

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

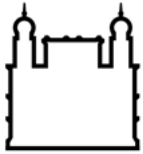
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE NETS POR NEUTRÓFILOS DE  
PESSOAS VIVENDO COM HIV, E SEU EFEITO SOBRE A  
REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM MACRÓFAGOS**

BARBARA SIMONSON GONÇALVES

Rio de Janeiro

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

***BARBARA SIMONSON GONÇALVES***

Análise da liberação de NETs por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV, e seu efeito sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos

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

**Orientador:** Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

**RIO DE JANEIRO**

**2021**

Gonçalves, Barbara Simonson.

Análise da liberação de NETs por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV, e seu efeito sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos / Barbara Simonson Gonçalves. - Rio de Janeiro, 2021.

xix, 126 f.; il.

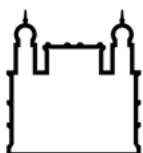
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Dumith Chequer Bou-Habib.

Bibliografia: f. 85-108

1. NETs (Neutrophil Extracellular Traps. 2. HIV-1. 3. Macrófagos. 4. Replicação. 5. Imunologia. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

***BARBARA SIMONSON GONÇALVES***

#### **ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE NETS POR NEUTRÓFILOS DE PESSOAS VIVENDO COM HIV, E SEU EFEITO SOBRE A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM MACRÓFAGOS**

**Aprovada em: 22 / 01 / 2021**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro – Presidente (IOC/FIOCRUZ – RJ)**

**Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza (INI/FIOCRUZ – RJ)**

**Prof. Dr. Anderson Guimarães Baptista Costa (UFRJ – RJ)**

**Prof. Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp – (IOC/FIOCRUZ – RJ)**

**Prof. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento – (UNIRIO-RJ)**

Rio de Janeiro, 22 de Janeiro de 2021





Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Celular e Molecular de **Barbara Simonson Gonçalves**, sob orientação do Dr. Dumith Chequer Bou Habib. Ao vigésimo segundo dia do mês de janeiro de dois mil vinte e um, realizou-se às dez horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: “**Análise da liberação de NETs por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV, e seu efeito sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos**”, no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Mecanismos Imunológicos Envolvidos na Patologia de Doenças Autoimunes Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Fernando Augusto Bozza– INI/FIOCRUZ, Dr. Anderson Guimarães Baptista Costa – UFRJ/RJ, e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento- UNIRIO/RJ e Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de janeiro de 2021.

Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimento@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimento@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

### **FONTE DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à energia superior, cuja personificação talvez se chame Deus, pela minha existência e pela combinação de fatores que me trouxeram até aqui. Agradeço a minha família por todo o apoio e carinho de sempre, em especial a minha mãe e aos meus avós, que foram fundamentais na minha criação e dos quais tenho imenso orgulho e admiração. Agradeço aos meus amigos próximos e distantes, recentes e antigos por se fazerem presentes nas mais diversas situações, por me auxiliarem e incentivarem a ser melhor todos os dias. São especiais também as relações que foram construídas com colegas de profissão durante o desenvolvimento deste trabalho e que me proporcionaram um grande aprendizado técnico e científico.

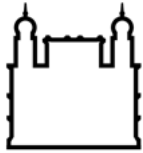
É fundamental reconhecer a importância das instituições públicas de ensino que frequentei, nomeadamente, o Colégio Pedro II, a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro e a Fundação Oswaldo Cruz. Agradeço, a cada um dos professores que tive, pela excelente qualidade do ensino oferecido e pela dedicação. Aproveito também para agradecer às agências de fomento, sem as quais esse trabalho não seria possível, e ao Programa Ciência sem Fronteiras por me proporcionar uma experiência excepcional na Université Paul Sabatier durante a graduação em Biomedicina.

É um privilégio ser orientada pelo Dr. Dumith Chequer, um pesquisador de grande prestígio científico e uma pessoa inspiradora, atenciosa e com valores tão admiráveis. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e pela orientação. Obrigada, Andrés Mojoli, por me acompanhar durante o desenvolvimento deste trabalho, me auxiliando e me inspirando a ser uma pesquisadora cada vez melhor. Agradeço à Dra. Elvira Saraiva por compartilhar seu vasto conhecimento científico comigo e contribuir de forma significativa para a minha formação. Obrigada, Dra. Carmem Gripp, pela revisão minuciosa da minha dissertação e por oferecer sugestões tão valiosas para sua melhoria. Agradeço também por gerenciar, com excelência, o laboratório de biossegurança de nível 3 do Pavilhão Leônidas Deane, no qual trabalho.

Tenho um prazer inenarrável de estar inserida em uma instituição que admiro e que oferece à sociedade pesquisas de altíssima qualidade e tecnologias para saúde pública. Ao laboratório de Pesquisas sobre o Timo e de Imunobiologia das Leishmanioses, agradeço pela oportunidade de frequentá-los e pela colaboração e suporte, fundamental, de seus membros. Também não poderia deixar de agradecer aos participantes voluntários que possibilitaram a realização do presente trabalho.

*“The greater our knowledge increases,  
the more our ignorance unfolds”*

John Fitzgerald Kennedy



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

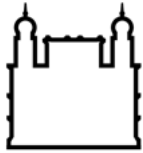
### **Análise da liberação de NETs por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV, e seu efeito sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Barbara Simonson Gonçalves**

A liberação das redes extracelulares é um mecanismo da resposta imune inata mediada por neutrófilos, que se caracteriza pela exteriorização de cromatina associada a proteínas de grânulos e citoplasmáticas sob a forma de uma rede/armadilha (*Neutrophil Extracellular Traps* – NETs). Neutrófilos liberam NETs após sua ativação por inúmeros agentes, inclusive o HIV-1, o qual é retido e inativado por essas redes. Estudo prévio de nosso grupo demonstrou que NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis inibem fortemente a replicação do HIV-1 em macrófagos infectados *in vitro*. Embora o cenário da infecção pelo HIV-1 favoreça o recrutamento e ativação de neutrófilos, e a indução de NETs, não está claro se neutrófilos de pessoas vivendo com HIV (PVH) liberam NETs *in vitro* e se essas estruturas estão presentes no plasma. O presente trabalho teve por objetivo verificar essa liberação *in vitro*, e se as NETs são capazes de modificar a replicação viral em macrófagos. Observou-se níveis elevados de complexos DNA-elastase no plasma, que se correlacionam positivamente com a concentração de LPS circulante, e que os neutrófilos desses indivíduos são capazes de liberar NETs *in vitro* mediante ativação com IL-8 e TNF- $\alpha$ . Isto sugere que a infecção pelo HIV-1 amplia a formação e a circulação de NETs e que a translocação microbiana pode contribuir para esse fenômeno. Observou-se também que as NETs reduzem a replicação viral em macrófagos infectados *in vitro* pelo HIV-1 e que a mieloperoxidase recombinante é capaz de reproduzir essa inibição. Além disso, foi verificada uma redução na integração do cDNA viral ao genoma da célula hospedeira, o que explica, pelo menos em parte, a inibição da replicação pelas NETs. Estes resultados indicam, portanto, a participação das NETs na fisiopatogenia da infecção pelo HIV-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Analysis of NETs release by neutrophils from people living with HIV, and their effect on HIV-1 replication in macrophages**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER'S THESIS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Barbara Simonson Gonçalves**

NETs (Neutrophil Extracellular Traps) release is an innate immune mechanism mediated by neutrophils, characterized by chromatin exteriorization associated with granule and cytoplasmic proteins. Neutrophils release NETs upon their activation by a number of agents, including HIV-1, which is entrapped and inactivated by these traps. We recently observed that NETs released by neutrophils from healthy individuals inhibit HIV-1 replication in *in vitro* infected macrophages. Although the clinical conditions of HIV-1 infection favor the recruitment and activation of neutrophils, and NETs release, it is not clear if the neutrophils from people living with HIV are able to release NETs *in vitro*, and if these structures are present in the plasma. Thus, the present study aimed to investigate the release of NETs *in vitro*, by neutrophils from HIV-patients, and their potential to interfere with HIV-1 replication in macrophages. We report that people living with HIV have high levels of DNA-elastase complexes in the plasma, which positively correlate with the concentration of circulating LPS, and that neutrophils from these individuals are able to release NETs *in vitro* upon activation with IL-8 and TNF- $\alpha$ . These findings suggest that HIV-1 infection increases the formation and circulation of NETs and that microbial translocation possibly contributes to this phenomenon. We also observed that NETs reduce viral replication in *in vitro* HIV-1-infected-macrophages, and that recombinant myeloperoxidase is able to reproduce this inhibition. In addition, we investigated NETs' effect on HIV-1 replicative cycle, and found a reduced integration of the viral cDNA into the host cell genome, which explains, at least in part, the inhibition of viral replication. Therefore, these results indicate the participation of NETs in the pathophysiology of HIV-1 infection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 7AAD – 7-aminoactinomicina D
- Aids – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- APOBEC3G – Enzima catalítica da edição de RNA mensageiro para Apolipoproteína B (do inglês, *Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide*)
- ASC – Proteína associada à apoptose contendo um domínio CARD (do inglês, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*)
- BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)
- C/EBP – Proteína de ligação ao *enhancer* CCAAT (do inglês, *CCAAT-enhancer-binding proteins*)
- CARD – Domínio de ativação e recrutamento de caspase (do inglês, *Caspase Activation and Recruitment Domain*)
- CCR – Receptor de quimiocina do tipo C-C (do inglês, *C-C Chemokine Receptor*)
- CD – Grupo de diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*)
- CDK – Kinase dependente de ciclina (do inglês, *Cyclin-Dependent Kinase*)
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês, *complementary Deoxyribonucleic Acid*)
- cGAS – (do inglês, *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate* (do inglês, *cGAMP*) *synthase*)
- Crml – Região de manutenção do cromossomo 1, Exportina-1 (do inglês, *Chromosomal Region Maintenance 1, Exportin-1*)
- CTLA-4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte-Antigen 4*)
- CXCL – Quimiocina Ligante C-x-C (do inglês, *Chemokine C-x-C motif ligand*)
- CXCR – Receptor de quimiocina do tipo C-X (do inglês, *C-X Chemokine Receptor*)
- DAMP - Padrão Molecular Associado a Dano (do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern*)
- DAPI – Dihidrocloreto de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (do inglês, *4, 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*)

- DC-SIGN – Não-integrina de captura intercelular específica de células dendríticas (do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular Grabbing Nonintegrin*)
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbeco (do inglês, *Dulbeco's Modified Eagle's Medium*)
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado (do inglês, *Deoxyribonucleotide triphosphate*)
- dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de fita dupla (do inglês, *Double-Strand Deoxyribonucleic Acid*)
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- ESCRT-1 - Complexos de classificação endossomal necessários para o transporte (do inglês, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*)
- ET – Rede extracelular (do inglês, *Extracellular Traps*)
- GALT – Tecido linfoide associado ao intestino (do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*)
- G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)
- GMP – Progenitor de granulócitos-monócitos (do inglês, *Granulocyte-Monocyte Progenitor*)
- gp – Glicoproteína
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)
- HLA – Antígeno leucocitário humano (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*)
- HTLV – Vírus linfotrópico de células T humanas (do inglês, *Human T-cell Leukemia Virus*)
- ICAM – Molécula de adesão intercelular (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule*)
- IFI16 – Proteína 16 induzível por Interferon gama (do inglês, *Interferon Gamma Inducible Protein 16*)
- IFN – Interferon
- IFNR – Receptor de Interferon (do inglês, *Interferon Receptor*)
- IRF – Fator regulador de Interferon (do inglês, *Interferon Regulatory Factor*)



- ISG – Gene estimulado por Interferon (do inglês, *Interferon-Stimulated Gene*)
- JAK – Kinase Janus (do inglês, *Janus Kinase*)
- LAG4 – Gene 3 de ativação de linfócitos (do inglês, *Lymphocyte Activation Gene 3*)
- LDN – Neutrófilos de baixa densidade (do inglês, *Low Density Neutrophil*)
- LFA-1 – Antígeno 1 associado à função linfocitária (do inglês, *Lymphocyte function-associated antigen 1*)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTR – Repetição terminal longa (do inglês, *Long Terminal Repeat*)
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)
- MIP – Proteína inflamatória de macrófagos (do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein*)
- MPO – Mieloperoxidase (do inglês, *Myeloperoxidase*)
- MVB – Corpos multivesiculares (do inglês, *multivesicular bodies*)
- Myd88 – Resposta primária da diferenciação mieloide 88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*)
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)
- NE – Elastase neutrofílica (do inglês, *Neutrophil elastase*)
- NET – Rede extracelular de neutrófilo (do inglês, *Neutrophil Extracellular Trap*)
- NFAT – Fator nuclear de células T ativadas (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T-cells*)
- NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*)
- NK – Células assassinas naturais (do inglês, *Natural Killer*)
- NLRP3 – Pirina da família de receptores tipo NOD contendo domínio 3 (do inglês, *Nod-Like Receptor family Pyrin domain containing 3*)
- PAD4 - Peptidilarginina desaminase 4 (do inglês, *Peptidylarginine deiminase 4*)
- PAMP - Padrão molecular associado a patógeno (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*)
- PBMC – Célula mononuclear do sangue periférico (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

- PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
- PD-1 – Morte programada 1 (do inglês, *Programmed Death 1*)
- PD-L1 – Ligante de morte programada 1 (*Programmed Death Ligand 1*)
- PHA – Fito-hemaglutinina (do inglês, *Phytohemagglutinin*)
- PIC – Complexo de pré-integração (do inglês, *Pre-Integration Complex*)
- PMA – Acetato miristato de forbol (do inglês, *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*)
- P-TEFb - Fator de alongamento positivo da transcrição b (do inglês, *Positive Transcription Elongation Factor b*)
- PVH – Pessoas vivendo com HIV
- RAGE – Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*)
- RANTES – Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (do inglês, *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*)
- RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)
- ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Oxygen Reactive Species*)
- RPMI – Meio Instituto Parque Memorial Roswell (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*)
- RRE – Elemento de resposta à Rev (do inglês, *Rev Response Element*)
- RT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*)
- SAMHD1 – Motivo alfa estéril e proteína contendo domínio de histidina-ácido aspártico (do inglês, *Sterile Alpha Motif and Histidin-Aspartate domain-containing protein 1*)
- siRNA – Pequeno ácido ribonucleico de interferência (do inglês, *Small Interfering Ribonucleic Acid*)
- SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia (do inglês, *Simian Immunodeficiency Virus*)
- SLE – Lúpus Eritematoso Sistêmico (do inglês, *Systemic Lupus Erythematosus*)
- STAT – Transdutor de sinal e ativador da transcrição (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

- STING – Estimulador de genes de Interferon (do inglês, *Stimulator of interferon genes*)
- TAR – Elemento de resposta de transativação (do inglês, *Trans-Activation Response element*)
- TBK1 – Kinase ligante de TANK 1 (do inglês, *TANK-binding kinase 1*)
- TCR – Receptor de célula T (do inglês, *T-Cell Receptor*)
- TIM3 – Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T (do inglês, *T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-3*)
- TLR – Receptor do tipo Toll (do inglês, *Toll-Like Receptor*)
- TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*)
- TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)
- TREX1 – Exonuclease 1 de reparo principal 3 (do inglês, *Three prime Repair Exonuclease 1*)
- TRIM5 $\alpha$  – Proteína tripartite contendo motivo 5 alfa (do inglês, *Tripartite motif-containing protein 5 alpha*)
- UNAIDS – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids
- VCAM – Molécula de adesão vascular (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule*)
- VCC – Compartimento contendo vírus (do inglês, *Virus-Containing Compartment*)
- VLA4 – Integrin  $\alpha 4\beta 1$  a (do inglês, *Very Late Antigen-4, Integrin  $\alpha 4\beta 1$* )

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Microscopia eletrônica de linfócitos infectados pelo HIV-1. ....	1
Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura do HIV-1. ....	5
Figura 1.3. Organização do genoma do HIV-1. ....	6
Figura 1.4. Ciclo replicativo do HIV-1. ....	9
Figura 1.5. Microscopia eletrônica de macrófagos infectados pelo HIV-1.....	15
Figura 1.6. Curso natural da infecção pelo HIV-1. ....	16
Figura 1.7. Translocação microbiana. ....	19
Figura 1.8. Receptores da imunidade inata e seu papel na infecção. ....	22
Figura 1.9. Ações microbicidas dos Neutrófilos. ....	32
Figura 1.10. Microscopia de neutrófilos em repouso e liberação de NETs.....	35
Figura 1.11. Microscopia confocal de fluorescência das NETs. ....	36
Figura 1.12. Interação de macrófagos com as NETs. ....	39
Figura 4.1. Quantificação de complexos DNA-elastase no plasma de pessoas vivendo com HIV. ....	60
Figura 4.2. Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis elevados de LPS no plasma. ....	62
Figura 4.3. Neutrófilos de pessoas vivendo HIV liberam NETs <i>in vitro</i> . ....	63
Figura 4.4. Neutrófilos de pessoas vivendo com HIV liberam NETs na presença de estímulos inflamatórios. ....	64
Figura 4.5. NETs liberadas por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV inibem a replicação viral em macrófagos. ....	66
Figura 4.6. Viabilidade de células expostas às NETs.....	68
Figura 4.7. Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs sobre a replicação viral.....	70
Figura 4.8. Mieloperoxidase inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos.....	71
Figura 4.9. NETs reduzem a integração do provírus de HIV-1.....	72
Figura 4.10. Efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs. ....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Proteínas identificadas nas NETs. ....	37
Tabela 1.2. Indutores da liberação de NETs.....	41
Tabela 3.1. <i>Primers</i> e sondas utilizados para avaliar a integração do cDNA do HIV-1 no genoma de macrófagos .....	57
Tabela 4.1. Dados de pessoas vivendo com HIV. ....	58

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
ÍNDICE DE TABELAS .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Histórico e dados epidemiológicos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Aspectos genômicos e estruturais do HIV-1 .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3. Infecção e Ciclo replicativo do HIV-1 .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.4. A infecção em macrófagos.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.5. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.6. Resposta imunológica e fatores de restrição viral .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.7. Inflamação crônica .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.8. Reservatórios virais e estratégias terapêuticas .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2. Neutrófilos e <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NETs) .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.1. Biologia do Neutrófilo.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.2. Funções e Ação microbicida .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.3. Redes Extracelulares de Neutrófilos .....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.4. Mecanismos moleculares de produção de NETs.....</b>	<b>40</b>
<b>1.2.5. NETs em doenças infecciosas e crônicas.....</b>	<b>42</b>
<b>1.3. NETs e a infecção pelo HIV-1.....</b>	<b>47</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>

<b>3.1.</b>	<b>Aprovação ética.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.</b>	<b>Classificação das pessoas vivendo com HIV.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.</b>	<b>Deteção de complexos DNA-elastase. ....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.</b>	<b>Quantificação de endotoxina no plasma.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.</b>	<b>Obtenção de Neutrófilos e Macrófagos.....</b>	<b>51</b>
<b>3.6.</b>	<b>Indução da liberação de NETs.....</b>	<b>52</b>
<b>3.7.</b>	<b>Microscopia de Imunofluorescência. ....</b>	<b>53</b>
<b>3.8.</b>	<b>Infecções virais. ....</b>	<b>53</b>
<b>3.9.</b>	<b>Viabilidade celular de macrófagos e PBMCs expostos às NETs. ....</b>	<b>54</b>
<b>3.10.</b>	<b>Efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1.....</b>	<b>54</b>
<b>3.11.</b>	<b>Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs. ....</b>	<b>55</b>
<b>3.12.</b>	<b>Efeito da Mieloperoxidase sobre a replicação do HIV-1.....</b>	<b>55</b>
<b>3.13.</b>	<b>Efeito das NETs sobre a integração do HIV-1. ....</b>	<b>55</b>
<b>3.14.</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.</b>	<b>Perfil das pessoas vivendo com HIV .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.</b>	<b>Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis elevados de complexos DNA-elastase no plasma.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3.</b>	<b>Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis plasmáticos elevados de LPS</b>	<b>61</b>
<b>4.4.</b>	<b>Neutrófilos de pessoas vivendo com HIV são capazes de liberar NETs .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5.</b>	<b>NETs liberadas por neutrófilos de pacientes inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos .....</b>	<b>65</b>
<b>4.6.</b>	<b>Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs sobre a replicação do HIV-1 .....</b>	<b>69</b>
<b>4.7.</b>	<b>Efeito da mieloperoxidase sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos ....</b>	<b>71</b>
<b>4.8.</b>	<b>Efeito das NETs sobre a integração do cDNA viral no genoma de macrófagos .....</b>	<b>72</b>
<b>4.9.</b>	<b>Efeito das NETs sobre a replicação viral em PBMCs .....</b>	<b>73</b>

<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>9.1.</b>	<b>Produção intelectual e participação em eventos .....</b>	<b>109</b>
<b>9.2.</b>	<b>Artigos.....</b>	<b>110</b>

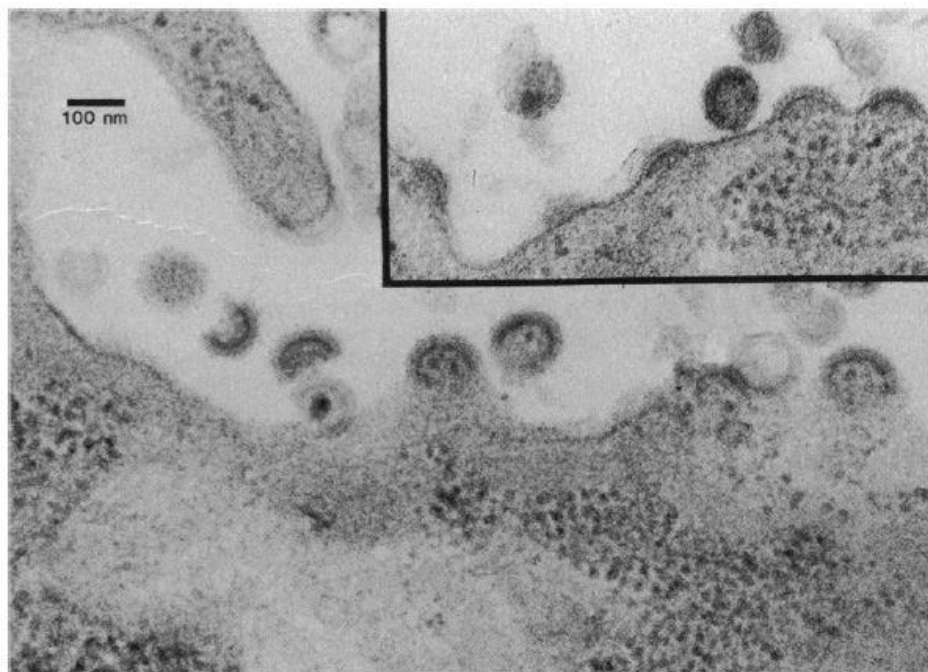


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana

#### 1.1.1. Histórico e dados epidemiológicos

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Esse vírus foi isolado pela primeira vez em 1983 por pesquisadores do Instituto Pasteur na França, a partir de biópsia de linfonodo de um paciente com linfadenopatia hiperplásica generalizada (Figura 1.1) (1,2). A Aids foi reconhecida como uma nova doença em 1981, associada a indivíduos homossexuais do gênero masculino e usuários de drogas injetáveis que apresentavam um quadro de linfadenopatia generalizada e infecções oportunistas, como pneumonia por *Pneumocystis carinii* e candidíase (3,4). A imunossupressão observada nessa doença estava associada também ao surgimento de neoplasias, como sarcoma de Kaposi e linfoma de células B, que contribuíam para o elevado número de óbitos (1,2,4–6).



**Figura 1.1. Microscopia eletrônica de linfócitos infectados pelo HIV-1.**

A imagem demonstra um linfócito infectado e diferentes momentos da liberação das partículas virais por brotamento. Retirado de (1).

Ainda na década de 1980, foi descrito que os linfócitos T eram o principal alvo da infecção pelo HIV, e que a perda dessas células era responsável pela grave

imunossupressão observada nos pacientes, sendo um importante parâmetro de monitoramento de evolução clínica da doença (1,3,5). Devido a sua semelhança com outro retrovírus, o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV, *Human T-cell Leukemia Virus*) e ao quadro clínico característico da infecção, o vírus recebeu diferentes nomenclaturas, como vírus associado à linfadenopatia, vírus linfotrópico de células T humanas tipo III e retrovírus associado à Aids (1,3,5).

A origem do HIV foi investigada por análises epidemiológicas e filogenéticas que demonstram que a introdução desse vírus na espécie humana ocorreu a partir de uma transmissão zoonótica do vírus da imunodeficiência símia (SIV, *Simiam Immunodeficiency Virus*) de primatas. Entre as evidências que explicam essa origem destacam-se a semelhança na organização do genoma, a proximidade filogenética, a prevalência no hospedeiro natural, a coincidência geográfica e as vias de transmissão desses vírus. A transmissão do HIV para os humanos teria ocorrido na África Central e Ocidental, entre as décadas de 1920 e 1940, a partir do contato direto com o sangue de animais infectados durante a caça e o consumo da carne desses primatas (7,8).

Atualmente, são reconhecidos dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, diferenciados por características genéticas, patogenicidade e origem. O HIV-1 foi o primeiro a ser isolado, em 1983, é mais patogênico, apresenta alta taxa de mutação na enzima transcriptase reversa e é responsável por 95% das infecções (9,10). O HIV-2, por sua vez, isolado em 1986 por Clavel e colaboradores, é menos virulento e está associado a uma doença mais branda, com progressão lenta e baixo grau de mortalidade relacionada à Aids (9,11–15). Embora os dois tipos de HIV sejam morfologicamente semelhantes, há uma variação genética de 55% entre eles que pode ser compreendida por suas origens. O HIV-1 evoluiu na espécie humana a partir de mutações do vírus SIV de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (SIV<sub>cpz</sub>), e o HIV-2 a partir do SIV<sub>sm</sub> de mangabeis da espécie *Cercopithecus atys* (1,8,9,11,15).

O HIV-1 tem uma ampla distribuição global e, baseado em análises filogenéticas, pode ser subdividido em quatro grupos chamados de M (*major*), N (não M, não O), O (*outlier*) e P (9,13). Essas variantes são resultado de diferentes eventos de transmissão interespecífica do SIV. As cepas virais pertencentes ao grupo M foram as primeiras a serem descobertas e são responsáveis por 95% dos casos mundiais. Os grupos O e N, identificados em 1990 e 1998, respectivamente, são pouco prevalentes

(1% das infecções) e, geralmente, estão restritos aos países do oeste da África e da região central do continente. O grupo P, por sua vez, foi descrito em 2009 na República dos Camarões e é o menos prevalente entre os quatro (9,13,16–18).

Devido a sua distribuição global, as cepas virais pertencentes ao grupo M do HIV-1 sofreram pressões seletivas variadas que favoreceram o surgimento de diferentes subtipos por áreas geográficas (9,13,19). Atualmente, são reconhecidos dez subtipos, nomeados de A a D, F a H, J a L, além de sub-subtipos decorrentes da evolução de formas recombinantes (20,21). O subtipo B é o mais prevalente nas Américas e na Europa ocidental e, desta forma, apesar de representar apenas 12% dos casos mundiais, é o subtipo predominante nas populações analisadas em pesquisas clínicas. No Sul da África e na Índia a maior prevalência é do subtipo C, que também representa a maior prevalência global, sendo responsável por 56% das infecções no mundo (19). As formas recombinantes únicas são uma combinação do genoma de subtipos virais diferentes em indivíduos infectados por duas ou mais variantes, resultando em um genoma mosaico composto por regiões provenientes das diferentes cepas. Quando essas recombinantes são transmitidas e isoladas de pelo menos três indivíduos epidemiologicamente desvinculados, elas são consideradas formas recombinantes circulantes (9,13,19). O fenômeno de recombinação gênica permite ao vírus evadir a resposta imune e a terapia antirretroviral, favorecendo o surgimento de cepas resistentes às drogas utilizadas.

De acordo com o relatório da UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids), em 2019, 38 milhões de pessoas viviam com o HIV e apenas 25,4 milhões tinham acesso à terapia antirretroviral (22). Estima-se que 32,7 milhões de indivíduos tenham ido a óbito por doenças relacionadas à Aids desde o início da epidemia, na década de 1980. Ainda em 2019, foram relatados 1,7 milhões de novos casos, o que é 40% inferior ao pico observado em 1998, e 23% inferior ao número de novos casos em 2010. A prevalência global também sofreu uma redução considerável de 2010 para 2019, passando de 7% para 4,4%, o que reflete a eficácia das estratégias de controle da epidemia. Esses números demonstram que, embora a terapia antirretroviral tenha melhorado substancialmente a qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV e seja capaz de controlar a progressão da doença, o transtorno causado por este vírus ainda persiste (22).

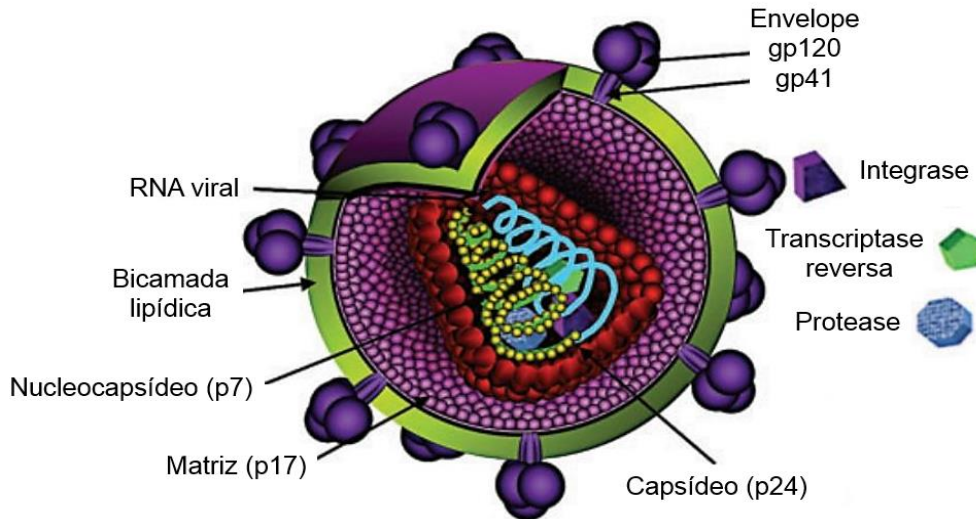
Em dezembro de 2014, representações governamentais de diferentes países assinaram a Declaração de Paris, proposta pela UNAIDS em parceria com a OMS, que previa a implementação da meta 90-90-90 até 2020. Com essa meta, esperava-se que nos países participantes 90% das pessoas vivendo com HIV (PVH) fossem diagnosticadas; destas, 90% estivessem submetidas à terapia antirretroviral e que, destas, 90% controlassem a carga viral a níveis indetectáveis. Além disto, almejava-se que o número de infecções anuais fosse inferior a 500 mil até 2020, e inferior a 200 mil até 2030 (22,23).

No Brasil, a infecção pelo HIV e a Aids estão inseridos na Lista Nacional de Notificação Compulsória e todos os casos devem ser registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (24). Desta forma, é possível gerenciar e proporcionar o diagnóstico, acompanhamento e fornecimento da terapia antirretroviral pelo sistema público de saúde. Diferentemente do que ocorre em alguns países, no Brasil, a medicação para controle da infecção pelo HIV é oferecida gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, o que amplia o acesso da população ao tratamento, contribui para melhoria da qualidade de vida dos pacientes e reduz as taxas de transmissão (24). Em 2019, foram notificados 48 mil novos casos, representando uma incidência de 0,23 a cada mil indivíduos. O número de óbitos por doenças relacionadas à Aids nesse ano foi de 14 mil e estima-se que 920 mil pessoas vivam com esta infecção. Com relação às metas propostas na declaração de Paris, esforços de saúde pública fizeram com que o país alcançasse, em 2019, uma taxa de diagnóstico de 88% das PVH. Além disso, 66% dos indivíduos diagnosticados estavam submetidos à terapia antirretroviral e, 62% destes, apresentavam carga viral indetectável (22).

### **1.1.2. Aspectos genômicos e estruturais do HIV-1**

O HIV-1 pertence à família Retroviridae, subfamília Orthovirinae e ao gênero *Lentivirinae*, característico de vírus com longos períodos de incubação e de agentes etiológicos de doenças crônicas. A partícula viral madura, ou vírion, é esférica e apresenta um diâmetro de aproximadamente 100 nm (nanômetro). Ela é constituída por um envelope externo de composição fosfolipídica e derivado da membrana plasmática, ou de compartimentos intracelulares, da célula hospedeira da qual o vírion foi liberado. Nesse envelope estão inseridos os trímeros de glicoproteínas (gp) virais compostos por monômeros formados por duas subunidades glicoproteicas (Figura 1.2). A subunidade

externa, denominada gp120, possui 120 kDa (kilodalton), enquanto a subunidade transmembranar, gp41, responsável pelo ancoramento da gp120 ao envelope viral, possui 41 kDa. As duas subunidades são derivadas de um mesmo precursor glicoproteico de 160 kDa, chamado gp160 (4,9,25).



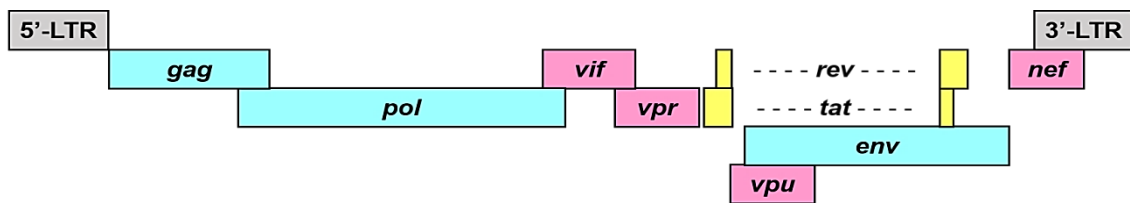
**Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura do HIV-1.**

A partícula viral apresenta uma bicamada de membrana lipídica derivada da célula hospedeira. No envelope viral estão inseridas as glicoproteínas gp120 e gp41. A parte interna é composta pela matriz (p17) e pelo capsídeo viral (p24). No interior deste capsídeo são encontradas duas cópias de RNA viral associadas ao nucleocapsídeo e às enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. Adaptado de (26).

Em contato com a parte interna do envelope, é encontrada uma matriz proteica formada por monômeros da proteína p17, que circunda o capsídeo cônico composto pelas proteínas p24. Estima-se que cada vírion contenha cerca de 2000 moléculas dessa proteína, e a quantificação de p24 no plasma de pacientes e em sobrenadantes de cultivos celulares é utilizada para avaliar a produção viral. Esse capsídeo abriga o nucleocapsídeo, composto pela proteína p7, e as enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease, que se encontram associadas ao genoma. O genoma do HIV-1 é composto por duas moléculas idênticas de ácido ribonucleico (RNA, *Ribonucleic acid*) em fita simples e com polaridade positiva, associadas de forma não covalente (4,9,25,27).

O DNA genômico do HIV-1 integrado ao genoma da célula hospedeira, chamado de provírus, tem aproximadamente 9,7 kb (kilobase) de comprimento e é composto por três genes estruturais característicos dos retrovírus, *gag*, *pol* e *env* (Figura

1.3). Esses genes são transcritos e traduzidos em poliproteínas que, posteriormente, são clivadas em proteínas funcionais. O DNA genômico compreende nove fases abertas de leitura, flanqueadas, em ambas as extremidades, por segmentos gênicos denominados repetições terminais longas (LTR, *Long terminal repeats*), divididas em regiões U5, R e U3 (25,28). Na região 5' do LTR é codificado o promotor da transcrição de genes virais e, seguindo em direção à extremidade 3', é encontrado o gene *gag*. Esse gene codifica um precursor poliproteico que é clivado e origina as proteínas nucleares p6, p7 e p24, e também proteínas p17 da matriz. Em continuidade, é encontrado o gene *pol* que, de modo semelhante, origina as enzimas protease (p12), integrase (p32), transcriptase reversa (p51) e RNase H (p15) (4,9,25). Em seguida à *pol*, é observado o gene *env* que codifica o precursor gp160, que é clivado por proteases celulares e origina as glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope viral (4,9,27,28).



**Figura 1.3. Organização do genoma do HIV-1.**

O genoma do HIV-1 contém nove fases abertas de leitura e é flanqueado pelas LTRs representadas por retângulos cinzas. Os retângulos azuis representam genes estruturais, os amarelos, genes regulatórios e os rosas, genes acessórios. Adaptado de (28).

