afinidade do Tat pelo VnR é suficiente para resultar em ativação/sinalização celular.

Tecido humano co-infectado (eg. Linfonodo)



**Figura 6:** Esquema que ilustra como o Tat estimula uma seqüência de etapas de sinalização interconectadas cujo desfecho é o aumento na replicação da *Leishmania* e do HIV-1. Um macrófago infectado pelo HIV-1 ou co-infectado por HIV/*Leishmania* libera partículas virais conjuntamente com a proteína Tat viral. O Tat pode penetrar diretamente na célula (nº1 circundado em vermelho) ou interagir com o receptor de integrina VnR (nº1 circundado em vermelho). Esta interação da proteína Tat com VnR, ou sua direta internalização, induz a expressão de COX-2 (nº2 circundado em vermelho) com conseqüente produção de PGE<sub>2</sub> (nº3 circundado em vermelho). A PGE<sub>2</sub> é liberada podendo atuar autocrinamente ou paracrinamente através de ligação com o receptor para PGE<sub>2</sub>. A ligação da PGE<sub>2</sub> com seu respectivo receptor dispara uma sinalização bioquímica (nº4 circundado em vermelho) que chega ao núcleo celular e leva à síntese de TGF-β (nº5 circundado em vermelho). Assim como para PGE<sub>2</sub>, o TGF-β pode atuar autocrinamente ou paracrinamente através da ligação com o seu receptor. A ligação do TGF-β com seu respectivo receptor gera uma sinalização intracelular (nº6 circundado em vermelho) a qual acarreta em produção de algum(s) fator(s) que propicia(Deniau *et al.*) uma maior replicação da *Leishmania*. Reavaliando o esquema por uma outra ótica, o Tat pode penetrar na célula diretamente ou se ligar ao receptor de integrina VnR (nº1 circundado em azul). Ao entrar diretamente na célula, o Tat é capaz de promover a replicação viral através da transativação do LTR do HIV-1 (nº2 circundado em azul). A interação do Tat com VnR, ou mesmo a sua entrada direta na célula, induz a síntese de COX-2 e PGE<sub>2</sub>. Quando a PGE<sub>2</sub> liga-se ao seu respectivo receptor, desencadeia uma sinalização que atinge o núcleo (nº3 circundado em azul) e promove a replicação do HIV-1 (nº4 circundado em azul). Porém a sinalização também pode induzir a secreção de TGF-β que, ao se ligar com o seu receptor, promove uma sinalização (nº5 circundado em azul) que chega ao núcleo e leva à produção de mais partículas virais (nº6 circundado em azul).

Para macrófagos, TGF- $\beta$  parece atuar como um fator anti-inflamatório, se considerarmos a secreção de citocinas pró-inflamatórias como um paradigma sobre inflamação. Neste contexto, TGF- $\beta$  inibe a secreção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-8 mesmo na presença de LPS (Li *et al.*, 2006). Se utilizarmos a ocorrência de migração celular como um dogma do processo pró-inflamatório, a citocina TGF- $\beta$  tem uma potente atuação quimiotática para monócitos e neutrófilos, seja pela atuação direta através da indução de moléculas de adesão ou através da estimulação para a liberação de Metaloproteinases (MMPs), as quais permitem um aumento da permeabilidade vascular (Li *et al.*, 2006; Nathan, 2002). Neste aspecto, dois estudos sugerem que o tratamento com o 100 ng/mL de Tat pode induzir a expressão de metaloproteinase-9 (MMP-9) por monócitos, e que o fenômeno é mediado pela ativação de NF- $\kappa$ B (Kumar *et al.*, 1999; Lafrenie *et al.*, 1996). É importante frisar que MMP-9 aumenta a permissividade à entrada de monócitos infectados pelo HIV-1 no local inflamado (Vaishnav & Wong-Staal, 1991). Como o Tat estimula a liberação tanto do TGF- $\beta$  quanto da MMP-9, isto nos remete a imaginar sobre a possibilidade do Tat potencializar o recrutamento de monócitos para o local onde o HIV-1 está replicando. Reforçando este pensamento está o fato do Tat estimular a produção de quimiocinas por células dendríticas (Izmailova *et al.*, 2003). No trabalho conduzido por Izmailova, os autores demonstraram que sobrenadantes de culturas de células dendríticas transfectadas com Tat eram capazes de recrutar monócitos e linfócitos T ativados (Izmailova *et al.*, 2003). Através da imunohistoquímica em linfonodos de símios infectados com SIV, estes autores verificaram que as células dendríticas produziam bastante Proteína Quimiotática para Macrófago (MCP)-2, a qual também era secretada *in vitro* por células dendríticas transfectadas com Tat (Izmailova *et al.*, 2003). Outros trabalhos também revigoram o pensamento de que Tat pode instigar a atração celular: por exemplo, o tratamento com o Tat também induz um fenótipo migratório em microglia fetal humana, via um mecanismo que parece depender da liberação de MCP-1 e MCP-2; tratamento com Tat é capaz de induzir a quimiocina IP-10 por células dendríticas e por astrócitos humanos (D'Aversa *et al.*, 2004; Eugenin *et al.*, 2005; Izmailova *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2009). Em 1998 e em 2000, três grupos reportaram independentemente que a proteína Tat *per se* é um potente quimio-atraente para monócitos, células dendríticas e

mastócitos, pois o Tat apresenta elevada homologia com  $\beta$ -quimiocinas (Albini *et al.*, 1998; Benelli *et al.*, 1998; de Paulis *et al.*, 2000). Surpreendente também é o fato do Tat compartilhar receptores com as quimiocinas MCP-1, MCP-3 e eotaxina, e que o Tat também é capaz de deslocar a ligação de  $\beta$ -quimiocinas dos receptores CCR2 e CCR3 (Albini *et al.*, 1998). Quando camundongos foram implantados subcutâneamente com esponja de *Matrigel* (composição química semelhante à matriz extracelular) embebida em Tat, Benelli e colaboradores verificaram alta concentração de monócitos aderidos a esta esponja, sugerindo que o Tat promove migração de monócitos *in vivo* (Benelli *et al.*, 1998). Nestes estudos supracitados, assim como os realizados por nós, o Tat utilizado foi sempre o do subtipo B (que é o subtipo prevalente nas Américas, Europa Ocidental, Austrália e Japão) (Geretti, 2006). Contudo, o Tat viral de variantes do subtipo C (com alta incidência na África, Índia e China) freqüentemente apresenta uma mutação no aminoácido cisteína da posição 31 (substituição por serina), o que torna esta proteína incapaz de exercer sua propriedade quimioatrativa (Campbell *et al.*, 2007). Logo, nós podemos visualizar um sistema coerente em que a infecção celular pelo HIV-1 (do subtipo B) resulte em liberação contínua da proteína Tat para a matriz tissular, acarretando em recrutamento de monócitos (normais ou mesmo infectados com o HIV-1) para o local (*e.g.* linfonodo) onde está ocorrendo a multiplicação do HIV-1 e da *Leishmania*. Com a chegada destes monócitos, o HIV-1 e a *Leishmania* poderiam infectar novas células hospedeiras e, conseqüentemente, continuar replicando ativamente. Altos níveis da citocina TGF- $\beta$ 1 e da quimiocina MCP-1 já foram reportados na circulação de indivíduos infectados pelo HIV-1 ou em tecidos linfáticos de macaco *rhesus* infectado com SIV (Estes *et al.*, 2007; Floris-Moore *et al.*, 2009; Izmailova *et al.*, 2003; Wiercinska-Drapalo *et al.*, 2004), o que nos faz acreditar que a replicação de tripanossomatídeos pode ser favorecida diretamente (através da presença de TGF- $\beta$  no tecido), ou mesmo indiretamente (via recrutamento de monócitos), quando o HIV-1 e o protozoário estão replicando no linfonodo de pacientes co-infectados.

Nossos resultados apontam para a citocina TGF- $\beta$ 1 como sendo o promotor final para o crescimento intracelular da *Leishmania*. Diversos relatos indicam que esta citocina pode alterar o metabolismo do macrófago a favor do patógeno intracelular,

fornecendo as condições bioquímicas ideais para o crescimento do microorganismo (Reed, 1999). Este conjunto de fatores nos fez especular sobre um possível efeito do Tat na desativação dos mecanismos microbicidas do macrófago, via um desvio para uma rota bioquímica favorável ao crescimento de protozoários. Com o objetivo de verificar se macrófagos humanos poderiam eliminar naturalmente um protozoário não adaptado à vida intracelular, nós incubamos macrófagos com *Blastocrithidia culicis* (10 protozoários/macrófago) por quatro horas, e o crescimento do tripanossomatídeo foi avaliado no dia 0 (logo após o término do período de incubação), terceiro e sexto dia pós-entrada do flagelado. Verificamos que em seis dias, macrófagos normais (não infectados/tratados) eram capazes de eliminar 75% da entrada (*input*) inicial do protozoário *Blastocrithidia culicis* (figura suplementar S2.1, capítulo 2; os protozoários não endocitados foram eliminados por lise com soro humano durante 5 minutos (Tuan & Chang, 1975). A análise microscópica das células coradas para a presença do protozoário indicou que a percentagem de células infectadas caiu drasticamente, indicando que o macrófago foi capaz de eliminar os flagelados intracelulares (a percentagem de células infectadas não está mostrada). Uma razão para isto é o fato do ciclo de vida da *B. culicis* desenvolver-se inteiramente em insetos (hospedeiro invertebrado) e a ausência do crescimento em macrófagos humanos sugere que este protozoário não está adaptado à vida no interior celular de hospedeiros vertebrados. Portanto, a infecção de macrófagos com este protozoário nos parece um bom modelo para o estudo das funções microbicidas desempenhadas naturalmente pelos macrófagos. Nos experimentos que serão discutidos a seguir, nós escolhemos avaliar o crescimento do protozoário no terceiro dia pós-infecção, pois neste ponto o macrófago normal elimina 50% dos parasitas endocitados.

Seguindo uma ordem semelhante ao racional para os estudos com *Leishmania*, fomos verificar se macrófagos co-infectados com HIV-1 e *B. culicis* permitiam o crescimento/sobrevivência intracelular deste flagelado. Como podemos verificar na figura 1 do artigo 2 (capítulo 2), o crescimento/sobrevivência intracelular das *B. culicis* em culturas de macrófagos infectados pelo HIV-1 triplica em relação ao crescimento do protozoário em macrófagos não infetados por este vírus. Nestas culturas celulares co-infectadas, a replicação viral também está amplificada em relação ao macrófago

infectado somente com o HIV-1, o que sugere uma interferência mútua na replicação dos patógenos. Este resultado sugere que a capacidade tripanomicida natural está reduzida nas células co-infectadas, e que a co-infecção determina um ambiente intracelular mais permissivo à replicação do HIV-1. Nossa próxima etapa foi analisar, por microscopia eletrônica de transmissão, duas questões fundamentais: se os dois patógenos podem co-habitar o mesmo macrófago; e se a identificação morfológica do comportamento da *Blastocrithidia* permite inferir se o protozoário está sofrendo divisões binárias. Conforme previamente mencionado na introdução, a *B. culicis* contém uma bactéria endossimbionte em seu interior, assim como uma estrutura flagelar apenas. Para que ocorra a divisão celular, o protozoário é obrigado a duplicar estas estruturas para posteriormente as repartir igualmente entre as células originadas.

Conforme podemos notar nas micrografias (figura 2, artigo 2, capítulo 2), macrófagos previamente infectados com HIV-1 (7 dias de infecção) foram expostos a *B. culicis*, e o interior celular foi visualizado por microscopia eletrônica de transmissão. Foi possível identificar os dois patógenos co-existindo na mesma célula hospedeira (painel A e painel B). A presença de vacúolos contendo elevada quantidade de vírus também indicou que a célula estava produtivamente infectada pelo vírus (painel A; setas indicam partículas virais no interior de vacúolos). Contrariamente ao que ocorre em linfócitos, o HIV-1 produzido por macrófagos apresenta-se maduro, ou seja, estruturalmente pronto e infectivo (Freed & Martin, 2007). No caso dos linfócitos, partículas virais brotam sem a formação completa do capsídeo (denominado de partícula imatura), e a formação completa da estrutura ocorre no meio extracelular (Freed & Martin, 2007). Em nosso trabalho, a visualização de capsídeos virais (mancha eletrodensa no interior do vírus) sugere que as partículas virais estão maduras, o que reforça estudos anteriores sugerindo que macrófagos liberam vírus infectivos (Carter & Ehrlich, 2008). Também foi possível detectar tripanossomatídeos com estruturas celulares duplicadas (painel C e D), sugerindo fortemente que o protozoário está sofrendo divisões. No painel D, podemos visualizar dois endossimbiontes (indicado pela letra E) diametralmente opostos, assim como duas estruturas flagelares (indicado pela letra F). Ainda nesta micrografia, é possível observar uma constrição da membrana, sugerindo uma citocinese, cujas células derivadas teriam um

endossimbionte e um flagelo cada. Em microscopia de campo claro, pudemos observar que as *B. culicis* não assumem formas morfológicas diferentes das que existiam no início da infecção (dado não mostrado). Na micrografia C, foi possível identificar formas alongadas do protozoário (forma epimastigota), semelhantes às observadas antes da infecção. Em conjunto, todos esses dados sugerem que macrófagos podem co-habitar a *B. culicis* e o HIV-1, e que o protozoário pode multiplicar-se no interior dos macrófagos co-infectados.

Na próxima etapa fomos avaliar se o Tat, liberado naturalmente pelas células infectadas com o vírus, poderia contribuir para o aumento da multiplicação protozoária nas culturas co-infectadas. Utilizando o modelo do artigo anterior, células foram infectadas com HIV-1 e após sete dias foram expostas à *B. culicis* por 4 horas. Após a remoção das *B. culicis* não internalizadas pela lise com complemento, anticorpos policlonais contra a proteína Tat foram adicionados às culturas co-infectadas ou infectadas com um só patógeno. Após três dias, a análise do índice endocítico indicou que a neutralização do Tat inibiu fortemente o crescimento do protozoário que normalmente ocorre em culturas co-infectadas onde não há neutralização desta proteína. Isto sugere que a multiplicação intracelular do flagelado é devida à presença do Tat liberado pelas células infectadas com o vírus. Contudo, não era possível discriminar se o efeito poderia ser promovido diretamente pelo Tat, ou se pela redução da produção de HIV-1 decorrente da neutralização do Tat. Também não era possível afirmar se o crescimento da *B. culicis* dependia do vírus. O próximo passo foi analisar se a proteína Tat adicionada seria capaz de induzir o crescimento intracelular da *B. culicis* em macrófagos infectados somente com este microorganismo.

Como demonstrado na figura 3B (artigo 2, capítulo 2), a exposição ao Tat permitiu o crescimento da *B. culicis*, assim como potencializou a replicação observada para a *L. amazonensis*. Como controle negativo, nós oxidamos o Tat com peróxido de hidrogênio, pois este tratamento inativa os efeitos biológicos desta proteína (Badou *et al.*, 2000; Ensoli *et al.*, 2006; Fanales-Belasio *et al.*, 2002). Este resultado sugere que a proteína Tat é capaz de promover a multiplicação intracelular de dois patógenos os quais apresentam ciclos de vida bem distintos. A *Leishmania* é dixênica e precisa

crescer no interior de macrófagos quando se encontra dentro do hospedeiro vertebrado. Porém a *Blastocrithidia* não cresce em células de organismos vertebrados e o ciclo de vida está restrito ao inseto hospedeiro. Curiosamente, o Tat é capaz de promover a replicação de um protozoário que não co-evoluiu para o crescimento em células de hospedeiros vertebrados. Portanto, é coerente especular que o Tat induza fatores que beneficiem a replicação intracelular destes monoxênicos. Um destes fatores poderia ser as poliaminas Putrescina, Espermidina e Espermina, as quais são essenciais para o crescimento e sobrevivência intracelular de *Leishmania* e *Trypanosoma* (Heby *et al.*, 2007). Por exemplo, a inibição da síntese de putrescina inibe o crescimento de *T. brucei*, *L. donovani* e *L. infantum* (Heby *et al.*, 2007). A enzima fundamental para a síntese de poliaminas é a Ornitina Descarboxilase (ODC). Existem duas enzimas importantes para a síntese da Putrescina: a L-Arginase que converte a L-arginina em Ornitina e a ODC que converte a Ornitina em Putrescina. A Espermidina e Espermina são formadas a partir da Putrescina (Heby *et al.*, 2007). Neste contexto, a atividade da ODC também parece ser importante em tripanossomatídeos que albergam um endossimbionte: cepas aposimbóticas (onde o endossimbionte é eliminado por tratamento com antibiótico) de *Crithidia deanei*, um tripanossomatídeo pertencente à mesma família da *Blastocrithidia*, apresentam baixa atividade da ODC e possuem crescimento ínfimo em meio de cultura, se comparados às cepas com o endossimbionte intracelular (Frossard *et al.*, 2006). A Arginase, a qual é fundamental para a produção do substrato para a ODC, pode ser induzida por TGF- $\beta$  em macrófagos murinos, resultando em produção acentuada de Putrescina (Boutard *et al.*, 1995). Logo, é coerente pensarmos que o Tat pode instigar a síntese de poliaminas via TGF- $\beta$ . Sabendo da importância da ODC no crescimento tanto da *Leishmania* quanto da *Blastocrithidia*, tentamos analisar a atividade desta enzima em macrófagos expostos ao Tat ou ao TGF- $\beta$ , porém não obtivemos êxito nesta empreitada.

Na próxima etapa, incubamos macrófagos infectados com *B. culicis* na presença de TGF- $\beta$ , e analisamos o efeito desta citocina sobre a sobrevivência/replicação intracelular do protozoário. Conforme observado na figura 4A do segundo artigo, o tratamento com TGF- $\beta$ 1 promoveu o crescimento intracelular da *B. culicis* em

macrófagos primários normais. Como demonstrado na figura 4B, houve uma redução significativa do crescimento da *B. culicis* quando as células foram incubadas com Tat na presença de anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$ 1. Assim como para a *Leishmania*, somente a presença do anticorpo não alterou o crescimento do protozoário, indicando que a redução da proliferação do parasito não se deve a uma atividade inespecífica do anticorpo. Quando todos os resultados são analisados em conjunto, podemos constatar que o Tat do HIV-1 desempenha um papel fundamental para o crescimento intracelular da *Leishmania* e da *Blastocystis*, e que este efeito intrínseco do Tat é co-relacionado com a indução de TGF- $\beta$ 1.

Nosso estudo, juntamente com dois outros, sugere que PGE<sub>2</sub> induz a secreção de TGF- $\beta$ 1 (Fadok *et al.*, 1998; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Entretanto diversas investigações demonstram que o tratamento com TGF- $\beta$  induz a expressão de COX-2 com conseqüente liberação de PGE<sub>2</sub> em macrófagos murinos, em astrócitos, em neurônios e em células musculares (Freire-de-Lima *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2008). Logo, é possível especular que ocorra um ciclo na indução de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, no qual a presença de um fator controla a síntese do outro, e vice-versa. É muito provável que a infecção pelo HIV-1 induza diversos fatores endógenos que contribuam para a secreção de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Além do Tat, a produção de PGE<sub>2</sub> ou TGF- $\beta$  também pode ser estimulada por fatores solúveis, os quais apresentam-se elevados em linfonodos infectados por HIV-1. Por exemplo, IL-1 $\beta$  é produzido em tecidos linfóides infectados *ex vivo* por HIV-1 e pode induzir a expressão de COX-2 com produção de PGE<sub>2</sub> (Dinarello, 2002; Lederman & Margolis, 2008). Já o TGF- $\beta$ 1 pode ser liberado por macrófagos que reconhecem células apoptóticas, e é inquestionável que a infecção pelo HIV-1 induz uma apoptose acentuada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em tecidos linfóides (Alimonti *et al.*, 2003; Fadok *et al.*, 1998). Recentemente observamos que o Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF), sabidamente um indutor de PGE<sub>2</sub> (Calandra & Roger, 2003), também está presente em concentrações elevadas em indivíduos infectados pelo HIV-1, e pode ser liberado por linfócitos infectados com o vírus *in vitro* (Regis *et al.*, submetido para publicação). Portanto é possível que Tat, IL-1 $\beta$ , MIF e reconhecimento de células apoptóticas estejam contribuindo (ou mesmo

sinergizando) para os elevados níveis de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> observados na circulação de indivíduos infectados pelo HIV-1 (Griffin *et al.*, 1994; Wiercinska-Drapalo *et al.*, 2004).

Além do grave comprometimento do sistema imune em decorrência da infecção pelo HIV-1, a presença contínua de um co-patógeno pode reativar células com infecções latentes pelo HIV-1. Infecção latente pelo HIV-1 já foi descrita em diversos estudos e ocorre principalmente em células T CD4<sup>+</sup> quiescentes e de memória (Han *et al.*, 2007). As células de memória em repouso, contendo o provirus integrado, podem sobreviver por um longo período no organismo (Han *et al.*, 2007). Quando estas células são re-ativadas, diversos fatores de transcrição são novamente expressos, e o resultado é o retorno da produção viral (Han *et al.*, 2007). Logicamente, a persistência de um co-patógeno nestes indivíduos portadores de HIV-1 possibilita a ativação e também re-ativação de uma percentagem elevada de células T CD4<sup>+</sup>. A ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode culminar em novos alvos celulares para o HIV-1, ou mesmo em aumento na produção viral quando células T CD4<sup>+</sup> de memórias (com provirus no seu cromossoma) forem reativadas. Neste ano, Nishimura e colaboradores reportaram que macacos *rhesus* infectados experimentalmente com SIV apresentam provirus integrado no genoma de linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens (Nishimura *et al.*, 2009). Sabe-se que a infecção por *Leishmania* desencadeia uma resposta imunológica intensa, a qual passa pela ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e reativação de células de memória (Bogdan, 2008). Por exemplo, sabe-se que a *Leishmania* pode permanecer latente em um organismo infectado (Bogdan, 2008), e a análise de pacientes europeus co-infectados por HIV-1 e *Leishmania* revelou que a recidiva da leishmaniose ocorre em maior frequência do que novas infecções com o protozoário (Alvar *et al.*, 2008). Portanto, o retorno da proliferação do protozoário, em pacientes co-infectados com os dois agentes patogênicos, pode promover reativação maciça de células de memória CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>, o que cria um ambiente altamente permissivo à replicação do HIV-1. Este nosso trabalho gerou uma série de perspectivas, as quais serão comentadas na seção “perspectivas” (após a seção “conclusão”).

Os resultados que integram este estudo são os primeiros a demonstrar que uma proteína do HIV-1 é capaz de aumentar a proliferação intracelular de *Leishmania*

*amazonensis* e *Blastocrithidia culicis* em macrófagos humanos primários. Este trabalho é pioneiro na investigação de moléculas do HIV-1 que estimulam a proliferação de possíveis co-patógenos, e aponta para a necessidade de estudos envolvendo outras possíveis moléculas do HIV-1. Por exemplo, proteínas gp120 também podem ser encontradas na circulação de pacientes infectados pelo HIV-1 e modulam a expressão de certas citocinas (Klasse & Moore, 2004), tornando atrativo o estudo desta molécula do HIV. Logo podemos sugerir que estratégias que visem neutralizar os efeitos do Tat (como imunização contra a proteína Tat) podem reduzir a proliferação do vírus e do tripanossomatídeo em indivíduos co-infectados com HIV-1/*Leishmania* ou HIV-1/*Blastocrithidia*. De fato, diversos autores acreditam que o Tat representa um alvo potencial para vacina contra o HIV (Ensoli *et al.*, 2006; Ensoli *et al.*, 2008). Este silogismo baseia-se nas seguintes premissas: seqüências imunogênicas conservadas entre diferentes subtipos do HIV-1; detecção de Tat na circulação sanguínea, e, portanto passível de neutralização por anticorpos; indução da secreção de citocinas por células dendríticas, com potencial polarização para Th1; o papel central na replicação do vírus (Ensoli *et al.*, 2006). Testes clínicos de imunização contra a proteína Tat recombinante estão sendo conduzidos por Ensoli e colaboradores (Ensoli *et al.*, 2008). Resultados preliminares em 27 pacientes portadores do HIV-1, os quais estavam clinicamente assintomáticos e sem tratamento com HAART, demonstraram que a injeção de Tat é segura e bem tolerada pelos indivíduos inoculados (Ensoli *et al.*, 2008). Além disso, a vacinação instigou uma resposta Th2 em todos os participantes, inclusive com a formação bem significativa de imunoglobulinas M, G e A contra o Tat (Ensoli *et al.*, 2008). Atualmente os estudos da estrutura do Tat também têm despertado interesse na área de endereçamento de nanopartículas para o interior celular (Berry, 2008; Torchilin, 2008). A proteína Tat do HIV-1 contém uma região denominada Peptídeo Penetrante de Célula (CPP), constituído do domínio compreendido entre os aminoácidos 47 ao 57 (Torchilin, 2008). Após a entrada, o Tat migra para o núcleo, embora ainda não esteja claro como a região peptídica CPP possibilite a entrada da molécula na célula (Berry, 2008; Torchilin, 2008). Esta propriedade do Tat permite o endereçamento de compostos farmacológicos para o interior celular, através da ligação do CPP com o composto de interesse (Berry, 2008;

Torchilin, 2008). Interessante mencionar que o CPP do Tat conjugado a  $\beta$ -galactosidase permite que esta enzima atinja diferentes tecidos *in vivo*, como coração, fígado, baço, pulmão e músculo esquelético (Torchilin, 2008). Nesta conjuntura, acreditamos que a interface entre pesquisas clínicas e básicas seja tênue, uma vez que estratégias terapêuticas necessitam de um embasamento teórico. Embora não existam bons modelos experimentais para o estudo da infecção pelo HIV-1 *in vivo* (o modelo animal com SIV é comparado ao HIV-1 por analogia), acreditamos que os modelos *in vitro* possam fornecer algumas evidências para o que acontece no organismo humano infectado pelo vírus. Um longo caminho ainda precisa ser descortinado para que possamos compreender os fatores que modulam mutuamente o crescimento do HIV-1 e de um patógeno clássico (*Leishmania*), ou mesmo de um possível patógeno (*Blastocrithidia*). Esta tese representa o primeiro passo nesta iniciativa.

## Conclusões

- A infecção pelo HIV-1 aumenta a replicação intracelular do protozoário *L. amazonensis* e permite a replicação do tripanossomatídeo *B. culicis* em macrófagos humanos primários co-infectados;

- A neutralização imune do Tat reduz significativamente o incremento da replicação protozoária instigada pela co-infecção com HIV-1 em macrófagos;

- A adição exógena da proteína Tat recombinante estimula o crescimento intracelular dos tripanossomatídeos *Leishmania* e *Blastocrithidia*;

- A proteína Tat estimula a síntese da COX-2, com conseqüente produção de PGE<sub>2</sub>, em macrófagos humanos não infectados;

- A neutralização do TGF- $\beta$ 1, ou da produção de PGE<sub>2</sub>, reduz a replicação pronunciada dos tripanossomatídeos em macrófagos expostos à proteína Tat do HIV-1;

- A PGE<sub>2</sub> é capaz de promover o crescimento intracelular da *Leishmania* em macrófagos humanos, e este efeito depende da liberação de TGF- $\beta$ 1;

- Adição de TGF- $\beta$ 1 estimula a replicação intracelular da *B. culicis* em macrófagos humanos normais;

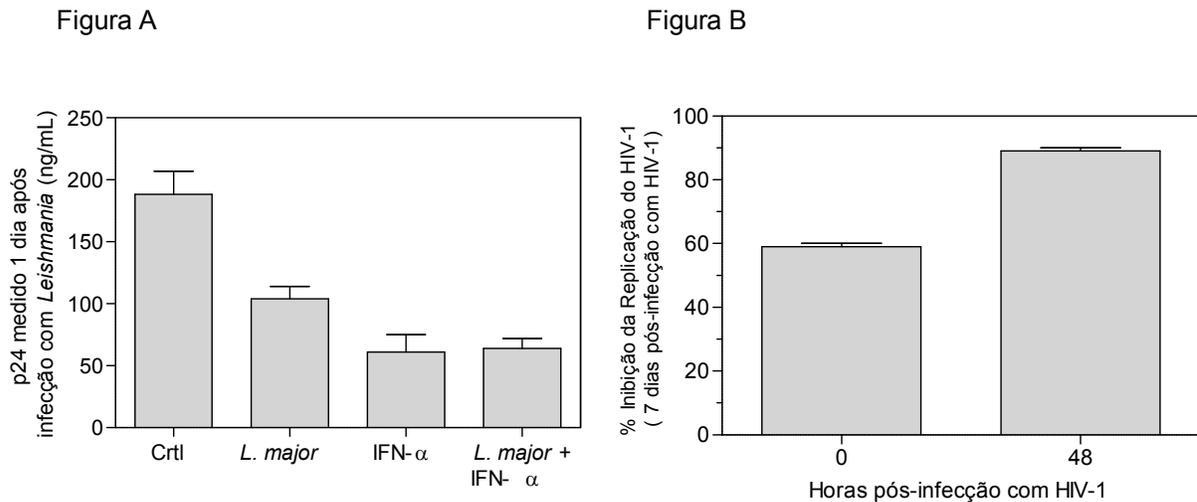
- O efeito que o Tat possui na exacerbação da replicação dos protozoários *Leishmania* e *Blastocrithidia* é dependente de TGF- $\beta$ 1.