Além dos genes que codificam as proteínas estruturais, são encontrados no genoma do HIV-1 dois genes reguladores, *tat* e *rev*, e quatro genes acessórios, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*. As proteínas transativadoras da transcrição (Tat, *trans-activator of transcription*) são codificadas a partir do gene *tat* e são essenciais para a replicação HIV-1, pois se associam ao RNAm (RNA mensageiro) viral e aumentam a eficiência da produção de transcritos completos. Tat promove uma remodelação na cromatina e recruta complexos transcripcionais que auxiliam no alongamento do RNAm nascente, além de prolongar o tempo de associação de fatores de transcrição com a RNA polimerase na região 5' do LTR (29). Essa proteína é liberada para o meio extracelular por células infectadas e pode ser detectada no plasma de pacientes. Além disso, foi observado que ao entrar em contato com linfócitos não infectados essa proteína pode induzir a morte celular por apoptose (4,9,29,30). A proteína Rev, codificada a partir de *rev*, participa da exportação de RNAs virais não processados (*unspliced*) ou

parcialmente processados do núcleo para o citoplasma para serem traduzidos. Essa função é importante para o ciclo replicativo visto que moléculas de RNA não processadas ou parcialmente processadas são retidas no núcleo da célula e, posteriormente, degradadas (4,9,25).

As proteínas acessórias são assim denominadas porque, embora possuam um papel importante na patogênese da infecção e na evasão imune, são dispensáveis para a replicação viral (4,29,31). A proteína Nef (*Negative regulator factor*) é fundamental para a patogênese do HIV-1, e a perda de função desta proteína resulta em pacientes com carga viral reduzida e com uma progressão mais lenta para Aids (29). Inicialmente, Nef foi descrita como reguladora negativa da replicação viral, mas estudos posteriores demonstraram que essa proteína interage com as moléculas CD4 e MHC I (*Major Histocompatibility Complex*), reduzindo a sua expressão na superfície de células infectadas, o que evita novas infecções e reduz a resposta imune de linfócitos T citotóxicos contra elas. Ademais, Nef modula o estado de ativação de células infectadas atuando sobre a sinalização intracelular e favorecendo a replicação (4,9,29,31).

A expressão de Vif (*Viral infectivity factor*) ocorre tardiamente e de modo dependente de Rev. Essa proteína é incorporada ao vírion durante a montagem da partícula viral e desempenha um papel importante na replicação do HIV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) e macrófagos. Embora Vif seja dispensável para a infecção de alguns tipos celulares, ela é reconhecida por aumentar a infectividade das partículas virais, atuando sobre a estabilidade do capsídeo e evitando que este seja degradado de forma prematura após a entrada do vírus na célula. Essa proteína também neutraliza a ação do fator de restrição viral APOBEC3G (*Apolipoprotein B MRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3G*), que é induzido por Interferon tipo I e promove mutações no genoma do HIV (4,29,31).

A proteína Vpr (*Viral protein R*) apresenta um papel importante sobre a replicação viral e a patogênese em estágios iniciais da infecção, e também sobre progressão para Aids por estimular a infecção de células que não estão em divisão (29). Após a entrada do vírus na célula e transcrição reversa do genoma, o DNA proviral precisa ser transportado para o núcleo para ser integrado ao genoma celular. Desta forma, Vpr se associa ao complexo de pré-integração (PIC, *Pre-Integration Complex*) auxiliando o seu transporte para o núcleo, aumenta a replicação viral via transativação do LTR do HIV e induz parada do ciclo celular na fase G2 (4,25,29,31).



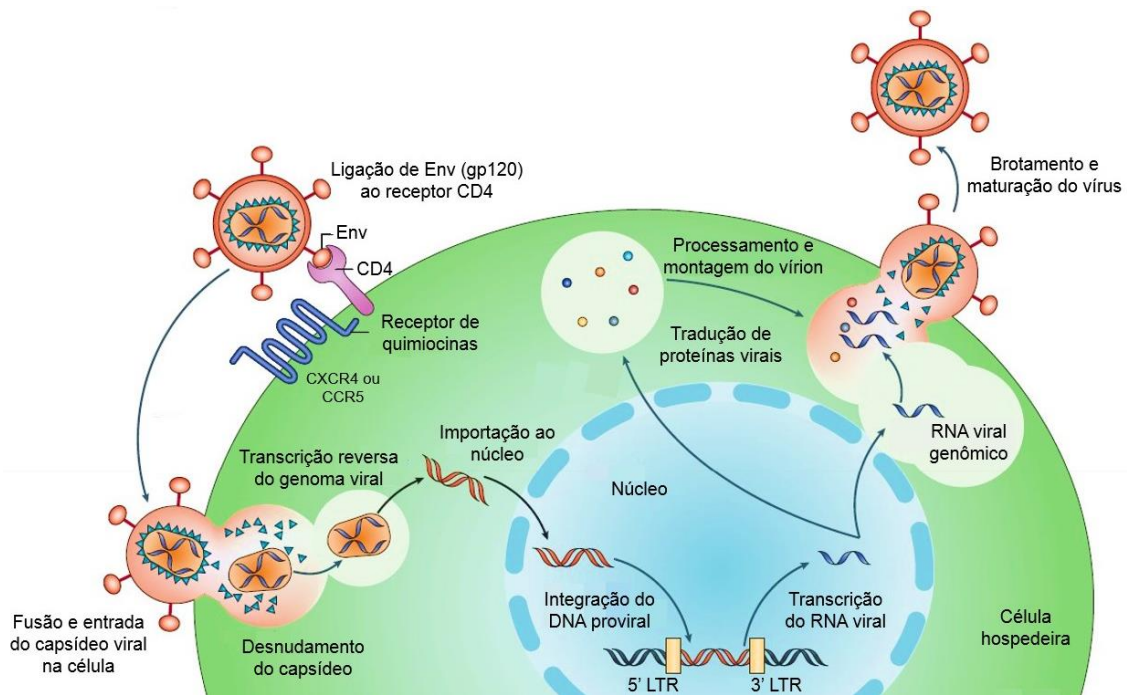
A proteína Vpu (*Viral protein U*), diferentemente das demais proteínas regulatórias, é expressa somente pelo HIV-1 (32). Ela, assim como Nef, inibe a expressão das moléculas CD4 e do MHC I na superfície de células infectadas auxiliando na evasão imune. Além disso, Vpu antagoniza o fator de restrição teterina, responsável por reter partículas virais na membrana, e aumenta, portanto, a liberação de vírions para o meio extracelular. O HIV-2 expressa a proteína Vpx (*Viral protein X*) invés de Vpu, o que é, parcialmente, responsável pela reduzida patogenicidade desse vírus (4,9,33).

### **1.1.3. Infecção e Ciclo replicativo do HIV-1**

A infecção pelo HIV-1 advém, geralmente, do contato sexual, perfuração com objetos cortantes ou passagem transplacentária de fluidos orgânicos de uma pessoa infectada para um indivíduo saudável (6,25). Nesses fluidos encontram-se as partículas virais maduras que penetram a mucosa por transcitose ou pela interação direta com células dendríticas intraepiteliais através da ligação da glicoproteína gp120 do envelope viral ao receptor DC-SIGN dessas células. Este receptor promove a internalização do HIV, que é transportado para os tecidos linfoides regionais, especialmente o associado à mucosa intestinal (GALT, *Gut-associated lymphoid tissue*), e apresentado aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> por contato direto (4,34).

A infecção de células alvo tem início com a interação da gp120 do HIV com a molécula CD4 na superfície celular, induzindo uma alteração conformacional que expõe o sítio de ligação dessa glicoproteína ao correceptor de entrada, CCR5 (*Chemokine receptor type 5*) ou CXCR4 (*Chemokine receptor type X4*) (Figura 1.4) (6). A ligação da gp120 ao CD4 e ao correceptor induz uma segunda alteração conformacional que expõe a região hidrofóbica da gp41 chamada de peptídeo de fusão. Essa região hidrofóbica N-terminal é inserida na membrana celular e promove a fusão do envelope viral com a bicamada fosfolipídica da célula permitindo a liberação do capsídeo viral no citoplasma, onde ocorre o desnudamento e liberação do genoma e das proteínas virais. Ainda no citoplasma, o genoma de RNA viral é retrotranscrito em DNA complementar (cDNA) pela ação da enzima transcriptase reversa. Em paralelo, ocorre a degradação da fita de RNA pela ação enzimática da RNase H e, em seguida, o cDNA de fita simples é convertido em DNA dupla fita (DNA proviral) pela atividade polimerase de DNA dependente de DNA da transcriptase reversa (9,25,28).





**Figura 1.4. Ciclo replicativo do HIV-1.**

O ciclo tem início com a ligação da gp120 do envelope viral à molécula CD4 e ao correceptor de quimiocina na célula alvo e uma alteração conformacional que expõe a gp41 promovendo a fusão do envelope com a membrana. Em seguida, o capsídeo viral é liberado no citoplasma, sofre desnudamento e o RNA genômico é retrotranscrito em DNA proviral. Este DNA é transportado para o núcleo e integrado ao genoma da célula hospedeira, permitindo que o provírus seja transcrito. Os transcritos virais são transportados para o citoplasma e traduzidos em proteínas para a montagem do capsídeo contendo o RNA genômico. O capsídeo incorpora a bicamada lipídica da membrana plasmática e as glicoproteínas à composição do envelope viral no processo de brotamento, e a partícula viral sofre maturação pela ação da protease. Adaptado de (35).

O DNA proviral de fita dupla se associa ao PIC contendo a enzima integrase, a proteína p17 da matriz e Vpr, e é transportado para o núcleo celular via nucleoporos (9,25). Uma vez no núcleo, o DNA proviral é integrado ao genoma humano, frequentemente em regiões com a sequência *Alu*, pela ação da enzima integrase, concluindo o estabelecimento da infecção na célula (36). A transcrição do genoma proviral ocorre junto com a transcrição do genoma da célula durante a divisão celular e, por isso, células em repouso apresentam pouca ou nenhuma produção de proteínas virais e são consideradas como reservatórios (4,9,25). O genoma proviral também é transcrito pela ação da RNA polimerase II do hospedeiro associada à interação de fatores de transcrição e da proteína viral Tat com o promotor das LTRs (37).

As LTRs são regiões reguladoras que contêm sequências promotoras e *enhancers* capazes de interagir com fatores celulares e modular a transcrição. Na sequência promotora é encontrado um elemento TATA, um elemento iniciador e três sítios de ligação para Sp1 (*Specificity protein 1*) que, em conjunto, orientam o posicionamento da RNA polimerase II e participam da transativação da transcrição mediada por Tat (38). A sequência *enhancer*, por sua vez, possui dois sítios de ligação para o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que aumenta a transcrição do LTR em resposta a diversos sinais de ativação celular, como as moléculas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. O fator de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) é capaz de se ligar ao mesmo sítio de ligação do NF- $\kappa$ B e promover a transcrição viral, porém ele apresenta menor afinidade por esse sítio. A transcrição tem início na presença de fatores capazes de ativar o LTR, mas a proteína Tat do HIV-1 é fundamental para que os transcritos sejam formados corretamente (37,39).

A transcrição do genoma viral origina três tipos de RNAs com comprimentos e processamentos distintos. As proteínas Nef, Tat e Rev são traduzidas a partir de diferentes transcritos completamente processados (*spliced*) que possuem cerca de 2 kb. Gag e Pol são codificadas por transcritos maiores de, aproximadamente, 9 kb que não sofrem processamento (*unspliced*) e as proteínas Env, Vif, Vpr e Vpu são traduzidas a partir de um transcrito parcialmente processado com cerca de 4 kb (37).

Os primeiros transcritos codificam para as proteínas Tat e Rev, que atuam sobre a replicação viral. Tat interage com o elemento de resposta de transativação (TAR) no RNA viral e se associa ao fator positivo b de alongamento da transcrição (P-TEFb), composto pela cinase dependente de ciclina 9 (CDK9) e pela ciclina T1. Desta forma, o complexo Tat/P-TEFb estabiliza a interação da RNA polimerase II com o RNA nascente, aumentando a taxa de transcrição e permitindo o alongamento dos transcritos. Além disso, Tat recruta histonas acetiltransferases que catalisam modificações na cromatina auxiliando o acesso de fatores de transcrição ao genoma. Deve-se ressaltar que, em monócitos, a atividade dessa proteína é limitada pela baixa disponibilidade de ciclina T1, enquanto a diferenciação em macrófagos promove aumento da expressão desta ciclina e, portanto, da atividade de Tat (37).

As células eucariotas em geral não produzem transcritos não processados ou parcialmente processados e, portanto, impedem a exportação desse tipo de material para

o citoplasma evitando a formação de proteínas truncadas. Entretanto, nos retrovírus, parte das proteínas virais é originada a partir de transcritos que não foram completamente processados (37). Dessa forma, a proteína Rev é fundamental para a exportação dos transcritos longos não processados e parcialmente processados para o citoplasma para serem traduzidos, evitando que sejam degradados no núcleo da célula. Esses transcritos contêm uma estrutura secundária denominada elemento de resposta à Rev (RRE, *Rev response element*) e são exportados para o citoplasma pela interação de Rev-RRE com a exportina celular 1 (Crm1) e com a helicase DDX3 (25,37).

Inicialmente, os transcritos processados atravessam os poros da membrana nuclear e são traduzidos em suas respectivas proteínas no citoplasma. Em seguida, a proteína Rev ingressa no núcleo e auxilia na exportação dos demais transcritos para o citoplasma, onde poderão ser traduzidos. Deste modo, os genes do HIV-1 podem ser divididos em genes de expressão precoce, que são independentes de Rev, e genes de expressão tardia, dependentes dessa proteína (25,37).

A síntese das glicoproteínas do envelope viral (Env) ocorre no retículo endoplasmático. Essas moléculas sofrem modificações no aparelho de Golgi e são transportadas para a membrana plasmática por vesículas. O precursor GagPol é sintetizado no citoplasma e contém domínios para as enzimas transcriptase reversa, protease, ribonuclease e integrase. O precursor poliproteico da proteína Gag é traduzido por ribossomos no citoplasma e sofre alterações que permitem a sua inserção na camada interna da membrana plasmática (40). Esse precursor contém quatro domínios: matriz, que direciona o precursor para a membrana plasmática onde interage com fosfolípidios, capsídeo, que promove a multimerização de Gag durante a montagem dos vírions, nucleocapsídeo, que recruta o genoma de RNA viral para o interior dos vírions em brotamento e o domínio p6, que recruta ESCRT-I auxiliando na catálise de fissão de membrana para a liberação da partícula viral para o meio extracelular (40).

Após a liberação das partículas virais ocorre o processo de maturação em que a protease viral cliva os precursores Gag e GagPol em proteínas e enzimas funcionais, o que é essencial para que as partículas se tornem infectivas (40). Em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estima-se que a liberação da primeira progênie viral ocorra 24 horas após o início da interação do vírus com a célula (9). A infecção de novas células pode ocorrer por partículas virais livres ou pelo contato direto com uma célula infectada, o que é de 100 a

1000 vezes mais eficiente (41,42). Essa transmissão célula-célula é dependente da formação de uma sinapse virológica que envolve a participação do citoesqueleto de actina e das moléculas de adesão celular, como a integrina LFA-1 (*Leukocyte function-association antigen 1*) e seu ligante ICAM-1 (*Intracellular adhesion molecule 1*). Nos tecidos linfoides, especialmente no GALT, ocorre uma maior interação entre as células favorecendo esse tipo de transmissão (41–43).

#### **1.1.4. A infecção em macrófagos**

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que pertencem à linhagem mieloide e desempenham diversas funções na imunidade e na homeostase tecidual. Essas células participam ativamente da resposta imune inata fagocitando patógenos e células infectadas, produzindo citocinas e mediadores inflamatórios que auxiliam na resolução da infecção, e contribuindo, de forma significativa, para a resposta imune adquirida pela apresentação de antígenos para os linfócitos (4).

Os macrófagos residentes são originados durante o período embrionário no saco vitelino, onde ocorre a hematopoese primária, e também no fígado fetal, a partir de monócitos que infiltram os tecidos e compõem a maior parte da população de macrófagos teciduais no adulto. Essas células apresentam fenótipos, funções e denominações específicas de cada tecido em que são encontradas, como os osteoclastos nos ossos, as células de Kupfer no fígado e os macrófagos alveolares no pulmão (44–46). Elas possuem uma meia-vida longa e, recentemente, foi demonstrado que são capazes de fazer autorrenovação para manter a população local estável. Nos tecidos são encontrados também macrófagos derivados de monócitos inflamatórios que são recrutados em resposta à injúria ou infecção, e se diferenciam em macrófagos. As características funcionais e fenotípicas dessas células variam de acordo com o estímulo oferecido e são descritas duas formas principais de polarização: macrófagos classicamente ativados por IFN- $\gamma$  e macrófagos alternativamente ativados por IL-4. As células classicamente ativadas refletem a resposta imune de linfócitos Th1 e atuam na eliminação de patógenos pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) e produção de citocinas inflamatórias, o que os caracteriza como pró-inflamatórios. As células ativadas de modo alternativo, por sua vez, refletem a resposta de linfócitos Th2 e atuam na resolução da inflamação e no reparo tecidual, sendo, então,

considerados anti-inflamatórios. Este perfil também pode ser induzido pelas citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (45,47,48).

A infecção de macrófagos pelo HIV-1 foi descrita, ainda na década de 1980, a partir da autópsia de um paciente com Aids que identificou a presença de macrófagos infectados em diversos tecidos (49,50). Os macrófagos expressam a molécula CD4 e os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 necessários à entrada do HIV-1. Atualmente, sabe-se que a infecção nessas células persiste em todos os estágios da infecção mesmo em indivíduos submetidos à terapia antirretroviral (51).

Embora o vírus seja capaz de interagir com os dois receptores, foi observado que as cepas que utilizam o receptor CXCR4 para a entrada não estabelecem uma infecção produtiva em macrófagos. Dessa forma, as cepas virais foram classificadas de acordo com o tropismo celular em M-trópicas, com tropismo para o receptor CCR5 (R5) em macrófagos, e T-trópicas, com tropismo para CXCR4 (X4) em linfócitos T. São encontradas, em menor frequência, cepas chamadas de dual-trópicas, ou seja, que apresentam tropismo para os dois receptores (52,53). Mais recentemente, foi descrito que ocorre uma modificação no tropismo viral ao longo da infecção, sendo esta iniciada, preferencialmente, por cepas R5-trópicas que sofrem mutações e se tornam X4-trópicas tardiamente. Estas cepas são mais citopáticas e induzem a formação de sincícios contribuindo, assim, para uma depleção mais rápida dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (51,52,54).

Ainda com relação aos receptores, foi identificado que indivíduos homozigotos para o alelo mutante CCR5 delta 32 apresentam resistência à infecção por cepas R5 trópicas. Isto porque essa mutação provoca a codificação de uma proteína truncada, que fica retida no retículo endoplasmático e, portanto, não é expressa na membrana, não permitindo a entrada do vírus (51). A modulação desse receptor por moléculas endógenas como as  $\beta$ -quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , que se ligam ao CCR5 e induzem a sua internalização, também é capaz de inibir a infecção pelo HIV-1 (51,55).

A susceptibilidade dos macrófagos à infecção pelo HIV-1 varia de acordo com o microambiente em que eles se encontram e o fenótipo que apresentam. Por exemplo, macrófagos do GALT são relativamente refratários à infecção, enquanto macrófagos localizados no reto são mais susceptíveis (56,57). Os monócitos do sangue periférico são pouco permissivos e raramente são infectados *in vivo*, mas macrófagos derivados de monócitos não polarizados são mais susceptíveis ao HIV-1 do que células pró ou anti-

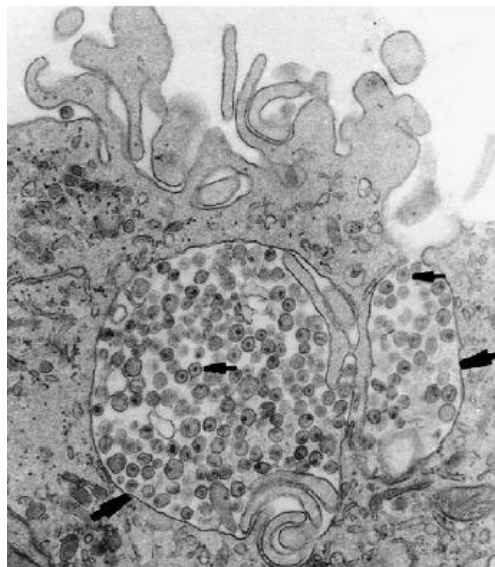
inflamatórias (51,52,58,59). As funções efetoras dos macrófagos são afetadas durante a infecção pelo HIV-1, o que interfere na resposta imune e favorece o surgimento de infecções oportunistas e a progressão para Aids. A capacidade fagocítica dessas células é reduzida, assim como a fusão do fagossomo com o lisossomo, necessária para promover a morte de patógenos internalizados. Nos macrófagos infectados também é observada redução da resposta a estímulos quimiotáticos e aumento da produção de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , que contribuem para a ativação imune crônica observada nos pacientes (58).

A infecção de macrófagos pelo HIV-1 apresenta características distintas da observada em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Os macrófagos são células de meia-vida longa que atuam na propagação do vírus e resistem aos efeitos citopáticos, persistindo durante todo o curso da infecção, mesmo na presença da terapia, e configurando um reservatório viral (52,60,61). O vírus, por outro lado, contribui para a longevidade dessas células, aumentando a sua resistência à apoptose induzida por TNF- $\alpha$  e a expressão das moléculas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, e reduzindo a expressão de Bax e Bad, pró-apoptóticas (51,62). Além disso, a proteína viral Tat é capaz de induzir ativação de macrófagos e monócitos, e estimular a expressão dos receptores CXCR4 e CCR5 (60).

A replicação viral em macrófagos é mais lenta do que em linfócitos T CD4 e acredita-se que a atividade de SAMHD1 (*Sterile alpha Motif and histidine/aspartate domain-containing protein 1*) seja o principal fator responsável por esse atraso. Essa proteína é uma fosfo-hidrolase que depleta o *pool* de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), reduzindo sua disponibilidade para a transcrição reversa e síntese do DNA proviral (63). Em células da linhagem mieloide e, principalmente em macrófagos pós-mitóticos, é observado um aumento da expressão de SAMHD1, o que reforça a diferença no tempo de replicação entre linfócitos e macrófagos. Dessa forma, o tempo estimado para a entrada do HIV-1 no macrófago é de 8 horas, enquanto a transcrição reversa e importação nuclear do DNA proviral parecem estar concluídas entre 60-72 horas pós-infecção (61). Nessas células, a replicação viral está, particularmente, relacionada à expressão de fatores de transcrição do hospedeiro e às proteínas virais Vpr e Tat que interagem com o LTR do HIV-1 e estimulam a transcrição. Os fatores que se destacam nessa sinalização são NFAT, NF- $\kappa$ B, Sp e C/EBP. O C/EBP é encontrado em diferentes isoformas, que podem se associar ao fator AP-1 e, a depender da isoforma, estimular ou inibir a transcrição. Além disso, nos macrófagos há um aumento da

expressão de ciclina T1, que compõe o complexo P-TEFb necessário para ligação de Tat ao TAR e ativação da transcrição (39).

As etapas finais do ciclo replicativo também são diferentes em macrófagos. Enquanto nos linfócitos a montagem da partícula viral ocorre na membrana plasmática e com efeitos citopáticos severos, nos macrófagos isso ocorre dentro de compartimentos que expressam as moléculas CD63 e CD81, características de corpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*). Estudos acerca desse compartimento demonstram diferenças entre as estruturas que albergam os vírions e os MVBs, e elas foram, então, renomeadas como compartimentos contendo vírus (VCCs, *virus-containing compartments*) (64–66). Os vírions são montados e se acumulam no interior destes compartimentos, e são liberados para o meio extracelular por meio de canais que conectam as VCCs à membrana plasmática (Figura 1.5). Assim, as partículas virais podem ser transmitidas para outras células pelo contato direto entre as membranas e formação da sinapse virológica entre elas, ou ainda, ser armazenadas no interior desses compartimentos por longos períodos (67–71).



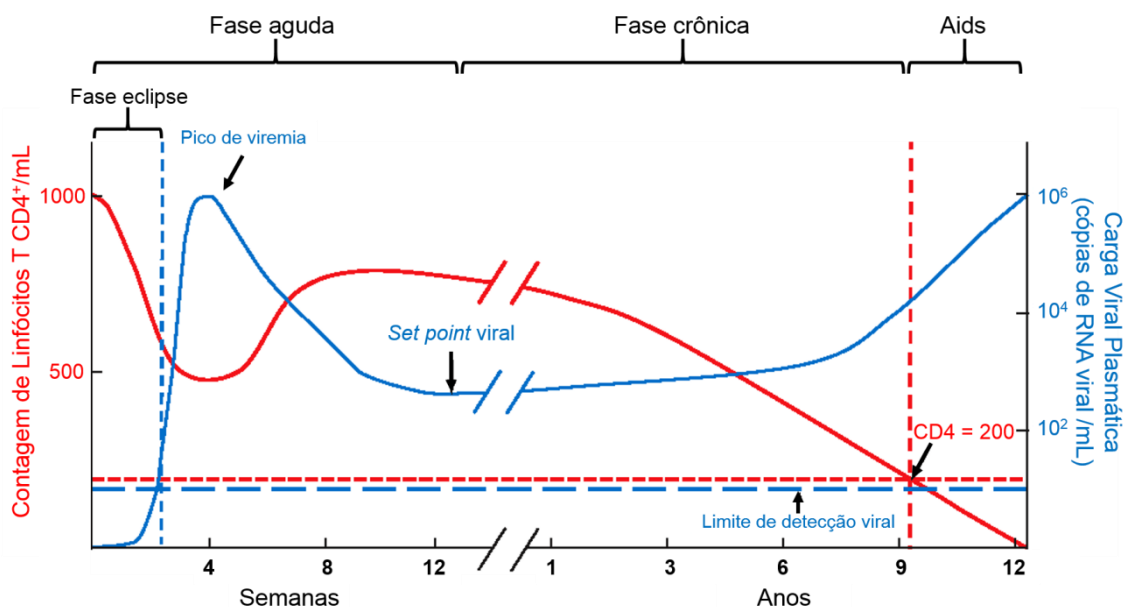
**Figura 1.5. Microscopia eletrônica de macrófagos infectados pelo HIV-1.**

Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos contendo compartimentos intracelulares envoltos por membranas (setas grandes) dentro dos quais são observadas partículas virais com núcleo eletrodenso (setas pequenas). Essas partículas são liberadas para o meio extracelular pela fusão dos compartimentos com a membrana da célula. Aumento 30.000x. Adaptado de (72).

### 1.1.5. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1

A maior parte das infecções pelo HIV-1 ocorre por transmissão sexual, em que fluídos de um indivíduo infectado entram em contato com a mucosa de um indivíduo sadio. O risco de transmissão está intimamente associado à presença de lesões e inflamações no epitélio, as quais facilitam o acesso do vírus à microcirculação da mucosa e favorecem o recrutamento de células T e monócitos inflamatórios para o local (9). As células dendríticas são as principais responsáveis por capturar o vírus, via lectinas de superfície, como a molécula DC-SIGN, e apresentá-lo aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos tecidos linfoides (34).

Em indivíduos infectados e não tratados, o curso natural da infecção pelo HIV-1 é bastante característico (Figura 1.6). Estudos em modelos de SIV demonstram que é possível observar uma replicação produtiva em linfócitos T CD4<sup>+</sup> após dois dias de infecção. Em humanos, durante as duas primeiras semanas de infecção é observada uma intensa replicação viral em células permissivas no local de entrada e a disseminação do vírus via sistema linfático, a partir dos linfonodos drenantes. Nesse período, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> do GALT são depletados por efeitos diretos e indiretos do vírus, e é iniciada a formação de reservatórios virais. Entretanto, ainda não é possível detectar a presença do vírus na circulação e, por isso, esse período é chamado de eclipse (6).



**Figura 1.6. Curso natural da infecção pelo HIV-1.**

Nas duas primeiras semanas após a infecção o vírus se multiplica nos tecidos linfoides, mas se mantém indetectável no plasma, caracterizando a fase eclipse. Em seguida, ainda



na fase aguda, é observado um pico de viremia associado à queda simultânea na contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Após algumas semanas, a replicação viral é controlada e essa contagem é, parcialmente, restabelecida. A fase crônica pode perdurar por vários anos e é caracterizada pela perda progressiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da capacidade de controlar a viremia. Com o decorrer dos anos, a redução progressiva do número de linfócitos compromete a imunidade e o indivíduo se torna susceptível a infecções secundárias. Além disso, a viremia aumenta de modo considerável. Adaptado de (73).

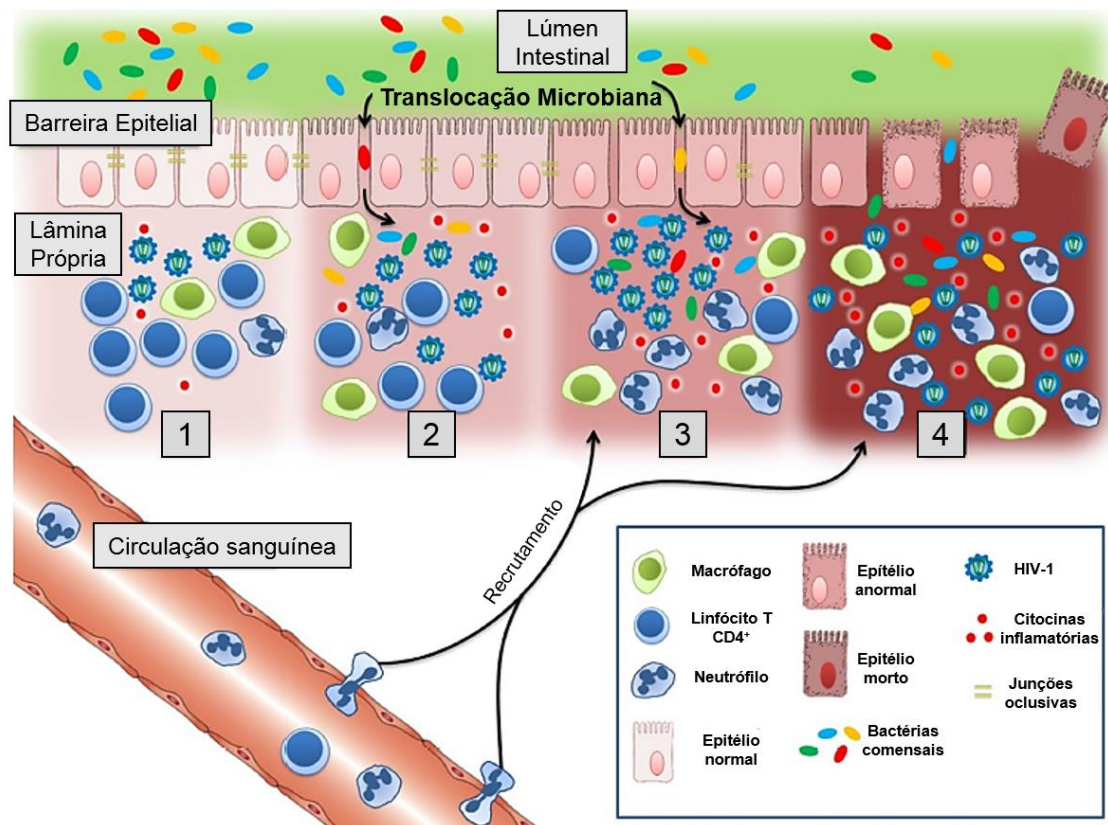
A fase aguda, também chamada de infecção primária, tem início no momento da infecção e compreende a fase eclipse. O final desta fase está associado à detecção do RNA viral no sangue e ao surgimento de sintomas como febre, linfadenopatia generalizada, mialgia e cefaleia. Geralmente, a severidade dos sintomas coincide com o pico de viremia, que pode atingir 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cópias de RNA viral/mL (6). Os sintomas variam de intensidade e duração entre os indivíduos, sendo alguns assintomáticos e outros desenvolvendo quadros de meningite. Na fase aguda é observada uma queda acentuada do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes, uma maior disseminação do vírus pelo organismo, infectando células de diferentes tecidos, e a soroconversão, que é a produção de níveis detectáveis de anticorpos anti-HIV-1. Durante esse período, também ocorre ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que reconhecem peptídeos virais acoplados ao HLA (*Human Leukocyte antigen*) de classe I. Esses linfócitos específicos para antígenos do HIV-1 passam por uma expansão clonal e, por meio de sua ação citotóxica, matam as células infectadas, controlando a infecção (4,6). Além dos linfócitos, outras células participam da resposta imune que ocorre durante essa fase e são fundamentais para a redução da viremia e recuperação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Apesar desse controle inicial, sabe-se que os danos provocados ao GALT são apenas parcialmente revertidos e que os reservatórios virais, responsáveis pela replicação persistente em longo prazo, são formados durante as primeiras semanas de infecção (6,34,74). A carga viral observada após o controle viral obtido com a resposta imune é chamada de *set point*, e pode variar entre os indivíduos. Ela está, geralmente, associada à progressão para Aids; portanto, indivíduos que mantêm uma carga viral elevada nessa fase costumam progredir mais rapidamente para a doença (4,6).

A fase crônica, também chamada de latência clínica, é caracterizada por um equilíbrio entre a replicação do HIV e a resposta imune que mantém a carga viral, razoavelmente, controlada. A sua duração é bastante variável, podendo chegar a 10 anos na ausência de terapia antirretroviral adequada, e as manifestações clínicas são raras ou

ausentes neste período. No início dessa fase, o paciente preserva a capacidade de combater a maioria das infecções provocadas por microrganismos oportunistas; entretanto, é observado um declínio numérico e funcional de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que ocorre progressivamente e compromete a resposta imune. A avaliação da carga viral plasmática e do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes durante esse período são parâmetros laboratoriais utilizados para monitorar a progressão da doença (6,9).

Os indivíduos que progridem para Aids desenvolvem uma imunossupressão severa ao longo da fase crônica, atingindo uma contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferior a 200 células/ $\mu$ L que se associa ao aumento da carga viral (6). A perda de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, especialmente de células Th1 e Th17, compromete a resposta imune celular e humoral em diversos estágios e torna esses indivíduos susceptíveis às infecções oportunistas e neoplasias (4,74). As infecções mais recorrentes nesses pacientes são a tuberculose cavitária/disseminada, pneumocistose, neurotoxoplasmose, candidíase, neurocriptococose e citomegalovirose disseminada, e as neoplasias mais relatadas são o sarcoma de Kaposi, Linfoma não Hodgkin e câncer de colo uterino (6,75).

Os linfócitos Th1 coordenam a resposta imune contra bactérias intracelulares e vírus, ativando, via liberação de citocinas, os fagócitos e linfócitos citotóxicos. Os linfócitos Th17, por sua vez, são fundamentais no combate a bactérias extracelulares e fungos (4). A perda numérica e funcional dessas células e de linfócitos T reguladores na mucosa compromete a imunidade local e está relacionada ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal. Isto ocorre devido à inflamação local que se estabelece pela persistente replicação viral e acúmulo de citocinas e mediadores inflamatórios, que induzem a apoptose de enterócitos e comprometem as junções oclusivas entre as células, danificando a barreira epitelial (76–78). Desta forma, ocorre a translocação microbiana, que é a passagem de componentes da microbiota e seus produtos antigênicos do lúmen intestinal para a circulação sanguínea, favorecendo a ativação de células do sistema imune e a inflamação de modo sistêmico (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Translocação microbiana.**

1) A replicação viral em linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no GALT tem início logo após a infecção pelo HIV-1. Nesse tecido, são encontrados macrófagos que participam da homeostase e regulam a presença de bactérias comensais. 2-3) Na infecção, ocorre a depleção dessas células e aumento da produção de citocinas inflamatórias e da inflamação local, que comprometem a barreira epitelial e aumentam a sua permeabilidade. 4) Assim, ocorre a passagem de produtos microbianos para a circulação, induzindo aumento da ativação imune, da inflamação e da replicação viral. Além disso, as moléculas liberadas nesse tecido recrutam monócitos e neutrófilos, amplificando ainda mais a inflamação e a lesão epitelial. Adaptado de (79).

A depleção de linfócitos CD4<sup>+</sup> ocorre por diferentes mecanismos, entre os quais se destacam os efeitos diretos do HIV-1 nas células infectadas, a ação citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a indução da piroptose pela infecção abortiva de células em repouso e linfócitos T CD4<sup>+</sup> não permissivos ao vírus (42,80–83). Diversos estudos demonstraram que, embora ocorra uma morte significativa de células infectadas, a depleção massiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é causada, principalmente, pela morte de células *bystanders* presentes nos linfonodos (84,85). Entre os mecanismos associados à morte dessas células destaca-se o reconhecimento de fragmentos de DNA proviral por sensores celulares, o que induz a piroptose, com liberação do conteúdo citoplasmático e

de moléculas inflamatórias no meio extracelular, recrutando células do sistema imune e perpetuando a inflamação crônica (42,81). O vírus é capaz de entrar em células *bystanders* e iniciar a transcrição reversa; entretanto, devido ao estado de repouso destas células, a elongação do DNA é interrompida, dando origem a transcritos incompletos que permanecem no citosol. Esses fragmentos de DNA são reconhecidos pelo sensor celular IFI16, que forma o inflamassoma com a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) e ativa a caspase-1 (42,82,83). Essa caspase é autoativada no inflamassoma de modo bastante controlado e a sua atividade catalítica promove o processamento da pró-IL-1 $\beta$  e a liberação da forma ativa desta citocina. A caspase-1 também induz a formação de poros de gasdermina na membrana da célula, causando um desequilíbrio eletrolítico que resulta em disfunção mitocondrial e lise celular (86–88).