## Perspectivas

Embora existam relatos clínicos de co-infecção HIV-1 e *Leishmania major* (Foulet *et al.*, 2006; Guiguemde *et al.*, 2003), nenhum estudo *in vitro* procurou correlacionar a replicação destes dois patógenos em macrófagos co-infectados. Em 2007, nós iniciamos um estudo em colaboração com a Dra Sharon Wahl (*National Institutes of Health*, MD, EUA) visando investigar a modulação da enzima APOBEC (um conhecido fator de restrição à infecção pelo HIV-1) em macrófagos infectados por *Leishmania major* ou expostos à molécula Lipofosfoglicana (LPG) da *L. major*. Surpreendemo-nos ao verificar que a infecção por *L. major* era capaz de inibir a produção de HIV-1 em culturas de macrófagos humanos co-infectados *in vitro*. Em macrófagos humanos primários, o protozoário *Leishmania major* era capaz de estimular a síntese de RNA mensageiro para um subtipo de APOBEC (APOBEC3A), sem alterar a produção dos demais subtipos. A produção de mRNA para APOBEC3A era transitória, e atingia o pico após 24h da infecção pela *Leishmania*. Porém a inibição da produção do HIV-1 era mais precoce, ocorrendo poucas horas após a infecção com *L. major*. Promastigotas de *Leishmania* interagem com moléculas presentes na membrana plasmática de macrófagos durante a entrada nestas células hospedeiras, o que confere uma amplitude de sinalizações intracelulares (Olivier *et al.*, 2005). Baseado nestas premissas, nós passamos a inferir que a infecção por *L. major* seria capaz de reduzir a replicação do HIV-1 em um período bem precoce, provavelmente durante o processo de invasão do macrófago. Para iniciar a investigação desta hipótese, decidimos padronizar uma curva em que a *Leishmania major* fosse exposta ao macrófago em diferentes momentos: concomitantemente com a infecção pelo vírus; ou dois dias após a entrada do HIV-1.

Conforme pode ser verificado na figura A (apresentada abaixo), a co-infecção com *L. major* acarretou em redução na replicação do HIV-1 em macrófagos que já estavam produzindo a partícula viral. Quando a *L. major* foi adicionada no mesmo momento do HIV-1, nós observamos uma inibição marcante da produção do HIV-1 por macrófagos infectados há sete dias com o vírus (Figura B). Porém a maior intensidade

de inibição (~90%) foi verificada quando os macrófagos eram expostos à *Leishmania major* no segundo dia pós-entrada do HIV-1 (48 horas). Considerando que já ocorre integração do HIV-1 no 2º dia pós-infecção viral, ou mesmo pelo fato da *L. major* inibir a produção viral em macrófagos que já estavam produzindo HIV-1, nós acreditamos que a interação da *L. major* com o macrófago não altera a integração do cDNA viral no genoma celular.



**Inibição da replicação do HIV-1 pela *L. major*.** (Fig A) Macrófagos humanos primários (oriundos de monócitos do sangue) foram infectados com HIV-1 por 2 horas e, após sete dias, as células foram infectadas com *L. major* (3 parasitos/macrófago). As culturas foram lavadas com PBS por 2X, meio fresco foi re-adicionado e alguns poços foram tratados com IFN- $\alpha$  à 10ng/mL. Após 24 horas, os sobrenadantes da cultura foram recolhidos e a produção do HIV-1 foi quantificada por ELISA comercial para o p24. Barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de 2 doadores; (Fig B) Culturas de Macrófagos humanos foram infectadas com HIV-1 por 2 horas, lavadas com PBS por 2X, e meio fresco foi re-adicionado. Algumas culturas foram co-infectadas com *Leishmania major* (3 parasitos/macrófago) logo após as 2 horas de interação das células com o HIV-1 (primeira barra) ou mesmo após 48 horas da infecção com o vírus (segunda barra). A replicação do HIV-1 foi avaliada por ELISA após 7 dias da infecção pelo vírus. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média (n=2) de percentagens de inibição da replicação do vírus em relação aos valores absolutos de p24 dos macrófagos infectados somente com HIV-1.

Conforme citado no parágrafo anterior, promastigotas de *Leishmania* disparam uma cascata de sinalizações intracelulares quando se ligam a certas moléculas

presentes na membrana de macrófagos. Uma destas moléculas é o receptor do tipo Toll (TLR) – 2, o qual pode interagir com formas promastigotas de *Leishmania major* ou mesmo com moléculas de Lipofosfoglicana (LPG) presentes na membrana destas espécies de parasitos (de Veer *et al.*, 2003). Nosso laboratório tem resultados demonstrando que o Zymosan, um carboidrato proveniente da parede de fungo, é capaz de inibir a replicação do HIV-1 em macrófagos. Assim como o LPG, Zymosan também é reconhecido pelo TLR-2, o que nos faz hipotetizar que a inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos expostos à *Leishmania major* seja decorrente da interação do LPG do protozoário com o TLR-2 na membrana plasmática do macrófago. Nós procederemos com experimentos utilizando LPG purificado, ou com LPG purificado na presença de anticorpos antagonistas para TLR-2 humano, com intuito de avaliar se ocorre inibição da replicação do HIV-1. Em paralelo, nós realizaremos estas mesmas condições em *L. amazonensis*, pois esta espécie de *Leishmania* promove um incremento da replicação viral. Uma vez que as moléculas LPGs variam entre espécies de *Leishmania* (a variação ocorre principalmente no domínio glicídico da molécula) (Beverley & Turco, 1998), é plausível especular que moléculas LPGs de *L. amazonensis* possam não ser reconhecidas por TLR-2, ou mesmo por outro receptor na membrana do macrófago. Partindo do pressuposto que a proteína adaptadora MyD88 é fundamental para a sinalização de TLR-2, e de que desempenha um importante papel quando a *Leishmania* é reconhecida por TLR-2 (de Veer *et al.*, 2003), também pretendemos investigar a participação do MyD88 no processo de inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos expostos à forma promastigota de *Leishmania*, ou tratados com LPGs provenientes de *L. major* ou *L. amazonensis*.

Em 1890, Robert Koch foi o primeiro a definir patogenicidade quando formulou o postulado sobre microorganismos causadores de doenças (Falkow, 1988). Segundo Koch, o inóculo destes microorganismos em um animal saudável deve causar doença (s). Entretanto, o quadro clínico de imunossupressão permite o estabelecimento de patógenos oportunistas os quais não se encaixam neste postulado de Koch. Desde a identificação da AIDS no início dos anos 80, os médicos e pesquisadores sempre reconheceram que infecções oportunistas podem agravar o quadro clínico da infecção pelo HIV-1. Por esta razão, as co-infecções entre HIV-1 e outros patógenos (ou

possíveis patógenos) jamais perderão enfoque ao longo dos anos. Nós acreditamos que o estudo das co-infecções HIV-1/*protozoários* mereça destaque, principalmente em nosso país onde a presença destes patógenos é elevada e endêmica. Estudar como um tripanossomatídeo interfere na replicação do HIV-1, e vice versa, contribui para a formulação de possíveis estratégias terapêuticas para a co-infecção, ou mesmo para as infecções isoladas. Por exemplo, o estudo de como a *L. major* promove uma sinalização intracelular capaz de reduzir a replicação do HIV-1 em macrófagos pode ser interessante no desenvolvimento de compostos com atividade anti-retroviral. Por fim, nós acreditamos que a infecção pelo HIV-1, e a respectiva repercussão no sistema imune, pode levar ao surgimento de doenças nunca vistas, tornando difícil prever quais são os microorganismos potencialmente perigosos para o ser humano.

## Referências Bibliográficas

Abbink TE, Berkhout B. HIV-1 reverse transcription initiation: a potential target for novel antivirals? *Virus Res.* 2008; 134(1-2):4-18.

Adamson CS, Freed EO. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.* 2007; 55:347-87.

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* 2008; 84(2):389-96.

Aguilar-Cordova E, Chinen J, Donehower L, Lewis DE, Belmont JW. A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994; 10(3):295-301.

Al-Jabri AA, Lambkin R, Oxford JS. Lack of evidence for complete resistance of peripheral blood mononuclear cells to HIV-1 and HIV-2 infection. *Viral Immunol.* 2008; 21(1):83-90.

Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, et al. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(22):13153-8.

Albright AV, Soldan SS, Gonzalez-Scarano F. Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol.* 2003; 9(2):222-7.

Alfano M, Crotti A, Vicenzi E, Poli G. New players in cytokine control of HIV infection. *Current HIV/AIDS reports.* 2008; 5(1):27-32.

Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 7):1649-61.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 1996; 272(5270):1955-8.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2):334-59, table of contents.

Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008; 214(2):231-41.

Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, Bahraoui E. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *Journal of virology.* 2000; 74(22):10551-62.

Bahr GM, Capron A, Dewulf J, Nagata S, Tanaka M, Bourez JM, et al. Elevated serum level of Fas ligand correlates with the asymptomatic stage of human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997; 90(2):896-8.

Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):310-26.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44(5):536-46.

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.

Barro-Traore F, Preney L, Traore A, Darie H, Tapsoba P, Bassole A, et al. [Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* involving the bone marrow in an AIDS patient in Burkina Faso]. *Ann Dermatol Venereol*. 2008; 135(5):380-3.

Barton CH, Biggs TE, Mee TR, Mann DA. The human immunodeficiency virus type 1 regulatory protein Tat inhibits interferon-induced iNos activity in a murine macrophage cell line. *J Gen Virol*. 1996; 77 ( Pt 8):1643-7.

Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*. 2008; 22(15):1993-2000.

Benelli R, Mortarini R, Anichini A, Giunciuglio D, Noonan DM, Montalti S, et al. Monocyte-derived dendritic cells and monocytes migrate to HIV-Tat RGD and basic peptides. *AIDS*. 1998; 12(3):261-8.

Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Journal of virology*. 1995; 69(11):7282-5.

Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol*. 1998; 160(6):2881-8.

Berry CC. Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1 tat peptide. *Nanomed*. 2008; 3(3):357-65.

Bertholet S, Dickensheets HL, Sheikh F, Gam AA, Donnelly RP, Kenney RT. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun*. 2003; 71(4):2095-101.

Beverley SM, Turco SJ. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol*. 1998; 6(1):35-40.

- Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, et al. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood*. 2008; 111(2):699-704.
- Blanco A, Alvarez S, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. Extracellular HIV-Tat induces cyclooxygenase-2 in glial cells through activation of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol*. 2008; 180(1):530-40.
- Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang HC, Lassen K, Lai J, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *Journal of virology*. 2007; 81(5):2508-18.
- Blankson JN, Siliciano RF. Elite suppression of HIV-1 replication. *Immunity*. 2008; 29(6):845-7.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med*. 2000; 191(12):2121-30.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001; 2(10):907-16.
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*. 2008; 10(6):1221-34.
- Boisseau-Garsaud AM, Cales-Quist D, Desbois N, Jouannelle J, Jouannelle A, Pratlong F, et al. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(1):51-2.
- Bol SM, van Remmerden Y, Sietzema JG, Kootstra NA, Schuitemaker H, van 't Wout AB. Donor variation in in vitro HIV-1 susceptibility of monocyte-derived macrophages. *Virology*. 2009; 390(2):205-11.
- Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM, et al. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature*. 1993; 363(6431):728-32.
- Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol*. 1995; 155(4):2077-84.
- Brady J, Kashanchi F. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology*. 2005; 2:69.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science (New York, NY)*. 2008; 319(5865):921-6.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004; 200(6):749-59.
- Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology*. 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. *Nature medicine*. 2006b; 12(12):1365-71.

Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol*. 2008; 1(1):23-30.

Brown A, Zhang H, Lopez P, Pardo CA, Gartner S. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(5):1127-35.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(10):791-800.

Camargo EP, Freymuller E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyltransferase in a trypanosomatid. *Nature*. 1977; 270(5632):52-3.

Campbell GR, Watkins JD, Singh KK, Loret EP, Spector SA. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *Journal of virology*. 2007; 81(11):5919-28.

Carter CA, Ehrlich LS. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol*. 2008; 62:425-43.

Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(5):1018-30.

Cavrois M, Neidleman J, Greene WC. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS pathogens*. 2008; 4(6):e1000051.

Cecchinato V, Trynieszewska E, Ma ZM, Vaccari M, Boasso A, Tsai WP, et al. Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol*. 2008; 180(8):5439-47.

Chang HC, Samaniego F, Nair BC, Buonaguro L, Ensoli B. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *Aids*. 1997; 11(12):1421-31.

Chang HK, Gallo RC, Ensoli B. Regulation of Cellular Gene Expression and Function by the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein. *J Biomed Sci*. 1995; 2(3):189-202.

Chang KP. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. *J Protozool*. 1974; 21(5):699-707.

Chang KP, Trager W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. *Science*. 1974; 183(124):531-2.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(11):873-82.

Chen P, Mayne M, Power C, Nath A. The Tat protein of HIV-1 induces tumor necrosis factor- $\alpha$  production. Implications for HIV-1-associated neurological diseases. *J Biol Chem.* 1997; 272(36):22385-8.

Cheng SM, Li JC, Lin SS, Lee DC, Liu L, Chen Z, et al. HIV-1 trans-activator protein induction of suppressor of cytokine signaling-2 contributes to dysregulation of IFN $\{\gamma\}$  signaling. *Blood.* 2009; 113(21):5192-201.

Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW, Jr., et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol.* 2006; 80(18):9039-52.

Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97 Suppl 1:75-8.

Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature.* 2005; 435(7038):108-14.

Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:317-53.

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 1996; 85(7):1135-48.

Chougnat CA, Margolis D, Landay AL, Kessler HA, Shearer GM. Contribution of prostaglandin E2 to the interleukin-12 defect in HIV-infected patients. *AIDS.* 1996; 10(9):1043-5.

Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature medicine.* 1995; 1(12):1284-90.

Ciuffi A, Bleiber G, Munoz M, Martinez R, Loeuillet C, Rehr M, et al. Entry and transcription as key determinants of differences in CD4 T-cell permissiveness to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2004; 78(19):10747-54.

Ciuffi A. Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Current gene therapy.* 2008; 8(6):419-29.

Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 1986; 324(6098):691-5.

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.

Correa-da-Silva MS, Fampa P, Lessa LP, Silva Edos R, dos Santos Mallet JR, Saraiva EM, et al. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitol Res.* 2006; 99(4):384-91.

Cossarizza A. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(3):237-44.

Costin JM. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virol J.* 2007; 4:100.

Crowe S, Zhu T, Muller WA. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol.* 2003; 74(5):635-41.

Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 2002; 359(9312):1124-5.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3):357-88.

D'Aversa TG, Yu KO, Berman JW. Expression of chemokines by human fetal microglia after treatment with the human immunodeficiency virus type 1 protein Tat. *J Neurovirol.* 2004; 10(2):86-97.

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984; 312(5996):763-7.

Dang CV, Lee WM. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem.* 1989; 264(30):18019-23.

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.

de la Loma A, Alvar J, Martinez Galiano E, Blazquez J, Alcala Munoz A, Najera R. Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79(3):421-2.

de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, Lancelot S, Opi S, et al. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology.* 2005; 2:5.

de Paulis A, De Palma R, Di Gioia L, Carfora M, Prevete N, Tosi G, et al. Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. *J Immunol.* 2000; 165(12):7171-9.

de Souza W, Motta MC. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 173(1):1-8.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 2003; 33(10):2822-31.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 1996; 273(5283):1856-62.

Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, et al. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89(6):644-6.

Dedet JP. Parasitism of HIV-infected patients by insect flagellates. *Lancet.* 1996; 347(9012):1409.

Dedet JP, Pratlong F. Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J Eukaryot Microbiol.* 2000; 47(1):37-9.

Delelis O, Carayon K, Saib A, Deprez E, Mouscadet JF. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology.* 2008; 5:114.

Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol.* 2007; 177(2):329-41.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 1996; 381(6584):661-6.

Deniau M, Canavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97 Suppl 1:115-33.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(3):239-43.

Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(9):692.

DeVico AL, Gallo RC. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(5):401-13.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20(5 Suppl 27):S1-13.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 1996; 85(7):1149-58.

Douek DC. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev.* 2003; 5(3):172-7.

Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009; 60:471-84

Dybul M, Connors M, Fauci AS. Immunology of HIV infection. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 1285-318.

Eckstein DA, Penn ML, Korin YD, Scripture-Adams DD, Zack JA, Kreisberg JF, et al. HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity.* 2001; 15(4):671-82.

Eisert V, Kreutz M, Becker K, Konigs C, Alex U, Rubsamen-Waigmann H, et al. Analysis of cellular factors influencing the replication of human immunodeficiency virus type I in human macrophages derived from blood of different healthy donors. *Virology*. 2001; 286(1):31-44.

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*. 1993; 362(6418):359-62.

Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, et al. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol*. 1993; 67(1):277-87.

Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, et al. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*. 1994; 371(6499):674-80.

Ensoli B, Fiorelli V, Ensoli F, Cafaro A, Titti F, Butto S, et al. Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials. *Aids*. 2006; 20(18):2245-61.

Ensoli B, Fiorelli V, Ensoli F, Lazzarin A, Visintini R, Narciso P, et al. The therapeutic phase I trial of the recombinant native HIV-1 Tat protein. *AIDS*. 2008; 22(16):2207-9.

Essex M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv Virus Res*. 1999; 53:71-88.

Estes JD, Wietgreffe S, Schacker T, Southern P, Beilman G, Reilly C, et al. Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *J Infect Dis*. 2007; 195(4):551-61.

Eugenin EA, Dyer G, Calderon TM, Berman JW. HIV-1 tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)-dependent mechanism: possible role in NeuroAIDS. *Glia*. 2005; 49(4):501-10.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998; 101(4):890-8.

Falkow S. Molecular Koch's Postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis*. 1988; 10(Suppl 2):S274-6

Fanales-Belasio E, Moretti S, Nappi F, Barillari G, Micheletti F, Cafaro A, et al. Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol*. 2002; 168(1):197-206.

Fang FC, Vazquez-Torres A. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282(5):L941-3.

Farrell JP, Kirkpatrick CE. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol.* 1987; 138(3):902-7.

Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane HC, Rook AH, Masur H, et al. NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med.* 1984; 100(1):92-106.

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999; 5(5):512-7.

Flora G, Pu H, Hennig B, Toborek M. Cyclooxygenase-2 is involved in HIV-1 Tat-induced inflammatory responses in the brain. *Neuromolecular Med.* 2006; 8(3):337-52.

Floris-Moore M, Fayad ZA, Berman JW, Mani V, Schoenbaum EE, Klein RS, et al. Association of HIV viral load with monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis burden measured by magnetic resonance imaging. *AIDS.* 2009; 23(8):941-9.

Fouchier RA, Brouwer M, Kootstra NA, Huisman HG, Schuitemaker H. HIV-1 macrophage tropism is determined at multiple levels of the viral replication cycle. *J Clin Invest.* 1994; 94(5):1806-14.

Foulet F, Cosnes A, Dellion S, Blum L, Bachmeyer C, Raguin G, et al. *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis in HIV-positive patients does not spread to extralesional sites. *Arch Dermatol.* 2006; 142(10):1368-9.

Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988; 55(6):1189-93.

Freed EO. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics.* 2001; 26(1-6):13-33.

Freed EO, Martin MA. HIVs and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000; 403(6766):199-203.

Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem.* 2006; 281(50):38376-84.

Frossard ML, Seabra SH, DaMatta RA, de Souza W, de Mello FG, Machado Motta MC. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343(2):443-9.

Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(1):33-42.

Garg R, Trudel N, Tremblay MJ. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends in parasitology*. 2007; 23(7):317-24.

Garg R, Lodge R, Descoteaux A, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* promastigotes reduce entry of HIV-1 into macrophages through a lipophosphoglycan-mediated disruption of lipid rafts. *The Journal of infectious diseases*. 2008; 197(12):1701-8.

Garin YJ, Sulahian A, Meneceur P, Pratlong F, Prina E, Gangneux J, et al. Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; 48(2):170-6.

Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(1):1-7.

Giri MS, Nebozyhn M, Raymond A, Gekonge B, Hancock A, Creer S, et al. Circulating monocytes in HIV-1-infected viremic subjects exhibit an antiapoptosis gene signature and virus- and host-mediated apoptosis resistance. *J Immunol*. 2009; 182(7):4459-70.

Goff SP. Knockdown screens to knockout HIV-1. *Cell*. 2008; 135(3):417-20.

Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, et al. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nature medicine*. 1998; 4(1):65-71.

Goldstein G. HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nature medicine*. 1996; 2(9):960-4.

Goletti D, Weissman D, Jackson RW, Graham NM, Vlahov D, Klein RS, et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol*. 1996; 157(3):1271-8.

Gordon S. Macrophages and the immune response. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 481-96.

Gousset K, Ablan SD, Coren LV, Ono A, Soheilian F, Nagashima K, et al. Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS pathogens*. 2008; 4(3):e1000015.

Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr Biol*. 1999; 9(1):21-9.

Gray MW. Organelle origins and ribosomal RNA. *Biochem Cell Biol*. 1988; 66(5):325-48.

Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature medicine*. 2002; 8(7):673-80.

Griffin DE, Wesselingh SL, McArthur JC. Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*. 1994; 35(5):592-7.

Guiguemde RT, Sawadogo OS, Bories C, Traore KL, Nezien D, Nikiema L, et al. Leishmania major and HIV co-infection in Burkina Faso. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97(2):168-9.

Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol.* 2004; 34(4):433-44.

Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(10):783-92.

Han Y, Wind-Rotolo M, Yang HC, Siliciano JD, Siliciano RF. Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nature reviews.* 2007; 5(2):95-106.

Hasegawa A, Liu H, Ling B, Borda JT, Alvarez X, Sugimoto C, et al. The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood.* 2009; *in press.*

Heby O, Persson L, Rentala M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids.* 2007; 33(2):359-66.

Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity.* 2007; 26(2):257-70.

Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(6):447-57.

Ho DD, Zhang L. HIV-1 rebound after anti-retroviral therapy. *Nat Med.* 2000; 6(7):736-7.

Hottiger M, Hubscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996; 377(2):97-120.

Hoxie JA, Alpers JD, Rackowski JL, Huebner K, Haggarty BS, Cedarbaum AJ, et al. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science.* 1986; 234(4780):1123-7.

Hsieh SM, Wang YH, Chang SC, Huang TS. Low dose HIV-1 Tat improves the defective nuclear factor (NF)-kappaB activity of dendritic cells from persons with spinal cord injury. *Cell Immunol.* 2009; 257(1-2):105-10.

Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol.* 2000; 74(13):6087-95.

Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, Narayan O, et al. Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol.* 2000; 6(2):145-55.

Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by

a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(2):658-63.

Igarashi T, Imamichi H, Brown CR, Hirsch VM, Martin MA. The emergence and characterization of macrophage-tropic SIV/HIV chimeric viruses (SHIVs) present in CD4+ T cell-depleted rhesus monkeys. *J Leukoc Biol*. 2003; 74(5):772-80.

Izmailova E, Bertley FM, Huang Q, Makori N, Miller CJ, Young RA, et al. HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nature medicine*. 2003; 9(2):191-7.

Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem*. 1999; 274(41):28837-40.

Jimenez MI, Lopez-Velez R, Molina R, Canavate C, Alvar J. HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet*. 1996; 347(8996):264-5.

Jones KA, Peterlin BM. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:717-43.

Joos B, Fischer M, Kuster H, Pillai SK, Wong JK, Boni J, et al. HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(43):16725-30.

Karp CL, Neva FA. Tropical infectious diseases in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 1999; 28(5):947-63; quiz 64-5.

Karp CL, Auwaerter PG. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. II. Helminthic, fungal, bacterial, and viral pathogens. *Clin Infect Dis*. 2007a; 45(9):1214-20.

Karp CL, Auwaerter PG. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. *Clin Infect Dis*. 2007b; 45(9):1208-13.

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. *Nature immunology*. 2007; 8(11):1246-54.

Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother*. 2001; 12(3):133-50.

Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003; 8(3):223-46.

Kim WK, Corey S, Alvarez X, Williams K. Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *J Leukoc Biol*. 2003; 74(5):650-6.

King JE, Eugenin EA, Buckner CM, Berman JW. HIV tat and neurotoxicity. *Microbes Infect*. 2006; 8(5):1347-57.

Kiselyeva Y, Ito Y, Lima RG, Grivel JC, Das AT, Berkhout B, et al. Depletion of CD4 T lymphocytes in human lymphoid tissue infected ex vivo with doxycycline-dependent HIV-1. *Virology*. 2004; 328(1):1-6.

Klasse PJ, Moore JP. Is there enough gp120 in the body fluids of HIV-1-infected individuals to have biologically significant effects? *Virology*. 2004; 323(1):1-8.

Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 1984; 225(4657):59-63.

Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*. 2008; 135(1):49-60.

Kubar J, Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Staccini P, Caroli-Bosc C, et al. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *Aids*. 1998; 12(16):2147-53.

Kumar A, Dhawan S, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Human immunodeficiency virus-1-tat induces matrix metalloproteinase-9 in monocytes through protein tyrosine phosphatase-mediated activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*. 1999; 462(1-2):140-4.

Kundu RK, Sangiorgi F, Wu LY, Pattengale PK, Hinton DR, Gill PS, et al. Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood*. 1999; 94(1):275-82.

Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Hewlett IK, Yamada KM, Dhawan S. HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes. *J Immunol*. 1996; 157(3):974-7.

Laguna F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97 Suppl 1:135-42.

Lederman MM, Margolis L. The lymph node in HIV pathogenesis. *Seminars in immunology*. 2008; 20(3):187-95.

Leghmari K, Contreras X, Moureau C, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-beta1 and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38. *Cell Immunol*. 2008; 254(1):46-55.

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

Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(12):930-9.

Lewin SR, Kirihara J, Sonza S, Irving L, Mills J, Crowe SM. HIV-1 DNA and mRNA concentrations are similar in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 1998; 12(7):719-27.

Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*. 1995; 268(5209):429-31.

Li JC, Lee DC, Cheung BK, Lau AS. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett*. 2005a; 579(14):3055-62.

Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res*. 2005b; 15(11-12):923-34.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:99-146.

Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005c; 434(7037):1148-52.

Li Q, Smith AJ, Schacker TW, Carlis JV, Duan L, Reilly CS, et al. Microarray Analysis of Lymphatic Tissue Reveals Stage-Specific, Gene Expression Signatures in HIV-1 Infection. *J Immunol*. 2009; 183(3):1975-82.

Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008; 213(3-4):377-87.

Lima RG, Van Weyenbergh J, Saraiva EM, Barral-Netto M, Galvao-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; 185(11):1561-6.

Lima RG, Moreira L, Paes-Leme J, Barreto-de-Souza V, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, et al. Interaction of macrophages with apoptotic cells enhances HIV Type 1 replication through PGE2, PAF, and vitronectin receptor. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22(8):763-9.