A infecção por partículas virais livres, geralmente, não promove reconhecimento do DNA proviral pelos sensores da imunidade inata e a morte por piroptose, porém é capaz de estabelecer uma infecção produtiva em linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e induzir a apoptose via ativação da caspase-3 (80). De modo distinto, a disseminação célula-célula via sinapse virológica induz uma infecção abortiva de células não permissivas, que morrem por piroptose via ativação da caspase-1. Essa diferença está associada, em parte, à atividade da exonuclease TREX1, que promove a degradação dos fragmentos de DNA produzidos pela retrotranscrição no citoplasma, antagonizando seu reconhecimento pelos sensores celulares (42,89,90). A atividade dessa enzima, junto a outros fatores virais e celulares, regula a quantidade de produtos de DNA que estabelecem uma infecção produtiva em células T CD4<sup>+</sup> permissivas ou que, por outro lado, ativam os sensores de DNA e iniciam a via da piroptose em células com infecção abortiva. Dessa forma, na transmissão do vírus célula-célula, a quantidade de DNA proviral no citoplasma estaria acima do limite de degradação da TREX1 e ativaria, portanto, a via da piroptose, enquanto em células infectadas por partículas virais livres a quantidade de DNA não ultrapassaria esse limite e, não ativando a via da piroptose, seria capaz de estabelecer uma infecção produtiva (42).

#### **1.1.6. Resposta imunológica e fatores de restrição viral**

A infecção pelo HIV-1 induz uma resposta imune adaptativa celular e humoral que se inicia próximo ao pico de viremia observado na fase aguda e é semelhante à

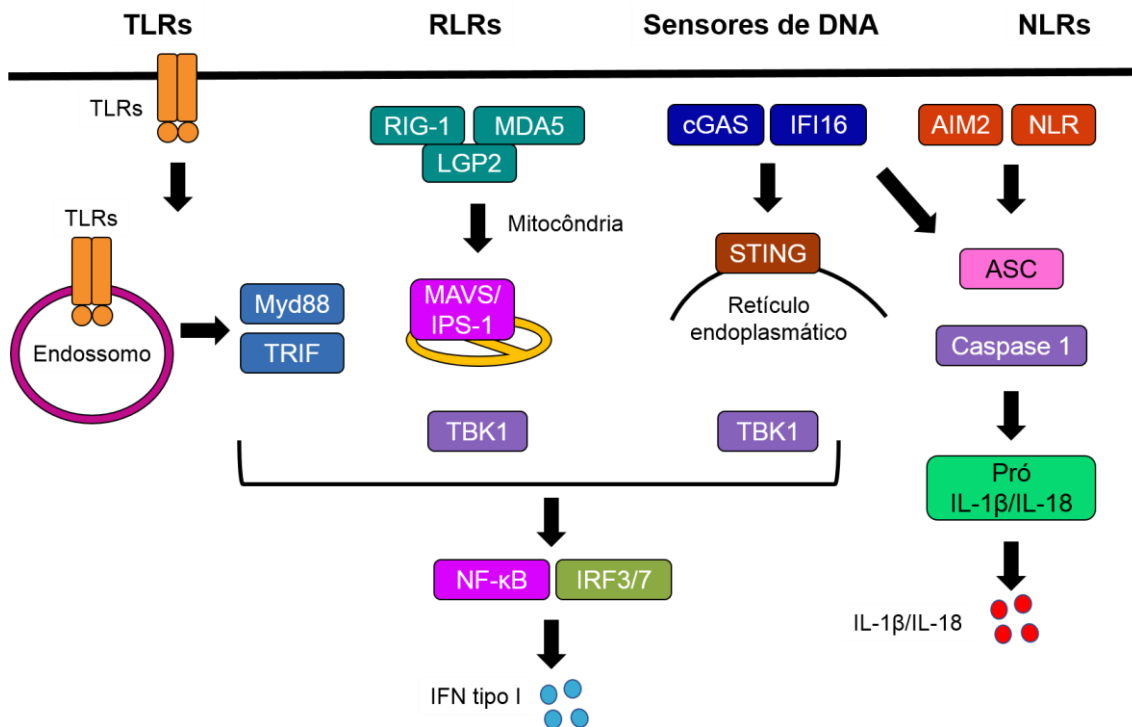
resposta observada em outras infecções virais. As células dendríticas, geralmente, são as primeiras a reconhecer o HIV-1 em seu sítio de entrada e são responsáveis por ativar os linfócitos T virgens (6).

Como um mecanismo da imunidade inata, os receptores do tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptors*) 7 e 9, expressos pelas células dendríticas, reconhecem o RNA viral de fita simples e motivos CpG repetidos e não metilados de DNA proviral, respectivamente, e iniciam uma cascata de sinalização celular que culmina na fosforilação de IRF7 (*Interferon-regulator factor 7*) e na produção de Interferon (IFN) tipo I, principalmente, IFN- $\alpha$  (91,92). Em macrófagos e linfócitos, o reconhecimento de fragmentos de DNA por sensores citoplasmáticos, como cGAS e IFI16, ativa a proteína adaptadora STING no retículo endoplasmático (cGas via AMP cíclico). Essa proteína recruta TBK1 (*Tank binding kinase 1*) que fosforila IFR3 (*Interferon-regulator factor 3*) induzindo sua homodimerização e translocação para o núcleo, onde estimula a produção de Interferon tipo I (92,93). A proteína STING também participa da ativação de NF- $\kappa$ B e, assim, da indução de citocinas inflamatórias (94).

Além de ácidos nucleicos do próprio HIV-1, outros PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) e DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) gerados durante a infecção são capazes de ativar os receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*) e modular a infecção (Figura 1.8). Esses receptores da imunidade inata atuam no reconhecimento precoce de patógenos e seus produtos antigênicos, e iniciam a resposta imune induzindo, entre outros, a produção de citocinas e quimiocinas (92,94,95). Na membrana plasmática, são encontrados os receptores TLR1, TLR2, TLR4-6 que reconhecem PAMPs expressos na superfície dos patógenos, enquanto no interior da célula são observados os sensores de ácidos nucleicos, receptores RLR (*RIG-Like Receptors*), NLR (*NOD-Like Receptors*) e os receptores endossômicos TLR3, TLR7-9 (91,94).

O reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS), derivados de bactérias Gram-negativas, pelos receptores TLR4 e pela molécula CD14, por exemplo, inicia uma sinalização celular via proteína Myd88, que resulta na ativação e translocação nuclear de NF- $\kappa$ B em células de linhagem monocítica (91). A ativação de NF- $\kappa$ B resulta na produção de citocinas inflamatórias, e também na interação desse fator de transcrição com o LTR do HIV-1, ativando a transcrição viral (96). Por outro lado, uma via

independente de Myd88 é responsável pela ativação de IRF3 e, conseqüente, produção de Interferon tipo I em macrófagos derivados de monócitos (94,97). Nessas células, a infecção pelo HIV-1 também induz uma pré-ativação da produção de IL-1 $\beta$  em resposta ao LPS via aumento da expressão de CD14, TLR4 e NLRP3 (*Nod-Like Receptor protein 3*), que está envolvido na formação do inflamassoma e ativação da caspase-1 (98). Nesse cenário, o LPS reduz a replicação viral em macrófagos de modo dependente da produção de IFN tipo I e contribui, ao mesmo tempo, para a ativação imune pela liberação de IL-1 $\beta$  (Figura 1.8) (98,99).



**Figura 1.8. Receptores da imunidade inata e seu papel na infecção.**

Os TLRs são encontrados na membrana plasmática ou em endossomos e sinalizam via proteínas Myd88 ou TRIF. Os RLRs, que reconhecem RNA, sinalizam através da proteína adaptadora MAVS localizada na mitocôndria. Os sensores citosólicos de DNA, cGAS e IFI16, sinalizam via STING, expresso no retículo endoplasmático, e induzem ativação de IRF3/7 ou NF- $\kappa$ B. A ativação desses receptores promove a produção de citocinas inflamatórias e do IFN tipo I. Além disso, IFI16, assim como os receptores NLRs e o sensor AIM2, ao serem ativados, interagem com a proteína ASC da via do inflamassoma levando à ativação da caspase 1 e à produção de IL-1 $\beta$ . Adaptado de (94).

O IFN- $\alpha$ , liberado principalmente por células dendríticas, interage com seus receptores (IFNRs, *Interferon receptors*) expressos em diferentes células e induz, pela via Jak-STAT, um aumento na transcrição de genes, denominados genes estimulados

por interferon (ISGs, *interferon-stimulated genes*), promovendo um estado antiviral (100,101). Os ISGs codificam diversos fatores de restrição viral que inibem fortemente a replicação do HIV-1 e participam do controle da viremia ao fim da fase aguda da infecção (102,103). Os principais fatores são: APOBEC3G, uma citidina desaminase do hospedeiro que induz mutações pontuais de guanina para adenina no cDNA viral; teterina, uma proteína transmembranar que retém os vírions na superfície da célula infectada, evitando sua liberação; SAMHD1, uma fosfo-hidrolase que degrada dNTPs em células que não sofrem divisão mitótica, limitando a transcrição reversa; TRIM5 $\alpha$  (*Trimpartite 5 alfa*), que promove a degradação precoce do capsídeo viral e bloqueia a transcrição reversa; Mx2 (*Myxovirus resistance 2*), uma GTPase que atua após a transcrição reversa, bloqueando a entrada do DNA proviral no núcleo (100). Como mencionado anteriormente, o HIV-1 possui proteínas capazes de antagonizar o efeito dos fatores de restrição expressos pela célula hospedeira e evadir a resposta imune. Entre essas proteínas destaca-se Nef, que promove a endocitose e degradação lisossomal da teterina, e Vif, que induz a ubiquitinação de APOBEC3G e reduz a incorporação desse fator de restrição em novos vírions (104).

No início da infecção pelo HIV-1, o IFN- $\alpha$  desempenha um papel determinante no controle da viremia, participando da ativação de células da imunidade inata e adaptativa, aumentando a função citotóxica de células NK (*Natural Killer*) e linfócitos T CD8 $^+$ , e estimulando a expressão das moléculas HLA de classe I (4,102). Na fase crônica, o IFN tipo I contribui para inflamação sistêmica e para depleção de linfócitos T CD4 $^+$ , aumentando a ativação imune, a expressão de moléculas associadas à exaustão celular, como TIM-3 e PD-1, e a apoptose mediada por TRAIL (105,106). Essa citocina também interfere negativamente na liberação de linfócitos T CD4 $^+$  pelo timo, o que limita a recuperação numérica dessas células na circulação (107). A sinalização crônica de IFN tipo I eleva a expressão de ISGs durante a fase crônica da infecção e contribui para a manutenção dos reservatórios latentes. Nessa fase, o bloqueio dos receptores IFNR reduz a expressão dos marcadores de exaustão celular em linfócitos T CD8 $^+$ , aumenta a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 e, desta forma, restaura a resposta imune específica para o HIV-1 (106). Em linfócitos T CD4 $^+$  o bloqueio do receptor de IFN tipo I diminui a expressão de HLA-DR, indicando uma redução na ativação destas células. Em conjunto, esses efeitos promovidos pelo bloqueio de IFNR durante a fase crônica contribuem para uma redução da carga viral plasmática. Além disso, a associação da

terapia antirretroviral ao bloqueio de IFNR contribui para a redução do reservatório viral, visto que, sem a sinalização por IFN tipo I ocorre reativação da replicação em células latentes e, subsequentemente, controle da infecção pela terapia e pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> que tiveram sua funcionalidade restaurada (106).

Os macrófagos possuem um papel importante na apresentação do vírus para os linfócitos, promovendo ativação dessas células e modulando a sua atividade através da produção de citocinas e mediadores inflamatórios, o que contribui para a supressão da carga viral no fim da fase aguda (58,68,69,108). Os monócitos, que se diferenciam em macrófagos, são *primados* para uma resposta inflamatória e expressam, constitutivamente, altos níveis de pró-IL-18, ASC e do sensor NLRP3 (42,109). O reconhecimento de PAMPs e DAMPs, como o ATP liberado por células em piroptose, age como segundo sinal, induzindo ativação do NLRP3 e formação do inflamassoma. Neste, ocorre ativação da caspase-1, resultando na produção das formas ativas de IL-1 $\beta$  e IL-18 e na morte por piroptose, induzindo ainda mais inflamação local. Dessa forma, a piroptose contribui para a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos tecidos, especialmente no GALT, e para a inflamação sistêmica nas pessoas vivendo com HIV (42,87,109–112).

A ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ocorre pela ligação dos receptores de células T (TCR, *T cell receptor*) ao peptídeo viral associado ao HLA de classe I na superfície da célula dendrítica e pela interação da molécula CD28 com o coestimulador B7. Entretanto, a aquisição do perfil citotóxico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o HIV-1 é dependente do auxílio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de fenótipo Th1, produtores de IL-2 e IFN- $\gamma$  (4). Os linfócitos T citotóxicos são essenciais para o controle da infecção, pois reconhecem células infectadas e induzem a morte celular pela liberação de perforina e granzimas (113,114). Ademais, essas células citotóxicas expressam em sua membrana o ligante de Fas (Fas-L) que, pela interação com a molécula Fas na célula-alvo, induz a ativação de caspases e promove a morte por apoptose (115–117). Esses linfócitos também inibem, indiretamente, a infecção pelo HIV-1 por meio da produção de fatores solúveis, como as  $\beta$ -quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , que interagem com o receptor CCR5 em células-alvo bloqueando a entrada do vírus, e pela produção de IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos e incrementa sua ação fagocítica (55).

A eficácia do reconhecimento do antígeno viral por células da imunidade adquirida é crucial para uma resposta imune eficaz e determinante para a progressão, ou



não, da doença. O HIV-1, por sua vez, consegue evadir a resposta dessas células por mutações de epítomos em sítios essenciais para o reconhecimento do HLA de classe I ou do TCR, ou ainda mutações nas regiões adjacentes, prejudicando o processamento antigênico (118). Nesse sentido, o estudo de Kaslow e colaboradores (2001) demonstrou que a presença dos alelos HLA-B27 e HLA-B57, observados em um número reduzido de indivíduos, favorece uma progressão mais lenta da infecção pelo HIV-1, ou não progressão. Os indivíduos infectados que apresentam esses alelos são denominados não progressores (LTNP, *long-term non progressor*) e são caracterizados por sua capacidade de controlar espontaneamente a carga viral plasmática e manter uma contagem elevada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (119). Essa particularidade está relacionada à formação de um repertório de HLA capaz de apresentar os diferentes epítomos derivados da mutação de moléculas antigênicas do vírus selvagem e induzir a resposta adaptativa (118,119).

#### **1.1.7. Inflamação crônica**

No contexto da inflamação crônica pelo HIV-1, a piroptose desempenha um papel deletério promovendo a morte de células não infectadas e a liberação de mediadores inflamatórios que estabelecem um círculo vicioso (81). O quadro de ativação imune crônica ocorre, ainda, devido à replicação viral persistente, à inflamação da mucosa intestinal e, conseqüente, translocação microbiana, e aos mecanismos de escape do vírus que modificam o funcionamento celular e comprometem a viabilidade de diversas células do sistema imune (6,9). A expressão de marcadores de ativação como CD38/HLA-DR encontra-se aumentada em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, enquanto a expressão da molécula coestimuladora CD28 está diminuída, demonstrando uma falha na maturação e no fenótipo efetor dessas células (120). Nesse cenário é observada expansão policlonal de células B, aumento da ativação de linfócitos e do recrutamento de monócitos e neutrófilos para os sítios de replicação, e amplificação considerável da produção de citocinas e mediadores inflamatórios (4). Os neutrófilos são importantes no controle de diversas infecções, entretanto, nesse cenário, a hiperativação dessas células pode resultar na liberação de moléculas citotóxicas e em lesão tecidual. Os níveis elevados de citocinas inflamatórias estão associados ao aumento de linfócitos T não específicos para o HIV-1 e com a expressão de moléculas associadas à anergia e à apoptose, como PD-1 e Fas, respectivamente (121). Essa ativação crônica acelera os processos de imunossenescência no paciente e contribui para a imunossupressão severa observada durante a progressão para Aids (122).

A infecção pelo HIV-1 promove alterações no fenótipo e funcionalidade de diversas células do sistema imune que ocorrem tanto na medula óssea, em progenitores mieloides, quanto em células diferenciadas presentes na circulação. Devido à ativação crônica, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o HIV-1 desenvolvem um fenótipo anormal característico de imunossenescência, com perda progressiva da capacidade de reconhecer antígenos associados ao HLA, ausência de perforina em seus grânulos e reduzida produção de citocinas e proliferação. Essas células, assim como os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, demonstram um aumento da expressão da molécula PD-1 em sua superfície que se correlaciona positivamente à carga viral plasmática (122). A interação de PD-1 com o ligante PD-L1, expresso por células de origem mieloide, regula negativamente a capacidade proliferativa e a produção de citocinas por linfócitos T. Esse fenômeno de exaustão celular também está associado ao aumento da expressão de inibidores do *checkpoint* imune, como CTLA-4, TIM3 e LAG4, que bloqueiam a ativação dos linfócitos, e à produção de IL-10 por células T reguladoras nos sítios de infecção, que inibe a proliferação celular (120). O perfil metabólico de células T em exaustão também sofre alterações, como redução da via glicolítica e desregulação da função mitocondrial, favorecendo a utilização de ácidos graxos para a obtenção de energia (120). Além dos eventos de morte celular e exaustão imune, durante a fase crônica ocorre uma redução na produção de IL-2, que diminui a capacidade proliferativa dos linfócitos T e contribui para a perda de função dessas células (120,121). A inflamação crônica desregula também a ação das citocinas IL-7 e IL-15, que estimulam a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória, contribuindo para a manutenção do reservatório viral latente (81).

O GALT é um dos principais locais de replicação viral e onde são encontrados diferentes tipos celulares permissivos ao vírus (74,76). Além de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos, são recrutados monócitos circulantes que infiltram a mucosa intestinal e são ativados e diferenciados em macrófagos por citocinas liberadas neste microambiente. Assim, esses macrófagos tornam-se também alvo da infecção pelo HIV, podendo replicar ativamente o vírus ou permanecer latentes como reservatórios virais. Em caso de ativação das células infectadas que constituem o reservatório, há transcrição do DNA proviral e retomada do ciclo replicativo com produção de novos vírions (9,25). Apesar disso, a presença de macrófagos nesse tecido e o recrutamento de monócitos inflamatórios é importante para o controle de microrganismos oportunistas (69).

### 1.1.8. Reservatórios virais e estratégias terapêuticas

Os reservatórios virais são formados durante a fase eclipse da infecção pelo HIV-1 e são compostos por células em repouso e de meia-vida longa que possuem o provírus integrado em seu genoma (123–125). As principais células que constituem esse reservatório são macrófagos residentes dos tecidos linfoides, micróglia, linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória e células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea. A formação desses reservatórios é favorecida pelo início tardio da terapia antirretroviral, por características próprias das células, que permanecem com o vírus inativo e não são identificadas como ameaça ao sistema imune, e por santuários anatômicos, como o cérebro, que apresentam reduzida vigilância imune e baixa penetração dos fármacos utilizados na terapia. O estado de ativação celular, a polarização e a presença de citocinas inflamatórias e fatores teciduais são determinantes para a indução, ou não, da latência viral (125–128).

As células com infecção latente podem ser reativadas por agentes reversores de latência, mediadores inflamatórios, infecções oportunistas ou pela interrupção da terapia antirretroviral. Dessa forma, esses reservatórios constituem o maior obstáculo para a obtenção de uma cura estéril e, por isso, diversas estratégias são estudadas visando eliminá-los. Uma delas é o “*Shock and Kill*” que propõe o uso concomitante de agentes reversores de latência e da terapia antirretroviral para reativar as células infectadas, estimulando a transcrição e a produção de partículas virais, e eliminar estas partículas atuando em diferentes etapas do ciclo, respectivamente (129).

A terapia gênica é outra abordagem que vem sendo estudada a partir da cura estéril obtida com o caso conhecido como paciente de Berlim, em 2006. Esse paciente desenvolveu leucemia mieloide aguda enquanto estava infectado pelo HIV-1 e, após ser submetido à radioterapia, recebeu um transplante de células-tronco hematopoiéticas halogênicas de um doador homozigoto para a mutação delta 32 no receptor CCR5, que confere resistência ao HIV-1 (130). Assim, esse indivíduo conseguiu interromper a terapia antirretroviral e recompor um sistema imune resistente ao vírus, capaz de manter indetectável a carga viral no plasma e nos linfonodos.

A terapia antirretroviral de alta eficiência utilizada atualmente promove o controle prolongado da carga viral e é composta pela combinação de fármacos classificados de acordo com a etapa do ciclo replicativo em que atuam, sendo eles

inibidores das enzimas protease, integrase e transcriptase reversa e inibidores de fusão e entrada (131). Essa terapia possibilitou uma melhoria substancial na qualidade de vida dos indivíduos infectados, reduzindo a carga viral plasmática a níveis indetectáveis, o que também reduz a transmissão, e minimizando os danos diretos e indiretos do vírus. Assim, o tratamento reduz a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a ativação imune crônica, preservando a capacidade funcional das células do sistema imune e retardando os efeitos da infecção sobre o organismo (131).

## **1.2. Neutrófilos e *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs)**

### **1.2.1. Biologia do Neutrófilo**

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes da circulação sanguínea e, junto aos monócitos, são os primeiros a serem recrutados para os sítios de inflamação. Essas células são assim denominadas pela tendência a reter corantes neutros, mas também são conhecidas como polimorfonucleares devido a sua morfologia, caracterizada por um núcleo multilobulado com 3 a 5 lóbulos interligados. Devido à presença de grânulos no citoplasma, essas células, junto aos eosinófilos e basófilos, são classificadas como granulócitos (132). A importância dos neutrófilos no sistema imune está relacionada a sua capacidade de produzir citocinas e modular a atividade das células com as quais interage, como os macrófagos, e a sua participação na patogênese de diferentes enfermidades (133). Esses leucócitos possuem origem mieloide e são produzidos na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas que se diferenciam em progenitores multipotentes e, posteriormente, em progenitores de granulócitos e monócitos (GMPs). Reguladas pelo fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF), essas células passam por diversos estágios de diferenciação e maturação até atingirem o estágio de neutrófilos maduros (133–135).

As células progenitoras se encontram em íntimo contato com as células estromais produtoras de SDF-1 $\alpha$  (*Stromal-Derived factor*)/CXCL12 e VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), e são retidas na medula óssea pela interação destas moléculas com a integrina VLA4 e o receptor CXCR4, respectivamente, expressos em sua membrana (133,134,136). Durante o processo de diferenciação e maturação ocorrem alterações morfológicas que resultam na formação do núcleo multilobulado e também modulações na expressão de receptores e moléculas de superfície (134,135). Além de regular os neutrófilos na medula óssea, o G-CSF participa do processo de

liberação destas células para a circulação, induzindo redução da expressão de CXCR4 e da integrina VLA4, e aumento de CXCR2. Também é observada redução de CXCL12 em células do estroma medular e aumento da expressão de ligantes de CXCR2, como CXCL1 e CXCL2, em megacariócitos e células endoteliais, favorecendo a mobilização dos neutrófilos para a circulação (134,137–142). Células imaturas, por sua vez, não expressam esse receptor e, no estado basal, não são encontradas na circulação. Entretanto, sabe-se que, durante a resposta inflamatória esses neutrófilos podem ser também liberados no sangue e recrutados para o sítio inflamatório (134,138).

A formação dos grânulos e vesículas secretoras, fundamentais para o armazenamento de proteínas antimicrobianas e enzimas necessárias para o desempenho das funções dos neutrófilos, ocorre durante o processo de diferenciação e maturação (133,134,136). A síntese das proteínas granulares é finamente regulada e a diferença na composição proteica de cada grânulo é determinada pelo momento em que são formados na granulopoese. Essas estruturas são classificadas em quatro tipos, de acordo com o momento de formação. Os grânulos primários, também chamados de azurofílicos, são observados já no estágio de promielócito e compreendem defensinas, elastase neutrofílica (NE), catepsina G e mieloperoxidase (MPO), importante para o *burst* respiratório e degranulação. A presença de moléculas com potencial antimicrobiano e ação enzimática torna esse tipo de grânulo essencial para as funções imunes executadas pelos neutrófilos (132,133). Os grânulos secundários, também chamados de específicos, são encontrados no estágio de mielócitos e metamielócitos e incluem moléculas como lisozima, lactoferrina e colagenase. Os terciários são os últimos a se formarem e são compostos por metaloproteinases como gelatinase e leucolisina. As vesículas secretórias, por sua vez, são detectadas somente em neutrófilos maduros e diferem dos demais grânulos por não se formarem a partir do complexo de Golgi. Essas estruturas são geradas por endocitose nos estágios finais da maturação dos neutrófilos e contêm proteínas citoplasmáticas, como albumina, além de armazenarem em sua membrana moléculas utilizadas para a migração celular (132,133).

Nos tecidos, a produção de neutrófilos pode ser estimulada pelas citocinas IL-17 e IL-23, produzidas por linfócitos T e fagócitos, respectivamente. A IL-17, em particular, induz a granulopoese e a liberação de neutrófilos para a circulação pelo aumento de G-CSF (133,143). Durante a homeostase, a produção de IL-17 e G-CSF encontra-se reduzida, assim como a produção e liberação de novas células. Entretanto,

em condições inflamatórias, o aumento da liberação de IL-1 pode induzir a produção de neutrófilos pela via IL-17/G-CSF (144). Os neutrófilos, por sua vez, ao produzirem IL-17 e recrutarem linfócitos Th17 também produtores desta interleucina, e pela ativação da produção de IL-1 por macrófagos, podem estabelecer um *loop* de recrutamento e ativação celular (143–146). Deshmukh e colaboradores (2014) demonstraram que a microbiota também estimula a produção de IL-17 e G-CSF por células linfoides inatas na mucosa intestinal, via sinalização por TLR4-Myd88, contribuindo para a produção de neutrófilos (147).

Em condições homeostáticas, estima-se que sejam produzidos de 1 a  $2 \times 10^{11}$  neutrófilos por dia em humanos. A meia-vida dessas células é bastante curta, mas ainda não há um consenso na literatura que determine sua duração. Os relatos variam de 12 horas a 5 dias a depender do método de análise dos neutrófilos na circulação (136,148–150). A produção e liberação dessas células pela medula óssea, assim como seu envelhecimento na circulação, seguem o ciclo circadiano, que modula também o conteúdo proteico e as funções celulares (151–154). As células recém liberadas da medula apresentam uma quantidade maior de grânulos e desempenham um papel protetor contra infecções, enquanto células senescentes atuam, preferencialmente, no *clearance* homeostático na circulação e nos tecidos. Assim como o fenótipo, o número de neutrófilos circulantes varia durante o dia, seguindo uma regulação da expressão dos receptores CXCR4 e CXCR2, envolvidos no envelhecimento celular (133,136,153,154).

O *clearance* de células senescentes é feito por macrófagos que fagocitam neutrófilos apoptóticos que completaram seu ciclo de vida. Na homeostase, essas células voltam a expressar altos níveis do receptor CXCR4 e retornam para a medula óssea para serem removidas, mas são também fagocitadas no fígado e no baço (133,136,155). Em condições inflamatórias, as células apoptóticas são fagocitadas no próprio tecido por macrófagos residentes durante o processo de resolução da inflamação. Apesar da curta meia vida, há um balanço estritamente regulado entre a produção e eliminação de neutrófilos, que mantém o número de células na circulação relativamente constante (137,140,149,156). Essa regulação é mediada, em parte, por macrófagos e células dendríticas que, ao fagocitarem neutrófilos apoptóticos, reduzem a produção de IL-23 e, desta forma, controlam a produção de IL-17 por linfócitos T e a granulopoese (157).

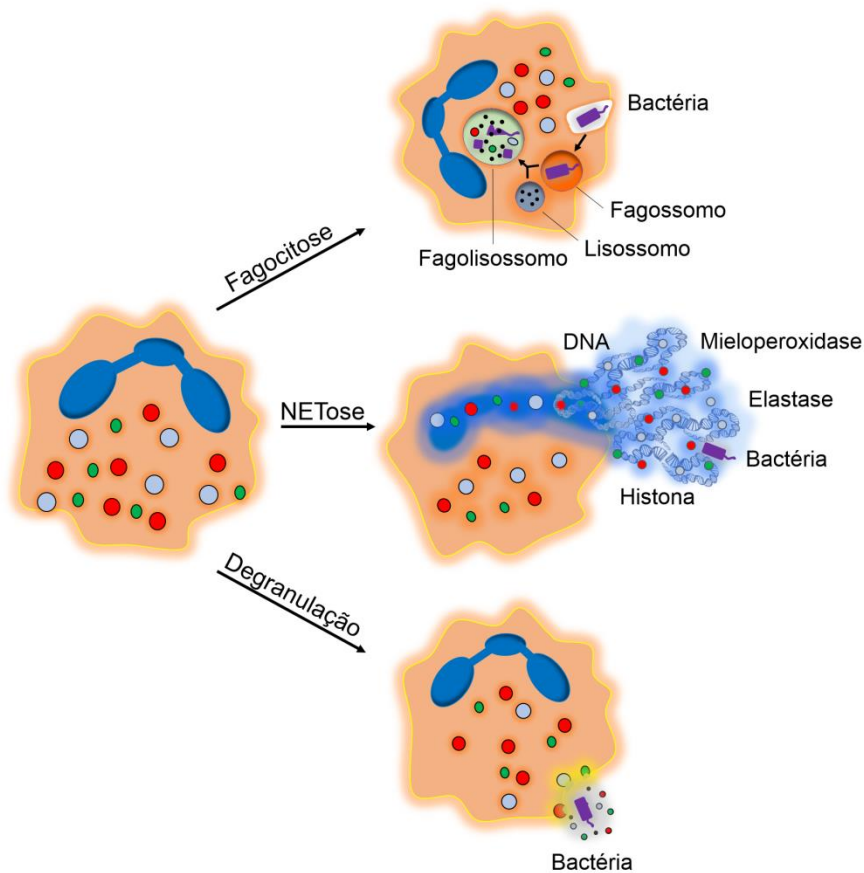
### 1.2.2. Funções e Ação microbicida

Os neutrófilos compõem 50-70% dos leucócitos circulantes e possuem um amplo repertório de funções que inclui o controle de patógenos, produção de citocinas, regulação da resposta imune e inflamatória através da modulação da atividade de macrófagos e indução da produção de anticorpos por linfócitos B, e participação em doenças autoimunes, infecciosas e no câncer (133,158,159). A heterogeneidade dessas células terminalmente diferenciadas é determinada por diversos fatores, como as alterações fenotípicas e funcionais promovidas pela preservação da atividade transcricional e regulação relacionada ao ciclo circadiano, e os estímulos específicos oferecidos no microambiente tecidual (133). Essa característica permite a formação de populações localizadas e distintas de células que podem atuar em múltiplos cenários e desempenhar diferentes funções sobre a imunidade adaptativa (160). A plasticidade destas células ainda é bastante discutida e não se sabe ao certo se ela ocorre somente após a liberação na corrente sanguínea e entrada dos neutrófilos nos tecidos, ou se há uma pré-determinação já na medula óssea. Entretanto, estudos sugerem que neutrófilos recém infiltrados nos tecidos apresentam uma função de patrulha, enquanto células *primadas* por sinais teciduais desenvolvem fenótipos tecido-específicos (133,136).

Esses leucócitos são células fagocíticas essenciais para o controle de infecções por meio de suas ações efectoras e pela geração de grande quantidade de ROS (Figura 1.9). O reconhecimento de patógenos por receptores de membrana promove a ativação de neutrófilos que, ao fagocitarem esses invasores, mobilizam as subunidades citosólicas da NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase e iniciam a formação do complexo enzimático na membrana do fagolisossomo (161,162). Essa enzima inicia uma cascata de sinalização altamente regulada pela ação de kinases e canais de prótons, e resulta na produção de ROS. Além da produção dessas espécies reativas, a fagocitose induz também a fusão das membranas dos grânulos e do fagolisossomo, promovendo a liberação de enzimas e proteínas antimicrobianas nesse compartimento. O patógeno em contato com elevadas concentrações dessas moléculas é, então, eliminado (132,161,162).

As ROS também atuam diretamente sobre os patógenos provocando danos estruturais em seu DNA, lipídeos e proteínas, que facilitam a sua eliminação. Além disso, a produção de ROS é importante para outras ações executadas pelos neutrófilos,

como a degranulação, apoptose e a formação de redes extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* – NETs) (162). Em indivíduos com Doença Granulomatosa Crônica, são observadas mutações na enzima NADPH oxidase, que promovem a formação de complexos enzimáticos não funcionais e, portanto, incapazes de produzir ROS (163). Dessa forma, os neutrófilos desses indivíduos apresentam uma capacidade limitada de degranular e liberar NETs, o que compromete sua ação microbicida e favorece o surgimento recorrente de infecções bacterianas e fúngicas (132,162,164).



**Figura 1.9. Ações microbicidas dos Neutrófilos.**

Os neutrófilos reconhecem os patógenos e empregam diferentes mecanismos microbicidas para eliminá-los. Na fagocitose, o patógeno é internalizado e degradado em fagolisossomos, onde são liberadas enzimas granulares e espécies reativas de oxigênio (ROS). No processo de NETose são liberadas as NETs, compostas de DNA e proteínas, que retêm fisicamente e inativam os patógenos de modo extracelular. Outro mecanismo microbicida é a liberação de enzimas dos grânulos diretamente para o meio extracelular, sem ruptura da membrana plasmática. Imagem própria, baseada em (133).



De forma distinta do mecanismo descrito acima, no qual o conteúdo dos grânulos é liberado no interior do fagolisossomo, a degranulação pode ocorrer também para o meio extracelular (Figura 1.9). Esse processo é induzido por estímulos considerados mais moderados, e é observada a fusão da membrana de vesículas secretórias e grânulos terciários com a membrana plasmática para liberação das proteínas (132). As moléculas presentes nesses grânulos possuem ação enzimática e tóxica que, no meio extracelular, causam inflamação e dano tecidual (161,162). Os peptídeos catiônicos dos neutrófilos, como catelicidinas e  $\alpha$ -defensinas, desempenham um importante papel microbicida, interagindo diretamente com moléculas de carga negativa expressas na membrana dos patógenos e induzindo a formação de poros nessa estrutura. Ademais, esses peptídeos modulam funções imunes dos neutrófilos, como a quimiotaxia, produção de citocinas e inibição da apoptose (161).