Lin X, Irwin D, Kanazawa S, Huang L, Romeo J, Yen TS, et al. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol*. 2003; 77(15):8227-36.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996; 86(3):367-77.

Loeuillet C, Deutsch S, Ciuffi A, Robyr D, Taffe P, Munoz M, et al. In vitro whole-genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV-1. *PLoS Biol*. 2008; 6(2):e32.

Lopez-Velez R, Casado JL, Pintado V. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(7):394-5.

Luo J, Lang JA, Miller MW. Transforming growth factor beta1 regulates the expression of cyclooxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons. *J Neurochem*. 1998; 71(2):526-34.

Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986; 47(3):333-48.

Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*. 2008; 3(6):388-98.

Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*. 2001; 75(22):11166-77.

Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005; 434(7037):1093-7.

Mayne M, Holden CP, Nath A, Geiger JD. Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages. *J Immunol*. 2000; 164(12):6538-42.

McElrath MJ, Pruett JE, Cohn ZA. Mononuclear phagocytes of blood and bone marrow: comparative roles as viral reservoirs in human immunodeficiency virus type 1 infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(2):675-9.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004; 200(6):761-70.

Menezes MCND, Roitmanz I. Nutritional Requirements of *Blastocrithidia culicis*, a Trypanosomatid with an Endosymbiont. *J Eukaryot Microbiol*. 1991; 38(2):122-3.

Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008; 29(6):1009-21.

Mikulak J, Gianolini M, Versmisse P, Pancino G, Lusso P, Verani A. Biological and physical characterization of the X4 HIV-1 suppressive factor secreted by LPS-stimulated human macrophages. *Virology*. 2009; 390(1):37-44.

Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 2005; 79(14):9217-27.

Ministério-da-Saúde/Brasil. Epidemiologia AIDS/HIV. 2008; Available from: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>.

Mira JA, Corzo JE, Rivero A, Macias J, De Leon FL, Torre-Cisneros J, et al. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(3):298-301.

Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*. 2009; 137(3):433-44.

Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of Leishmania. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97 Suppl 1:29-45.

Morsy TA, Schnur LF, Feinsod FM, Michael SA, Saah A, Salama MM, et al. The discovery and preliminary characterization of a novel trypanosomatid parasite from *Rattus norvegicus* and stray dogs from Alexandria, Egypt. *Ann Trop Med Parasitol.* 1988; 82(5):437-44.

Motta MC, Soares MJ, Attias M, Morgado J, Lemos AP, Saad-Nehme J, et al. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. *Eur J Cell Biol.* 1997; 72(4):370-7.

Munch J, Rucker E, Standker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell.* 2007; 131(6):1059-71.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999; 96(3):319-28.

Naif HM, Li S, Alali M, Chang J, Mayne C, Sullivan J, et al. Definition of the stage of host cell genetic restriction of replication of human immunodeficiency virus type 1 in monocytes and monocyte-derived macrophages by using twins. *Journal of virology.* 1999; 73(6):4866-81.

Nakata K, Rom WN, Honda Y, Condos R, Kanegasaki S, Cao Y, et al. Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155(3):996-1003.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79(4):1193-226.

Nath A, Conant K, Chen P, Scott C, Major EO. Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon. *J Biol Chem.* 1999; 274(24):17098-102.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002; 420(6917):846-52.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 2008; 451(7177):425-30.

Neuveut C, Jeang KT. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol.* 1996; 70(8):5572-81.

Nicholson JK, McDougal JS, Jaffe HW, Spira TJ, Kennedy MS, Jones BM, et al. Exposure to human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus and immunologic abnormalities in asymptomatic homosexual men. *Ann Intern Med.* 1985; 103(1):37-42.

Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, Braner J, Cinatl J, Palermo F, et al. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999; 60(1):142-5.

Nishimura Y, Sadjadpour R, Mattapallil JJ, Igarashi T, Lee W, Buckler-White A, et al. High frequencies of resting CD4+ T cells containing integrated viral DNA are found in rhesus macaques during acute lentivirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(19):8015-20.

Novey FG, McNeal WJ, Torrey HN. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J Infect Dis*. 1907; 4:223-76.

Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007; 28(9):378-84.

Olivier M, Badaro R, Medrano FJ, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2003; 97 Suppl 1:79-98.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(2):293-305.

Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science*. 1997; 276(5320):1857-61.

Osorio y Fortea J, Prina E, de La Llave E, Lecoer H, Lang T, Milon G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol Rev*. 2007; 219:66-74.

Pacheco RS, Marzochi MC, Pires MQ, Brito CM, Madeira Mde F, Barbosa-Santos EG. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93(4):531-7.

Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003; 3(3):210-21.

Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, Brenchley JM, Butler IF, Pattison M, et al. Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol*. 2007; 179(5):3035-46.

Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13:487-512.

Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, et al. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood*. 2007; 110(1):393-400.

Peruzzi F. The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci*. 2006; 11:708-17.

Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(2):97-107.

Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell.* 2006; 23(3):297-305.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(3):746-9.

Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(4):399-405.

Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:665-708.

Pilcher CD, Eron JJ, Jr., Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *The Journal of clinical investigation.* 2004; 113(7):937-45.

Pintado V, Lopez-Velez R. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7(6):291-300.

Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 2001; 80(1):54-73.

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 1984; 224(4648):497-500.

Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, Braner J, Nunnari A, Doerr HW, et al. Immunological findings in HIV-Leishmania coinfection. *Intervirology.* 1996; 39(4):285-8.

Pu H, Hayashi K, Andras IE, Eum SY, Hennig B, Toborek M. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2007; 1184:333-44.

Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 2008; 11(2):81s-110s.

Re MC, Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Roderigo G, De Rosa V, et al. Effect of antibody to HIV-1 Tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995; 10(4):408-16.

Re MC, Vignoli M, Furlini G, Gibellini D, Colangeli V, Vitone F, et al. Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients. *J Clin Virol.* 2001; 21(1):81-9.

Reed SG. TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes and infection* / Institut Pasteur. 1999; 1(15):1313-25.

Reinhold D, Wrenger S, Kahne T, Ansorge S. HIV-1 Tat: immunosuppression via TGF-beta1 induction. *Immunol Today*. 1999; 20(8):384-5.

Rezza G, Fiorelli V, Dorrucci M, Ciccozzi M, Tripiciano A, Scoglio A, et al. The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters. *J Infect Dis*. 2005; 191(8):1321-4.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2004; 172(7):4454-62.

Ribeiro RM. Dynamics of CD4+ T cells in HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(4):287-94.

Roan NR, Greene WC. A seminal finding for understanding HIV transmission. *Cell*. 2007; 131(6):1044-6.

Rodriguez SK, Sarr AD, Olorunnipa O, Popper SJ, Gueye-Ndiaye A, Traore I, et al. The absence of anti-Tat antibodies is associated with risk of disease progression in HIV-2 infection. *J Infect Dis*. 2006; 194(6):760-3.

Ruibal-Ares B, Belmonte L, Bare P, Bayo-Hanza C, Mendez G, Bianco RP, et al. Monocyte differentiation and HIV replication after prolonged culture of peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Cell Immunol*. 2001; 210(1):11-20.

Rusert P, Fischer M, Joos B, Leemann C, Kuster H, Flepp M, et al. Quantification of infectious HIV-1 plasma viral load using a boosted in vitro infection protocol. *Virology*. 2004; 326(1):113-29.

Sabri F, De Milito A, Pirskanen R, Elovaara I, Hagberg L, Cinque P, et al. Elevated levels of soluble Fas and Fas ligand in cerebrospinal fluid of patients with AIDS dementia complex. *J Neuroimmunol*. 2001; 114(1-2):197-206.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *The Indian journal of medical research*. 2006; 123(3):245-66.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996; 382(6593):722-5.

Santos DO, Bourguignon SC, Castro HC, Silva JS, Franco LS, Hespanhol R, et al. Infection of mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. *J Eukaryot Microbiol*. 2004; 51(5):570-4.

Sastry KJ, Marin MC, Nehete PN, McConnell K, el-Naggar AK, McDonnell TJ. Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene*. 1996; 13(3):487-93.

Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science*. 1999; 283(5403):857-60.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(2):163-89.

Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol*. 1993; 122(4):923-32.

Sharkey M, Triques K, Kuritzkes DR, Stevenson M. In vivo evidence for instability of episomal human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Journal of virology*. 2005; 79(8):5203-10.

Sharova N, Swingle C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J*. 2005; 24(13):2481-9.

Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol*. 2008; 214(2):405-12.

Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(3):395-402.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113(6):685-700.

Shibata R, Maldarelli F, Siemon C, Matano T, Parta M, Miller G, et al. Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J Infect Dis*. 1997; 176(2):362-73.

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med*. 2003; 9(6):727-8.

Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998; 4(9):1032-7.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:145-82.

Steinaa L, Sorensen AM, Nielsen JO, Hansen JE. Antibody to HIV-1 Tat protein inhibits the replication of virus in culture. *Arch Virol*. 1994; 139(3-4):263-71.

Steinman RM, Granelli-Piperno A, Pope M, Trumpfheller C, Ignatius R, Arrode G, et al. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 2003; 276:1-30.

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

Stopak KS, Chiu YL, Kropp J, Grant RM, Greene WC. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(6):3539-46.

Strebel K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS.* 2003; 17 Suppl 4:S25-34.

Swingler S, Mann AM, Zhou J, Swingler C, Stevenson M. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathog.* 2007; 3(9):1281-90.

Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008; 358(15):1590-602.

Thomas JA, Ott DE, Gorelick RJ. Efficiency of human immunodeficiency virus type 1 postentry infection processes: evidence against disproportionate numbers of defective virions. *J Virol.* 2007; 81(8):4367-70.

Torchilin VP. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(4-5):548-58.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine.* 2006; 12(10):1198-202.

Tsubota H, Lord CI, Watkins DI, Morimoto C, Letvin NL. A cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *The Journal of experimental medicine.* 1989; 169(4):1421-34.

Tuan RS, Chang KP. Isolation of intracellular symbiotes by immune lysis of flagellate protozoa and characterization of their DNA. *J Cell Biol.* 1975; 65(2):309-23.

Uchil PD, Mothes W. HIV Entry Revisited. *Cell.* 2009; 137(3):402-4.

UNAIDS. 2008 Report on the global AIDS epidemic. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2008; Available from: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/>.

Urbinati C, Bugatti A, Giacca M, Schlaepfer D, Presta M, Rusnati M. alpha(v)beta3-integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF-kappaB activation and motogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 17):3949-58.

Vaishnav YN, Wong-Staal F. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:577-630.

van Furth R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol.* 1989; 79:125-50.

Vazquez N, Greenwell-Wild T, Rekka S, Orenstein JM, Wahl SM. Mycobacterium avium-induced SOCS contributes to resistance to IFN-gamma-mediated mycobactericidal activity in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2006; 80(5):1136-44.

Veazey R, Lackner A. The mucosal immune system and HIV-1 infection. *AIDS Rev.* 2003; 5(4):245-52.

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvets DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998; 280(5362):427-31.

Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol*. 2001; 22(11):626-33.

Veazey RS, Acierno PM, McEvers KJ, Baumeister SH, Foster GJ, Rett MD, et al. Increased loss of CCR5+ CD45RA- CD4+ T cells in CD8+ lymphocyte-depleted Simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Virol*. 2008; 82(11):5618-30.

Vellutini C, Horschowski N, Philippon V, Gambarelli D, Nave KA, Filippi P. Development of lymphoid hyperplasia in transgenic mice expressing the HIV tat gene. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995; 11(1):21-9.

Verani A, Pesenti E, Polo S, Tresoldi E, Scarlatti G, Lusso P, et al. CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *J Immunol*. 1998; 161(5):2084-8.

Verani A, Gras G, Pancino G. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol*. 2005; 42(2):195-212.

Vodovotz Y. Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide*. 1997; 1(1):3-17.

Vogel BE, Lee SJ, Hildebrand A, Craig W, Pierschbacher MD, Wong-Staal F, et al. A novel integrin specificity exemplified by binding of the alpha v beta 5 integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin. *J Cell Biol*. 1993; 121(2):461-8.

Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Hale-Donze H, Doherty TM, Mizel D, et al. Mycobacterium avium complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(21):12574-9.

Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Hale-Donze H, Orenstein JM. Co-infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages. *J Infect Dis*. 1999; 179 Suppl 3:S457-60.

Wahl SM, Greenwell-Wild T, Vazquez N. HIV accomplices and adversaries in macrophage infection. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(5):973-83.

Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Krausslich HG. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS pathogens*. 2007; 3(3):e36.

Westhorpe CL, Zhou J, Webster NL, Kalionis B, Lewin SR, Jaworowski A, et al. Effects of HIV-1 infection in vitro on transendothelial migration by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol*. 2009.

- Whitelaw DM. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet.* 1972; 5(4):311-7.
- WHO. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV coinfection. Geneva: World Health Organization 2007.
- Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol.* 2004; 17(1):109-13.
- Williams R, Yao H, Dhillon NK, Buch SJ. HIV-1 Tat co-operates with IFN-gamma and TNF-alpha to increase CXCL10 in human astrocytes. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5709.
- Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valantine A, Britton S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand J Infect Dis.* 1998; 30(1):29-34.
- Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS.* 2000; 14(8):921-9.
- Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews.* 2006; 6(11):859-68.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(6):454-65.
- Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, et al. Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998a; 95(7):3851-6.
- Zagury JF, Sill A, Blattner W, Lachgar A, Le Buanec H, Richardson M, et al. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. *J Hum Virol.* 1998b; 1(4):282-92.
- Zauli G, Davis BR, Re MC, Visani G, Furlini G, La Placa M. tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression. *Blood.* 1992; 80(12):3036-43.
- Zhang M, Li X, Pang X, Ding L, Wood O, Clouse KA, et al. Bcl-2 upregulation by HIV-1 Tat during infection of primary human macrophages in culture. *J Biomed Sci.* 2002; 9(2):133-9.
- Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chappier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev.* 2008; 226:29-40.
- Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science.* 1999; 286(5443):1353-7.

## Referências Bibliográficas

---

Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. Leishmania infantum enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. Clin Immunol. 2004; 113(1):81-8.