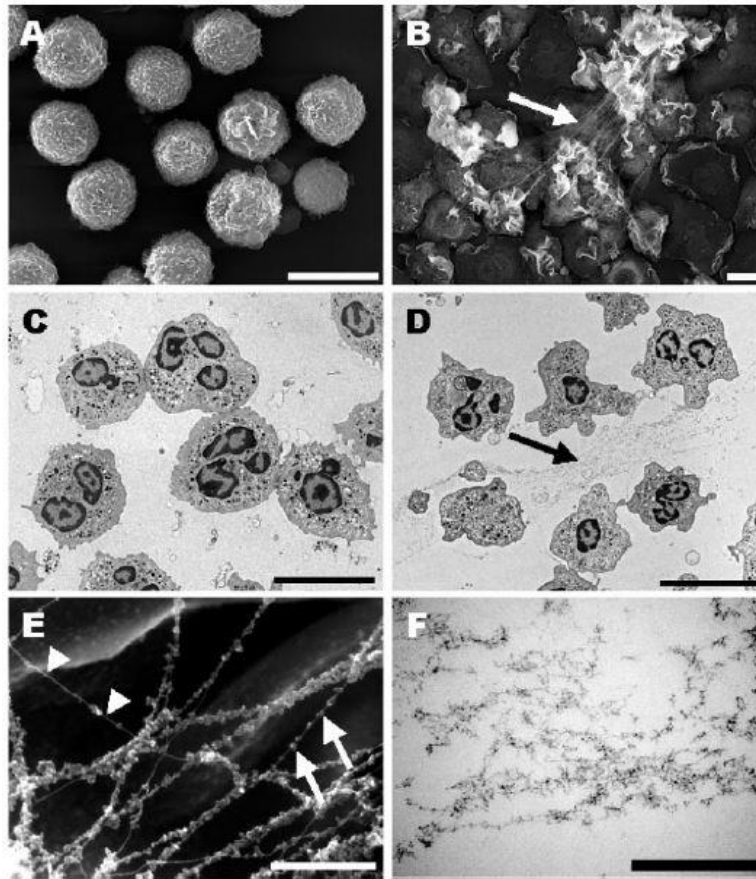
O mecanismo de ação do neutrófilo em resposta a cada estímulo é determinado por um conjunto de variáveis que incluem o microambiente em que ele se encontra, o estado metabólico e o conteúdo proteico de seus grânulos, além da origem e intensidade dos sinais de ativação (165). Um dos fatores que influenciam se o neutrófilo irá fagocitar ou liberar NETs mediante um estímulo é o tamanho e a morfologia das partículas às quais eles são expostos. Em infecções fúngicas, por exemplo, as NETs são essenciais para a retenção física e eliminação das hifas, que são estruturas grandes e não podem ser fagocitadas. As leveduras, por outro lado, são estruturas pequenas que podem ser reconhecidas pelo receptor Dectina-1 e fagocitadas. Para compreender a regulação entre esses mecanismos, é necessário identificar os eventos comuns, como a produção de ROS, e os *checkpoints* que os diferenciam, como a degradação do citoesqueleto de actina, que é observada durante a formação das NETs (142,165,166). A formação destas estruturas requer a participação da NE e da MPO, que migram para o núcleo e promovem a descondensação da cromatina (167). De modo distinto, durante a fagocitose os grânulos azurofílicos se fundem à membrana do fagossomo e contribuem para a degradação do microrganismo ali presente. Assim, Branzk e colaboradores (2015) demonstraram que a fagocitose regula negativamente a liberação de NETs pela retenção dos grânulos contendo elastase na membrana do fagossomo, impedindo que esta enzima migre para o núcleo (168). Na infecção fúngica, essa regulação é dependente do reconhecimento das leveduras pela Dectina-1, que promove a fagocitose e a formação do fagossomo. Na ausência desse receptor ou na presença de hifas, que

não são fagocitadas, a resposta do neutrófilo é desviada para a formação de NETs (168). A produção de IL-1 $\beta$  e o recrutamento de neutrófilos durante as infecções também são regulados pelo tamanho dos patógenos, o que evita um influxo desnecessário de neutrófilos para os locais de infecção e controla a liberação de NETs, minimizando os danos teciduais provocados por essas estruturas (169).

Além dos neutrófilos clássicos, um subgrupo de neutrófilos de baixa densidade (LDNs, *Low density Neutrophils*) é identificado na fração de PBMCs após a separação por gradiente de densidade. Esses LDNs podem apresentar o fenótipo de células maduras que sofreram degranulação ou de células imaturas, com o núcleo parcialmente lobulado, reduzida capacidade migratória e fagocítica, atividade imunossupressora e uma assinatura transcricional diferenciada (170–172). Eles participam da patogênese de neoplasias e autoimunidades, como a Esclerose Múltipla e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE, *Systemic Lupus Erythematosus*). No SLE, foi observado que os LDNs liberam NETs espontaneamente e que estas estruturas apresentam maior quantidade de DNA mitocondrial oxidado, o que favorece a produção de IFN tipo I (173,174).

### **1.2.3. Redes Extracelulares de Neutrófilos**

As NETs foram inicialmente descritas em 2004 por Brinkmann e colaboradores, que identificaram uma estrutura filamentosa composta por DNA associado a proteínas granulares e nucleares com atividade antimicrobiana (175). Nesse estudo foi demonstrado que a ativação dos neutrófilos por PMA (acetato miristato de forbol), LPS ou IL-8 induzia alterações morfológicas, como a perda da lobulação do núcleo, ruptura da membrana nuclear e emissão de protusões da membrana plasmática, que precediam a liberação de fibras alongadas de DNA associadas a complexos proteicos globulares (Figura 1.10). Essas redes extracelulares demonstraram-se capazes de capturar e restringir fisicamente bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri*, concentrando ao seu redor moléculas antimicrobianas, como histonas, NE, MPO e catepsina G (175).

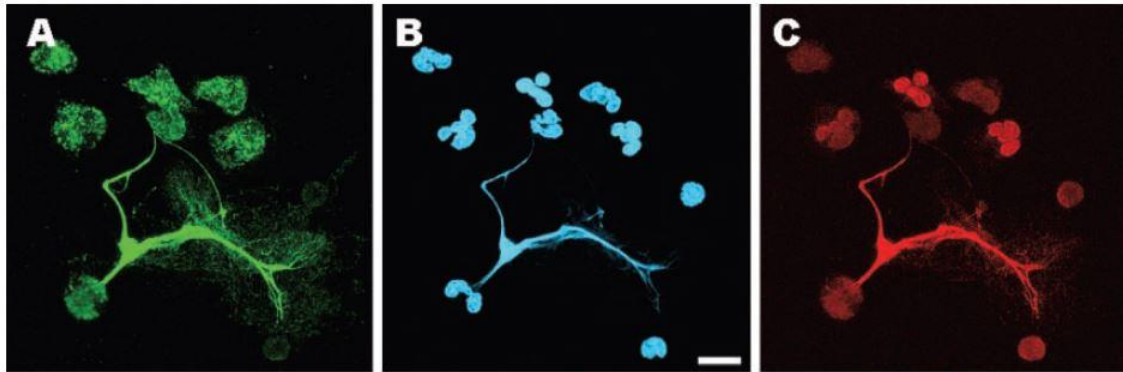


**Figura 1.10. Microscopia de neutrófilos em repouso e liberação de NETs.**

(A, C) Neutrófilos em repouso com morfologia arredondada, núcleo multilobulado e citoplasma repleto de grânulos, ausência de fibras extracelulares. Neutrófilos estimulados com PMA (B) ou IL-8 (D, F) apresentam morfologia achatada e protusões de membrana, e formam fibras de cromatina no espaço extracelular (setas em B e D). (E) Imagem de alta resolução das NETs mostrando fibras finas com diâmetro entre 15-17 nm (cabeças de seta) e os domínios globulares com diâmetro de 25 nm (setas). (F) NETs no espaço extracelular sem associação com a membrana plasmática. (A, B, E) Microscopia eletrônica de varredura; (C, D, F) Microscopia eletrônica de transmissão. (A-D) Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ; (E, F) 50  $\mu\text{m}$ . Adaptado de (175).

A quantidade de material liberado e a composição das NETs podem sofrer pequenas variações em função dos estímulos, mas as proteínas classicamente descritas em sua composição são a NE, a MPO e a catepsina G, derivadas dos grânulos azurofílicos, e as histonas, provenientes do núcleo (Tabela 1.1) (175–177). Assim, a visualização dessas estruturas pode ser feita por microscopia de fluorescência com a imunomarcção das proteínas por anticorpos específicos e com corantes para o DNA, como o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) (Figura 1.11). A colocalização extracelular do DNA com proteínas, como a elastase, a mieloperoxidase ou a histona 3

citrulinada, são utilizadas para a identificação das NETs em estudos *in vitro* e em biopsias de tecido (175,178). Além disso, as NETs podem ser detectadas e quantificadas como complexos de DNA-proteína no sobrenadante de cultivos celulares e na circulação por ensaio imunoenzimático (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), com anticorpos para essas moléculas (179–181).



**Figura 1.11. Microscopia confocal de fluorescência das NETs.**

Neutrófilos estimulados com IL-8 e marcados para (A) elastase neutrofílica, (B) DNA e (C) complexos Histona 2A-2B-DNA. Nas células, a elastase é observada em grânulos citoplasmáticos, enquanto o DNA e as histonas são marcados no núcleo. Nas fibras extracelulares, a marcação para os três componentes se sobrepõe. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ . Adaptado de (175).

O DNA é o principal componente dessas redes, atuando como um arcabouço ao qual as proteínas se associam, e a degradação dos filamentos de DNA pelo tratamento das NETs com nucleases acarreta a perda da função antimicrobiana e da barreira física. Assim, compreende-se que a manutenção da estrutura física das NETs é fundamental para reter os patógenos capturados e concentrar as proteínas ao seu redor, inativando fatores de virulência e induzindo a morte dos mesmos. Além disso, o DNA possui carga negativa, o que favorece a interação eletrostática com moléculas positivamente carregadas na superfície de bactérias e auxilia na sua retenção física (182,183). Alguns estudos sugerem que parte do DNA presente nas NETs é derivado das mitocôndrias, e que este material contribui para a progressão de doenças, como o SLE (184–186).

**Tabela 1.1. Proteínas identificadas nas NETs.**

<b>Localização celular</b>	<b>Nome da proteína</b>
Grânulos	Elastase neutrofílica (NE)
	Mieloperoxidase (MPO)
	Catepsina G
	Catelicidina
	Defensinas 1 e 3
	Lactoferrina
	Proteinase 3
	Proteína de aumento da permeabilidade/bactericida
	Lisozima C
	Azurocidina
Núcleo	Histonas H2A, H2B, H3, H4
	Antígeno nuclear de diferenciação mieloide
Citoplasma	Proteínas S100 ligantes de cálcio A8, A9, A12
Citoesqueleto	Actina ( $\beta$ e/ou $\gamma$ )
	Alfa-actina (1 e/ou 4)
	Citoqueratina-10
	Miosina-9
	Plastina-2
Peroxisoma	Catalase
Enzimas Glicolíticas	Alfa enolase
	Transquetolase

Adaptado de (187).

Atualmente, são reconhecidos diversos estímulos fisiológicos e sintéticos capazes de induzir a liberação das NETs. Entre eles destacam-se patógenos, como as bactérias *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*, os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, os vírus Influenza e HIV-1, os protozoários *Plasmodium falciparum* e *Leishmania amazonensis*, citocinas como IL-8 e TNF- $\alpha$ , plaquetas ativadas, e concentrações elevadas de glicose (177,188). Além destes, são também descritas como indutoras da liberação de NETs moléculas que aumentam o influxo de cálcio nos neutrófilos, como o PMA, a fito-hemaglutinina (PHA, *Phytohemagglutinin*), a ionomicina e os cristais de urato monossódico (175,188).

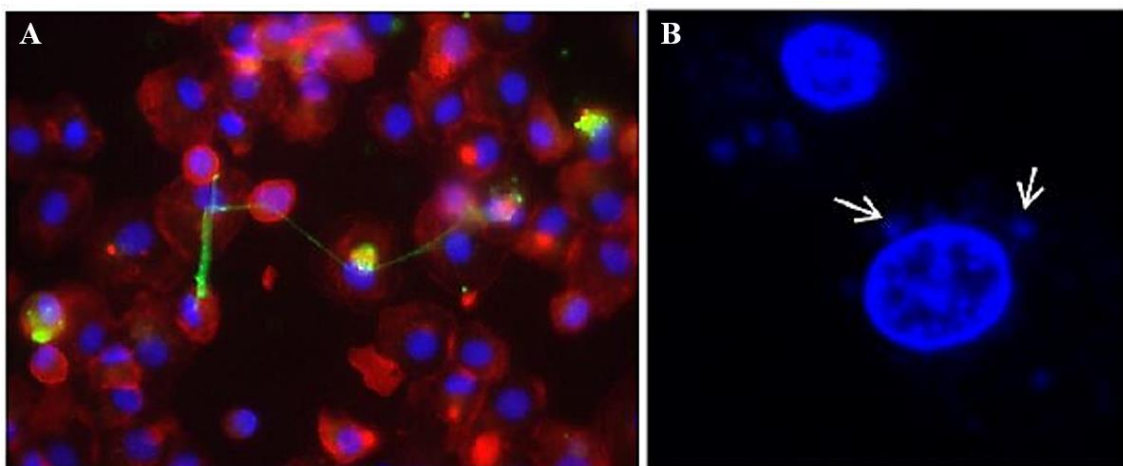
As NETs foram contempladas, inicialmente, por sua potente atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos. Entretanto, essas estruturas também desempenham um papel importante em cenários como o câncer, a

autoimunidade e a trombose, e são capazes de modular a atividade dos diferentes tipos celulares com os quais interagem (189–194). Os ácidos nucleicos próprios e autoantígenos, geralmente, não são reconhecidos pelos receptores da imunidade inata. Entretanto, no caso de doenças autoimunes, como o SLE, esse material é reconhecido como não próprio e dispara uma resposta inflamatória nociva. Nessa doença, as proteínas catelicidina e HMGB1, presentes nas NETs, formam complexos com o DNA e RNA próprios e promovem o reconhecimento pelos receptores TLR9 e TLR7/8, respectivamente, induzindo a produção de IFN tipo I pelas células dendríticas (191,195). Além disso, nos pacientes com SLE, é descrita uma deficiência na atividade plasmática da DNase-I, enzima responsável pela hidrólise do DNA de fita dupla, que resulta em degradação das NETs e manutenção da homeostase (191,194,196).

De fato, a liberação exacerbada de NETs nos tecidos, assim como a detecção de níveis elevados no plasma, está associada a uma intensa resposta inflamatória e ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Dessa forma, a degradação das NETs pela ação da DNase-I e o *clearance* dessas estruturas por fagócitos, como os macrófagos, são eventos essenciais (197). Os monócitos contribuem para a eliminação das NETs, embora também sejam capazes de liberar redes extracelulares (ETs, *Extracellular Traps*) após interação com a NE e histonas citrulinadas (198). Nos tecidos, os macrófagos participam da homeostase e são responsáveis pela fagocitose de células senescentes e de moléculas extracelulares com potencial inflamatório. Farrera e colaboradores, demonstraram que os macrófagos internalizam as NETs de forma ativa e dependente do rearranjo do citoesqueleto, e que as enzimas lisossomais participam da degradação intracelular dessas redes (222) (Figura 1.12). A internalização das NETs aumenta na presença da DNase I, sugerindo que a fragmentação do DNA facilita o *clearance* e, provavelmente, ocorre de forma cooperativa *in vivo*. Ainda, a produção de citocinas pelos macrófagos não é alterada pela internalização, sugerindo um processo silencioso (199). Entretanto, os efeitos da internalização das NETs sobre a resposta inflamatória de macrófagos ainda são controversos.

Alguns autores reportam alteração na produção de citocinas, como aumento de IL-1 $\beta$  em macrófagos expostos simultaneamente às NETs e ao LPS, demonstrando que, em um cenário infeccioso, a presença das NETs potencializa a liberação dessa citocina inflamatória (200). Recentemente, nosso grupo demonstrou que as NETs são capazes de carrear micro-RNAs com padrões que variam de acordo com o estímulo, os quais

apresentam potencial de modular a atividade dos macrófagos, como a produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS (192). No contexto da sepse, a proteína HMGB1 presente nas NETs é reconhecida pelo receptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*) expresso nos macrófagos, desencadeando eventos intracelulares que promovem a liberação de catepsina B dos lisossomos, ativação da caspase-1 e morte celular por piroptose (201). Os efeitos celulares também variam de acordo com o tempo de exposição às NETs, pois uma exposição breve de macrófagos e células dendríticas a essas estruturas induz ativação e expressão de moléculas coestimulatórias, enquanto a exposição prolongada induz dano mitocondrial e morte por apoptose (202).



**Figura 1.12. Interação de macrófagos com as NETs.**

Microscopia de fluorescência de macrófagos primários derivados de monócitos humanos interagindo com as NETs. (A) Marcação para elastase (verde), faloidina (vermelho) e DNA (azul). Aumento original 40x. (B) Microscopia confocal demonstrando a internalização de NETs (setas) por macrófagos. Marcação com DAPI. Aumento original 60x. Adaptado de (199).

Diante da barreira imune estabelecida pelas NETs, alguns patógenos desenvolveram mecanismos de evasão, que incluem a inibição da liberação dessas redes pela presença de moléculas de superfície que reduzem a ativação do neutrófilo, a degradação do DNA pela produção de nucleases, e a inativação de enzimas antimicrobianas por fatores de virulência, como é o caso da proteína M1 do grupo A de *Streptococcus* que inibe diretamente a catelicidina presente nas NETs (203–207). Outro mecanismo de escape da resposta imune mediada por neutrófilos é a inibição de vias oxidativas que promovem a produção de ROS pela enzima NADPH oxidase (162,208). Como mencionado anteriormente, essas espécies reativas participam da sinalização

intracelular envolvida na degranulação, na liberação das NETs e na eliminação intracelular de patógenos fagocitados. A inibição dessa via por patógenos, bem como a deficiência observada na Doença Granulomatosa Crônica, compromete de modo significativo a resposta imune inata e facilita o estabelecimento de infecções (208–210).

Além dos neutrófilos e dos monócitos/macrófagos, outras células do sistema imune são capazes de liberar redes extracelulares de DNA associadas a proteínas com função antimicrobiana, como os eosinófilos e mastócitos, ou de comunicação celular, como os linfócitos. Os estímulos e mecanismos de formação dessas ETs, assim como a composição proteica e a origem do DNA (mitocondrial ou nuclear), variam entre os tipos celulares (211–218).

#### **1.2.4. Mecanismos moleculares de produção de NETs**

Nos neutrófilos, os mecanismos moleculares da formação e liberação de NETs constituem um processo com diferentes etapas que envolvem a produção de ROS, a mobilização da NE e da MPO dos grânulos azurofílicos para o núcleo, a citrulinização de histonas e a ruptura da membrana plasmática com liberação da cromatina (183). A ativação dos neutrófilos ocorre pelo reconhecimento de diferentes estímulos (Tabela 1.2) via receptores da imunidade inata, como as integrinas e os TLRs, receptores do tipo Fc, que reconhecem patógenos opsonizados, e receptores de citocinas (183,219–221). As vias de sinalização iniciadas podem ser distintas de acordo com o receptor envolvido, mas resultam de modo comum, na liberação de cálcio do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, aumento da atividade da proteína kinase C (PKC) (222,223). O PMA é uma molécula sintética que se liga diretamente à PKC e induz ativação celular, sendo amplamente utilizada como indutor da liberação de NETs em ensaios *in vitro* (186,224–226).



**Tabela 1.2. Indutores da liberação de NETs.**

<b>Bactérias</b>	<i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> e Grupo A
<b>Vírus</b>	Influenza A SARS-CoV-2 Vírus da Imunodeficiência Humana 1 Vírus da Leucemia Felina Vírus Sincicial Respiratório
<b>Fungos</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i>
<b>Parasitas</b>	<i>Leishmania amazonensis</i> <i>Toxoplasma gondii</i>
<b>Moléculas e fatores endógenos</b>	Glicose Fator ativador de plaquetas Íons de cálcio IL-8 TNF- $\alpha$ Anticorpos
<b>Derivados de patógenos</b>	Leucocidina de Panton-Valentine Lipofosfoglicana LPS (lipopolissacarídeo)
<b>Moléculas sintéticas</b>	PHA (fito-hemaglutinina) PMA

Adaptado de (177,188).

A formação das NETs tem início com a ativação celular, que induz a associação das subunidades citoplasmática e membranar da NADPH oxidase e a ativação desse complexo enzimático, promovendo a formação de ROS (188). A perda da morfologia multilobulada do núcleo é uma das etapas iniciais, em que ocorre a descondensação da cromatina, e está relacionada à atividade da NE e da MPO (167,188). Com o aumento da concentração de ROS, ocorre desestabilização das membranas dos grânulos e liberação da NE, que é transportada para o núcleo e catalisa a clivagem da histona H1. A MPO, liberada mais tardiamente dos grânulos azurofílicos, também é direcionada para o núcleo e atua na descondensação da cromatina de modo independente da sua atividade enzimática (167,227).

A enzima nuclear peptidil-arginina desaminase 4 (PAD4) é ativada pelo aumento da concentração citoplasmática de cálcio e catalisa a desaminação de resíduos de arginina em citrulina, em três dos quatros cores das histonas, o que desestabiliza os nucleossomas e favorece a descondensação da cromatina (228–231). Com a desintegração da membrana nuclear, o DNA é liberado no citoplasma e se associa às proteínas granulares e citoplasmáticas (Tabela 1.1). Em seguida, com a ruptura da membrana plasmática e contração da célula, ocorre a extrusão dessas redes de DNA e proteínas para o meio extracelular. O transporte das enzimas granulares para o núcleo, bem como a contração da célula para a liberação das NETs, são eventos que demandam a participação da tubulina e dos filamentos de actina, componentes do citoesqueleto (166). Entretanto, a regulação exata desse mecanismo ainda não está clara. Devido à ruptura da membrana plasmática e perda da viabilidade, esse processo é considerado mecanismo de morte celular e chamado de NETose clássica ou suicida (164,175,182).

Como mencionado anteriormente, indivíduos com a Doença Granulomatosa Crônica apresentam uma deficiência na produção de ROS e, com isso, seus neutrófilos são incapazes de formar NETs quando estimulados com PMA (164). Entretanto, estudos realizados com diferentes patógenos, como *S. aureus*, *Candida albicans* e *L. amazonensis*, demonstram uma via alternativa de liberação de NETs que é independente dessa produção. Nessa via alternativa, a liberação das NETs ocorre rapidamente após a exposição ao agente indutor e não é observada ruptura da membrana plasmática, sendo assim denominada NETose vital. A membrana nuclear sofre uma dilatação com a formação de *blebbings* e a cromatina descondensada é transportada por vesículas para o meio extracelular, onde se mistura com as proteínas granulares liberadas por degranulação formando as NETs. Como a membrana plasmática se mantém intacta, os neutrófilos remanescentes se apresentam como células anucleadas, com alguns grânulos citoplasmáticos e com capacidade de fagocitar e migrar (142,232–234).

### **1.2.5. NETs em doenças infecciosas e crônicas**

O papel das NETs foi investigado em diversas infecções de origem bacteriana, fúngica, viral e parasitária (175,187,220,235). Nos primeiros anos após sua descoberta, acreditava-se que esse papel era exclusivamente protetor e capaz de controlar os patógenos. Entretanto, com o avanço dos estudos foi observado que as NETs podem

potencializar o quadro inflamatório e contribuir na patogênese de doenças crônicas, como a fibrose cística e o câncer (142).

As NETs são compostas por uma ampla gama de moléculas com ação antimicrobiana e a contribuição de cada uma delas para a resposta imune varia de acordo com o cenário observado. A presença de algumas proteínas é identificada, preferencialmente, em determinadas patologias, como é o caso da HGMB1 no SLE (195). A MPO, por exemplo, possui ação virucida contra o HIV-1 e participa da eliminação de bactérias, mas também contribui para a lesão tecidual em infecções respiratórias e para o desenvolvimento de doenças autoimunes (236–240). Assim, a detecção de determinadas proteínas, a proporção em que são encontradas nas NETs e o seu papel na imunidade devem ser considerados de forma particular em cada patologia.

A contribuição das NETs para o controle de infecções bacterianas é amplamente conhecida. Bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus* e o *S. pneumoniae*, induzem a liberação dessas redes e são retidas fisicamente por elas (241,242). As NETs também são estimuladas por bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *S. flexneri*, e desempenham um papel importante durante infecções gastrointestinais, inativando fatores de virulência. Contudo, as proteases presentes nessas redes parecem danificar as células epiteliais e contribuir para a lesão tecidual (175,197).

O *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, é uma bactéria intracelular que utiliza os fagócitos para replicação e disseminação pelo organismo. Em resposta à ativação pelo *Mycobacterium*, os neutrófilos liberam a proteína do choque térmico 72 (Hsp72, *Heat shock protein 72*) e NETs, de modo dependente da produção de ROS. As NETs capturam a bactéria, mas são incapazes de eliminá-la, enquanto os macrófagos fagocitam essas redes e são ativados, produzindo níveis elevados de citocinas inflamatórias. A presença da proteína Hsp72 associada às NETs confere um potencial inflamatório específico a estas estruturas e é necessária para a ativação dos macrófagos nesse contexto (243,244).

Na leishmaniose, a forma promastigota do parasita é inoculada na derme do hospedeiro vertebrado e induz uma resposta inflamatória que envolve o recrutamento e a ativação dos neutrófilos (245). Esses promastigotas apresentam uma superfície recoberta por lipofosfoglicanas que são reconhecidas pelos neutrófilos e, no caso da *L. amazonensis*, induzem a liberação de NETs capazes de imobilizar e eliminar o parasita

de modo dependente de histonas. A susceptibilidade dos parasitas aos efeitos promovidos pelas NETs varia entre as espécies de *Leishmania*, sendo algumas capazes de evadir essa resposta pela expressão de nucleases (242,245).

A imobilização física de patógenos extracelulares é uma característica das NETs que se destaca em infecções fúngicas. Essas redes concentram moléculas com ação antifúngica, como a calprotectina, que contribuem de forma ativa para o controle da infecção (168). A *Candida albicans*, por exemplo, induz a ativação dos neutrófilos pelo reconhecimento da  $\beta$ -glucana da parede celular e estimula a liberação de NETs de modo dependente da fibronectina da matriz extracelular. Essa via de liberação de NETs é independente da produção de ROS e ocorre rapidamente, sendo fundamental para destruição das hifas que não podem ser eliminadas por fagocitose (168,187,246,247).

A liberação de NETs também contribui para a imunopatogênese de diversas infecções virais. A ativação de neutrófilos pelo HIV-1 e pelo CHIKV, agente etiológico da febre chikungunya ocorre pelo reconhecimento do RNA viral por receptores TLR7 e TLR8, enquanto o vírus sincicial respiratório é reconhecido pela proteína de fusão, expressa em sua superfície, pelo receptor TLR4 (220,221,248,249). Esses três vírus induzem a liberação de NETs pela via clássica, ou seja, de modo dependente da produção de ROS. As NETs apresentam moléculas com atividade antiviral conhecida, como as histonas, mieloperoxidase, catelicidina e  $\alpha$ -defensinas, e são capazes de ativar células dendríticas plasmocitóides induzindo a produção de elevadas concentrações de IFN tipo I, que promove a expressão de ISGs e estabelece um estado antiviral nas células alvo (100,191,249,250). Esses efeitos antivirais são capazes de inativar o CHIKV *in vitro* e parecem estar relacionados ao controle a carga viral plasmática dos pacientes com febre chikungunya (248). Na infecção pelo vírus sincicial respiratório, as NETs capturam as partículas virais e reduzem sua disseminação entre as células epiteliais do pulmão; entretanto, é observada uma produção exacerbada dessas redes, o que contribui para a obstrução das vias aéreas (221,251).

A atual pandemia do novo coronavírus, o SARS-CoV-2, trouxe inúmeros questionamentos para a comunidade científica, e o efeito prejudicial das NETs na patogênese dessa infecção se tornou um importante alvo de pesquisa, com potencial aplicação terapêutica (252,253). Esse vírus infecta um amplo repertório de células que expressam o receptor para a enzima conversora de angiotensina 2 e induz uma resposta

imune que varia entre os indivíduos (254). Nos pacientes com a forma grave, é observada uma intensa resposta inflamatória com produção exacerbada de citocinas e quimiocinas que promovem morte celular e lesão tecidual (255). Nesse cenário, os neutrófilos são recrutados para os pulmões, ativados e estimulados a executarem suas funções efetoras, o que inclui a liberação de NETs. Quando exacerbada, essa liberação induz a apoptose de células epiteliais pulmonares e agrava as lesões teciduais (253,256). Além disso, as NETs se acumulam nos vasos sanguíneos, favorecendo a agregação plaquetária e a formação de microtrombos que prejudicam a circulação e contribuem para a coagulopatia observada nos pacientes com a forma grave da doença (257–259). Assim, estratégias de inibição da formação das NETs ou de degradação das estruturas liberadas *in vivo* vêm sendo avaliadas como possíveis intervenções para minimizar os danos teciduais e vasculares descritos. Uma das estratégias propostas é a degradação do DNA extracelular presente nas NETs pelo uso da dornase alfa. Esse fármaco é uma deoxiribonuclease humana recombinante utilizada no tratamento da fibrose cística para a redução da viscosidade do muco nas vias aéreas, facilitando a eliminação do mesmo e melhorando a capacidade respiratória dos pacientes (252,253,260). Estudos preliminares, *in vitro* e *in vivo*, demonstram que a degradação das NETs, liberadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2, pela dornase-alfa, também promove uma melhora do quadro clínico (261,262). Entretanto, os ensaios clínicos para comprovação da eficácia e segurança desse tratamento, bem como a determinação da dose e via de administração, ainda estão em desenvolvimento.

A participação das NETs em doenças vasculares está relacionada à retenção física de plaquetas, hemácias e moléculas, como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, que favorecem a coagulação e a estabilização de trombos (224,263). As histonas, presentes nas NETs, induzem a ativação de plaquetas e a expressão do fator tecidual por células endoteliais, monócitos e macrófagos, contribuindo para a agregação plaquetária e ativação da via extrínseca da coagulação, respectivamente (264,265). As plaquetas ativadas, por sua vez, expressam moléculas como HMGB1 e P-selectina, que estimulam, via TLR4 e RAGE, a liberação de NETs (266–268). Esse aumento da coagulação intravascular pelas NETs é descrito em doenças como sepse, diabetes mellitus, aterosclerose, no câncer e na infecção pelo SARS-CoV-2 (259,269–272). Nos pequenos vasos, a obstrução vascular relacionada às NETs ocorre também devido à formação de extensos agregados de DNA extracelular e proteínas (273).

Em doenças autoimunes ocorre uma produção elevada de NETs que contribui para a resposta imune contra antígenos próprios e amplificam a inflamação. No SLE, essas estruturas se acumulam no plasma devido à deposição de proteínas C1q do sistema complemento, que inibem sua degradação pela DNase I e favorecem a produção de autoanticorpos, agravando a doença (194,274). Nessa patologia, são identificados os LDNs, que apresentam maior capacidade de liberar NETs e estimular a síntese de IFN- $\alpha$  por células dendríticas plasmocitóides (275). A ativação dessas células ocorre pelo reconhecimento do DNA e da proteína HMGB1, encontrada nas NETs liberadas nessa condição, pelos receptores TLR9 e RAGE, respectivamente (276–278). O IFN- $\alpha$  também induz a liberação de NETs que, além de promoverem ativação imune pela exposição de autoantígenos, contribuem para os danos vasculares pela ação citotóxica das histonas sobre as células endoteliais (239).

As NETs também desempenham um papel importante na progressão tumoral. Essas estruturas são capazes de se depositar na microvasculatura e capturar células tumorais circulantes, facilitando o desenvolvimento de metástases (279,280). As NETs contribuem para a adesão de células tumorais ao endotélio e invasão tecidual, de modo dependente do DNA. As enzimas presentes nessas estruturas atuam sobre a matriz extracelular podendo induzir a proliferação celular e a angiogênese (281,282). A formação de agregados celulares tumorais também favorece a disseminação do tumor através da circulação e o depósito destes agregados em outras regiões (283). Recentemente, foi descrito que a matriz metaloproteinase 9 e a NE das NETs clivam a laminina na matriz extracelular, induzindo uma sinalização via integrina que promove a reativação de células tumorais quiescentes e o crescimento do tumor (189). As NETs também participam da progressão tumoral em modelo *in vitro* de glioma, induzindo a proliferação, migração e invasão das células tumorais. A interação da proteína HMGB1, com o receptor RAGE, expresso na membrana das células, induz a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de IL-8, que recruta os neutrófilos e estimula a liberação de NETs no microambiente tumoral, amplificando essa interação de modo favorável ao tumor (284).

As NETs configuram um importante mecanismo da imunidade inata capaz de restringir fisicamente agentes infecciosos, inativar fatores de virulência e modular a atividade celular. O efeito dessas redes, entretanto, é dependente do contexto e da quantidade em que são liberadas, podendo ser benéfico no controle de infecções ou prejudicial, ao ampliar a resposta inflamatória e causar lesão tecidual. A visualização

das NETs em biopsias e a detecção de complexos formados pela associação do DNA com proteínas, como elastase e MPO, corroboram os achados *in vitro* sobre o papel dessas estruturas em diferentes condições (178,181,285,286).

### 1.3. NETs e a infecção pelo HIV-1

A infecção pelo HIV-1 provoca alterações imunes que comprometem a capacidade de defesa do hospedeiro. Os neutrófilos, por exemplo, sofrem redução da sua capacidade fagocítica, migratória e antimicrobiana, e alguns pacientes apresentam neutropenia. Essa neutropenia está relacionada a diferentes fatores como a morte celular por apoptose, o aumento da infiltração dessas células nos tecidos e as alterações na hematopoese, que podem ser provocadas diretamente pelo HIV-1 ou pelos fármacos utilizados na terapia antirretroviral (79). Nessa infecção, a inflamação crônica promovida pela replicação viral, a persistente ativação plaquetária, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a translocação microbiana favorecem a ativação dos neutrófilos. Além disso, estas células são recrutadas para os sítios inflamatórios, como o GALT, e recebem estímulos que, possivelmente, induzem a liberação de NETs (76,287,288).

As NETs são compostas por uma ampla gama de moléculas e, algumas delas, estudadas isoladamente, apresentam efeito modulador sobre a infecção pelo HIV-1. A catepsina G, por exemplo, é uma das serino-proteases presentes nos grânulos dos neutrófilos capazes de induzir a quimiotaxia e a produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos, e favorecer a replicação viral nessas células (289). De modo distinto, a  $\alpha$ -defensina-1 possui ação antiviral, inativando diretamente o vírus, na ausência de soro, e inibindo a replicação em células T CD4<sup>+</sup> na presença do mesmo (290). A catelicidina, peptídeo catiônico presente nos grânulos primários, interage com a transcriptase reversa do HIV-1 e inibe sua atividade, enquanto a NE interage com a gp41 do envelope viral e favorece a entrada do vírus na célula-alvo (291,292). A MPO, por sua vez, possui um papel dual na infecção pelo HIV-1, podendo induzir a ativação do LTR no genoma ou produzir íons com potencial antiviral (293).

Em 2012, Saitoh e colaboradores realizaram o primeiro estudo sobre a relação das NETs, com a infecção pelo HIV-1. Esse estudo demonstrou que o reconhecimento do RNA viral, via receptores TLR7 e TLR8 dos neutrófilos, induz a produção de ROS e a liberação de NETs capazes de reter fisicamente o HIV-1 e inativá-lo. O efeito antiviral dessas redes se mostrou dependente das  $\alpha$ -defensinas e da atividade enzimática da

MPO. Além disso, foi observado que o HIV-1 inibe, indiretamente, a formação de NETs, pela indução da produção de IL-10 por células dendríticas (220). A liberação de NETs com ação antiviral nos sítios de infecção pelo HIV-1, como na mucosa genital feminina, sugere que essas estruturas possam desempenhar um papel protetor contra a infecção *in vivo* (294). Na infecção de macacos pelo SIV é observado um aumento da produção de NETs e da detecção destas estruturas em biopsias de intestino, pulmão, fígado e coração. Os neutrófilos isolados de animais na fase crônica produzem níveis elevados de NETs, de modo espontâneo e estimulado por PMA, e a terapia antirretroviral reduz, parcialmente, essa produção. As biopsias demonstram que as NETs interagem com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> *in vivo* e capturam essas células nas redes de DNA, induzindo a sua morte por apoptose (285).

A resultante sistêmica entre ação virucida e o efeito deletério das NETs sobre os linfócitos no indivíduo vivendo com HIV é uma questão a ser investigada. A presença de moléculas tóxicas nas NETs está associada à morte de células do sistema imune, endoteliais e epiteliais (295). Assim, na infecção pelo HIV-1, deve-se considerar a possível contribuição dessas redes para a lesão do epitélio intestinal e o fenômeno de translocação microbiana. Por outro lado, a inativação direta de partículas virais e a modulação da replicação viral nas células alvo é um importante mecanismo da imunidade inata a ser explorado. O controle da replicação mediado pelas NETs nos estágios iniciais da infecção pelo HIV-1 poderia reduzir o *pool* de células infectadas que se tornam reservatórios na fase crônica.

A literatura sobre o papel das NETs na infecção pelo HIV-1 é escassa e restrita ao efeito direto sobre o vírus. Em outras palavras, não havia até recentemente, análises quanto ao efeito de NETs sobre a replicação do HIV-1. No entanto, em estudos recentes conduzidos por nosso grupo, foi visto que as NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis reduzem a replicação do HIV-1 em macrófagos (296,297). Desse modo, o presente estudo teve por hipótese que neutrófilos de pessoas vivendo com HIV seriam capazes de liberar NETs, e que estas estruturas também promoveriam a redução do crescimento viral em macrófagos, possivelmente restringindo a propagação viral em sítios ricos em células permissivas.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar se neutrófilos de pessoas vivendo com HIV são capazes de liberar NETs, e se estas modificam a replicação viral em macrófagos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença de marcadores de NETs nos plasmas de PVH;
- Investigar a presença de marcadores plasmáticos de translocação microbiana;
- Verificar a capacidade de liberação de NETs por neutrófilos de PVH;
- Analisar a capacidade das NETs obtidas de neutrófilos de PVH de modular a replicação do HIV-1 em macrófagos infectados *in vitro*;
- Estudar o papel de moléculas associadas às NETs na modulação da replicação do HIV-1 por estas estruturas, com ênfase na mieloperoxidase;
- Avaliar o efeito das NETs sobre a integração do cDNA do HIV-1 no genoma de macrófagos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aprovação ética.**

Os procedimentos experimentais utilizando células humanas de indivíduos saudáveis e de pessoas vivendo com HIV foram realizados com amostras de sangue obtidas após consentimento informado por escrito, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob o número 397-07, em nome de Dumith Chequer Bou-Habib e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Geral de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro, Brasil) sob o número 008/2010, em nome de José Henrique Pilotto. As amostras de sangue de doadores saudáveis foram fornecidas como *buffy coats* pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e as amostras de cerca de 10 mL de sangue periférico de PVH foram fornecidas em tubos de coleta, contendo o anticoagulante EDTA pelo Hospital Geral de Nova Iguaçu.

#### **3.2. Classificação das pessoas vivendo com HIV.**

As amostras obtidas foram classificadas em coortes de acordo com a carga viral plasmática presente no momento da coleta. A quantificação da carga viral foi realizada por RT-PCR, com limite inferior de detecção equivalente a 40 cópias de RNA viral/mL (Abbott RealTime HIV-1, Abbott Laboratories, Chicago, EUA), no Hospital Geral de Nova Iguaçu, que também forneceu as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, avaliadas por citometria de fluxo, (BD Multitest, BD Bioscience, San Jose, EUA), e os dados sobre sexo dos participantes. As coortes foram definidas como: indetectável (carga viral abaixo do limite de detecção -  $\leq 40$  cópias de RNA viral/mL), baixa (inferior a 10 mil cópias/mL), intermediária (entre 10 e 100 mil cópias/mL) e alta (superior a 100 mil cópias/mL). Todos os participantes estavam submetidos à terapia antirretroviral de alta eficiência no momento da coleta.

#### **3.3. Detecção de complexos DNA-elastase.**

Com a finalidade de identificar marcadores de NETs no plasma, complexos DNA-elastase foram investigados em pessoas vivendo com HIV e em indivíduos saudáveis, pelo método de ELISA. Primeiramente, a placa de poliestireno foi sensibilizada com 2,5 µg/mL de anticorpo anti-elastase (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Alemanha) por 18-20 horas a 4 °C e lavada com tampão fosfato-salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*, LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil). O bloqueio foi feito com 2% de

albumina de soro bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*, Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e as amostras de plasma, diluídas 1:2 em PBS, foram adicionadas e incubadas por 18-20 horas a 4 °C. No terceiro dia, após a lavagem da placa com PBS acrescido de Tween20 (0,05%) (Sigma Aldrich), foi adicionado 1,5 µg/mL do anticorpo anti-dsDNA conjugado à enzima peroxidase (Immunotools, Friesoythe, Alemanha), incubado por 2 horas em agitador e em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e foi adicionado o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, BD Bioscience). A densidade óptica foi determinada em leitor de placas automático em comprimento de onda de 450 nm após 20 minutos de reação (179,298).

### **3.4. Quantificação de endotoxina no plasma.**

A fim de avaliar a presença de marcadores plasmáticos de translocação microbiana, os plasmas de pessoas vivendo com HIV e de indivíduos saudáveis foram avaliados pelo método cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL, Thermofisher, Waltham, EUA), para quantificação de endotoxina. As amostras de plasma foram inativadas a 70 °C por 15 minutos e diluídas 1:2 em PBS. Em seguida, essas amostras e concentrações conhecidas de endotoxina foram distribuídas na placa, foi adicionado o LAL a todos os poços e a placa foi incubada por 10 minutos. O substrato cromogênico foi então adicionado e, após 6 minutos, a reação foi interrompida com o acréscimo de ácido acético 25%. A densidade óptica foi medida em leitor de placas automático em comprimento de onda de 410 nm. As concentrações de endotoxina presentes no plasma são representadas em unidades por mL (EU/mL) e foram obtidas pela interpolação dos valores de densidade óptica sobre uma curva-padrão.

### **3.5. Obtenção de Neutrófilos e Macrófagos.**

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos em temperatura ambiente para obtenção do plasma, cerca de 3 mL por amostra. O plasma coletado foi armazenado a -80 °C até sua utilização. Em seguida, foram acrescidos 3 mL de PBS às amostras de sangue e estas foram centrifugadas na presença de Ficoll-Hypaque (d=1,077 g/mL, Sigma Aldrich) a 400 x g durante 30 minutos. Uma vez separadas por gradiente de densidade, as PBMCs foram isoladas, lavadas com PBS (LGC Biotecnologia) e contadas em câmara de Neubauer, no microscópio óptico, com 0,1% de azul de Tripán (Sigma Aldrich), para viabilidade celular. As células foram

distribuídas em placas de cultura de 6 ( $1,6 \cdot 10^7$ /poço/3 mL) ou 96 poços ( $10^6$  células/poço/200  $\mu$ L) (Costar, Corning, Glendale, EUA), a depender do experimento, e cultivadas em meio DMEM com baixa glicose (LGC Biotecnologia), contendo 10% de soro AB humano (Sigma Aldrich) previamente inativado (30 minutos a 56 °C; Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina (10 ng/mL; Sigma Aldrich) e gentamicina (50  $\mu$ g/mL; Gibco). Após 7-10 dias de cultivo (37 °C e 5% CO<sub>2</sub>) para diferenciação de monócitos em macrófagos por aderência ao plástico, as células não-aderentes foram removidas por lavagem com PBS, e a monocamada remanescente foi mantida em cultura (DMEM contendo 5% de soro humano e antibióticos). A pureza destas culturas foi superior a 95% em avaliação por citometria de fluxo, usando anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD68 (BD Bioscience), e o citômetro BD Canto II equipado com o software BD FACSDiva (BD Bioscience).

Os neutrófilos também foram obtidos por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque. Após a centrifugação, essas células foram aspiradas da monocamada intimamente associada às hemácias e lavadas com PBS. Em seguida, os eritrócitos residuais associados aos neutrófilos foram sedimentados em solução de Dextran (3%; Sigma Aldrich) durante 45 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, lisados em solução de lise hipotônica (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA), durante 5 minutos em temperatura ambiente (299). Os neutrófilos foram então lavados com PBS e contados em microscópio com 0,1% de Azul de Tripán (Sigma Aldrich). A pureza destas células, determinada por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD16 (BD Bioscience), foi de aproximadamente 95%.

### **3.6. Indução da liberação de NETs.**

Para avaliar a capacidade de liberação de NETs, imediatamente após a obtenção de neutrófilos, estas células foram distribuídas em placas de 48 poços ( $2 \cdot 10^6$ /poço/400  $\mu$ L) (Costar) em meio RPMI (LGC Biotecnologia) sem soro e estimuladas com IL-8 (50 ng/mL; Biolegend, San Diego, EUA) ou TNF- $\alpha$  (20 ng/mL, R&D Systems, Mineápolis, EUA), durante 3 horas a 37 °C. Células mantidas apenas em meio RPMI foram usadas como controle. Os sobrenadantes ricos em NETs foram coletados e centrifugados a 400 x g por 10 minutos para remover células e *debris*, e estocados a -80 °C até sua utilização.

As NETs obtidas foram quantificadas com base na concentração de DNA de fita dupla pelo método de Quant-it™ Picogreen dsDNA (Invitrogen, California, EUA), de

acordo com as instruções do fabricante. Os valores de fluorescência foram interpolados a partir de uma curva-padrão obtida com concentrações conhecidas de DNA de salmão (Sigma Aldrich) (235).

### **3.7. Microscopia de Imunofluorescência.**

Neutrófilos cultivados em lâminas com câmara ( $5.10^5$  células/poço/200  $\mu$ L) (Lab-Tek, Thermofisher) e estimulados com IL-8, como descrito no item 3.6, foram fixados com solução de paraformaldeído (PFA, 4%; Merck) durante 30 minutos, e lavados cuidadosamente com PBS. Em seguida, as amostras foram incubadas com soro AB humano (Sigma Aldrich) puro durante 1 hora (etapa de bloqueio) e marcadas com anticorpo policlonal anti-elastase obtido em coelho (Calbiochem), por 2 horas. Após a marcação, foi feita a lavagem com solução de bloqueio (PBS, 10% de soro fetal bovino, 5% de BSA), durante 5 minutos, e a incubação com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa 546, obtido em cabra (Life Technologies), durante 30 minutos. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS e montadas em ProLong® Diamond *anti-fade* contendo DAPI (Life Technologies). Todo o processo foi realizado em temperatura ambiente. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Ax10) com auxílio do programa AxioVision. Brilho, contraste e cor das imagens digitais foram ajustados com o programa Adobe Photoshop CS6 v13.0, Adobe Systems Inc, EUA.

### **3.8. Infecções virais.**

Os experimentos envolvendo material infectado pelo HIV-1 foram realizados no laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) do Pavilhão Leônidas Deane, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz Rio de Janeiro, Brasil. As infecções *in vitro* foram realizadas com o isolado de HIV-1 Ba-L, monocitotrópico e dependente de CCR5, doado pelo NIH Aids Research and Reference Reagent Program (Divisão de Aids, NIAID, NIH, MD, EUA). Os macrófagos de indivíduos saudáveis e de pessoas vivendo com HIV foram expostos ao isolado viral (10-15 ng/mL da proteína viral p24) por 18 a 20 horas, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas e realimentadas com meio de cultura para o tratamento com as NETs.

As PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis foram distribuídas em garrafas de cultura, e ativadas com meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino, IL-2 (5 U/mL, Sigma), e PHA (2  $\mu$ g/mL, Fito-hemaglutinina, Sigma), por 48-72 horas. Em

seguida, as células foram lavadas, contadas para ajuste da concentração de  $1.10^6$  células/mL, e infectadas com o isolado viral Ba-L de HIV-1 (10-15 ng/mL de p24), por 2 horas. Ao fim deste período, as células foram lavadas e realimentadas com meio de cultura para o tratamento com as NETs

### **3.9. Viabilidade celular de macrófagos e PBMCs expostos às NETs.**

Macrófagos expostos às NETs por 3 horas e lavados foram avaliados quanto à viabilidade pelo método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazólio-5-carboxanilida, Sigma Aldrich) e por citometria de fluxo. De modo resumido, após 24 ou 48 horas da exposição às NETs, foram adicionados à cultura celular 50 µL de uma solução de DMEM sem soro, contendo 1 mg/mL de XTT e 15 ng/mL de PMS (N-metil dibenzopyrazina metil sulfato). Após 3 horas a 37° C, a densidade óptica foi medida em leitor de placas automático em comprimento de onda de 450 nm. Por citometria, após 24 horas da exposição às NETs, a viabilidade também foi avaliada com Anexina V (R&D Systems) e 7AAD (BD Bioscience), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para verificar o efeito da exposição prolongada de macrófagos às NETs sobre a viabilidade, células expostas às NETs por 14 dias (tratamento único na concentração de 40 ng/mL, sem remoção das NETs) também foram avaliadas por XTT, como previamente descrito.

Por sua vez, PBMCs expostas às NETs por 16-18 horas em meio sem soro, foram lavadas e realimentadas com meio de cultura (RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, IL-2 e antibióticos). A viabilidade foi avaliada após 48 horas por citometria de fluxo com Anexina V (R&D Systems) e 7AAD (BD Bioscience).

### **3.10. Efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1.**

Macrófagos de indivíduos saudáveis e de pessoas vivendo com HIV, previamente infectados *in vitro* pelo HIV-1, foram expostos a NETs individuais (40 ng/mL) liberadas por neutrófilos de pacientes, em DMEM sem soro, durante 3 horas (37 °C e 5% CO<sub>2</sub>). Em seguida, as células foram lavadas com PBS, realimentadas com meio completo (DMEM contendo 5% de soro humano e antibiótico) e mantidas em cultura durante 12-14 dias. Após esse período, a replicação viral foi quantificada pela detecção do antígeno p24 do HIV-1 nos sobrenadantes das culturas, pela técnica de ELISA (Sino Biological, Chesterbrook, EUA). Também foi avaliado o efeito do tratamento com *pools* de NETs de pacientes (4-5 NETs/*pool*, 40 ng/mL) sobre a replicação viral. Como

controle do efeito inibitório das NETs, foram utilizadas NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis.

As PBMCs previamente infectadas foram tratadas de modo semelhante aos macrófagos: lavadas com PBS, plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações de NETs em meio RPMI com 2% de soro fetal bovino por 2 horas. Ao fim da incubação, as células foram lavadas e realimentadas com meio completo (RPMI acrescido de soro fetal bovino a 10%, IL-2 e antibióticos). A replicação viral foi avaliada por ELISA do sobrenadante das culturas de PBMCs após 7 dias, conforme descrito acima.

### **3.11. Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs.**

Para verificar se a adição tardia de NETs poderia modular a replicação viral em macrófagos, células infectadas *in vitro* pelo HIV-1 foram expostas às NETs por 3 horas, após 5 e 7 dias de infecção. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, realimentadas com meio de cultura e a replicação viral foi quantificada por ELISA após 12-14 do início da infecção. Também foi avaliado o efeito de adições múltiplas (1 a 3 vezes) de uma concentração sub-ótima (10 ng/mL) de NETs. Essas adições foram iniciadas logo após a infecção e realizadas com intervalos de 3 a 4 dias. Macrófagos infectados foram tratados com NETs por 3 horas e após cada tratamento as células foram lavadas e o meio de cultura foi repostado. As replicações virais foram quantificadas por ELISA, após 12-14 dias do início da infecção, como descrito no item 3.10.

### **3.12. Efeito da Mieloperoxidase sobre a replicação do HIV-1.**

Para verificar a contribuição da proteína MPO presente nas NETs sobre o efeito antiviral observado, macrófagos, previamente infectados pelo HIV-1, foram expostos a diferentes concentrações de MPO recombinante (R&D Systems), por 3 horas em DMEM sem soro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e realimentadas com meio completo (DMEM contendo 5% de soro humano e antibióticos). A replicação viral foi quantificada após 12-14 dias, como descrito.

### **3.13. Efeito das NETs sobre a integração do HIV-1.**

Para avaliar este efeito, macrófagos, cultivados em placa de 6 poços e previamente infectados pelo HIV-1, foram tratados com NETs (40 ng/mL) por 3 horas, lavados com PBS e mantidos em cultura por 72 horas. Em seguida, as células foram coletadas com auxílio de um *Cell Scraper* (Falcon, Corning, Glendale, EUA) e o DNA total foi extraído com o Kit Mini AllPrep DNA/RNA (Qiagen, Hilden, Alemanha). O

DNA total foi quantificado pelo Qubit, com o kit Qubit™ dsDNA HS Assay (ThermoFisher, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente, utilizando-se células J-Lat, uma linhagem celular derivada de células Jurkat que contém um genoma completo do HIV-1 integrado, foi gerada uma curva padrão para beta-globulina e para o genoma do HIV-1 integrado. Em seguida, para avaliar a integração do cDNA viral por célula, foi realizada a quantificação do DNA genômico nas amostras por qPCR (PCR quantitativo em tempo real) com base no gene de beta-globina, e então foi feito um Nested-PCR, como descrito em (36).

A reação de PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher), utilizando-se o mix PrimeTime® Gene Expression Master Mix 2X (Integrated DNA Technologies). A reação de amplificação para a quantificação de beta-globina consistiu em: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*) e as sondas utilizadas na reação são apresentados na tabela 3.1. A reação de PCR para quantificar a integração do HIV-1 foi realizada em duas etapas. A primeira foi uma reação de PCR convencional utilizando *primers* para a região *Alu* do genoma humano e Gag do HIV-1, e tendo como amostra o DNA total extraído dos macrófagos. As condições dessa reação foram: 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos e 30 segundos. A segunda reação foi uma PCR em tempo real para quantificar os produtos específicos do HIV-1 usando *primers* para as regiões R e U5 na LTR do vírus. A integração do cDNA do HIV-1 no genoma dos macrófagos foi calculada com base na curva-padrão determinada a partir das células J-Lat, e considerando a massa de DNA.



**Tabela 3.1. Primers e sondas\* utilizados para avaliar a integração do cDNA do HIV-1 no genoma de macrófagos**

Região alvo	Primers		Sonda (Probe)
	Senso (Forward)	Anti-senso (Reverse)	
Beta-globina	CCCTTGGACCCAG AGGTTCT	CGAGCACTTTCTT GCCATGA	GCGAGCATCTGTCCA CTCCTGATGCTGTTA TGGGCGCTCGC
Alu	GCCTCCCAAAGTG CTGGGATTACAG		
Gag		GTTCTGCTATG TCACTTCC	
R-U5	TTAAGCCTCAATAA AGCTTGCC	GTTCGGGCGCCA CTGCTAGA	CCAGAGTCACACAA CAGACGGGCACA

\*Primers e sondas expressos no sentido 5' – 3'

### 3.14. Análise Estatística.

Os dados obtidos foram inicialmente avaliados quanto à distribuição pelos testes de normalidade D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. A partir desta avaliação inicial, os dados paramétricos de experimentos com duas condições foram analisados por teste t Student e os de experimentos com três ou mais condições foram analisados por One-Way ANOVA. Os pós-testes utilizados foram o de Dunnett e de Tukey para comparações múltiplas com o controle e entre as diferentes condições, respectivamente. As análises estatísticas realizadas para cada experimento estão indicadas nas legendas das figuras. Os resultados estão representados como a média associada ao desvio padrão, linhas horizontais e verticais, respectivamente. O software utilizado para gerar os gráficos e testes estatísticos foi o Prism 7 (GraphPad Software, EUA), e a significância estatística foi definida como  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil das pessoas vivendo com HIV

Inicialmente, as amostras de pessoas vivendo com HIV foram classificadas em coortes de acordo com a carga viral plasmática informada no relatório clínico, a partir do qual também foram coletadas informações sobre sexo e contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os dados dos participantes, cujas amostras de plasma foram avaliadas para a quantificação de complexos DNA-elastase e de endotoxina, são demonstrados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1. Dados de pessoas vivendo com HIV.**

Distribuição dos valores médios e desvios-padrões da carga viral plasmática e das contagens absolutas de células T, em função das coortes de carga viral, indicando o número de participantes em cada coorte e de acordo com o sexo.

Coorte	N	Carga viral (cópias de RNA viral/mL)	Contagens de Linfócitos T (células/ $\mu$ L)		Sexo	
			CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	M	F
Indetectável	14	-	592 $\pm$ 206	790 $\pm$ 217	6	8
Baixa	14	831 $\pm$ 917	505 $\pm$ 347	1312 $\pm$ 681	9	5
Intermediária	22	36.646 $\pm$ 20.679	220 $\pm$ 155	904 $\pm$ 372	8	14
Alta	18	453.459 $\pm$ 975.020	77 $\pm$ 60	768 $\pm$ 446	11	7

Média  $\pm$  Desvio-Padrão

M: Masculino, F: Feminino

N: número de participantes

Em função das coortes de carga viral, os participantes se agruparam em três faixas claramente distintas de contagens de células T CD4<sup>+</sup>: entre 500 e 1000 células/ $\mu$ L, entre 200 e 500 células/ $\mu$ L e <200 células/ $\mu$ L. Essa divisão foi utilizada para análises em função das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

### 4.2. Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis elevados de complexos DNA-elastase no plasma

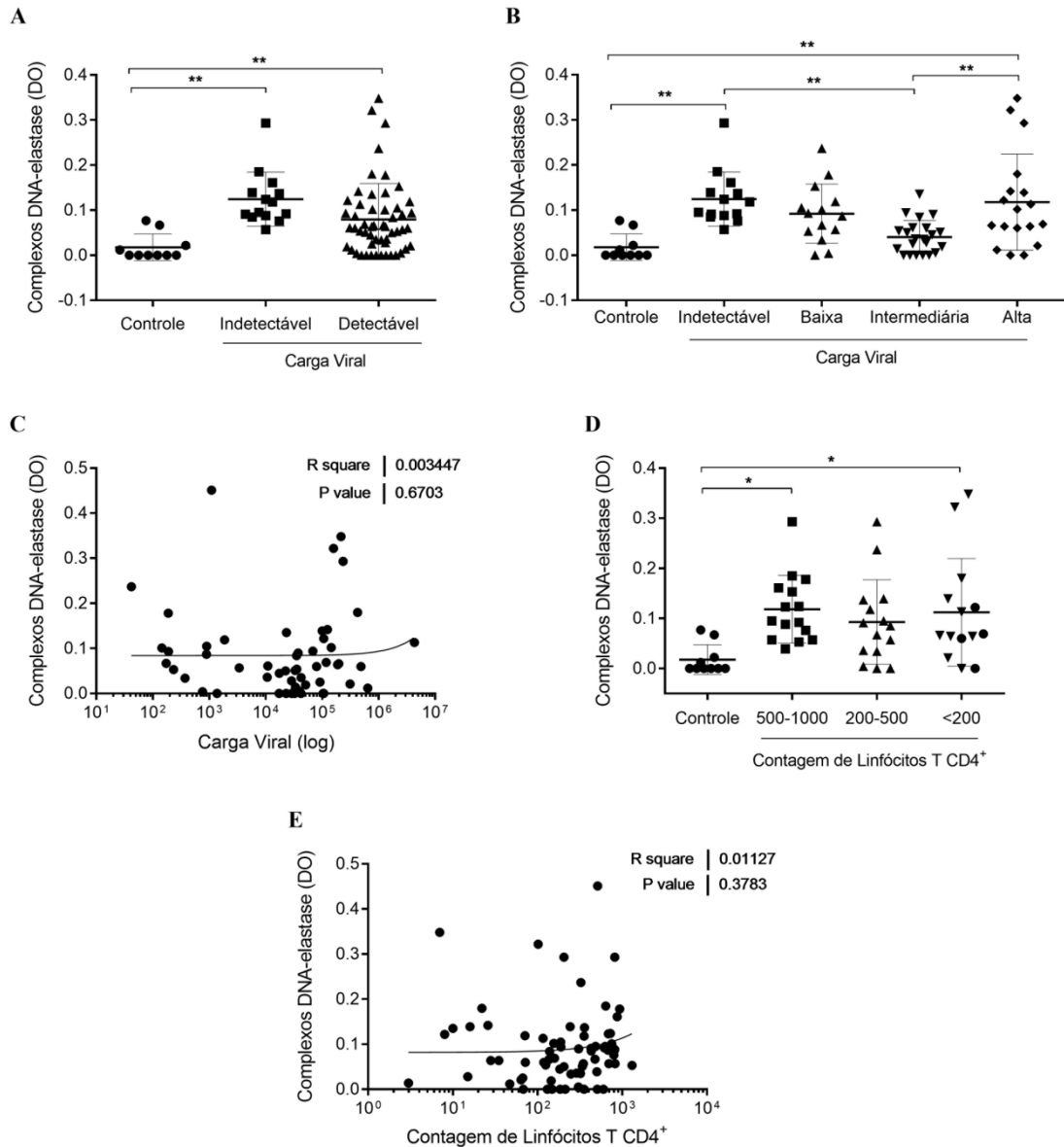
As pessoas vivendo com HIV apresentam, mesmo na presença da terapia antirretroviral, um quadro inflamatório crônico caracterizado pela ativação de células do sistema imune e aumento dos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios que,

assim como os produtos antigênicos derivados da translocação microbiana e o próprio vírus, são capazes de ativar neutrófilos e estimular a liberação de NETs (2,76,285). Para verificar a hipótese de que pessoas vivendo com HIV apresentariam níveis plasmáticos elevados de NETs quando comparados aos doadores saudáveis, foram quantificados os complexos de DNA-elastase nos plasmas destes indivíduos, os quais foram avaliados como grupo controle, e nos plasmas de pacientes.

Como pode ser observado na Figura 4.1A, níveis significativamente mais elevados ( $p < 0,01$ ) de complexos DNA-elastase foram observados no plasma de pacientes, em relação aos doadores saudáveis, independente da carga viral estar detectável ou indetectável. Quando as amostras de plasma foram separadas por coortes, também foi observada uma maior detecção dos complexos ( $p < 0,01$ ) na circulação dos pacientes em relação aos saudáveis, de modo mais evidente nos indivíduos com carga viral indetectável e alta (Figura 4.1B).

A depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é um marcador evolutivo da doença que pode se associar ao quadro inflamatório, bem como ao recrutamento de neutrófilos para os tecidos linfóides onde há maior replicação viral e morte celular (9,76). Nesses tecidos, e também na circulação sanguínea, a ativação de neutrófilos pode estimular a liberação de NETs. Desta forma, avaliamos os níveis de complexos DNA-elastase de acordo com as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 4.1D). Todos os pacientes apresentaram níveis mais elevados de complexos DNA-elastase quando comparados aos doadores controles; entretanto, esse aumento foi significativo ( $p < 0,05$ ) apenas nos pacientes com contagens absolutas inferiores a 200 células/ $\mu$ L e entre 500 e 1000 células/ $\mu$ L.

Visto que o próprio HIV-1 é capaz de induzir a liberação de NETs e que a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> contribui para o quadro inflamatório observado nos pacientes, buscamos associar a carga viral e a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com a concentração dos complexos no plasma (220). Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação positiva entre estes dados, conforme observado nas figuras 4.1C e E.



**Figura 4.1. Quantificação de complexos DNA-elastase no plasma de pessoas vivendo com HIV.**

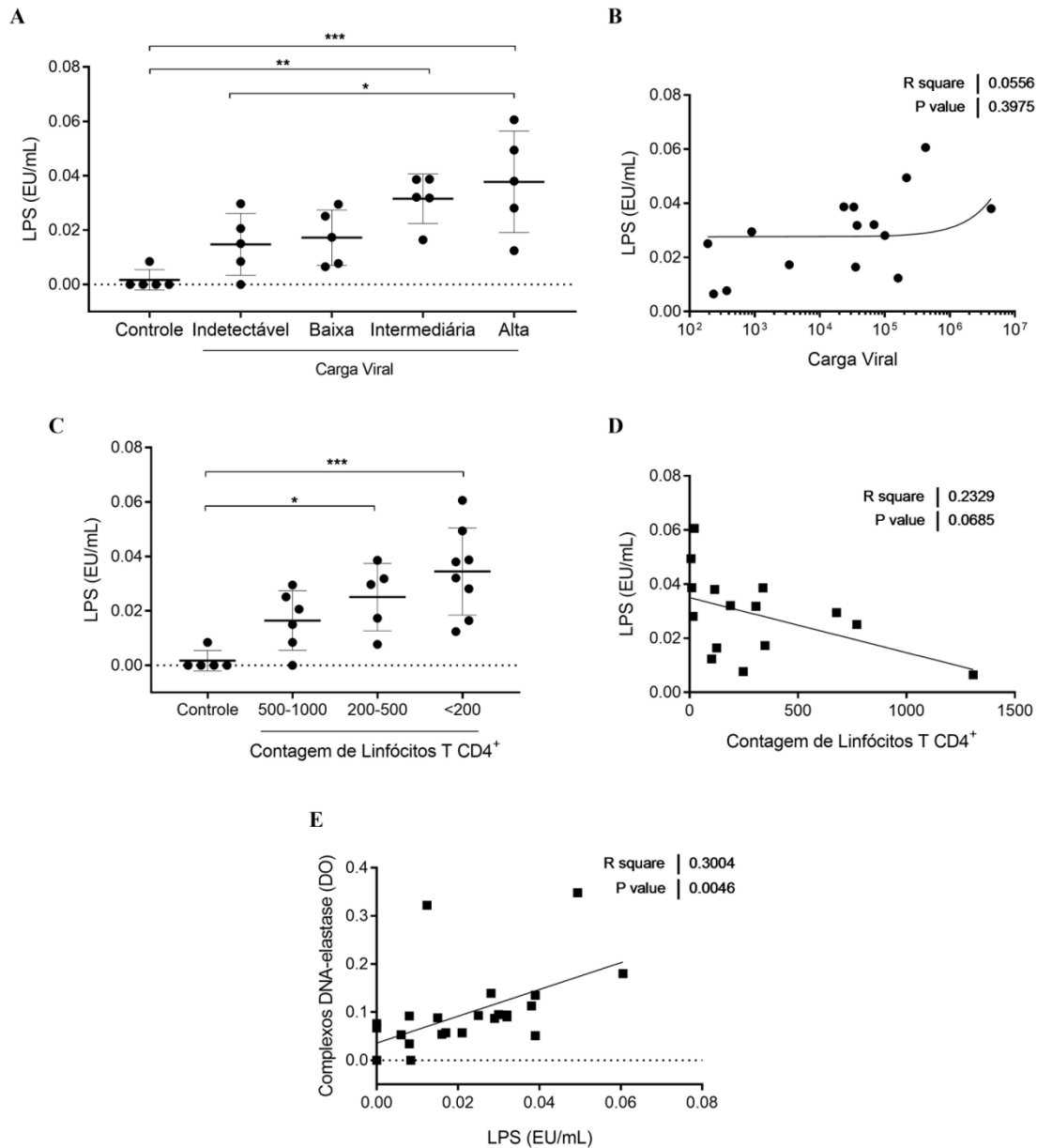
Plasmas de pacientes e de indivíduos saudáveis (controle) foram testados para a detecção de complexos DNA-elastase, pela técnica de ELISA, com anticorpos anti-elastase e anti-dsDNA. A absorbância foi determinada a 450 nm e os valores estão apresentados em densidade óptica (DO). (A) Quantificação de complexos DNA-elastase, de acordo com a carga viral indetectável e detectável, ou (B) com as coortes de carga viral. (C) Análise de correlação entre carga viral e complexos DNA-elastase por regressão linear. (D) Quantificação de complexos DNA-elastase de acordo com as contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. (E) Análise de correlação entre as contagens absolutas de linfócitos e complexos DNA-elastase por regressão linear. As barras representam a média ± desvio-padrão. Dados analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### **4.3. Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis plasmáticos elevados de LPS**

A presença de níveis elevados de complexos DNA-elastase no plasma de pessoas vivendo com HIV e a ausência de correlação entre esses complexos e a carga viral, nos incitou a investigar outro fator relacionado à infecção que pudesse induzir diretamente a liberação de NETs, como a endotoxina associada à translocação microbiana: o LPS.

Inicialmente, as concentrações plasmáticas de LPS foram avaliadas em função dos níveis de detecção da carga viral. Foi observado que os pacientes apresentam níveis elevados dessa endotoxina ( $p < 0,01$ ) quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 4.2A), e que esse aumento é mais proeminente em indivíduos com a carga viral elevada ( $p < 0,001$ ). No entanto, não foi observada uma correlação direta entre a carga viral e as concentrações de LPS para as amostras estudadas (Figura 4.2B). As análises também foram conduzidas em função das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, visto que a depleção destas células no tecido linfoide associado à mucosa intestinal é um fator determinante para a translocação microbiana. Foi visto que pacientes com uma contagem inferior a 200 células/ $\mu\text{L}$  apresentam níveis significativamente elevados ( $p < 0,05$ ) de LPS circulante quando comparados ao grupo controle. Para esses pacientes, uma tendência de correlação negativa com o LPS foi observada (Figuras 4.2C e D).

Conforme mencionado, o LPS é um potente indutor da liberação de NETs e, de fato, foi observada uma correlação positiva ( $p = 0,0046$ ) entre os níveis plasmáticos dessa endotoxina e dos complexos DNA-elastase em nossas análises (Figura 4.2E).



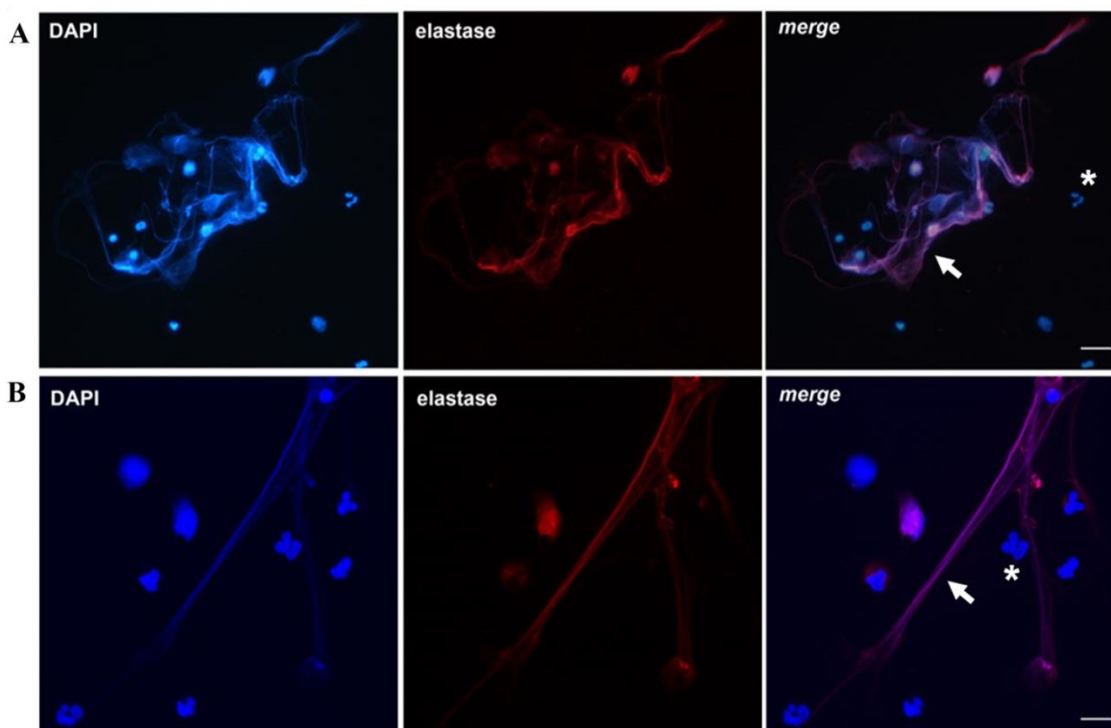
**Figura 4.2. Pessoas vivendo com HIV apresentam níveis elevados de LPS no plasma.**

A quantificação de LPS no plasma de indivíduos saudáveis e de PVH foi feita pelo método cromogênico utilizando o ensaio de LAL. As concentrações de LPS são representadas em EU/mL. Quantificação de LPS por (A) coortes de carga viral e por (C) contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Correlação entre os níveis plasmáticos de LPS e (B) carga viral ou (D) contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (E) Correlação entre os níveis plasmáticos de LPS e de complexos DNA-elastase. As barras representam a média ± desvio-padrão. Dados analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey (A, C). Correlações feitas por regressão linear (B, D, E). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.4. Neutr3filos de pessoas vivendo com HIV s3o capazes de liberar NETs

Diversos trabalhos sobre NETs, al3m de estudo anterior desenvolvido em nosso laborat3rio, demonstram que neutr3filos isolados de indiv3duos saud3veis s3o capazes de liberar NETs *in vitro* mediante est3mulo com citocinas inflamat3rias (177,296). Questionamos, portanto, se a inflama33o cr3nica observada nas PVH e as altera33es celulares provocadas pela infec33o poderiam afetar a capacidade de seus neutr3filos liberarem NETs quando estimulados *in vitro*. Para avaliar essa capacidade, neutr3filos isolados do sangue perif3rico de pacientes foram estimulados com IL-8 e TNF- $\alpha$ .

As an3lises por imunofluoresc3ncia dos neutr3filos estimulados com IL-8 por 3 horas demonstraram uma rede de fibras de DNA em colocaliza33o com a prote3na granular elastase neutrof3lica (Figura 4.3) e c3lulas 3ntegras identificadas pela preserva33o do n3cleo multilobulado, que n3o liberaram NETs. A colocaliza33o dos marcadores indica associa33o da elastase com a rede de DNA extracelular, coincidindo com descri333es presentes na literatura e demonstrando a capacidade dos neutr3filos de pessoas vivendo com HIV-1 liberarem NETs mediante est3mulo com IL-8 (175).

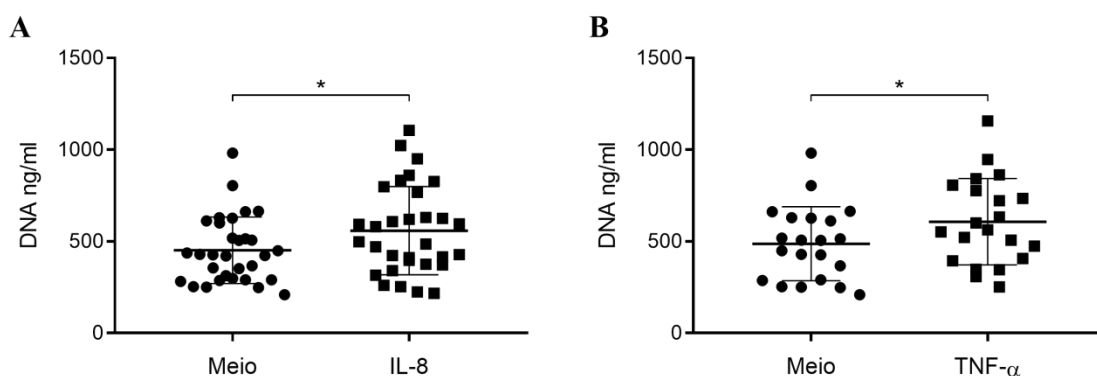


**Figura 4.3. Neutr3filos de pessoas vivendo HIV liberam NETs *in vitro*.**

Neutr3filos de PVH (A) e de indiv3duos saud3veis (B) foram isolados e ativados com IL-8 (50 ng/mL) por 3 horas, fixados em paraformalde3do 4% e marcados com DAPI (DNA, em azul) e anticorpos anti-elastase (em vermelho). Nas duas figuras, o terceiro

painel à direita (*merge*) mostra a sobreposição da marcação para os dois componentes. O asterisco indica células íntegras e as setas apontam as fibras de DNA associado à elastase (NETs). Imagem representativa de quatro doadores saudáveis e seis pacientes diferentes. Barra de escala: 10 $\mu$ m.