Zhao C, Cantin R, Breton M, Papadopoulou B, Tremblay MJ. DC-SIGN-mediated transfer of HIV-1 is compromised by the ability of Leishmania infantum to exploit DC-SIGN as a ligand. The Journal of infectious diseases. 2005; 191(10):1665-9.

Zhao C, Thibault S, Messier N, Ouellette M, Papadopoulou B, Tremblay MJ. In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of Leishmania infantum rely on its enhanced uptake? J Gen Virol. 2006; 87(Pt 5):1295-302.

Zheng L, Yang Y, Guocai L, Pauza CD, Salvato MS. HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand. Intervirology. 2007; 50(3):224-8.

Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. J Immunol. 2006; 176(3):1840-7.

**Co-autoria de trabalho realizado durante a tese**

**Título:** Interaction of Macrophages with Apoptotic Cells Enhances HIV Type 1 Replication Through PGE<sub>2</sub>, PAF, and Vitronectin Receptor.

**Publicado em:** AIDS Research and Human Retroviruses 2006, **22**(8):763-69

**Autores:** Rosângela Gomes Lima, Letícia Moreira, Joana Paes Leme, Victor Barreto de Souza, Hugo Caire Castro Faria Neto, Patrícia Torres Bozza, Dumith Chequer Bou-Habib.

**Objetivos do Estudo:** Neste estudo investigamos a participação de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) e do receptor de Vitronectina no aumento da replicação do HIV-1 em consequência do reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos humanos primários. Demonstramos que a adição de PGE<sub>2</sub> e de PAF foi capaz de aumentar a produção de HIV-1 por macrófagos, e que o antagonista do receptor de PAF, assim como o inibidor farmacológico da Ciclooxigenase (COX-2), reverteram o aumento da replicação viral instigada pelo reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos. Também reportamos que o receptor de Vitronectina é importante para a fagocitose de células apoptóticas neste modelo, e que a estimulação deste receptor induz o aumento da produção viral.

## Interaction of Macrophages with Apoptotic Cells Enhances HIV Type 1 Replication Through PGE<sub>2</sub>, PAF, and Vitronectin Receptor

ROSANGELA G. LIMA,<sup>1,3,\*</sup> LETÍCIA MOREIRA,<sup>3,\*</sup> JOANA PAES-LEME,<sup>3</sup>  
VICTOR BARRETO-DE-SOUZA,<sup>3</sup> HUGO C. CASTRO-FARIA-NETO,<sup>2</sup> PATRÍCIA T. BOZZA,<sup>2</sup>  
and DUMITH CHEQUER BOU-HABIB<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages increases secretion of soluble mediators and generates an antiinflammatory environment. We previously reported that phagocytosis of apoptotic cells by HIV-1-infected macrophages enhances viral replication, with the participation of the cytokine transforming growth factor- $\beta$ 1 and an integrin receptor. Now, we describe the role of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), platelet-activating factor (PAF), and the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 (vitronectin receptor, VnR) in this phenomenon. Exacerbation of HIV-1 growth induced by phagocytosis of apoptotic cells was inhibited when HIV-1-infected macrophages were treated with a cyclooxygenase 2 inhibitor, or with a PAF receptor antagonist (BN 52021) immediately after macrophage interaction with apoptotic cells. Treatment of HIV-1-infected macrophages with BN 52021 decreased viral replication, whereas addition of PGE<sub>2</sub> or PAF to these cells enhanced viral replication. Monoclonal antibodies (MAbs) to VnR reduced the macrophage uptake of apoptotic cells, prevented the enhancement of HIV-1 growth upon the engulfment of apoptotic cells, and potently augmented viral replication in HIV-1-infected macrophages in the absence of apoptotic cells. In conclusion, PGE<sub>2</sub> and PAF, and ligation of VnR as well, contribute to amplify viral growth in HIV-1-infected macrophages upon uptake of apoptotic cells.

### INTRODUCTION

CELLS FROM THE MONOCYTE/MACROPHAGE LINEAGE and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are the main targets of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Although most of the circulating HIV-1 isolates are released from activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, these cells are rapidly destroyed by the virus, whereas macrophages are resistant to HIV-1-mediated cytopathicity.<sup>1</sup> Indeed, chronically infected macrophages can survive for longer periods, sustaining productive viral replication and, thus, functioning as an important reservoir for HIV-1 infection.<sup>2</sup> Production and release of HIV-1 by macrophages can be influenced by many factors in tissues where macrophages populate and exert their physiologic activities, such as in the lymph nodes. Accordingly, increased permissiveness of

macrophages to HIV-1 infection and higher numbers of HIV-1-infected and virus-producing macrophages have been associated with a number of conditions, such as coinfections<sup>3–5</sup> and immune activation.<sup>6,7</sup> In this sense, we indicated that the phagocytosis of apoptotic cells by HIV-1-infected macrophages resulted in an exacerbated viral growth, a phenomenon involving the cytokine transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and an integrin receptor,<sup>8</sup> suggesting that HIV-1 replication could be up-modulated in patients when apoptotic cells are cleared by HIV-1-infected macrophages. Production of TGF- $\beta$ 1 by HIV-1-infected macrophages exposed to apoptotic cells was elevated, and neutralizing antibodies to TGF- $\beta$ 1 reduced by 50% the enhancement effect of apoptotic cells on viral growth. Since TGF- $\beta$ 1 is only partially responsible for the augmented HIV-1 replication in this model, other modulators could possibly participate in the increment of viral growth.

<sup>1</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica and <sup>3</sup>Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*R.G. Lima and L. Moreira contributed equally to this work.

It has been proposed that phagocytosis of apoptotic cells by macrophages, a physiological and essential process for internal homeostasis, generates an antiinflammatory and immunosuppressive environment regulated by synthesis of several cytokines.<sup>9–11</sup> In fact, the TGF- $\beta$ 1 released by macrophages upon interaction with apoptotic cells<sup>12</sup> contributes to the impairment of the ability of macrophages to control the growth of the harbored infectious agents.<sup>8,13</sup> Besides TGF- $\beta$ 1, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and platelet-activating factor (PAF) are produced by macrophages following uptake of apoptotic cells,<sup>12,13</sup> and may be additional factors contributing for the generation of such an immunosuppressive milieu. These two mediators are synthesized upon cell activation from lipid precursors present in the plasma membrane by action of phospholipase A<sub>2</sub>.<sup>14,15</sup> PGE<sub>2</sub> is released by many cells, including macrophages, and, like other prostaglandins, is active only near the site where it is produced.<sup>15</sup> Relative to PAF, it has been recognized that this molecule presents multiple physiological functions in innate immunity.<sup>14</sup> Since there have been suggestions that PAF participates in the pathogenesis of AIDS-associated dementia,<sup>16</sup> and because PGE<sub>2</sub> production is up-modulated in HIV-1 infection,<sup>17</sup> we now investigate whether these two mediators also contribute to the enhancement of HIV-1 replication following the uptake of apoptotic cells and, therefore, would modulate HIV-1 replication in peripheral human macrophages.

Recognition and removal of apoptotic cells by professional phagocytes occur upon engagement of multiple receptors present on phagocyte plasma membrane,<sup>10</sup> including the vitronectin receptor (VnR).<sup>10,18,19</sup> Since we have previously found that the Arg-Gly-Asp-Ser peptide, which presents high affinity for integrin receptors, reduced the binding of apoptotic cells to macrophages and inhibited the enhancement of HIV-1 replication driven by the ingestion of apoptotic cells,<sup>8</sup> we also studied whether the engagement of VnR results in enhanced HIV-1 replication. In this paper, we present further evidence that signaling originated from VnR contributes to the enhancement of viral growth in HIV-1-infected macrophages, exposed or not exposed to apoptotic cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Virus and reagents*

All assays of macrophage infection were performed with the monocytotropic, CCR5-dependent isolate HIV-1<sub>BA-L</sub>.<sup>8</sup> PAF and the PAF receptor antagonist BN 52021 were purchased from Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA). PGE<sub>2</sub> was from Cayman Chemicals, Inc. (Ann Arbor, MI), and the COX-2 inhibitor Celecoxib was from Searle Pharmaceuticals (Skokie, IL). Anti- $\alpha_V$  (clone AV1) and anti- $\alpha_V\beta_3$  (clone LM609) monoclonal antibodies (MAbs) were from Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), and IgG1 isotype control from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The concentrations of Celecoxib and BN 52021 used in this study were not toxic for peripheral primary cells, as evaluated by a trypan blue dye exclusion assay.

### *Cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were obtained by density gradient centrifugation

(Hystopaque, Sigma) from buffy coat preparations and, from these PBMCs, monocyte-derived macrophages were isolated by plastic adherence. Briefly,  $2.5 \times 10^6$  PBMCs were plated in 48-well plates in RPMI without serum for 1 h, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Nonadherent cells were washed out, and adherent cells were maintained with Dulbecco's modified essential medium (DMEM) with 10% human serum (Sigma) for 7 days, for differentiation in macrophages. Macrophage purity was above 90%, as checked by flow cytometry analysis performed on an EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter, Hialeah, FL), using anti-CD3 (Caltag, Burlingame, CA) and anti-CD16 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) MAbs. Apoptotic cells (APO) were prepared from the CD4<sup>+</sup> T cell line Jurkat, by exposing these cells to UV radiation (312 nm) for 10 min, followed by culturing them at 37°C for 2 h. This treatment induced apoptosis in approximately 80% of the cells, as confirmed by annexin V and propidium iodide staining. Fixed cells were obtained by treating Jurkat cells with 1% paraformaldehyde for 30 min.

### *Phagocytosis of apoptotic cells by uninfected macrophages*

To measure the uptake of apoptotic cells, 10<sup>6</sup> PBMCs were seeded in 8-well Permax chamber slides (Nalge Nunc International, Naperville, IL), and macrophage differentiation was performed as above. Next, apoptotic cells were added to macrophages in a ratio of 10:1 for 1 h. Nonphagocytized cells were washed out and macrophages were fixed and stained with Giemsa. Phagocytic indices (PI) were determined as the percentage of macrophages that had phagocytized apoptotic cells, multiplied by the average number of ingested cells per macrophage,<sup>8</sup> and are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). To evaluate the effect of anti-VnR MAbs on the uptake of apoptotic cells, macrophages were treated with anti- $\alpha_V$  or with anti- $\alpha_V\beta_3$  MAbs for 15 min, followed by the addition of apoptotic cells, and the PI was calculated as mentioned above.

### *Macrophage infection and exposure to apoptotic cells and to exogenous compounds*

Macrophages were infected with 10–20 ng/ml of HIV-1 p24 antigen and, after overnight incubation, excess virus was washed out. Apoptotic cells were added to HIV-1-infected macrophages in a 10:1 ratio for 2 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in DMEM without serum. Nonphagocytized apoptotic cells were removed, and monolayers were replenished with fresh medium supplemented with 10% human serum, with or without Celecoxib or BN52021. Culture medium was renewed each 7 days, with no further addition of apoptotic cells or exogenous compounds. Viral replication was measured in culture supernatants using a p24 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) capture assay (ZeptoMetrix Co., Buffalo, NY). Uninfected macrophages were also exposed to apoptotic cells to evaluate modulation of PGE<sub>2</sub> release, which was measured in cell culture supernatants by enzyme immunoassay (EIA) (Cayman Chemicals, Inc.), according to manufacturer's instructions. In separate experiments, HIV-1-infected macrophages were treated with PAF or PGE<sub>2</sub> immediately after cell infection. Culture medium was renewed each 7 days, with no further addition of these compounds, and viral replication was measured as described above.

### Treatment of HIV-1-infected macrophages with anti-VnR MAbs

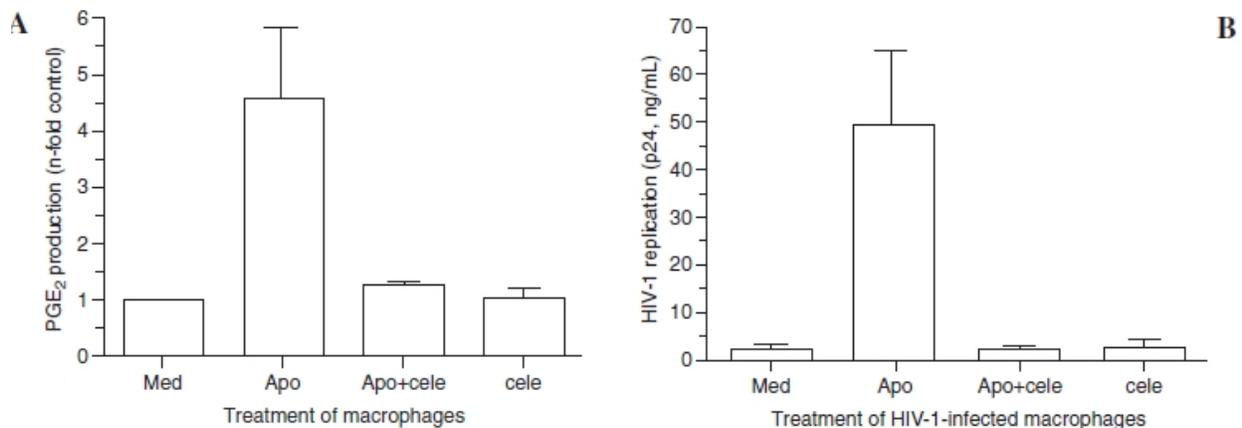
HIV-1-infected macrophages were treated either with anti- $\alpha_V$  or anti- $\alpha_V\beta_3$  MAbs to investigate whether they could modulate HIV-1 replication. In some assays, infected macrophages were treated with anti- $\alpha_V\beta_3$  MAb for 15 min, followed by addition of apoptotic cells. After 2 h cells were washed to remove nonphagocytized apoptotic cells and cultures were maintained as described. Viral replication was assessed as mentioned above.