Uma vez observada a presença de NETs por imunofluorescência, foi então realizada a quantificação do DNA extracelular presente no sobrenadante das culturas de neutrófilos. Conforme demonstrado na Figura 4.4, há um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de DNA extracelular após estímulo com IL-8 (Figura 4.4A) e com TNF- $\alpha$  (Figura 4.4B), quando comparados aos sobrenadantes das células sem estímulo, indicando o potencial de liberação de NETs dessas células. Embora a quantificação de DNA não represente exclusivamente o DNA presente nas NETs liberadas, a confirmação da presença destas estruturas por imunofluorescência nos permite correlacionar a quantidade de DNA com a de NETs (179,300).



**Figura 4.4. Neutrófilos de pessoas vivendo com HIV liberam NETs na presença de estímulos inflamatórios.**

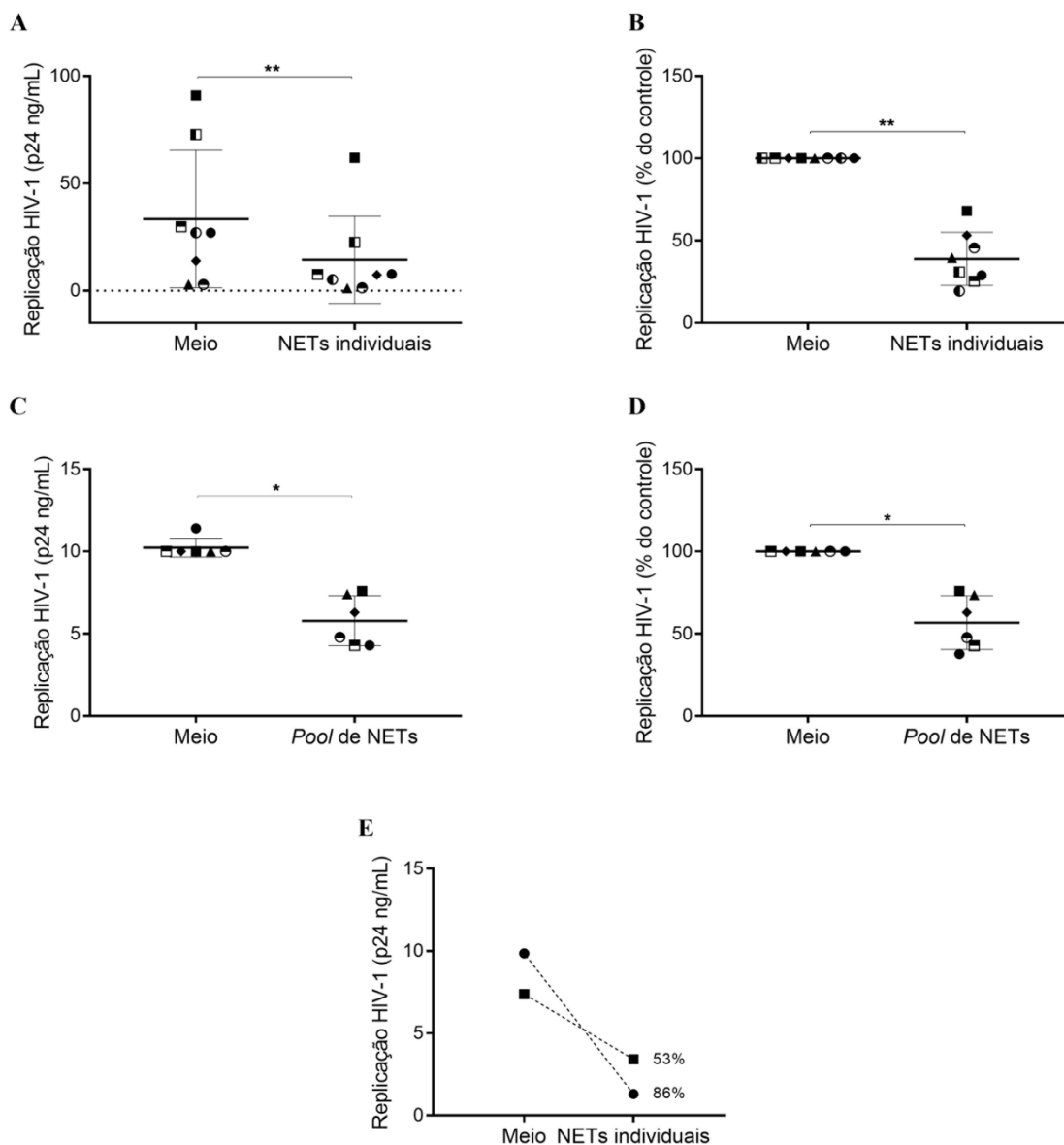
Neutrófilos de PVH foram isolados e mantidos na presença de RPMI (Meio) ou ativados com (A) IL-8 (50 ng/mL) ou (B) TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) por 3 horas. A liberação de NETs foi quantificada por Picogreen através da detecção de dsDNA. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão de cada condição. Dados analisados por teste t Student pareado. \* $p < 0,05$  vs. meio. Meio vs. IL-8,  $n = 31$ ; meio vs. TNF- $\alpha$ ,  $n = 21$ .



#### **4.5. NETs liberadas por neutrófilos de pacientes inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos**

O papel das NETs na patogênese de infecções virais é bem descrito na literatura e, com relação ao HIV-1, dois estudos demonstraram a capacidade dessas redes de reterem o vírus e inativá-lo *in vitro* (220,248,294). Em nosso laboratório, mostramos que NETs liberadas *in vitro* por neutrófilos de indivíduos saudáveis são capazes de inibir a replicação viral em macrófagos e reduzir a infectividade das partículas virais liberadas por essas células (296,297).

No presente estudo, expandimos a análise para neutrófilos de pessoas vivendo com HIV para compreender se o fenômeno descrito também ocorre nestes indivíduos e se contribui para a patogênese da infecção. Assim, macrófagos infectados *in vitro* pelo HIV-1 foram tratados com NETs, individuais ou em *pool*, liberadas por neutrófilos de PVH, e a replicação viral foi avaliada no sobrenadante das culturas após 14 dias. Foi observado que o tratamento com NETs de pacientes, de modo individual (Figuras 4.5A e B), é capaz de inibir a replicação viral em macrófagos de indivíduos saudáveis ( $p < 0,05$ ), uma vez que a detecção de p24 em culturas tratadas foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que aquela observada nos controles. Como pode ser observado na Figura 4.5B, uma redução acima de 50% em média pode ser alcançada em relação ao controle. Da mesma forma, NETs de pacientes em *pool* também foram capazes de reduzir de modo significativo ( $p < 0,05$ ) a detecção de p24 no sobrenadante das culturas de macrófagos em relação ao controle (Figuras 4.5C e D). Uma redução de cerca de 40% em média na replicação viral foi alcançada com esse tratamento (Figura 4.5D). Além disso, foi visto que NETs de pacientes inibem a replicação em seus próprios macrófagos (Figura 4.5E), os quais também foram infectados *in vitro*.



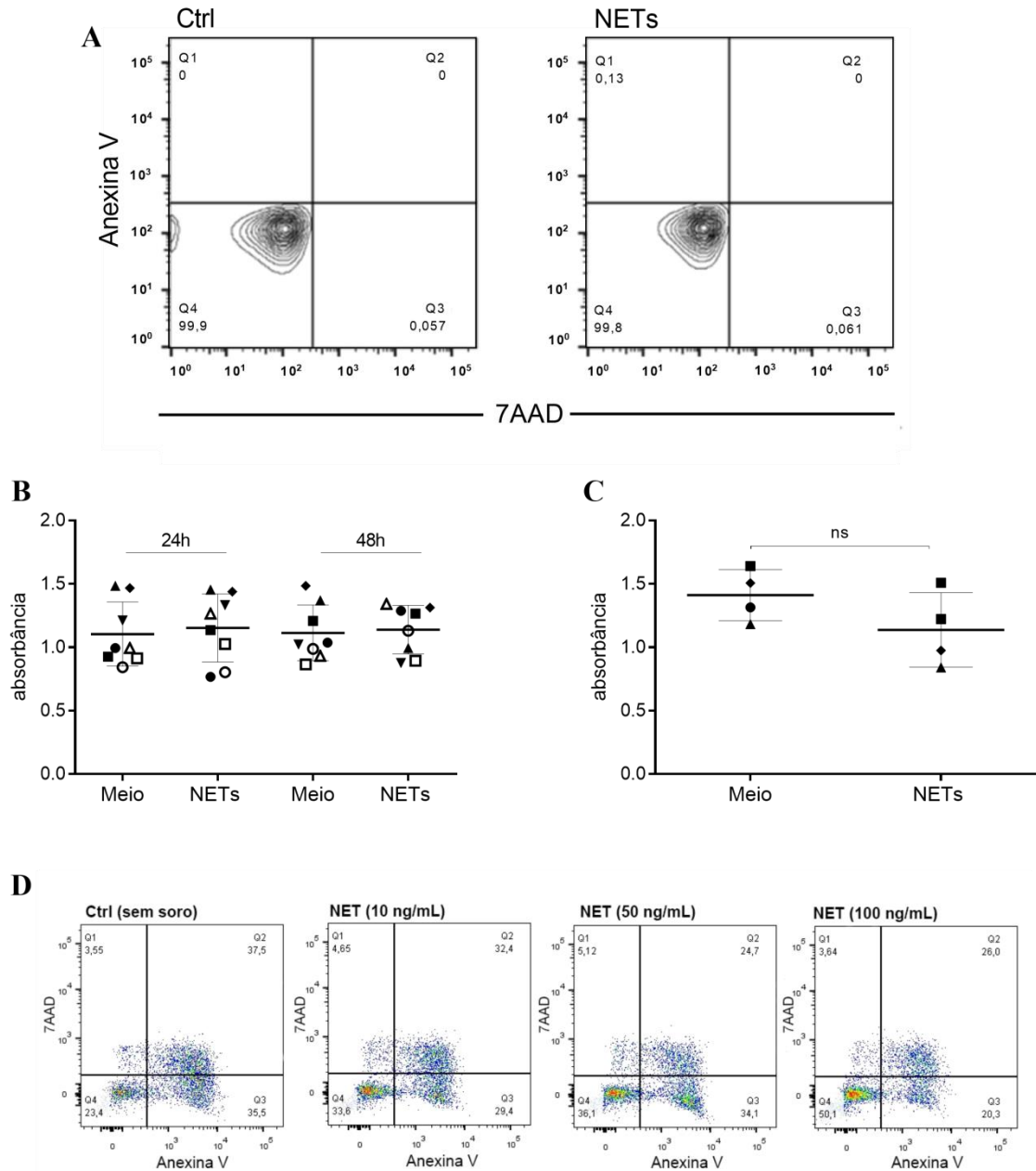
**Figura 4.5. NETs liberadas por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV inibem a replicação viral em macrófagos.**

Macrófagos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* foram tratados com 40 ng/mL de (A, B) NETs individuais (n=8) ou de (C, D) Pool de NETs (n=6) de PVH por 3 horas, lavados e mantidos em cultura por 14 dias. A replicação viral foi quantificada por ELISA. (A, C) Quantificação representada em ng/mL de p24; (B, D) normalização. (E) Macrófagos de PVH (células infectadas *in vitro*) foram tratados com NETs (40 ng/mL) liberadas por seus próprios neutrófilos (n=2). Os percentuais de inibição da replicação viral estão indicados no gráfico. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão de cada condição. Dados analisados por teste t Student pareado. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

As NETs possuem enzimas com potencial citotóxico conhecidas por degradarem proteínas da matriz extracelular e induzir vias de morte celular (201,202,301,302). Desta forma, para verificar se essas estruturas poderiam alterar a viabilidade das células tratadas e interferir na interpretação do seu efeito anti-HIV-1, os macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo, com marcação por Anexina V e 7AAD, e pelo método XTT. Na citometria de fluxo (Figura 4.6A), observou-se que macrófagos expostos por 3 horas às NETs, lavados e avaliados após 24 horas apresentavam viabilidade semelhante aos macrófagos controle, com 99% da população negativa para os marcadores de morte celular. As células tratadas por 3 horas com NETs, lavadas e avaliadas pelo método XTT após 24 ou 48 horas também não demonstraram perda de viabilidade quando comparadas aos controles (Figura 4.6B).

Nos tecidos, o recrutamento de neutrófilos, o acúmulo de estímulos inflamatórios e a liberação de NETs ocorrem de modo contínuo e dinâmico, assim como a interação de macrófagos com as NETs e o *clearance* destas estruturas (199,200). Para avaliar o efeito da exposição prolongada dos macrófagos às NETs sobre a viabilidade celular, células tratadas e não lavadas foram avaliadas pelo método XTT, 14 dias após o tratamento (Figura 4.6C). Não houve diferença significativa na viabilidade do grupo exposto às NETs quando comparado ao grupo controle não tratado, demonstrando que na concentração de 40 ng/mL e no período de cultivo avaliado, as NETs não são tóxicas para os macrófagos.

De modo semelhante, foi investigado o efeito de diferentes concentrações de NETs sobre a viabilidade de PBMCs tratadas por 16-18 horas, lavadas e realimentadas com meio de cultura. A análise foi feita por citometria de fluxo, 48 horas após o tratamento (Figura 4.6D). Assim como nos macrófagos, observou-se que o tratamento com as NETs não causou perda de viabilidade em PBMCs quando comparado ao controle. Nas células expostas às concentrações de 10, 50 e 100 ng/mL foi observado, respectivamente, 32, 25 e 26% da população duplo-positiva para os marcadores Anexina V e 7AAD, enquanto no controle essa população foi de 37%. É importante mencionar que nessa avaliação as células foram cultivadas na ausência de soro fetal bovino, o que explica a percentagem razoavelmente elevada de morte celular em todos os grupos, inclusive no controle sem NETs.



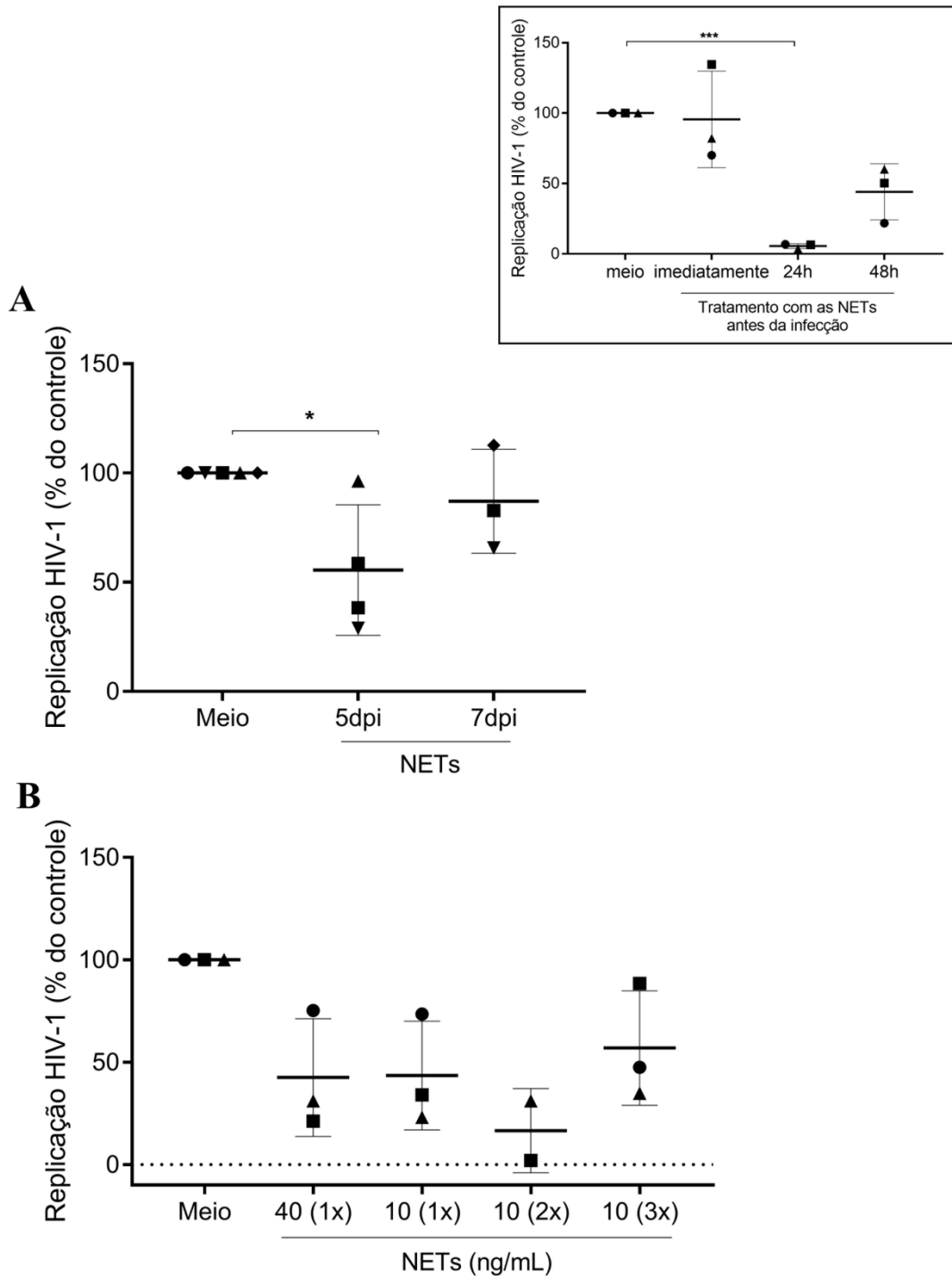
**Figura 4.6. Viabilidade de células expostas às NETs.**

Macrófagos tratados com NETs (40 ng/mL) por 3 horas foram lavados e realimentados com meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada por (A) citometria de fluxo após 24 horas e (B) pelo método XTT após 24 e 48 horas do tratamento (n=8). (C) A viabilidade de macrófagos foi avaliada também pelo método XTT após 14 dias do tratamento e sem remoção das NETs (n=4). (D) PBMCs expostos a diferentes concentrações de NETs durante 16-18 horas (na ausência de soro fetal bovino) foram avaliados quanto à viabilidade celular por citometria de fluxo após 48 horas. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão de cada condição. (B, C) Dados analisados por teste t Student. ns: não significativo.

#### **4.6. Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs sobre a replicação do HIV-1**

Buscando elucidar o efeito das NETs sobre a infecção pelo HIV-1 em macrófagos, e considerando a dinâmica dessa interação no organismo, foi avaliado o efeito da exposição às NETs em diferentes momentos. Como pode ser visualizado na Figura 4.7 (*insert*), nosso estudo prévio demonstrou que o tratamento de macrófagos com NETs de indivíduos saudáveis 24 horas antes da infecção inibia fortemente a replicação viral, enquanto o tratamento 48 horas ou imediatamente antes não produzia inibições significativas (296). No presente estudo, foi visto que o tratamento de macrófagos com NETs 5 dias após a infecção reduz em média 45% da replicação viral (Figura 4.7A). Por outro lado, essa redução não foi observada no tratamento realizado 7 dias após a infecção.

Além da adição tardia das NETs aos macrófagos infectados, foi investigado o efeito de adições múltiplas, com intervalo de 3 a 4 dias entre elas, de uma concentração sub-ótima (10 ng/mL) de NETs. Com esse esquema de tratamento, procurou-se representar, respeitando as limitações do modelo *in vitro*, a dinâmica que ocorre nos tecidos linfoides para os quais os neutrófilos migram e liberam concentrações variadas de NETs de acordo com o estímulo local, isso podendo ocorrer em diferentes etapas da infecção. Verificou-se que duas exposições às NETs, na concentração de 10 ng/mL, inibem fortemente a replicação do HIV-1, reduzindo-a em cerca de 75% em relação ao controle (Figura 4.7B). As demais exposições avaliadas também foram capazes de interferir na replicação, embora em menor intensidade. Entretanto, o pequeno número de experimentos não permitiu uma análise estatística para interpretar melhor esse fenômeno.



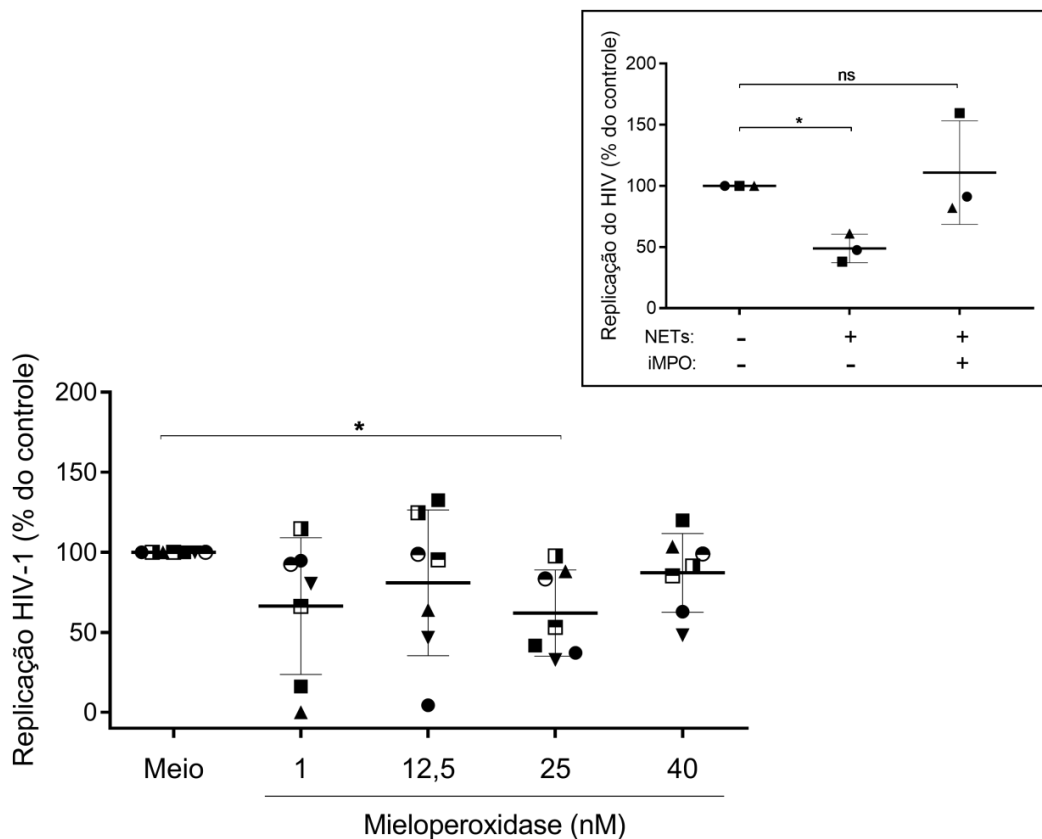
**Figura 4.7. Efeito do tratamento tardio e adições múltiplas de NETs sobre a replicação viral.**

*Insert* demonstra resultado prévio do tratamento de macrófagos com NETs antes da infecção pelo HIV-1 (296). (A) Macrófagos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* foram tratados com NETs (40 ng/mL) por 3 horas, nos dias 5 ou 7 pós-infecção (dpi), lavados e mantidos em cultura (n=4). (B) Macrófagos infectados foram tratados com

NETs nas concentrações de 10 ou 40 ng/mL. O tratamento foi repetido 2 ou 3 vezes, conforme indicado entre parênteses. A replicação viral foi quantificada por ELISA 14 dias após o início da infecção. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão de cada condição. Dados analisados com One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnett.

#### 4.7. Efeito da mieloperoxidase sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos

A MPO é um importante componente enzimático das NETs e contribui, junto com a NE, para a sinalização celular que promove a liberação dessas redes (167,227). Em nosso estudo prévio foi identificada uma reversão do efeito anti-HIV-1 das NETs frente à adição de inibidor de MPO (iMPO) (Figura 4.8 *insert*). Deste modo, foi levantada a hipótese de o tratamento dos macrófagos com MPO recombinante, isoladamente, ser capaz de reproduzir a inibição. Como demonstrado na Figura 4.8, diferentes concentrações foram testadas e ocorre uma redução média de 38% da replicação viral em células tratadas com 25 nM (nanomolar) da proteína, reforçando sua importância no fenômeno descrito com as NETs.



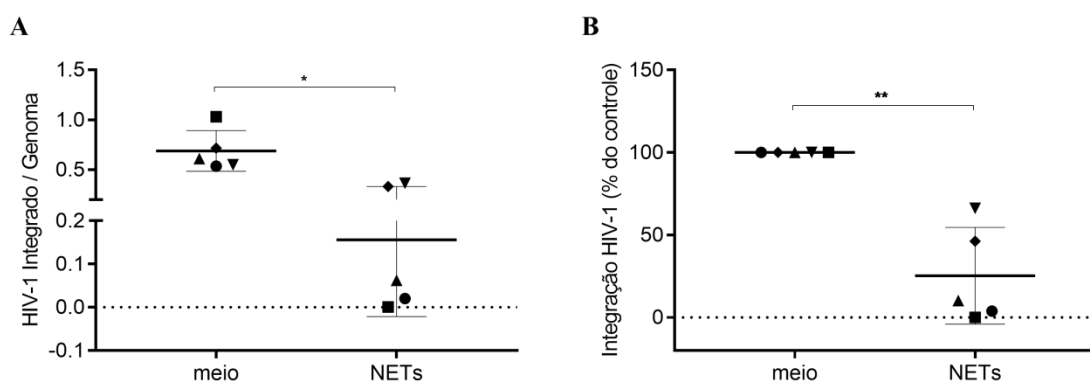
**Figura 4.8. Mieloperoxidase inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos.**

*Insert* demonstra resultado prévio da inibição da replicação viral em macrófagos expostos a NETs previamente tratadas com inibidor de MPO. Macrófagos de indivíduos

saudáveis infectados *in vitro* pelo HIV-1 foram tratados com as concentrações 1, 12,5, 24 e 40 ng/mL de MPO, durante 3 horas. A replicação viral foi quantificada por ELISA após 14 dias (n=7), e definida em função do controle sem NETs. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão de cada condição. Dados analisados com One-Way ANOVA e pós-teste de Dunnett.

#### 4.8. Efeito das NETs sobre a integração do cDNA viral no genoma de macrófagos

Uma vez concretizado o achado de que as NETs reduzem a replicação viral em macrófagos infectados pelo HIV-1, buscou-se compreender o mecanismo responsável por este fenômeno. O tratamento dos macrófagos com as NETs foi realizado imediatamente após o período de infecção (18-20 horas), com lavagem das células para a remoção de partículas virais não internalizadas. Desta forma, as NETs estariam modulando, necessariamente, eventos pós-entrada do HIV-1 na célula. Assim, pela técnica de Nested-PCR (36), 72 horas após o tratamento, foi verificada a taxa de integração em macrófagos tratados ou não com NETs obtidas de neutrófilos de indivíduos saudáveis. A Figura 4.9 apresenta a quantificação de DNA proviral nos macrófagos (Figura 4.9A) e a normalização dos valores (Figura 4.9B), na qual se observa uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da integração do provírus em células expostas às NETs, com média de integração 75% inferior a do controle.



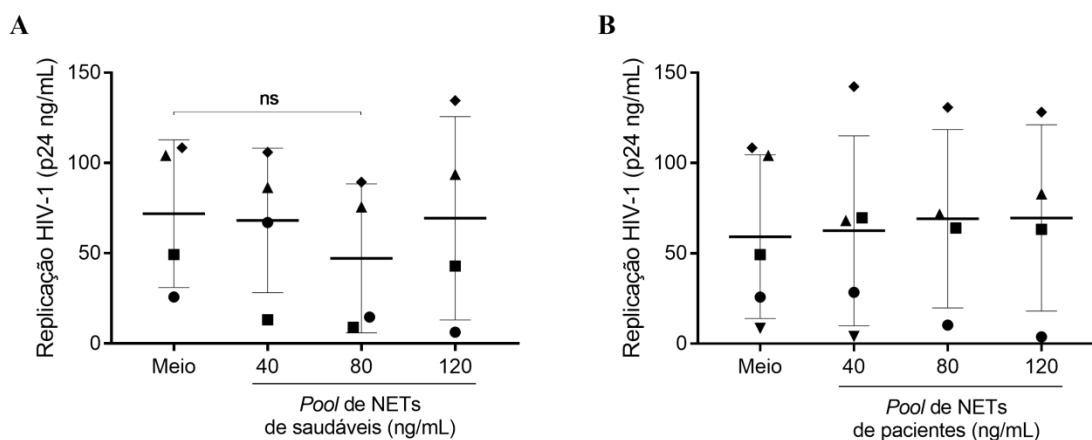
**Figura 4.9. NETs reduzem a integração do provírus de HIV-1.**

Macrófagos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* pelo HIV-1 foram tratados com NETs (40 ng/mL) por 3 horas, lavados e a integração do provírus de HIV-1 foi analisada por Nested-PCR após 72 horas (n=5). (A) Número de provírus integrado por genoma. (B) Normalização dos dados de (A). As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão. Dados analisados por teste t Student pareado. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



#### 4.9. Efeito das NETs sobre a replicação viral em PBMCs

Embora este trabalho avalie o efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, entendeu-se a importância de realizar uma análise preliminar com linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que são os principais alvos dessa infecção. Foi observado que, ao contrário dos macrófagos, as NETs não modularam a replicação viral dos PBMCs na concentração pré-estabelecida de 40 ng/mL (dados não mostrados). Verificou-se, então, se concentrações maiores de NETs poderiam revelar seu efeito modulador sobre a replicação nessas células. Avaliamos uma curva de concentrações de *pools* de NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis e de pacientes (Figura 4.10). As PBMCs infectadas foram tratadas com NETs na presença de 2% de soro fetal bovino por 2 horas e a quantificação de p24 no sobrenadante foi feita após 7 dias. Embora os resultados ainda sejam inconclusivos devido ao número pequeno de experimentos e à variação de intensidade no efeito, é possível que, na concentração de 80 ng/mL, *pools* de NETs de indivíduos saudáveis inibam a replicação viral em PBMCs. Esta hipótese será avaliada em experimentos futuros com um número maior de doadores.



**Figura 4.10. Efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs.**

PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* com HIV-1 e tratadas com diferentes concentrações de *pools* de NETs (A) de indivíduos saudáveis (n=4) ou (B) de pacientes (n=4) por 2 horas. A replicação viral foi quantificada por ELISA após 7 dias. Dados analisados por teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett. ns: não significativo.

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, as NETs possuem implicações fisiológicas e patológicas bastante variadas, podendo auxiliar o organismo do hospedeiro na contenção e eliminação de patógenos, ou favorecer a inflamação local e provocar dano tecidual (222,257,303). Diferentes estudos demonstram a capacidade das NETs de reter e eliminar patógenos, como bactérias, fungos, protozoários e, também, vírus (220,225,235,246). Entretanto, os estudos relacionando esse mecanismo da imunidade inata com a patogênese da infecção pelo HIV-1 ainda são escassos. Saitoh e colaboradores (2012) demonstraram que NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis estimulados pelo próprio HIV-1, inativam as partículas virais e, assim, reduzem a propagação do vírus (220). Além disso, um estudo recente demonstrou que NETs liberadas por neutrófilos do trato genital feminino são capazes de capturar e inativar o HIV-1, evitando a infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na mucosa vaginal (294). Nossos estudos anteriores revelaram que NETs produzidas por neutrófilos de indivíduos saudáveis inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos infectados *in vitro* (297). Esse fenômeno se mostrou dependente da presença e integridade das redes de DNA e da NE, e também foi associado à perda de infectividade das partículas virais liberadas pelas células tratadas com NETs (296).

As pessoas vivendo com HIV apresentam uma multiplicidade de condições que favorecem a formação de NETs, como a circulação do próprio vírus, DAMPs liberados durante o processo de morte celular, níveis elevados de mediadores inflamatórios e a translocação microbiana. Essas múltiplas condições podem explicar nosso achado sobre os níveis elevados de NETs observados no plasma de pacientes, de forma independente da carga viral, em particular, a correlação positiva entre os níveis de LPS e de complexos DNA-elastase. Além disso, é descrita uma maior ativação plaquetária nos pacientes submetidos à terapia antirretroviral e com carga viral indetectável quando comparados aos indivíduos saudáveis, o que também pode contribuir para a ativação dos neutrófilos e aumento da liberação de NETs de modo independente da carga viral (288). O DNA constitui o arcabouço das NETs e a NE é uma das proteínas granulares mais abundantes nessas estruturas; além disso, a detecção de complexos DNA-elastase por ELISA coincide com as descrições observadas na literatura (298,300,304,305).

O LPS, derivado de bactérias Gram-negativas, está relacionado ao fenômeno de translocação microbiana e é um potente indutor da liberação de NETs, o que nos permite interpretar a correlação positiva observada. Embora todos os pacientes, participantes voluntários, do presente estudo estivessem submetidos à terapia antirretroviral, alguns apresentaram carga viral elevada. A ausência de correlação entre os níveis de carga viral e NETs reforça que, mesmo na presença da terapia, os danos imunológicos e a inflamação crônica persistem, pois, outros fatores indutores da liberação dessas redes certamente são encontrados em níveis elevados, como a ativação plaquetária em pacientes com carga indetectável (77,288). É possível, ainda, que os pacientes apresentem uma alteração na atividade da enzima DNase, responsável pelo *clearance* das NETs, que contribua para o acúmulo dessas redes na circulação. Essa hipótese pode ser verificada pela determinação da atividade enzimática da DNase no soro de pacientes e de indivíduos saudáveis.

A liberação excessiva de NETs na circulação possui efeitos sistêmicos que contribuem para a progressão de doenças cardiovasculares, respiratórias e do câncer. Essas patologias são caracterizadas pelo aumento da liberação de citocinas inflamatórias, como é o caso da IL-1 $\beta$  produzida por células tumorais, que ativam os neutrófilos e induzem a liberação das NETs. Estas, por sua vez, favorecem a formação de trombos, pela ativação de plaquetas e depósito na parede dos vasos, e a ocorrência de metástases, pela ativação de fatores teciduais e carreamento de células tumorais (189,265,279). Estudo recente, realizado em colaboração com nosso grupo, demonstrou que o bloqueio de IL-1 $\beta$  em modelo murino de câncer de mama reduz a formação de NETs e o desenvolvimento de trombos (306). Tendo em vista que pessoas vivendo com HIV e submetidas à terapia antirretroviral possuem maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, o aumento da circulação de NETs é um achado importante cuja implicação sistêmica deve ser investigada (6,307).

Pessoas vivendo com HIV apresentam alterações imunes provocadas, direta e indiretamente, pelo vírus que podem ser observadas no fenótipo, produção e funcionalidade de células da imunidade inata e adquirida. Os neutrófilos, por exemplo, apresentam alterações funcionais, como redução da quimiotaxia, fagocitose e capacidade oxidativa, além de redução na expressão do receptor de IL-8 na membrana plasmática. Também é relatada, na literatura, uma neutropenia discreta em alguns pacientes (79,302). Essas células são altamente responsivas aos estímulos inflamatórios,

como citocinas e quimiocinas, e também a produtos antigênicos e patógenos (308). Na infecção pelo HIV-1, ocorre uma liberação massiva de DAMPs, derivados do efeito citopático do vírus sobre linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e de mediadores da resposta imune que buscam controlar a replicação e disseminação viral (76). Diante deste cenário, neutrófilos e monócitos são recrutados para os sítios de replicação, especialmente para os tecidos linfoides, e são ativados. Na presença da terapia antirretroviral, a replicação é controlada e os níveis de RNA viral na circulação diminuem podendo se tornar indetectáveis. Entretanto, os danos causados ao sistema imune, tanto pela replicação viral residual quanto pela própria terapia, persistem e estabelecem um quadro inflamatório crônico (76,302).

Tendo em vista as alterações celulares e esse quadro inflamatório crônico que favorece a liberação de NETs, foi questionado se neutrófilos isolados de pacientes poderiam ser ativados e responder à estimulação *in vitro*. Diversos autores reportam um aumento nos níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- $\alpha$  durante a infecção pelo HIV-1 e foi considerado relevante avaliar a produção de NETs mediante estímulo com moléculas recombinantes que reproduzem a presença dessas citocinas no cenário de ativação imune crônica (309,310). Foi observado que, embora os neutrófilos sejam provenientes do sangue periférico de indivíduos com inflamação crônica, decorrente da infecção pelo HIV-1, a sua capacidade de responder aos estímulos e liberar NETs *in vitro* se encontra preservada. As variações observadas na quantificação para as condições controle e células estimuladas com IL-8 ou TNF- $\alpha$  refletem variações interindividuais previstas para estudos com células primárias e relatadas por diversos autores (177,304). É importante comentar que fatores como sexo, idade, esquema terapêutico e comorbidades como diabetes, podem, também, influenciar na ativação dos neutrófilos e na liberação de NETs, e que algumas destas informações, infelizmente, não foram obtidas e analisadas no presente estudo (311–313). Como os estímulos utilizados promoveram uma indução significativa da liberação de NETs, presumiu-se que, mesmo durante a infecção pelo HIV-1, a expressão dos receptores de IL-8 (CXCR1 e CXCR2) e TNF- $\alpha$  (TNFR1), seja mantida em níveis suficientes para promover a ativação dos neutrófilos. Esta hipótese deverá ser confirmada em futuros estudos, assim como seria interessante avaliar também a resposta desses neutrófilos a outros estímulos, como o LPS e o próprio HIV-1, visto que ambos induzem a liberação de NETs via receptores TLR4 e TLR7/8,

respectivamente, e que essa infecção pode afetar a expressão destes receptores (220,311,314).

Um repertório numeroso e conhecido de moléculas pode ser encontrado associado ao DNA formando as NETs, entretanto, a quantidade e proporção de cada uma delas são altamente variáveis (305). Os estímulos oferecidos e as condições aos quais os neutrófilos são submetidos influenciam diretamente a composição das redes que serão liberadas e os efeitos biológicos dessas estruturas, sendo algumas proteínas encontradas, preferencialmente, em determinadas patologias (305). A avaliação da liberação de NETs por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV apresentada neste estudo é inédita. O estímulo utilizado *in vitro* para indução da liberação de NETs por neutrófilos de indivíduos saudáveis e de pessoas vivendo com HIV foi o mesmo, descartando o indutor como uma variável para os resultados obtidos.

Assim como NETs liberadas por neutrófilos de indivíduos saudáveis, verificamos que NETs liberadas por neutrófilos de pessoas vivendo com HIV inibem fortemente a replicação viral em macrófagos. Essa avaliação foi realizada tanto com NETs individuais quanto em *pools*. Como mencionado, as NETs apresentam, naturalmente, variações relativas à concentração das proteínas associadas ao DNA. Além disso, esse estudo foi realizado com neutrófilos primários sujeitos a uma variação que reflete características intrínsecas de cada doador. A composição de *pools* com NETs de 4 ou 5 doadores reduz essa possível interferência em nossa análise.

Ambos os tratamentos com NETs de pacientes revelaram inibição significativa da replicação do HIV-1. Esse resultado sugere que, independentemente das possíveis variações na composição proteica das NETs causadas pela infecção pelo HIV-1, as moléculas responsáveis pelo efeito biológico observado são conservadas em concentrações funcionais. Acredita-se, entretanto, que análises futuras devam se dedicar à composição proteica das NETs, investigando possíveis alterações, na presença e quantidade das proteínas associadas ao DNA, provocadas pela infecção e pela terapia antirretroviral, visto que ambos interferem na hematopoiese (76,287,302).

Diversos estudos demonstram uma modulação da atividade microbicida de macrófagos contra patógenos intracelulares após a captura ou interação com moléculas presentes nos grânulos de neutrófilos (192,243,315). Nesse sentido, o efeito inibitório promovido pelas NETs pode estar relacionado a algumas de suas proteínas específicas.

Em estudo anterior do nosso grupo, foi verificado que a NE é um componente essencial das NETs na promoção do efeito anti-HIV-1, uma vez que sua inibição reverte esse efeito e que a molécula recombinante o reproduz (296). O mecanismo pelo qual essa proteína reduz a replicação viral ainda não foi estabelecido, entretanto, na infecção por *L. major*, ela é descrita como capaz de inibir o crescimento do parasita em macrófagos ativado, de modo dependente do receptor TLR4 (316).

Como é possível que outras moléculas tenham efeito semelhante, foi investigada a participação da MPO sobre o efeito antiviral das NETs. Resultados de alguns estudos são controversos quanto ao papel dessa molécula sobre a infecção pelo HIV-1, apontando tanto uma atividade virucida com inativação do vírus, quanto uma cascata de sinalização que ativa NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, o LTR do HIV-1, induzindo a replicação viral (293). No presente estudo, foi avaliada uma curva de concentrações da MPO recombinante em macrófagos infectados pelo HIV-1 e observou-se uma inibição da replicação viral em células tratadas com 25 nM. Embora alguns autores já tenham relatado a capacidade dessa peroxidase de inativar o HIV-1 *in vitro*, acredita-se que no presente modelo a sua atuação, assim como a das NETs, seja sobre a célula infectada, visto que os tratamentos são feitos imediatamente pós-infecção e que não há partículas virais em suspensão para serem inativadas (220,236). Além disso, após 3 horas de tratamento, as células são lavadas e realimentadas com meio de cultura, o que reforça a hipótese de que a inibição ocorra na célula e não diretamente sobre o vírus. Os mecanismos envolvidos na sinalização celular desencadeada pelas NETs, bem como de suas moléculas de modo individual, ainda precisam ser explorados e esclarecidos.

Em macrófagos, a replicação do HIV-1 apresenta uma dinâmica diferente daquela observada em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Isso ocorre, em parte, devido à reduzida disponibilidade de dNTPs, causada pela atividade do fator de restrição SAMHD1. De acordo com Bejarano e colaboradores (2018), a entrada do HIV-1 nos macrófagos ocorre cerca de 8 horas após a infecção, que seria o início do contato da célula com a partícula viral. As etapas de transcrição reversa e a importação do cDNA viral para o núcleo, por sua vez, são concluídas entre 60 e 72 horas após a infecção (61).

Em nosso modelo de experimentação *in vitro*, a infecção dos macrófagos é realizada pela exposição destas células às partículas virais por 18-20 horas, seguida de lavagem com PBS para remoção de partículas que não foram internalizadas. O

tratamento com as NETs é realizado imediatamente após essa lavagem, o que evidencia que a inibição da replicação viral, observada depois de 14 dias, reflete uma interferência das NETs em eventos posteriores à entrada do HIV-1 na célula.

A etapa de integração cDNA viral no genoma da célula é crucial para o estabelecimento da infecção e início do ciclo replicativo. Dessa forma, investigou-se se o tratamento dos macrófagos com as NETs poderia afetar esse processo, e para isso, células infectadas e tratadas com NETs foram coletadas após 72 horas de infecção para quantificação do cDNA viral integrado no genoma. Essa quantificação foi realizada por Nested-PCR com base nos métodos descritos por Liszewski (36). Tendo em vista que as sequências *Alu* são um elemento repetitivo presente no genoma humano que favorecem a integração do cDNA do HIV-1, *primers* específicos para esta sequência foram utilizados em combinação com *primers* para a sequência *gag* do vírus. Com essa metodologia foi possível observar que cultivos de macrófagos tratados com NETs apresentam menor taxa de integração/genoma após 72 horas de infecção. Esse resultado sugere que as NETs modulam etapas iniciais do ciclo replicativo e justifica, pelo menos em parte, a reduzida replicação viral observada no sobrenadante das culturas após os 14 dias de infecção. Entretanto, não sabemos, por enquanto, se a ação dessas redes ocorre diretamente na etapa de integração ou em processos que a antecedem, como a transcrição reversa e a importação do cDNA viral para o núcleo (61). Em nosso laboratório, a análise precisa de qual etapa as NETs atuam e quais as possíveis modulações que elas promovem nos macrófagos é alvo de estudos futuros acerca desse fenômeno.

Ainda com relação à integração, é possível que a NE e a MPO, moléculas presentes nas NETs e capazes de inibir a replicação viral em macrófagos, possam reproduzir o efeito inibitório sobre essa etapa do ciclo replicativo (296). A avaliação desse efeito pode elucidar o papel dessas moléculas no contexto da infecção pelo HIV-1, não somente associadas às redes de DNA, compondo as NETs, como também liberadas no processo de degranulação.

Outra importante questão a ser respondida futuramente, refere-se aos receptores que participam da interação entre as NETs e os macrófagos. A literatura demonstra que o receptor RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) é expresso em diversas células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos, e atua na

homeostase, migração celular e ativação da resposta inflamatória (317–319). Alguns autores já descreveram que a ativação de RAGE pode modular a replicação do HIV-1 (320–322). Tendo em vista que determinadas moléculas presentes nas NETs, como S100A8/A9 e HMGB1, são capazes de interagir com esse receptor em células de Kupfer, estimulando a produção de IL-6, e com macrófagos, induzindo vias de morte celular, como a piroptose no contexto da sepse, parece relevante verificar se os receptores RAGE estão na origem de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na capacidade das NETs de controlar a replicação do HIV-1 (201,323,324).

Em nossas análises não foi observada perda de viabilidade celular em macrófagos expostos às NETs, mas também não foi avaliada a presença das moléculas mencionadas acima em NETs obtidas de neutrófilos de pacientes e de indivíduos saudáveis. Isso motiva a investigação da possível participação do receptor RAGE e qual via de sinalização é ativada por ele em nosso modelo de infecção pelo HIV-1. Nesse contexto, será importante verificar se as NETs modulam a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, visto que esse fator está presente na via de sinalização ativada por RAGE e é crítico na ativação do promotor LTR do HIV-1, relacionado à transcrição do genoma viral.

Ainda quanto à possível participação de outros receptores celulares, não se pode deixar de mencionar o TLR-4, pois vários componentes proteicos das NETs são agonistas deste receptor, o qual, quando estimulado, promove a inibição da replicação do HIV-1 tanto em macrófagos quanto em PBMCs (325,326).

Estudos com SLE demonstram que as NETs são capazes de estimular a produção de citocinas, em especial IFN tipo I, por células dendríticas plasmocitóides (184,191,277). Em nosso modelo, é possível supor que essas estruturas também induzam a produção de IFN tipo I por macrófagos, e que esta citocina ative fatores antivirais como APOBEC3G e SAMHD1, modulando assim, a infecção pelo HIV-1. Como foi visto que partículas de HIV-1 que emergem de macrófagos infectados expostos às NETs perdem infectividade, investigaremos em breve, por sequenciamento, se esta queda na capacidade infectiva pode estar relacionada a mutações G→A no genoma viral, as quais são provocadas pela atividade da proteína APOBEC3G, cuja síntese é induzida por Interferon (100,296). Visto que o efeito das NETs sobre os macrófagos pode variar em função do perfil de ativação destas células, nós também



pretendemos caracterizar o fenótipo dos macrófagos utilizados em nosso modelo de diferenciação *in vitro* para melhor compreender a relevância do nosso achado (327).

Os resultados obtidos com amostras clínicas destacam a relevância dos achados de Andrés Mojoli (Tese de Doutorado, 2018) e demonstram um novo mecanismo da imunidade inata no controle da infecção pelo HIV-1. Nossos dados não nos permitem afirmar que as NETs realmente inibem a replicação viral *in vivo*; no entanto, sugerem que a formação dessas estruturas possa ocorrer nos sítios de replicação viral e que, uma vez liberadas, possam interagir com macrófagos infectados, reduzindo a replicação do HIV-1 e a propagação viral para outras células e tecidos.

No início da infecção, momento em que há maior replicação viral nos tecidos linfoides associados à mucosa, a chegada dos neutrófilos e liberação de NETs com potencial antiviral pode reduzir o *pool* de células que serão infectadas pelo HIV-1, tanto pela inativação direta do vírus, quanto pela modulação da replicação viral em macrófagos, que atuam como células apresentadoras de antígeno, atenuando a depleção linfócitos T CD4<sup>+</sup> e reduzindo os danos teciduais (126,328). Em uma análise temporal, esse controle inicial da infecção pelas NETs poderia implicar em menor formação de reservatórios virais latentes em longo prazo. Por outro lado, tardiamente, a infiltração massiva de neutrófilos junto aos estímulos inflamatórios, que se acumulam ao longo da infecção, estimulariam uma liberação excessiva de NETs no tecido, a qual poderia contribuir para a reativação da replicação viral em células com infecção latente, favorecendo assim o aumento da carga viral plasmática, ou a liberação de partículas virais que podem ser imediatamente inativadas pelas próprias NETs.

Sivanandham e colaboradores (2018), demonstraram que neutrófilos isolados de primatas não-humanos infectados por SIV liberam NETs, e que estas interagem com células do sistema imune, incluindo macrófagos, em diferentes tecidos desses animais. Além disso, o aumento de NETs na circulação dos pacientes está de acordo com o que é observado em condições patológicas e em diferentes doenças infecciosas (181,189,285).

Deve-se notar que, embora as NETs tenham efeito anti-HIV-1 em macrófagos, essas estruturas concentram diferentes moléculas inflamatórias e enzimas, as quais podem estar relacionadas ao processo de inflamação sistêmica (329). Além disso, Sivanandham e colaboradores (2018) demonstraram em modelo de SIV, que NETs são capazes de capturar e destruir linfócitos T CD4<sup>+</sup>, possivelmente contribuindo para a

depleção destas células, observada durante a infecção. Acreditamos que o efeito benéfico ou prejudicial das NETs depende de um balanço entre a formação moderada ou excessiva destas estruturas nos tecidos onde ocorre intensa replicação viral. Deste modo, uma visão sistêmica do indivíduo infectado nos faz compreender as NETs como produto do recrutamento e ativação de neutrófilos, causados pela inflamação, mas também como um agente que contribui para a manutenção desse perfil inflamatório. Por isso, é necessário identificar e compreender os mecanismos pelos quais as NETs inibem a replicação viral em macrófagos e, também investigar o efeito destas estruturas em outras células-alvo da infecção pelo HIV-1, como linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células dendríticas. Neste sentido, em breve serão iniciados, pelo nosso grupo, estudos nos quais se pretende verificar se as NETs exercem similar efeito anti-HIV-1 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e identificar mecanismos moleculares que expliquem, entre outros fenômenos, a capacidade dessas estruturas de induzir a síntese de  $\beta$ -quimiocinas, e diminuir a integração do cDNA do HIV-1 no genoma das células infectadas por este vírus. O progresso dos nossos estudos poderá contribuir para ampliar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção pelo HIV-1, para melhor entender o papel dos neutrófilos no progresso da infecção e, talvez, futuramente, sugerir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controlar a infecção por este vírus.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam a participação das NETs na fisiopatogenia da infecção pelo HIV-1, visto que:

- Neutrófilos de pessoas vivendo com HIV respondem a estímulos *in vitro* liberando NETs capazes de inibir a replicação viral em macrófagos;
- Pacientes apresentam níveis elevados de NETs na circulação, que se correlacionam positivamente com os níveis séricos de LPS;
- A mieloperoxidase reproduz o efeito anti-HIV-1 das NETs;
- As NETs reduzem a integração do cDNA do HIV-1 no genoma de macrófagos infectados.

## 7. PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente trabalho estão descritas abaixo, que serão objeto de estudos dos projetos de doutorado da autora desta dissertação e de mestrado de um novo estudante do nosso grupo. Assim, ao longo dos próximos dois a quatro anos, nós pretendemos:

- Analisar o fenótipo dos macrófagos primários diferenciados *in vitro*;
- Avaliar o efeito das NETs sobre a expressão de receptores de entrada do HIV-1 em macrófagos;
- Quantificar os produtos da retrotranscrição do HIV-1 em macrófagos expostos às NETs;
- Identificar o papel da elastase neutrofílica e da mieloperoxidase no aumento da produção de  $\beta$ -quimiocinas por macrófagos, e na queda da integração do HIV-1 no genoma destas células;
- Avaliar a expressão de IFN tipo I e a modulação de fatores de restrição viral (tais como, APOBEC3G e SAMHD1) em macrófagos expostos às NETs;
- Examinar a ocorrência de mutações no DNA proviral HIV-1 com assinatura de APOBEC3G;
- Verificar a produção de NETs por neutrófilos de pacientes e de indivíduos saudáveis estimulados com plaquetas ativadas;
- Avaliar a atividade enzimática da DNase no soro de pacientes e de indivíduos saudáveis;
- Investigar a participação do receptor RAGE no efeito anti-HIV-1 promovido pelas NETs;
- Verificar se as NETs modulam a replicação do HIV-1 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e analisar os mecanismos envolvidos neste fenômeno.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barré-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). *Rev Investig Clin.* 2004;56(2):126–9.
2. Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev.* 2013;254(1):78–101.
3. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men . *N Engl J Med.* 1981;305(24):1425–31.
4. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular.* In: Elsevier, organizador. 9ª. Rio de Janeiro; 2019. p. 1580.
5. Goedert JJ, Gallo RC. Epidemiological evidence that HTLV-III is the aids agent. *Eur J Epidemiol.* 1985;1(3):155–9.
6. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(October).
7. Gao F, Balles E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature.* 1999;397(6718):436–41.
8. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science (80- ).* 2000;287(5453):607–14.
9. Seitz R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;43(3):203–22.
10. Peruski AH, Wesolowski LG, Delaney KP, Chavez PR, Owen SM, Granade TC, et al. Trends in HIV-2 Diagnoses and Use of the HIV-1/HIV-2 Differentiation Test — United States, 2010–2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(3):63–6.
11. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* dezembro de 1986;324(6098):691–5.
12. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(6):780–7.
13. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):1–22.
14. Gottlieb GS. Changing HIV epidemics. *AIDS.* janeiro de 2013;27(1):135–7.
15. Ingole NA, Sarkate PP, Paranjpe SM, Shinde SD, Lall SS, Mehta PR. HIV-2 infection: Where are we today? *J Glob Infect Dis.* 2013;5(3):110–3.
16. De Leys R, Vanderborcht B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human

- immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol.* 1990;64(3):1207–16.
17. Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med.* setembro de 1998;4(9):1032–7.
  18. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2 de agosto de 2009;15(8):871–2.
  19. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS.* 2019;14(3):153–60.
  20. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *Aids.* 2011;25(5):679–89.
  21. Yamaguchi J, Vallari A, McArthur C, Sthreshley L, Cloherty GA, Berg MG, et al. Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2020;83(3):319–22.
  22. UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS). UNAIDS DATA 2019. Geneva; 2019.
  23. Marsh K, Eaton JW, Mahy M, Sabin K, Autenrieth CS, Wanyeki I, et al. Global, regional and country-level 90-90-90 estimates for 2018: Assessing progress towards the 2020 target. *Aids.* 2019;33(August 2019):S213–26.
  24. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília; 2018.
  25. Fanales-Belasio E, Raimondo, Mariangela; Suligoj, Barbara; Buttò S. Quality of life in mental health services with a focus on psychiatric rehabilitation practice. *Ann Ist Super Sanità.* 2011;47(4):363–72.
  26. Steckbeck JD, Kuhlmann AS, Montelaro RC. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: Functionally rich and structurally enigmatic. *J Gen Virol.* 2013;94(PART11):1–19.
  27. Tang S, Zhao J, Wang A, Viswanath R, Harma H, Little RF, et al. Characterization of immune responses to capsid protein p24 of human immunodeficiency virus type 1 and implications for detection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(8):1244–51.
  28. Nkeze J, Li L, Benko Z, Li G, Zhao RY. Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci.* 2015;5(1):1–13.
  29. Seelamgari A. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 2004;9(1–3):2388.
  30. Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, Bourgarel-Rey V, Peyrot V, Esquieu D, et al. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48197–204.

31. Steffens CM, Hope TJ. Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *AIDS*. 2001;15:S21–6.
32. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* (80- ). 1988;241(4870):1221–3.
33. Vicenzi E, Poli G. Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro. *Tissue Antigens*. 2013;81(2):61–71.
34. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 22 de dezembro de 2010;7(1):54.
35. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. THE CAUSES AND CONSEQUENCES OF HIV EVOLUTION. 2004;5(January):52–61.
36. Liszewski MK, Yu JJ, O’Doherty U. Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. *Methods*. abril de 2009;47(4):254–60.
37. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):1–17.
38. Roebuck KA, Saifuddin M. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr*. 1999;8(2):67–84.
39. Kilaeski EM, Shah S, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*. 2009;6:1–24.
40. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. 29 de agosto de 2015;13(8):484–96.
41. Jolly C. Cell-to-cell transmission of retroviruses: Innate immunity and interferon-induced restriction factors. *Virology*. 2011;411(2):251–9.
42. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe*. março de 2016;19(3):280–91.
43. Agosto LM, Uchil PD, Mothes W. HIV cell-to-cell transmission: Effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. *Trends Microbiol*. 2015;23(5):289–95.
44. Gordon S. The macrophage: Past, present and future. *Eur J Immunol*. 2007;37(SUPPL. 1):9–17.
45. Belhareth R. Macrophage populations and self-renewal: Changing the paradigm. *World J Immunol*. 2015;5(3):131.
46. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*. 2016;17(1):34–40.
47. Jurberg AD, Cotta-de-Almeida V, Temerozo JR, Savino W, Bou-Habib DC, Riederer I. Neuroendocrine Control of Macrophage Development and Function. *Front Immunol*. 25 de junho de 2018;9.

48. Martinez FO. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13(13):453.
49. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest.* 1 de maio de 1986;77(5):1712–5.
50. Koenig S, Gendelman H, Orenstein J, Dal Canto M, Pezeshkpour G, Yungbluth M, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* (80- ). 5 de setembro de 1986;233(4768):1089–93.
51. Herskovitz J, Gendelman HE. HIV and the Macrophage: From Cell Reservoirs to Drug Delivery to Viral Eradication. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2019;14(1):52–67.
52. Kedzierska K, Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem.* novembro de 2002;9(21):1893–903.
53. Sattentau QJ, Stevenson M. Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host Microbe.* 2016;19(3):304–10.
54. Tsang J, Chain BM, Miller RF, Webb BLJ, Barclay W, Towers GJ, et al. Europe PMC Funders Group HIV-1 infection of macrophages is dependent on evasion of innate immune cellular activation. 2010;23(April 2009):2255–63.
55. 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* (80- ). 15 de dezembro de 1995;270(5243):1811–5.
56. Shen R, Meng G, Ochsenbauer C, Clapham PR, Grams J, Novak L, et al. Stromal Down-Regulation of Macrophage CD4/CCR5 Expression and NF- $\kappa$ B Activation Mediates HIV-1 Non-Permissiveness in Intestinal Macrophages. Douek DC, organizador. *PLoS Pathog.* 26 de maio de 2011;7(5):e1002060.
57. King DFL, Siddiqui AA, Buffa V, Fischetti L, Gao Y, Stieh D, et al. Mucosal Tissue Tropism and Dissemination of HIV-1 Subtype B Acute Envelope-Expressing Chimeric Virus. *J Virol.* 15 de janeiro de 2013;87(2):890–9.
58. Porcheray F, Samah B, Léone C, Dereuddre-Bosquet N, Gras G. Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. *Virology.* 2006;349(1):112–20.
59. Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G. Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J Leukoc Biol.* abril de 2010;87(4):599–608.
60. Kumar A, Herbein G. The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. *Mol Cell Ther.* 2014;2(1):10.
61. Bejarano DA, Puertas MC, Börner K, Martinez-Picado J, Müller B, Kräusslich HG. Detailed characterization of early HIV-1 replication dynamics in primary



- human macrophages. *Viruses*. 2018;10(11):1–25.
62. Guillemard E, Jacquemot C, Aillet F, Schmitt N, Barré-Sinoussi F, Israël N. Human immunodeficiency virus 1 favors the persistence of infection by activating macrophages through TNF. *Virology*. novembro de 2004;329(2):371–80.
  63. Hollenbaugh JA, Tao S, Lenzi GM, Ryu S, Kim D, Diaz-griffero F, et al. dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. 2014;11(1):1–12.
  64. 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.
  65. Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Kräusslich HG. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog*. 2007;3(3).
  66. Waki K, Freed EO. Macrophages and Cell-Cell Spread of HIV-1. 2010;4:1603–20.
  67. Gousset K, Ablan SD, Coren L V., Ono A, Soheilian F, Nagashima K, et al. Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS Pathog*. 2008;4(3).
  68. Groot F, Welsch S, Sattentau QJ. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood*. 2008;111(9):4660–3.
  69. Koppensteiner H, Wu L. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*. 2012;9(1):82.
  70. Tan J, Sattentau QJ. The HIV-1-containing macrophage compartment: A perfect cellular niche? *Trends Microbiol*. 2013;21(8):405–12.
  71. Chu H, Wang J-J, Qi M, Yoon J-J, Chen X, Wen X, et al. Tetherin/BST-2 Is Essential for the Formation of the Intracellular Virus-Containing Compartment in HIV-Infected Macrophages. *Cell Host Microbe*. setembro de 2012;12(3):360–72.
  72. Barreto-de-Souza V, Xavier Medeiros T, Machado Motta MC, Chequer Bou-Habib D, Saraiva EM. 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. *Microbes Infect*. 2008;10(6):642–9.
  73. Bashirova AA, Thomas R, Carrington M. HLA/KIR restraint of HIV: Surviving the fittest. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:295–317.
  74. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):2–18.
  75. Yarchoan R, Uldrick TS. HIV-Associated Cancers and Related Diseases. Longo DL, organizador. *N Engl J Med*. 15 de março de 2018;378(11):1029–41.

76. Yaseen MM, Abuharfeil NM, Yaseen MM, Shabsoug BM. The role of polymorphonuclear neutrophils during HIV-1 infection. *Arch Virol.* janeiro de 2018;163(1):1–21.
77. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365–71.
78. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013;21(1):6–13.
79. Yaseen MM, Abuharfeil NM, Yaseen MM, Shabsoug BM. The role of polymorphonuclear neutrophils during HIV-1 infection. *Arch Virol.* 4 de janeiro de 2018;163(1):1–21.
80. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, Santiago ML, et al. Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell.* novembro de 2010;143(5):789–801.
81. Doitsh G, Galloway NLKK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Pyroptosis drives CD4 T-cell depletion. *Nature.* 2014;505(7484):509–14.
82. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. Immune Control of HIV. *J life Sci (Westlake Village, Calif).* junho de 2019;1(1):4–37.
83. Yin X, Langer S, Zhang Z, Herbert KM, Yoh S, König R, et al. Sensor Sensibility—HIV-1 and the Innate Immune Response. *Cells.* 20 de janeiro de 2020;9(1):254.
84. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med.* fevereiro de 1995;1(2):129–34.
85. Holm GH, Gabuzda D. Distinct Mechanisms of CD4+ and CD8+ T-Cell Activation and Bystander Apoptosis Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions. *J Virol.* 15 de maio de 2005;79(10):6299–311.
86. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature.* 2015;526(7575):666–71.
87. Leal VNC, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows. *Mol Immunol.* 2020;118(November 2019):9–18.
88. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014;514(7521):187–92.
89. Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol.* 26 de novembro de 2010;11(11):1005–13.
90. Geijtenbeek TBH. Host DNase TREX1 hides HIV from DNA sensors. *Nat*

- Immunol. 19 de novembro de 2010;11(11):979–80.
91. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent.* 2019;43(1).
  92. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de março de 2012;4(3):a006049–a006049.
  93. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* (80- ). 15 de fevereiro de 2013;339(6121):786–91.
  94. Ma Z, Damania B. The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell Host Microbe.* fevereiro de 2016;19(2):150–8.
  95. McGettrick AF, O’Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(1):20–7.
  96. Hiscott J, Kwon H, Génin P, Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers : viral appropriation of the NF-  $\kappa$  B pathway Find the latest version : Hostile takeovers : viral appropriation of the NF-  $\kappa$  B pathway. *J Clin Invest.* 2001;107(2):143–51.
  97. Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation. *Science* (80- ). 2005;309(5742):1854–7.
  98. Zhang L, Mosoian A, Schwartz ME, Florman SS, Gunasekaran G, Schiano T, et al. HIV infection modulates IL-1 $\beta$  response to LPS stimulation through a TLR4-NLRP3 pathway in human liver macrophages. *J Leukoc Biol.* 18 de abril de 2019;105(4):783–95.
  99. Simard S, Maurais É, Gilbert C, Tremblay MJ. LPS reduces HIV-1 replication in primary human macrophages partly through an endogenous production of type I interferons. *Clin Immunol.* 2008;127(2):198–205.
  100. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* dezembro de 2011;1(6):519–25.
  101. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol.* 21 de março de 2014;32(1):513–45.
  102. Utay NS, Douek DC. Interferons and HIV Infection: The Good, the Bad, and the Ugly. *Pathog Immun.* 2016;1(1):107.
  103. Wang B, Kang W, Zuo J, Kang W, Sun Y. The significance of type-I interferons in the pathogenesis and therapy of human immunodeficiency virus 1 infection. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1–12.
  104. Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol.* 2018;9(December):2876.

105. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*. 2005;105(6):2458–64.
106. Zhen A, Rezek V, Youn C, Lam B, Chang N, Rick J, et al. Targeting type I interferon – mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. 2017;127(1).
107. Dion M-L, Poulin J-FO, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, et al. HIV Infection Rapidly Induces and Maintains a Substantial Suppression of Thymocyte Proliferation T cell receptor excision circles (TREC)s, molecular markers of distinct T cell receptor rearrangements occurring at different stages of thymocyte develop. *Immunity*. 2004;21:757–68.
108. Muratori C, Sistigu A, Ruggiero E, Falchi M, Bacigalupo I, Palladino C, et al. Macrophages Transmit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Products to CD4-Negative Cells: Involvement of Matrix Metalloproteinase 9 . 2007;81(17):9078–87.
109. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99–109.
110. Feria MG, Taborda NA, Hernandez JC, Rugeles MT. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1 $\beta$ , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. Puebla I, organizador. *PLoS One*. 19 de abril de 2018;13(4):e0192845.
111. Chattergoon MA, Latanich R, Quinn J, Winter ME, Buckheit RW, Blankson JN, et al. HIV and HCV Activate the Inflammasome in Monocytes and Macrophages via Endosomal Toll-Like Receptors without Induction of Type 1 Interferon. 2014;10(5):1–12.
112. Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol Immunol*. 2020;64(4):252–69.
113. Collins DR, Gaiha GD, Walker BD. CD8+ T cells in HIV control, cure and prevention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(8):471–82.
114. 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.
115. Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, et al. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med*. 3 de maio de 1999;189(9):1489–96.
116. Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*. junho de 2011;133(2):190–6.
117. Poonia B, Pauza CD, Salvato MS. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. *Retrovirology*. 2009;6(1):91.
118. Kaslow RA, Rivers C, Tang J, Bender TJ, Goepfert PA, El Habib R, et al.

- Polymorphisms in HLA Class I Genes Associated with both Favorable Prognosis of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Infection and Positive Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to ALVAC-HIV Recombinant Canarypox Vaccines. *J Virol.* 2001;75(18):8681–9.
119. Kumar P. Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. *Indian J Med Res.* setembro de 2013;138(3):291–3.
  120. Fenwick C, Joo V, Jacquier P, Noto A, Banga R, Perreau M, et al. T-cell exhaustion in HIV infection. 2019;(July):149–63.
  121. 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. *Nat Med.* 1 de outubro de 2006;12(10):1198–202.
  122. 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.
  123. Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res.* setembro de 2008;6(5):388–400.
  124. Bachmann N, von Siebenthal C, Vongrad V, Turk T, Neumann K, Beerenwinkel N, et al. Determinants of HIV-1 reservoir size and long-term dynamics during suppressive ART. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–11.
  125. Vanhamel J, Bruggemans A, Debyser Z. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *J virus Erad.* 2019;5(1):3–9.
  126. Wong ME, Jaworowski A, Hearps AC. The HIV reservoir in monocytes and macrophages. *Front Immunol.* 2019;10(JUN).
  127. Wallet C, De Rovere M, Van Assche J, Daouad F, De Wit S, Gautier V, et al. Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(October):1–18.
  128. Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: The main obstacles to viral eradication. *Clin Infect Dis.* 2002;34(1):91–7.
  129. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe.* janeiro de 2018;23(1):14–26.
  130. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 12 de fevereiro de 2009;360(7):692–8.
  131. Atta MG, De Seigneux S, Lucas GM. Clinical pharmacology in HIV therapy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(3):435–44.
  132. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function : From Mechanisms to Disease.

133. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol.* 2018;9(FEB):1–17.
134. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity.* fevereiro de 2018;48(2):364-379.e8.
135. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* 2015;10(4):562–73.
136. Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(April):255–65.
137. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* 2008;125(3):281–8.
138. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423–31.
139. Köhler A, De Filippo K, Hasenberg M, Van Den Brandt C, Nye E, Hosking MP, et al. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood.* 2011;117(16):4349–57.
140. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(9):1415–23.
141. Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun.* 2013;5(4):304–14.
142. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134–47.
143. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine.* setembro de 2008;43(3):402–7.
144. Ueda Y, Cain DW, Kuraoka M, Kondo M, Kelsoe G. IL-1R Type I-Dependent Hemopoietic Stem Cell Proliferation Is Necessary for Inflammatory Granulopoiesis and Reactive Neutrophilia. *J Immunol.* 2009;182(10):6477–84.
145. Eskin MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim J-H, Liang S, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol.* 25 de maio de 2012;13(5):465–73.
146. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA, et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.* 14 de maio de 2017;10(3):673–84.
147. Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, Mei J, Dai N, O’Leary CE, et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med.* 20 de maio de 2014;20(5):524–30.

148. Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625–7.
149. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, et al. Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell*. maio de 2013;153(5):1025–35.
150. Lahoz-Beneytez J, Elemans M, Zhang Y, Ahmed R, Salam A, Block M, et al. Human neutrophil kinetics: Modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*. 2016;127(26):3431–8.
151. Ella K, Mócsai A, Káldi K. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? *Eur J Clin Invest*. 2018;48(January):1–9.
152. Aroca-Crevillén A, Adrover JM, Hidalgo A. Circadian Features of Neutrophil Biology. *Front Immunol*. 2020;11(April):1–9.
153. Adrover JM, del Fresno C, Crainiciuc G, Cuartero MI, Casanova-Acebes M, Weiss LA, et al. A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity*. 2019;50(2):390-402.e10.
154. Adrover JM, Aroca-Crevillén A, Crainiciuc G, Ostos F, Rojas-Vega Y, Rubio-Ponce A, et al. Programmed ‘disarming’ of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat Immunol*. 2020;21(2):135–44.
155. Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583–93.
156. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. outubro de 2013;94(4):595–601.
157. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005;22(3):285–94.
158. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 25 de fevereiro de 2012;13(2):170–80.
159. Minns D, Smith KJ, Findlay EG. Review Article Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. 2019;2019.
160. Silvestre-roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Review Article Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. 2016;127(18):2173–82.
161. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):181–218.