## RESULTS

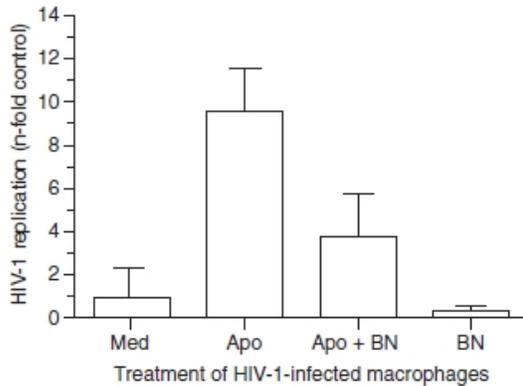
It has been indicated that the clearance of apoptotic cells by human or murine macrophages modulates the production of cytokines and inflammatory mediators, including PGE<sub>2</sub>.<sup>12,13</sup> Here, we also observed an up-modulation of PGE<sub>2</sub> secretion when human monocyte-derived macrophages were exposed to apoptotic cells (Fig. 1A). The amount of PGE<sub>2</sub> released by macrophages after apoptotic cell uptake increased more than four times relative to spontaneous release of this mediator ( $p = 0.03$ , as calculated using Student's *t* test). Addition of Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, drastically reduced the enhancement effect of apoptotic cell uptake, similar to other studies that suggest that macrophage-apoptotic cell interaction activates the enzyme COX-2, thus resulting in an elevated PGE<sub>2</sub> synthesis and release.<sup>12,13</sup> Celecoxib had no effect on spontaneous release of PGE<sub>2</sub> by macrophages cultured only in the presence of medium, and macrophage interaction with fixed cells did not induce PGE<sub>2</sub> release (data not shown). Based on these findings, and given that we indicated that uptake of apoptotic cells potently

enhances HIV-1 growth,<sup>8</sup> we investigated whether the blockage of COX-2 could have any consequence on HIV-1 replication in macrophages after phagocytosis of apoptotic cells. Of note, we and others have indicated that the phagocytic abilities of the HIV-1-infected macrophages are not altered.<sup>8,20,21</sup> Thus, we added Celecoxib to HIV-1-infected macrophages immediately after interaction with apoptotic cells, and viral growth was evaluated 14 days after infection, when the differences in viral replication levels between unstimulated and apoptotic cell-stimulated macrophages are usually higher.<sup>8</sup> Similar to our former results,<sup>8</sup> phagocytosis of apoptotic cells increased HIV-1 replication 20 times over spontaneous viral growth, and Celecoxib treatment completely ablated the enhancement effect of apoptotic cells (Fig. 1B; Apo vs. Med:  $p = 0.02$ ; Apo vs. Apo+cele:  $p = 0.003$ ). (Due to the commonly observed donor-to-donor variation of viral production by macrophages, the next results will be shown as HIV-1 replication over production, arbitrarily defined as 1.) These findings suggest that prostaglandins stimulate viral replication in HIV-1-infected macrophages and, indeed, addition of PGE<sub>2</sub> at 1  $\mu$ M to HIV-1-infected macrophages amplified HIV-1 growth by  $3.2 \pm 0.7$ -fold control ( $n = 4$ ;  $p = 0.05$ ). As we have already reported,<sup>8</sup> exposure of HIV-1-infected macrophages to fixed cells did not affect viral replication (data not shown). Of note, addition of supplementary apoptotic cells to HIV-1-infected macrophages at 7 and 14 days after infection did not further enhance viral replication relative to HIV-1 growth in macrophages exposed to apoptotic cells just after infection.

The inflammatory mediator PAF is also released by macrophages upon phagocytosis of apoptotic cells.<sup>12</sup> Thus, we investigated whether the blockage of the PAF receptor would inhibit the augmentation of HIV-1 replication mediated by interaction with apoptotic cells. We found that addition of the



**FIG. 1.** (A) Interaction with apoptotic cells up-modulates PGE<sub>2</sub> release by macrophages. Macrophages were provided with fresh medium (Med) or exposed to apoptotic cells (Apo) for 2 h and, then, washed out to remove nonphagocytized cells. Celecoxib (10  $\mu$ M) was added to macrophages exposed (Apo + cele) or not (cele) to apoptotic cells. After 24 h levels of PGE<sub>2</sub> were measured by EIA in cell culture supernatants. Data are shown as PGE<sub>2</sub> production over control, arbitrarily defined as 1. (B) Inhibition of COX-2 abolishes the enhancement of HIV-1 growth driven by phagocytosis of apoptotic cells. Macrophages were infected with HIV-1<sub>Ba-L</sub>, replenished with fresh medium, and left untreated (Med) or exposed to apoptotic cells (Apo) for 2 h. Then, Celecoxib (10  $\mu$ M) was added to macrophages exposed (Apo + cele) or not (cele) to apoptotic cells. HIV-1 replication was measured in culture supernatants by an HIV p24 ELISA 14 days after infection. Data represent means  $\pm$  SEM of four (A) or three (B) independent experiments.

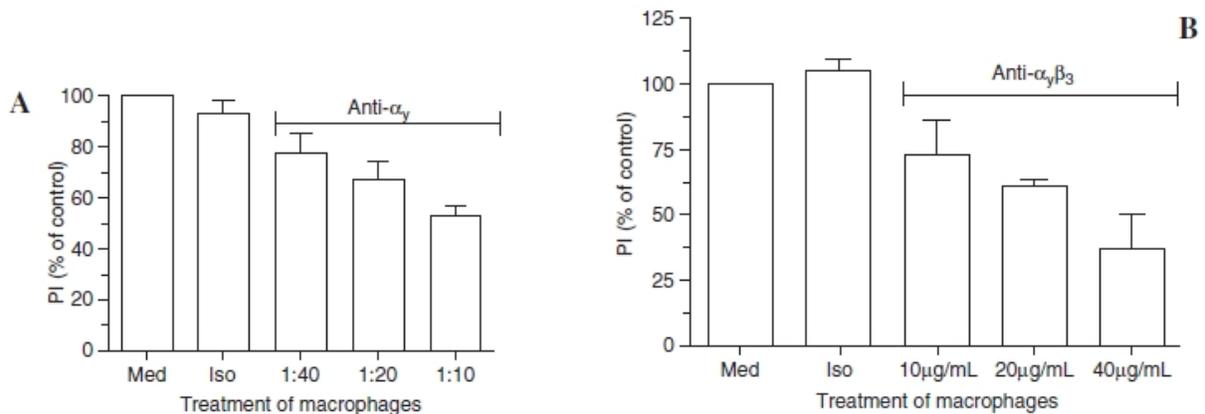


**FIG. 2.** Blockage of PAF receptor reduces the enhancement of HIV-1 growth driven by phagocytosis of apoptotic cells. Macrophages were infected with HIV-1<sub>Ba-L</sub>, replenished with fresh medium, and left untreated (Med) or exposed to apoptotic cells (Apo) for 2 h. Then, BN 52021 (10  $\mu$ M) was added to macrophages exposed (Apo + BN) or not to apoptotic cells (BN). Viral replication was evaluated in culture supernatants by an HIV p24 ELISA 14 days after infection. Data are shown as virus production over control, arbitrarily defined as 1, and represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

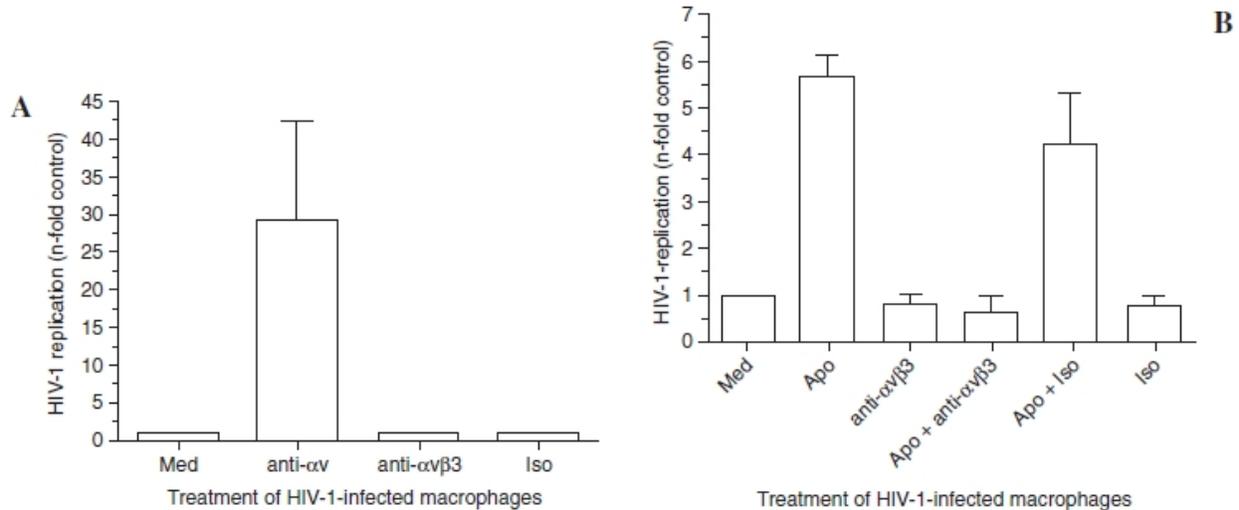
PAF receptor antagonist BN 52021 to HIV-1-infected macrophages right after interaction with apoptotic cells expressively reduced (60%) the viral growth amplification induced by this interaction (Fig. 2; Apo vs. Med:  $p = 0.05$ ; Apo vs. Apo+BN 52021:  $p = 0.11$ ; Med vs. Apo+BN 52021:  $p = 0.28$ ). In additional experiments, we further evaluated the ability of BN 52021 to down-modulate HIV-1 growth by adding this compound to macrophages soon after HIV-1 infection, and we found that BN 52021 consistently inhibited spontaneous HIV-1 replication at 10  $\mu$ M (mean  $\pm$  SEM =  $65 \pm 7.8\%$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0.006$ ). Higher doses of BN 52021 (25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) were also inhibitory, although we could not detect a dose-dependent

inhibition (data not shown). Moreover, we also treated HIV-1-infected PBMCs with 10  $\mu$ M BN 52021, and observed a reduced HIV-1 growth in these cells (mean  $\pm$  SEM =  $43.2 \pm 6.9\%$ ;  $n = 6$ ;  $p = 0.001$ ). These results indirectly suggest that PAF up-modulates HIV-1 replication, and, in fact, addition of exogenous PAF at 1.0  $\mu$ M to HIV-1-infected macrophages amplified viral growth by  $7.0 \pm 5.3$  times the control ( $n = 3$ ;  $p = 0.03$ ), supporting our assumption that PAF increases HIV-1 replication in peripheral macrophages.

Several macrophage receptors, including members of the integrin family, can recognize and bind to apoptotic cells.<sup>10,18,19</sup> We previously inferred that integrins are involved in the enhancement of HIV-1 replication in macrophages exposed to apoptotic cells because the peptide Arg-Gly-Asp-Ser, which binds to integrin receptors, inhibited the uptake of apoptotic cells and the subsequent enhancement of HIV-1 replication.<sup>8</sup> Now we confirm this conjecture with direct evidence that the VnR participates in this phenomenon using monoclonal antibodies to this receptor. Initially, we found that pretreatment of macrophages with two anti-VnR MABs (anti- $\alpha_V$  and anti- $\alpha_V\beta_3$ ) reduced approximately 50% of the macrophage uptake of apoptotic cells (Fig. 3A and B; anti- $\alpha_V$  1:10 vs. Med:  $p = 0.03$ ; anti- $\alpha_V\beta_3$  40  $\mu$ g/ml vs. Med:  $p = 0.04$ ). Next, we treated HIV-1-infected macrophages with these antibodies using the concentrations that more intensely inhibited the uptake of apoptotic cells, and analyzed viral replication thereafter. Ligation of VnR by the anti- $\alpha_V$  MAB increased HIV-1 replication 29 times relative to control ( $p = 0.02$ ), whereas the anti- $\alpha_V\beta_3$  MAB did not change viral replication ( $p = 0.5$ ) (Fig. 4A). Based on this last observation, we investigated whether the anti- $\alpha_V\beta_3$  MAB could revert the enhancement effect on HIV-1 replication mediated by uptake of apoptotic cells. Thus, pretreatment of HIV-1-infected macrophages with anti- $\alpha_V\beta_3$  MAB resulted in an almost total blockage of enhancement of viral replication mediated by apoptotic cells (Apo vs. Apo + anti- $\alpha_V\beta_3$ :  $p = 0.01$ ) (Fig. 4B). Collectively, these results show that stimulation of VnR can induce HIV-1 growth in peripheral macrophages.



**FIG. 3.** Anti-VnR MABs diminish macrophage uptake of apoptotic cells. Macrophages were treated with anti- $\alpha_V$  MAB (A) or anti- $\alpha_V\beta_3$  MAB (B) at indicated concentrations, or with irrelevant isotypes (Iso) at 40  $\mu$ g/ml, before adding apoptotic cells. Phagocytic indices (PI) were determined as described in Materials and Methods and data represent means  $\pm$  SEM from three (A) or two (B) independent experiments for each MAB, and are shown as percentage of control (Med).



**FIG. 4.** (A) Stimulation of VnR up-modulates HIV-1 replication. Macrophages were infected with HIV-1<sub>Ba-L</sub>, replenished with fresh medium, and left untreated (Med) or treated with anti- $\alpha_V$  (1:10 dilution), anti- $\alpha_V\beta_3$  (40  $\mu\text{g/ml}$ ), or isotype control (40  $\mu\text{g/ml}$ , Iso). (B) VnR is involved in the enhancement of HIV-1 replication in macrophages following phagocytosis of apoptotic cells. Infected macrophages were left untreated (Med), treated with apoptotic cells (Apo), anti- $\alpha_V\beta_3$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  (anti- $\alpha_V\beta_3$ ), Apo + anti- $\alpha_V\beta_3$  (Apo + anti- $\alpha_V\beta_3$ ), or with isotype control, 40  $\mu\text{g/ml}$  (Apo + Iso; Iso). Viral replication was evaluated in culture supernatants using an HIV p24 antigen ELISA 14 days after infection. Data represent means  $\pm$  SEM of three (A) or two (B) independent experiments and are shown as virus production over control (Med), arbitrarily defined as 1.

## DISCUSSION

It has been demonstrated that phagocytosis of apoptotic cells can influence the ability of macrophages to produce soluble mediators.<sup>9-12</sup> This common and prevailing process results in synthesis inhibition of a variety of cytokines and soluble mediators, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . In opposition, the production of other factors, such as TGF- $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub>, and PAF, is stimulated. The modulation of cytokine release mediated by the uptake of apoptotic cells can influence the activity of macrophages themselves. In fact, clearance of apoptotic cells results in a loss of the ability of macrophages to destroy tumor cells,<sup>22</sup> and failure to control parasite growth by murine macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*.<sup>13</sup> We have already reported that viral replication is enhanced in HIV-1-infected macrophages following phagocytosis of apoptotic cells,<sup>8</sup> a phenomenon partially mediated by TGF- $\beta$ 1 and involving an integrin molecule. As long as TGF- $\beta$ 1 participates only to some extent in the enhancement of viral growth, other factors might be involved in this process. Herein, we indicate that PGE<sub>2</sub> and PAF contribute to raising viral replication in HIV-1-infected macrophages exposed to apoptotic cells, and that the vitronectin receptor, a member of the integrin family, is involved in this phenomenon.

Patients with AIDS show elevated levels of circulating PGE<sub>2</sub>,<sup>23</sup> but reports about the effect of PGE<sub>2</sub> on HIV-1 replication *in vitro* are contradictory, since PGE<sub>2</sub> has the ability to inhibit<sup>24,25</sup> or to stimulate<sup>26,27</sup> viral growth. Divergent experimental conditions, e.g., source of cells, time of infection, and use of viral proteins instead of whole virus, can explain these conflicting observations. Interestingly, PGE<sub>2</sub> up-modulates the

replication of the retrovirus human lymphotropic virus type 1 (HTLV-1),<sup>28</sup> supporting the notion that this modulator can enhance HIV-1 replication. Addition of PGE<sub>2</sub> to PBMCs from asymptomatic HTLV-1-infected subjects caused an activation of the virus *long terminal repeats*, supported HTLV-1 replication, and induced viral spread to other cells.<sup>28</sup> In our study we observed that inhibition of COX-2 (a crucial enzyme in the synthesis pathway of PGE<sub>2</sub>) completely blocked the enhancement of viral replication triggered by phagocytosis of apoptotic cells, indirectly showing that PGE<sub>2</sub> is an up-modulator of HIV-1 growth, and that the PGE<sub>2</sub> amplifying effect can be neutralized by inhibiting the COX-2 enzyme. Based on reports suggesting that PGE<sub>2</sub> regulates TGF- $\beta$  synthesis<sup>12,13</sup> and that COX-2 inhibitors affect TGF- $\beta$  pharmacological activity,<sup>13</sup> it is likely that addition of a COX-2 inhibitor negated TGF- $\beta$  activity and completely ablated the effect of apoptotic cell uptake on HIV-1 replication. As with other authors,<sup>12,13</sup> we also detected that phagocytosis of apoptotic cells induces PGE<sub>2</sub> release by uninfected macrophages, which was thwarted by the addition of a selective COX-2 inhibitor (Fig. 1A). We further found that addition of PGE<sub>2</sub> to HIV-1-infected macrophages elevated viral growth, corroborating the findings obtained with COX-2 inhibition, and supporting the assumption that PGE<sub>2</sub> up-modulates HIV-1 replication in monocyte-derived macrophages.

It has been postulated that PAF plays an important role in damage of the central nervous system (CNS) of HIV-1 infected patients, leading to AIDS-associated dementia,<sup>16,29,30</sup> but little is known about its role in modulating HIV-1 replication in peripheral cells. It was reported in a murine model of HIV-1 infection that antiinflammatory drugs exerted a protective action on the CNS by inhibiting macrophage release of PAF and TNF- $\alpha$ .<sup>31</sup> TNF- $\alpha$  is a positive modulator of HIV-1 growth<sup>32</sup> and PAF

apparently stimulates TNF- $\alpha$  synthesis in monocytic cell lines,<sup>33</sup> and this possible association could have an important role in the development of AIDS neuropathogenesis.<sup>30</sup> In our model, in which human monocyte-derived macrophages are infected *in vitro* with HIV-1, we verified that PAF is an up-modulator of HIV-1 replication, suggesting that PAF can contribute to viral infection and propagation in peripheral tissues.

Initially, we found that addition of the PAF receptor antagonist BN 52021<sup>34</sup> to HIV-1-infected macrophages exposed to apoptotic cells inhibited the enhancement of viral growth (Fig. 2A). Next, we observed that addition of BN 52021 to HIV-1-infected macrophages or to HIV-1-infected PBMCs reduced viral replication in both cell types. Other authors have reported similar observations with the PAF antagonist PMS 601 in macrophages infected with the HIV-1 clone Ba-L.<sup>35</sup> Since PMS 601 also inhibits the synthesis of TNF- $\alpha$ , a well-known HIV-1 up-modulator,<sup>32</sup> it is possible that the decline of HIV-1 replication following PAF receptor blocking results from the combined inhibition of the modulatory role of PAF and TNF- $\alpha$ , a mechanism that should be considered to explain the potent effect of BN 52021 as well. Our above findings that PAF is an up-modulator of HIV-1 replication in peripheral cells were further confirmed in separate experiments in which addition of PAF to HIV-1-infected macrophages augmented viral growth.

It has been shown that engagement of integrin receptors on HIV-1-infected macrophages influences viral growth,<sup>36,37</sup> but so far there is no direct evidence that stimulation of VnR up-modulates HIV-1 replication, such as our present findings. Indeed, treatment of HIV-1-infected macrophages with anti- $\alpha_V$  MAb meaningfully augmented viral growth (Fig. 4A). Interestingly, it has been claimed that VnR may function as a cofactor for HIV-1 infection,<sup>38</sup> since HIV-1 gp120 interacted with CD4 and  $\alpha_V\beta_3$  integrin in immunoprecipitation experiments, and that anti- $\alpha_V\beta_3$  MAbs partially inhibited HIV-1 infection when cells were treated with these antibodies before infection, or exposed to virus and antibodies simultaneously. Different cell culture conditions, time of MAb addition to infected cells, and distinct MAb clones should be considered to explain these apparently contradictory results. In fact, we added anti-VnR MAbs after macrophage infection, hence not affecting the virus entry process. We could verify that whereas the anti- $\alpha_V\beta_3$  MAb did not stimulate viral replication, the anti- $\alpha_V$  MAb exerted an agonistic effect that resulted in an exacerbated HIV-1 replication. Therefore, we could confirm our previous suggestion that the VnR is involved in the augmentation of HIV-1 growth in macrophages upon phagocytosis of apoptotic cells,<sup>8</sup> since the enhancement effect on HIV-1 replication is neutralized when interaction of apoptotic cells with HIV-1-infected macrophages is prevented by nonagonistic MAbs directed to VnR (Fig. 4A). Considering that ligation of VnR on macrophage membrane induces TGF- $\beta$  and PGE<sub>2</sub> release by these cells,<sup>13</sup> we could envisage that the increment of HIV-1 replication through stimulation of VnR is at least partially mediated by those soluble factors. Although we cannot exclude the participation of other receptors for apoptotic cells in this process, it is possible that the VnR is the main receptor involved, since its blockage completely reversed the exacerbation of HIV-1 replication subsequent to uptake of apoptotic cells by HIV-1-infected macrophages. All together, our results suggest that PAF and PGE<sub>2</sub> should be recognized as positive mediators of HIV-1 replica-

tion in peripheral macrophages upon recognition of apoptotic cells, and that signaling through VnR favors viral growth subsequent to interaction between apoptotic cells and HIV-1-infected macrophages.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alvaro Bertho (Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Rio de Janeiro) for flow cytometric analysis, the Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro) for providing buffy coats, Dr. Elvira Saraiva (Department of Immunology, IMPPG, Federal University of Rio de Janeiro) for valuable suggestions, and Dr. Luiz Roberto R. Castello-Branco (Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Rio de Janeiro) for helpful discussions. This work was supported by CNPq, Papes/Fiocruz, Capes, and Faperj.

## REFERENCES

1. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng GMG, Orenstein JM, and Vazquez N: Viral and host cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages. *J Leukoc Biol* 2003;74:726-735.
2. Crowe S, Zhu T, and Muller WA: The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2003;74:635-641.
3. Toossi Z, Sierra-Madero JG, Blinkhorn RA, Mettler MA, and Rich EA: Enhanced susceptibility of blood monocytes from patients with pulmonary tuberculosis to productive infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 1993;177:1511-1516.
4. Orenstein JM, Fox C, and Wahl SM: Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 1997;276:1857-1861.
5. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, Moutsopoulos N, and Orenstein JM: Permissive factors for HIV-1 infection of macrophages. *J Leukoc Biol* 2000;68:303-310.
6. Stanley SK, Ostrowski MA, Justement JS, *et al.*: Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1996;334:1222-1230.
7. Ortigão-de-Sampaio MB, Shattock RJ, Hayes P, *et al.*: Increase in plasma viral load after oral cholera immunization of HIV-infected subjects. *AIDS* 1998;12:F145-F150.
8. Lima RG, Van Weyenbergh J, Saraiva EMB, Barral-Netto M, Galvão-Castro B, and Bou-Habib DC: The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J Infect Dis* 2002;185:1561-1566.
9. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, and Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-351.
10. Savill J, Dransfield I, Gregory C, and Haslett C: A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2:965-975.
11. Lucas M, Stuart LM, Savill J, and Lacy-Hulbert A: Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol* 2003;171:2610-2615.
12. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, and Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-898.

13. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, *et al.*: Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000;403:199–203.
14. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, and McIntyre TM: Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 2000;69:419–445.
15. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, and Phipps RP: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:144–150.
16. Gelbard HA, Nottet HS, Swindells S, *et al.*: Platelet-activating factor: A candidate human immunodeficiency virus type 1-induced neurotoxin. *J Virol* 1994;68:4628–4635.
17. Steer SA and Corbett JA: The role and regulation of COX-2 during viral infection. *Viral Immunol* 2003;16:447–460.
18. Savill J, Dransfield I, Hogg N, and Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170–173.
19. Fadok VA, Warner MA, Bratton DL, and Henson PM: CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor. *J Immunol* 1998;161:6250–6257.
20. Nottet HS, De Graaf L, De Vos NM, *et al.*: Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1993;168:84–91.
21. Reed SG, Da Silva JS, Ho JL, *et al.*: Cytokine activation of human macrophages infected with HIV-1 to inhibit intracellular protozoa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:666–675.
22. Reiter I, Krammer B, and Schwamberger G: Cutting edge: Differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol* 1999;163:1730–1732.
23. Foley P, Kazazi F, Biti R, Sorrell TC, and Cunningham AL: HIV infection of monocytes inhibits the T-lymphocyte proliferative response to recall antigens, via production of eicosanoids. *Immunology* 1992;75:391–397.
24. Thivierge M, Le Gouill C, Tremblay MJ, Stankova J, and Rola-Pleszczynski M: Prostaglandin E<sub>2</sub> induces resistance to human immunodeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: Downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate. *Blood* 1998;92:40–45.
25. Hayes MM, Lane BR, King SR, Markovitz DM, and Coffey MJ: Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits replication of HIV-1 in macrophages through activation of protein kinase A. *Cell Immunol* 2002;215:61–71.
26. Yamamoto N, Harada S, and Nakashima H: Substances affecting the infection and replication of human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS Res* 1986;2(Suppl. 1): S183–S189.
27. Dumais N, Barbeau B, Olivier M, and Tremblay MJ: Prostaglandin E<sub>2</sub> up-regulates HIV-1 long terminal repeat-driven gene activity in T cells via NF- $\kappa$ B-dependent and -independent signaling pathways. *J Biol Chem* 1998;273:27306–27314.
28. Moriuchi M, Inoue H, and Moriuchi H: Reciprocal interactions between human lymphotropic virus type 1 and prostaglandins: Implications for viral transmission. *J Virol* 2001;75:192–198.
29. Nottet HS, Jett M, Flanagan CR, *et al.*: A regulatory role for astrocytes in HIV-1 encephalitis. An overexpression of eicosanoids, platelet-activating factor, and tumor necrosis factor-alpha by activated HIV-1-infected monocytes is attenuated by primary human astrocytes. *J Immunol* 1995;24:3567–3581.
30. Perry SW, Hamilton JA, Tjoelker LW, *et al.*: Platelet-activating factor receptor activation. An initiator step in HIV-1 neuropathogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:17660–17664.
31. Persidsky Y, Limoges J, Rasmussen J, Zheng J, Gearing A, and Gendelman HE: Reduction in glial immunity and neuropathology by a PAF antagonist and an MMP and TNF- $\alpha$  inhibitor in SCID mice with HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol* 2001;114:57–68.
32. Alfano M and Poli G: Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* 2005;42:161–182.
33. Weissman D, Poli G, Bousseau A, and Fauci AS: A platelet-activating factor antagonist, RP 55778, inhibits cytokine-dependent induction of human immunodeficiency virus expression in chronically infected promonocytic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2537–2541.
34. Braquet P: Proofs of involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (ginkgolide B): A powerful PAF-acether antagonist isolated from *Ginkgo biloba* L. *Adv Prostaglandin Thrombox Leukot Res* 1986;16:179–198.
35. Martin M, Serradji N, Dereuddre-Bosquet N, *et al.*: PMS-601, a new platelet-activating factor receptor antagonist that inhibits human immunodeficiency virus replication and potentiates zidovudine activity in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3150–3154.
36. Gilles PN, Lathey JL, and Spector AS: Replication of macrophage-tropic and T cell-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1 is augmented by macrophage-endothelial cell contact. *J Virol* 1995;69:2133–2139.
37. Dhawan S, Vargo M, and Meltzer MS: Interactions between HIV-infected monocytes and the extracellular matrix: Increased capacity of HIV-infected monocytes to adhere to and spread on extracellular matrix associated with changes in the extent of virus replication and cytopathic effects in infected cells. *J Leukoc Biol* 1992;52:62–69.
38. Lafrenie RM, Lee SF, Hewlett IK, Yamada KM, and Dhawan S: Involvement of integrin alphavbeta3 in the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection in monocytes. *Virology* 2002;297:31–38.

Address reprint requests to:  
Dumith Chequer Bou-Habib  
Departamento de Imunologia  
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ  
Av. Brasil 4365, Manguinhos  
Pav. Leônidas Deane/409  
21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

E-mail: dumith@ioc.fiocruz.br