162. Zeng MY, Miralda I, Armstrong CL, Uriarte SM, Bagaitkar J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol Oral Microbiol.* 7 de abril de 2019;34(2):27–38.
163. Liese J, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Belohradsky B., Jendrossek V, et al. Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet.* janeiro de 1996;347(8996):220–3.
164. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231–41.
165. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The neutrophil's choice: Phagocytose vs make neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology.* 2018.
166. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194–201.
167. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677–91.
168. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 14 de novembro de 2014;15(11):1017–25.
169. Warnatsch A, Tsourouktoglou TD, Branzk N, Wang Q, Reincke S, Herbst S, et al. Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. *Immunity.* 2017;46(3):421–32.
170. Sagiv JY, Voels S, Granot Z. Isolation and characterization of low- vs. High-density neutrophils in cancer. *Methods Mol Biol.* 2016;1458:179–93.
171. Hsu BE, Tabariès S, Johnson RM, Andrzejewski S, Senecal J, Lehuédé C, et al. Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis. *Cell Rep.* 2019;27(13):3902-3915.e6.
172. Kegerreis BJ, Catalina MD, Geraci NS, Bachali P, Lipsky PE, Grammer AC. Genomic Identification of Low-Density Granulocytes and Analysis of Their Role in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2019;202(11):3309–17.
173. Neil LJO, Kaplan MJ, Carmona-rivera C. The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Damage in Systemic Lupus Erythematosus. 2019;1–13.
174. Ostendorf L, Mothes R, van Koppen S, Lindquist RL, Bellmann-Strobl J, Asseyer S, et al. Low-Density Granulocytes Are a Novel Immunopathological Feature in Both Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Immunol.* 2019;10(November):13–8.
175. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et



- al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80- ). 2004;303(5663):1532–5.
176. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes : an integrated view. 2007;219:88–102.
  177. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, Van Cappellen WA, Houtsmuller AB, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One*. 2017;12(5):1–29.
  178. Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial and vascular compartments in severe Covid-19. *J Exp Med*. 2020;217(12).
  179. Kano H, Aminul Huq M, Tsuda M, Noguchi H, Takeyama N. Sandwich ELISA for Circulating Myeloperoxidase- and Neutrophil Elastase-DNA Complexes Released from Neutrophil Extracellular Traps. *Adv Tech Biol Med*. 2017;05(01):366.
  180. Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, Takenaka N, Gocho T, Huq MA. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. 2018;1–10.
  181. Schechter MC, Buac K, Adekambi T, Cagle S, Celli J, Ray SM, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182587.
  182. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577–82.
  183. Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Neutrophil Extracellular Traps in Infectious Human Diseases. *Role Neutrophils Dis Pathog*. 2017;3–25.
  184. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016;22(2):146–53.
  185. Wang H, Li T, Chen S, Gu Y, Ye S. Neutrophil extracellular trap mitochondrial DNA and its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of metformin. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(12):3190–200.
  186. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. 2016. p. 302.
  187. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10).
  188. Vorobjeva N V, Pinegin B V. Neutrophil Extracellular Traps : Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. 2014;79(12):1286–96.
  189. Albrengues J, Shields MA, Ng D, Park CG, Ambrico A, Poindexter ME, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant

- cancer cells in mice. 2018;4227.
190. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, de Chaisemartin L, Gorges R, Sandré C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol.* 2014;
  191. Garcia-romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. 2011;3(73).
  192. Linhares-Lacerda L, Temerozo JR, Ribeiro-Alves M, Azevedo EP, Mojoli A, Nascimento MTC, et al. Neutrophil extracellular trap-enriched supernatants carry microRNAs able to modulate TNF- $\alpha$  production by macrophages. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–13.
  193. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RTA, Soehnlein O, et al. Auto-Antigenic Protein-DNA Complexes Stimulate Plasmacytoid Dendritic Cells to Promote Atherosclerosis. *Circulation.* 3 de abril de 2012;125(13):1673–83.
  194. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease. *J Immunol.* 1 de abril de 2012;188(7):3522–31.
  195. Whittall-García LP, Torres-Ruiz J, Zentella-Dehesa A, Tapia-Rodríguez M, Alcocer-Varela J, Mendez-Huerta N, et al. Neutrophil extracellular traps are a source of extracellular HMGB1 in lupus nephritis: associations with clinical and histopathological features. *Lupus.* 16 de novembro de 2019;28(13):1549–57.
  196. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564–9.
  197. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Frontiers in Immunology.* 2017.
  198. Haritha VH, Seena P, Shaji B V, Nithin TU, Hazeena VN, Anie Y. Monocyte clearance of apoptotic neutrophils is unhindered in the presence of NETosis, but proteins of NET trigger ETosis in monocytes. *Immunol Lett.* março de 2019;207:36–45.
  199. Farrera C, Fadeel B. Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process. *J Immunol.* 2013;191(5):2647–56.
  200. Lazzaretto B, Fadeel B. Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. 2019;(14).
  201. Chen L, Zhao Y, Lai D, Zhang P, Yang Y, Li Y, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. 2018;
  202. Donis-maturano L, Sánchez-torres LE, Cerbulo-vázquez A, Chacón-salinas R, García-romo GS, Orozco-uribe MC, et al. Prolonged exposure to neutrophil

- extracellular traps can induce mitochondrial damage in macrophages and dendritic cells. 2015;
203. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2006;16(4):396–400.
  204. Storisteanu DML, Pocock JM, Cowburn AS, Juss JK, Nadesalingam A, Nizet V, et al. Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(4):423–31.
  205. Bouchery T, Moyat M, Sotillo J, Silverstein S, Volpe B, Coakley G, et al. Hookworms Evade Host Immunity by Secreting a Deoxyribonuclease to Degrade Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host Microbe*. 2020;27(2):277-289.e6.
  206. Khatua B, Bhattacharya K, Mandal C. Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. *J Leukoc Biol*. 1 de abril de 2012;91(4):641–55.
  207. Lauth X, Von Köckritz-Blickwede M, McNamara CW, Myskowski S, Zinkernagel AS, Beall B, et al. M1 protein allows group a streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun*. 2009;1(3):202–14.
  208. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(AUG).
  209. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *J Innate Immun*. 2018;10(5–6):432–41.
  210. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner W-D. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules*. 2015;5(2):702–23.
  211. Aulik NA, Hellenbrand KM, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and Its Leukotoxin Cause Macrophage Extracellular Trap Formation by Bovine Macrophages. Urban JF, organizador. *Infect Immun*. maio de 2012;80(5):1923–33.
  212. Loureiro A, Pais C, Sampaio P. Relevance of Macrophage Extracellular Traps in *C. albicans* Killing. 2019;10(December).
  213. Campillo-Navarro M, Leyva-Paredes K, Donis-Maturano L, González-Jiménez M, Paredes-Vivas Y, Cerbulo-Vázquez A, et al. *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*. 2017;222(2):432–9.
  214. Costanza M, Poliani PL, Portararo P, Cappetti B, Musio S, Pagani F, et al. DNA threads released by activated CD4 + T lymphocytes provide autocrine costimulation. *Proc Natl Acad Sci*. 30 de abril de 2019;116(18):8985–94.
  215. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol*. 2013;3(JAN).

216. Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 2 de setembro de 2017;102(3):775–81.
217. Ingelsson B, Söderberg D, Strid T, Söderberg A, Bergh A-C, Loitto V, et al. Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *Proc Natl Acad Sci.* 16 de janeiro de 2018;115(3):E478–87.
218. Koh CC, Wardini AB, Vieira M, Passos LSA, Martinelli PM, Neves EGA, et al. Human CD8+ T Cells Release Extracellular Traps Co-Localized With Cytotoxic Vesicles That Are Associated With Lesion Progression and Severity in Human Leishmaniasis. *Front Immunol.* 8 de outubro de 2020;11(October):1–19.
219. Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J Immunol.* 15 de agosto de 2014;193(4):1954–65.
220. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012;12(1):109–16.
221. Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS One.* 2015;10(4):1–14.
222. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol.* 15 de setembro de 2012;189(6):2689–95.
223. DeSouza-Vieira T, Guimarães-Costa A, Rochael NC, Lira MN, Nascimento MT, Lima-Gomez P de S, et al. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania : role of PI3Kγ, ERK, PI3Kσ, PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. *J Leukoc Biol.* outubro de 2016;100(4):801–10.
224. Bonaventura A, Liberale ÁL, Carbone ÁF, Vecchié A, Giovanni CD, Fabrizio GC, et al. The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. 2018;(January).
225. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun.* 2018;1–8.
226. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytniuk LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386–93.
227. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A. Article A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *CellReports.* 2014;8(3):883–96.
228. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil

- extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 26 de janeiro de 2009;184(2):205–13.
229. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 30 de agosto de 2010;207(9):1853–62.
230. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol.* 26 de março de 2015;11(3):189–91.
231. Thiama HR, Wong SL, Qiu R, Kittisopikul M, Vahabikashi A, Goldman AE, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(13):7326–37.
232. Yipp BG, Kubes P. NETosis: How vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784–94.
233. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 15 de dezembro de 2010;185(12):7413–25.
234. Burgener SS, Schroder K. Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* julho de 2020;12(7):a037028.
235. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci.* 21 de abril de 2009;106(16):6748–53.
236. KLEBANOFF SJ, COOMBS RW. Virucidal Effect of Stimulated Eosinophils on Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* janeiro de 1996;12(1):25–9.
237. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol.* 2011;179(1):199–210.
238. Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol.* 2012;91(3):369–76.
239. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2011;187(1):538–52.
240. Odoabas D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J Immunol Res.* 2016;2016.
241. Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, Von Köckritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010;2(6):576–86.

242. Guimarães-Costa AB, DeSouza-Vieira TS, Paletta-Silva R, Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR, Saraiva EM. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun*. 2014;82(4):1732–40.
243. Braian C, Hoge V, Stendahl O. *Mycobacterium tuberculosis*-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun*. 2013;5(6):591–602.
244. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009;89(1):29–37.
245. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends Parasitol*. 2016;32(5):392–401.
246. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006;8(4):668–76.
247. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida albicans*. *J Immunol*. 15 de abril de 2013;190(8):4136–48.
248. Hiroki CH, Toller-Kawahisa JE, Fumagalli MJ, Colon DF, Figueiredo LTM, Fonseca BALD, et al. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. *Front Immunol*. 2020;10(January):1–11.
249. Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil extracellular traps go viral. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. 2016. p. 366.
250. Gwyer Findlay E, Currie SM, Davidson DJ. Cationic host defence peptides: Potential as antiviral therapeutics. *BioDrugs*. 2013;27(5):479–93.
251. Cortjens B, De Boer OJ, De Jong R, Antonis AFG, Sabogal Piñeros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol*. 2016;238(3):401–11.
252. Earhart AP, Holliday ZM, Hofmann HV, Schrum AG. Consideration of dornase alfa for the treatment of severe COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *New Microbes New Infect*. maio de 2020;35:100689.
253. Veras FP, Pontelli M, Silva C, Toller-Kawahisa J, de Lima M, Nascimento D, et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps (NETs) mediate COVID-19 pathology. *medRxiv*. 2020;217(12).
254. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8.
255. Iwasaki M, Saito J, Zhao H, Sakamoto A, Hirota K, Ma D. Inflammation Triggered by SARS-CoV-2 and ACE2 Augment Drives Multiple Organ Failure of Severe COVID-19: Molecular Mechanisms and Implications. *Inflammation*. 8

de outubro de 2020;

256. Zuo Y, Kanthi Y, Knight JS. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. 2020;
257. Kim SJ, Jenne CN. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury. Vol. 28, *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 546–54.
258. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020;58.
259. Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*. 2020;136(10):1169–79.
260. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, et al. Effect of Treatment with Dornase Alpha on Airway Inflammation in Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de março de 2004;169(6):719–25.
261. Okur HK, Yalcin K, Tastan C, Demir S, Yurtsever B, Karakus GS, et al. Preliminary report of in vitro and in vivo effectiveness of dornase alfa on SARS-CoV-2 infection. *New Microbes New Infect*. 2020;37:100756.
262. Weber AG, Chau AS, Egeblad M, Barnes BJ, Janowitz T. Nebulized in-line endotracheal dornase alfa and albuterol administered to mechanically ventilated COVID-19 patients: A case series. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci*. 15 de maio de 2020;
263. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880–5.
264. Thålin C, Hisada Y, Lundström S, Mackman N, Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1724–38.
265. Qi H, Yang S, Zhang L. Endothelial dysfunction in atherosclerosis and thrombosis. *Front Immunol*. 2017;8(AUG).
266. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463–9.
267. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 2014;12(12):2074–88.
268. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*. 2015;126(2):242–6.

269. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(32):13076–81.
270. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017;129(10):1357–67.
271. Nahrendorf M, Swirski FK. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis. *Science (80- )*. 2015;349(6245):237–8.
272. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, Mcconkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. 2018;8292(April):1–11.
273. Moschonas IC, Tselepis AD. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis. *Atherosclerosis*. 2019;288(June):9–16.
274. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*. 2016.
275. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *J Immunol*. 15 de março de 2010;184(6):3284–97.
276. Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016;99(2):265–78.
277. Tian J, Avalos AM, Mao S, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9 – dependent activation by DNA- containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. 2007;8(5).
278. Liu T, Son M, Diamond B. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 27 de maio de 2020;11.
279. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3446–58.
280. Tohme S, Yazdani HO, Al-khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. 2016;(13):1367–81.
281. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):737–44.
282. Mollinedo F. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis. *Trends Immunol*. 2019;40(3):228–42.
283. Morimoto-Kamata R, Mizoguchi SI, Ichisugi T, Yui S. Cathepsin G induces cell



- aggregation of human breast cancer MCF-7 cells via a 2-step mechanism: Catalytic site-independent binding to the cell surface and enzymatic activity-dependent induction of the cell aggregation. *Mediators Inflamm.* 2012;2012.
284. Zha C, Meng X, Li L, Mi S, Qian D, Li Z, et al. Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1 / RAGE / IL-8 axis. 2020;
  285. Sivanandham R, Brocca-Cofano E, Krampe N, Falwell E, Venkatraman SMK, Ribeiro RM, et al. Neutrophil extracellular trap production contributes to pathogenesis in SIV-infected nonhuman primates. *J Clin Invest.* 2018;128(11):5178–83.
  286. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis.* 2018;(January).
  287. Heit B, Jones G, Knight D, Antony JM, Gill MJ, Brown C, et al. HIV and Other Lentiviral Infections Cause Defects in Neutrophil Chemotaxis, Recruitment, and Cell Structure: Immunorestorative Effects of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Immunol.* 2006;177(9):6405–14.
  288. Mesquita EC, Hottz ED, Amancio RT, Carneiro AB, Palhinha L, Coelho LE, et al. Persistent platelet activation and apoptosis in virologically suppressed HIV-infected individuals. *Sci Rep.* 9 de dezembro de 2018;8(1):14999.
  289. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. Cathepsin G, a neutrophil-derived serine protease, increases susceptibility of macrophages to acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2000;74(15):6849–55.
  290. Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of  $\alpha$ -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest.* 2005;115(3):765–73.
  291. Bristow CL, Mercatante DR, Kole R. HIV-1 preferentially binds receptors copatched with cell-surface elastase. *Blood.* 15 de dezembro de 2003;102(13):4479–86.
  292. Wong JH, Legowska A, Rolka K, Ng TB, Hui M, Cho CH, et al. Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides.* 2011;32(6):1117–22.
  293. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase : friend and foe. 2005;
  294. Barr FD, Ochsenbauer C, Wira CR, Rodriguez-Garcia M. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunol.* 2018;11(5):1420–8.
  295. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2).
  296. Mojoli AHLQ. EFEITO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS SOBRE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM MACRÓFAGOS. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro; 2018.

297. Mojoli A, Gonçalves BS, Temerozo JR, Cister-Alves B, Geddes V, Herlinger A, et al. Neutrophil extracellular traps from healthy donors and HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 production in macrophages. *Sci Rep.* 2020;10(1):19603.
298. Yoo D goon, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett.* 2014;160(2):186–94.
299. Nauseef WM. Isolation of Human Neutrophils from Venous Blood. In 2014. p. 13–8.
300. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Induction and quantification of NETosis. *Curr Protoc Immunol.* 2016;2016(November):4.41.1-14.41.14.
301. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. 2017;93(2):185–98.
302. Hensley-mcbain T, Klatt NR. The Dual Role of Neutrophils in HIV Infection. 2018;
303. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine.* 2017.
304. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? 2012;198(5):773–83.
305. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, et al. Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One.* 2019;14(7):1–18.
306. Gomes T, Várady CBS, Lourenço AL, Mizurini DM, Rondon AMR, Leal AC, et al. IL-1 $\beta$  Blockade Attenuates Thrombosis in a Neutrophil Extracellular Trap-Dependent Breast Cancer Model. *Front Immunol.* 4 de setembro de 2019;10.
307. Palella FJ, Phair JP. Cardiovascular disease in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS.* julho de 2011;6(4):266–71.
308. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* julho de 2019;40(7):584–97.
309. Bergamini A, Faggioli E, Bolacchi F, Gessani S, Cappannoli L, Uccella I, et al. Enhanced Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-6 Due to Prolonged Response to Lipopolysaccharide in Human Macrophages Infected In Vitro with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis.* abril de 1999;179(4):832–42.
310. Matsumoto T, Miike T, Nelson RP, Trudeau WL, Lockey RF, Yodoi J. Elevated serum levels of IL-8 in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol.* agosto de 1993;93(2):149–51.
311. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al.

- Impaired neutrophil extracellular trap formation: A novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*. 2014;13(4):690–8.
312. Tillack K, Naegele M, Haueis C, Schippling S, Wandinger KP, Martin R, et al. Gender differences in circulating levels of neutrophil extracellular traps in serum of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2013;261(1–2):108–19.
  313. Ortmann W, Kolaczowska E. Age is the work of art ? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. 2018;473–88.
  314. Hernandez JC, Giraldo DM, Paul S, Urcuqui-inchima S. Involvement of Neutrophil Hyporesponse and the Role of Toll-Like Receptors in Human Immunodeficiency Virus 1 Protection. 2015;1:1–16.
  315. Soehnlein O, Ortega-gómez A, Döring Y, Weber C. Neutrophil-macrophage interplay in atherosclerosis : protease-mediated cytokine processing versus NET release. 2012;866–7.
  316. Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MCA, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase . *J Immunol*. 2007;179(6):3988–94.
  317. Qin Q, Niu J, Wang Z, Xu W, Qiao Z, Gu Y. Heparanase induced by advanced glycation end products ( AGEs ) promotes macrophage migration involving RAGE and PI3K / AKT pathway. 2013;1–9.
  318. Huebener P, Pradere J, Hernandez C, Gwak G, Caviglia JM, Mu X, et al. The HMGB1 / RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. 2015;125(2):539–50.
  319. Chen M-C, Chen K-C, Chang G-C, Lin H, Wu C-C, Kao W-H, et al. RAGE acts as an oncogenic role and promotes the metastasis of human lung cancer. *Cell Death Dis*. 23 de abril de 2020;11(4):265.
  320. Saïdi H, Melki M-T, Gougeon M-L. HMGB1-Dependent Triggering of HIV-1 Replication and Persistence in Dendritic Cells as a Consequence of NK-DC Cross-Talk. Unutmaz D, organizador. *PLoS One*. 31 de outubro de 2008;3(10):e3601.
  321. Nasreddine N, Borde C, Gozlan J, Bélec L, Maréchal V, Hocini H. Advanced Glycation End Products Inhibit Both Infection and Transmission In Trans of HIV-1 from Monocyte-Derived Dendritic Cells to Autologous T Cells. *J Immunol*. 15 de maio de 2011;186(10):5687–95.
  322. Troseid M, Sonnerborg A, Nowak P. High Mobility Group Box Protein-1 in HIV-1 Infection: Connecting Microbial Translocation, Cell Death and Immune Activation. *Curr HIV Res*. 1 de janeiro de 2011;9(1):6–10.
  323. Lee H, Park J, Kim WJ, Sundar IK, Rahman I, Park S, et al. Blockade of RAGE ameliorates elastase-induced emphysema development and progression via RAGE-DAMP signaling. 2017;
  324. Chen R, Fu S, Fan X-G, Lotze MT, Zeh HJ, Tang D, et al. Nuclear DAMP

- complex-mediated RAGE-dependent macrophage cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* março de 2015;458(3):650–5.
325. Equils O, Khosrowdad K, Cornataeanu R, Lu D, Singh S, Whittaker K, et al. Repeated lipopolysaccharide ( LPS ) exposure inhibits HIV replication in primary human macrophages \*. 2006;8.
326. Geonnotti AR, Bilska M, Yuan X, Ochsenbauer C, Edmonds TG, Kappes JC, et al. Differential Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and TZM-bl Cells by Endotoxin-Mediated Chemokine and Gamma Interferon Production. *AIDS Res Hum Retroviruses.* março de 2010;26(3):279–91.
327. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, et al. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J Autoimmun.* 2016;67:19–28.
328. Kristoff J, Haret-Richter G, Ma D, Ribeiro RM, Xu C, Cornell E, et al. Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2802–6.
329. Daniel C, Leppkes M, Muñoz LE, Schley G, Schett G, Herrmann M. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat Rev Nephrol.* 18 de setembro de 2019;15(9):559–75.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Produção intelectual e participação em eventos

- XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e XI Seção Extra de Imunologia Clínica. 2018. (Congresso). **Ouvinte**
- Semana de Pós-graduação *Stricto sensu* do Instituto Oswaldo Cruz. 2018. (Encontro). **Ouvinte**
- CRISPRio - International workshop on CRISPR genome editing. 2018. (Oficina). **Participante** Apresentação do projeto e justificativa para participação no workshop. Constituído por debates, apresentação de artigos e prática, o workshop me proporcionou um grande aprendizado sobre a técnica e suas aplicações.
- Symposium on regulation of the immune response in chronic inflammatory diseases. *Neutrophil Extracellular Traps restrain HIV-1 infection in macrophages*. 2019. (Simpósio). **Participante** Apresentação oral. A participação no simpósio agregou novos conceitos sobre a inflamação que acredito serem importantes no meu projeto, visto que a infecção pelo HIV-1 é crônica e intimamente relacionada à inflamação. Além disso, a oportunidade de apresentar meus dados e debater com pesquisadores de outras áreas foi interessante.
- Coautora do artigo intitulado “*IL-1 $\beta$  blockade attenuates thrombosis in a neutrophil extracellular trap-dependent breast cancer model*”, com coordenação do Dr. Robson Queiroz Monteiro e publicado em setembro de 2019 na **Frontiers Immunology**. A colaboração foi estabelecida para a realização do experimento de detecção de complexos DNA-elastase no soro de camundongos, visto que o protocolo adaptado por nós foi bem sucedido em detectar NETs em plasma de pacientes. (Gomes T, Várady CBS, Lourenço AL, Mizurini DM, Rondon AMR, Leal AC, et al. IL-1 $\beta$  Blockade Attenuates Thrombosis in a Neutrophil Extracellular Trap-Dependent Breast Cancer Model. *Front Immunol*. 2019 Sep 4;10.)
- XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e XII Seção Extra de Imunologia Clínica. 2019. “*Neutrophil Extracellular Traps from healthy donors and from HIV-1-infected patients restrain HIV-1 infection in macrophages*” **Apresentação oral e pôster**

- I Simpósio Online de Imunologia da Sociedade Brasileira de Imunologia – Entendendo a imunidade: o conhecimento ao alcance de todos. 2020. (Simpósio online). **Ouvinte**
- Publicação, como segunda autora, contendo parte dos resultados da dissertação (Anexo). Artigo intitulado “*Neutrophil Extracellular Traps from healthy donors and HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 production in macrophages*”, com primeira autoria de Andrés Mojoli e publicado em novembro de 2020 na revista **Scientific Reports**. (Mojoli A, Gonçalves BS, Temerozo JR, Cister-Alves B, Geddes V, Herlinger A, et al. Neutrophil extracellular traps from healthy donors and HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 production in macrophages. *Sci Rep* 2020;10(1):19603.)

## 9.2. Artigos



# IL-1 $\beta$ Blockade Attenuates Thrombosis in a Neutrophil Extracellular Trap-Dependent Breast Cancer Model

Tainá Gomes<sup>1</sup>, Carolina B. S. Várady<sup>1</sup>, André L. Lourenço<sup>1</sup>, Daniella M. Mizurini<sup>1</sup>, Araci M. R. Rondon<sup>1</sup>, Ana C. Leal<sup>1</sup>, Barbara S. Gonçalves<sup>2</sup>, Dumith Chequer Bou-Habib<sup>2,3</sup>, Emiliano Medei<sup>4</sup> and Robson Q. Monteiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup> National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup> Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Janos G. Filep,  
Université de Montréal, Canada

### Reviewed by:

Elmar Pieterse,  
Radboud University Nijmegen Medical  
Centre, Netherlands  
Paola Migliorini,  
University of Pisa, Italy

### \*Correspondence:

Robson Q. Monteiro  
robsonqm@bioqmed.ufrj.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 08 November 2018

Accepted: 19 August 2019

Published: 04 September 2019

### Citation:

Gomes T, Várady CBS, Lourenço AL, Mizurini DM, Rondon AMR, Leal AC, Gonçalves BS, Bou-Habib DC, Medei E and Monteiro RQ (2019) IL-1 $\beta$  Blockade Attenuates Thrombosis in a Neutrophil Extracellular Trap-Dependent Breast Cancer Model. *Front. Immunol.* 10:2088. doi: 10.3389/fimmu.2019.02088

Cancer patients are at increased risk of developing thrombosis, comorbidity that has been associated with increased neutrophil counts and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) modulates the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), a cytokine that promotes cancer-associated neutrophilia and NET generation. Herein, we combined a murine breast cancer model with a flow-restriction thrombosis model to evaluate whether the IL-1 $\beta$  blockade could interfere with cancer-associated thrombosis. Mice bearing metastatic 4T1 tumors exhibited high neutrophil counts as well as elevated expression of G-CSF and IL-1 $\beta$  in their tumors. On the other hand, mice bearing non-metastatic 67NR tumors showed no elevation in neutrophil counts and displayed low expression levels of G-CSF and IL-1 $\beta$  in their tumors. 4T1 tumor-bearing mice but not 67NR tumor-bearing mice exhibited a NET-dependent prothrombotic state. Pharmacological blockade of IL-1 receptor (IL-1R) decreased the primary growth of 4T1 tumors and reduced the systemic levels of myeloperoxidase, cell-free DNA (cfDNA) and G-CSF, without interfering with the neutrophil counts. Most remarkably, the blockade of IL-1R abolished the prothrombotic state observed in 4T1 tumor-bearing mice. Overall, our results demonstrate that IL-1 $\beta$  might be a feasible target to attenuate cancer-associated thrombosis, particularly in cancer types that rely on increased G-CSF production and involvement of NET formation.

**Keywords:** cancer, IL-1 $\beta$ , G-CSF, neutrophil extracellular trap (NET), thrombosis

## INTRODUCTION

The incidence of thrombosis in patients with cancer is higher than that in a general population free from tumor burdens (1, 2). Cancer-associated thrombosis is usually correlated with a worse prognosis and is the second leading cause of death in cancer patients. In this context, the incidence, prevalence, and treatment of cancer-associated thrombosis have prompted multiple research campaigns worldwide, but the mechanisms that allow this phenomenon to occur have yet to be fully elucidated. In an attempt to identify the cancer patients who are at the highest risk of developing a thrombotic event, multiple risk factors and biomarkers have been evaluated (1, 3–6). Among those, leukocytosis has become an event well-correlated with venous thrombosis (7, 8).



OPEN

## Neutrophil extracellular traps from healthy donors and HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 production in macrophages

Andrés Mojoli<sup>1</sup>, Barbara Simonson Gonçalves<sup>1</sup>, Jairo R. Temerozo<sup>1,6</sup>, Bruno Cister-Alves<sup>1</sup>, Victor Geddes<sup>2</sup>, Alice Herlinger<sup>2</sup>, Renato Santana Aguiar<sup>2,3</sup>, José Henrique Pilotto<sup>4</sup>, Elvira M. Saraiva<sup>5</sup>✉ & Dumith Chequer Bou-Habib<sup>1,6</sup>✉

Neutrophils release extracellular traps (NETs) after interaction with microorganisms and physiological or synthetic products. NETs consist of decondensed chromatin complexed with proteins, some of them with microbicidal properties. Because NETs can modulate the functioning of HIV-1 target cells, we aimed to verify whether they modify HIV-1 replication in macrophages. We found that exposure of HIV-1-infected macrophages to NETs resulted in significant inhibition of viral replication. The NET anti-HIV-1 action was independent of other soluble factors released by the activated neutrophils, but otherwise dependent on the molecular integrity of NETs, since NET-treatment with protease or DNase abolished this effect. NETs induced macrophage production of the anti-HIV-1  $\beta$ -chemokines Rantes and MIP-1 $\beta$ , and reduced the levels of integrated HIV-1 DNA in the macrophage genome, which may explain the decreased virus production by infected macrophages. Moreover, the residual virions released by NET-treated HIV-1-infected macrophages lost infectivity. In addition, elevated levels of DNA-elastase complexes were detected in the plasma from HIV-1-infected individuals, and neutrophils from these patients released NETs, which also inhibited HIV-1 replication in in vitro infected macrophages. Our results reveal that NETs may function as an innate immunity mechanism able to restrain HIV-1 production in macrophages.

### Abbreviations

NETs Neutrophil extracellular traps  
 HIV-1 Human immunodeficiency virus type-1  
 PAMPS Pathogen-associated molecular patterns

Neutrophil extracellular traps (NETs) are structures composed of decondensed chromatin fibers complexed with granular and cytoplasmic proteins released by neutrophils after activation by a range of products, including inflammatory mediators, microorganisms, pathogen-associated molecular patterns (PAMPS), and synthetic molecules<sup>1–6</sup>. NETs have been shown to play an important role in the control of infectious diseases. In fact, these structures inactivate and restrict pathogen dissemination through NET-associated proteins endowed with microbicidal properties, including histones, neutrophil elastase, myeloperoxidase, calprotectin and defensins<sup>1,2,7,8</sup>. In

<sup>1</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Virology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>4</sup>Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Laboratory of Immunobiology of Leishmaniasis, Department of Immunology, Paulo de Goes Institute of Microbiology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Bloco D/D1-44, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. <sup>6</sup>National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Rio de Janeiro, Brazil. ✉email: esaraiva@micro.ufrj.br; dumith@ioc.fiocruz.br



contrast, some authors have reported that NETs are central components of the exacerbated inflammatory reaction occurring in individuals with Covid-19, showing that the virus SARS-CoV-2 induces NET formation and that NETs are present in the plasma and lungs of critically ill Covid-19 patients<sup>9–12</sup>.

It has been shown that NET components are able to modulate the phenotype of immune cells<sup>13–16</sup> and the antimicrobial activities of macrophages<sup>17–21</sup>. Also, human macrophages internalize NETs<sup>22</sup> and are regulated by these structures, changing their production profile of inflammatory mediators<sup>13,23</sup>. Therefore, NETs can be considered as multifunctional agents, acting both in the direct control of pathogens, through their antimicrobial properties, and in the regulation of the immune responses, after interaction with lymphocytes and macrophages in the tissue microenvironment.

The inflammatory response is an important component of the pathogenesis of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection, contributing to CD4<sup>+</sup> T cell death, tissue damage and, thus, to disease progression<sup>24,25</sup>. The HIV-1 infection and subsequent viral replication in the gut-associated lymphoid tissue (GALT) promote tissue injury, neutrophil infiltration and tissue reorganization<sup>26</sup>, leading to a chronic inflammatory condition, increased mucosal permeability and translocation of microbial products from the intestinal lumen to the bloodstream<sup>27</sup>. It is possible that neutrophils migrating to the site of HIV-1 infection release NETs after interaction with inflammatory mediators, translocated PAMPs, or even with HIV-1 particles or proteins. In fact, HIV-1 virions induce and are inactivated by NETs<sup>8</sup>, a finding that points to a possible role of these structures in the control of HIV-1 propagation. Also, NETs interact with macrophages and other immune cells in several tissues of SIV-infected macaques<sup>28</sup>, suggesting that NETs can also interact with HIV-1-infected cells *in vivo*.

Macrophages are critical cells for the establishment and maintenance of HIV-1 infection, due to their resistance to HIV-1-mediated cytopathic effects and ability to produce virus continuously, thus functioning as an HIV-1 reservoir<sup>29</sup>. Macrophages also contribute to virus propagation in lymphoid tissues through transmitting HIV-1 virions to CD4<sup>+</sup> T cells<sup>30</sup>. Despite the potential NET interaction with infected cells in the sites of HIV-1 infection and replication, the impact of NETs on viral production in HIV-1-infected macrophages has not yet been studied.

It is reasonable to believe that NETs may interfere with the HIV-1 infection and production by macrophages. For example, NETs elicit macrophage release of inflammatory mediators able to regulate HIV-1 production<sup>13,23</sup>; NETs carry molecules that have been reported to modulate HIV-1 infection and replication, such as elastase<sup>31</sup>, cathepsin G<sup>32</sup>, myeloperoxidase<sup>33</sup> and defensins<sup>34</sup>; the presence in the NETs of ligands of Toll-like receptors (e.g., calprotectins, histones, elastase), whose activation in HIV-1-infected cells reduce viral production<sup>35–37</sup>. Therefore, we evaluated here whether NETs can modulate HIV-1 replication in human primary macrophages and found that NETs released by neutrophils from either healthy donors or HIV-1-infected individuals restrict HIV-1 replication in human primary macrophages.

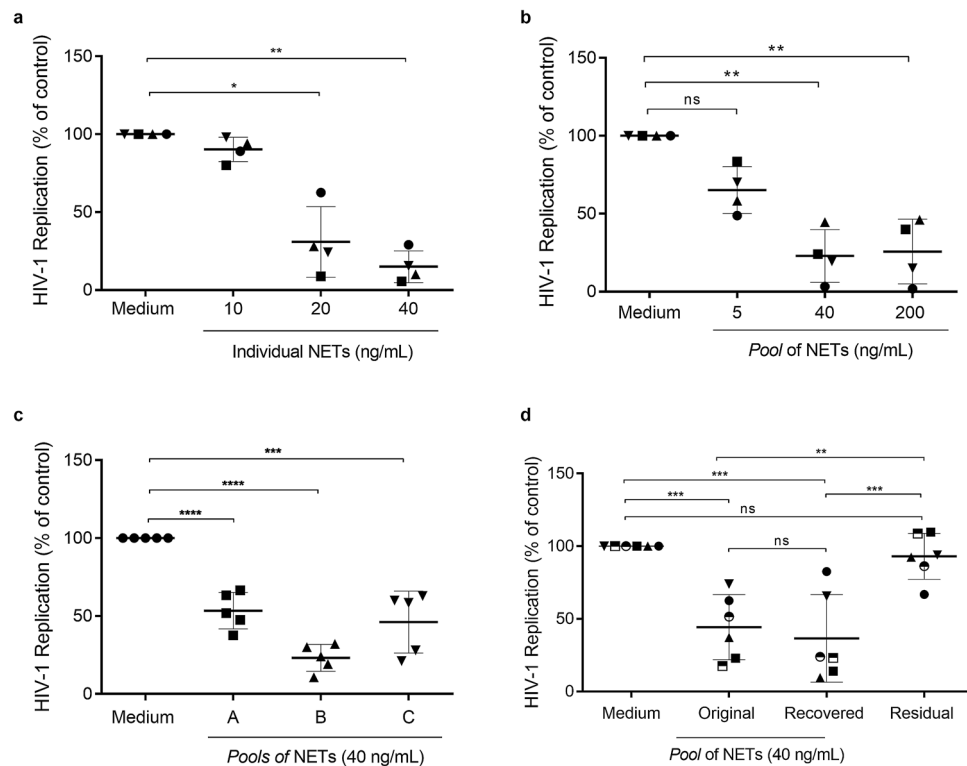
## Results

**NETs inhibit HIV-1 growth in macrophages.** Based on the findings that macrophages interact with NETs<sup>13,22,23</sup>, we investigated whether NETs would be able to modify the viral replication in HIV-1-infected macrophages. Initially, we obtained NETs from IL-8-activated neutrophils from healthy donors, which released a substantial amount of these structures (Neutrophils + IL-8: mean  $\pm$  SD = 1145  $\pm$  440 ng/mL of DNA; Neutrophils + medium: mean  $\pm$  SD = 380  $\pm$  356 ng/mL; n = 24; p < 0.0001). Next, to evaluate the effect of NETs on HIV-1 replication, HIV-1-infected macrophages from healthy donors were treated during three hours with varied concentrations of NETs obtained from different individuals, and we found that NETs reduced the viral production (Fig. 1a), reaching up to 80% of HIV-1 inhibition with 40 ng/mL of NETs.

To avoid potential variable results caused by possible constituent differences in NETs derived from individual donors, we analyzed HIV-1 replication in macrophages exposed to a pool of NETs, formed with NETs from at least five different donors, and observed that this first pool diminished the viral production at a similar degree to that promoted by individual NETs, with reductions close to 80% (Fig. 1b). We additionally assessed the anti-HIV-1 effect of three extra pools, randomly assembled with NETs from at least five different donors, and found a comparable viral inhibitory capacity between all them (Fig. 1c). Since the inhibitory effects on HIV-1 production were identical between pools or individual NETs, the next experiments were conducted using only pools of these structures.

During the activation processes, neutrophils may undergo degranulation and release several molecules into extracellular medium<sup>38</sup>. To rule out possible inhibitory effects from other neutrophil factors present in supernatant-containing NETs, but not related to these structures, pools of NETs were enriched using Centricon 100 centrifuge tubes, which allow the passage of molecules of molecular weight lower than 100 kDa. NETs retained on the membranes were recovered and resuspended in the original volume, and thus added to HIV-1-infected macrophages. We found that the recovered pool of NETs showed the same HIV-1 inhibition capacity as the original pool (Fig. 1d), whereas, in contrast, the residual supernatants, free of NETs, did not affect the virus production. These results suggest that the NET effects on HIV-1 replication in macrophages are independent of other unrelated neutrophil factors under 100 kDa possibly present in supernatant-containing NETs. Based on these findings, the next experiments were performed only with the original pools.

**NETs interact with macrophages without affecting cell viability.** At this point, some critical controls were performed. First, we noticed, by immunofluorescence, that the NETs colocalized with macrophages, suggesting an interaction with these cells (Fig. 2a). Second, we ascertained whether NETs were completely removed from macrophage cultures after washing (Fig. 2b), ruling out any possible NET direct inactivation effect on HIV-1 particles in our assays, as described elsewhere<sup>8</sup>. In addition, since it was recently described that NETs kill CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in SIV-infected nonhuman primates<sup>28</sup>, we evaluated the cell viability by two

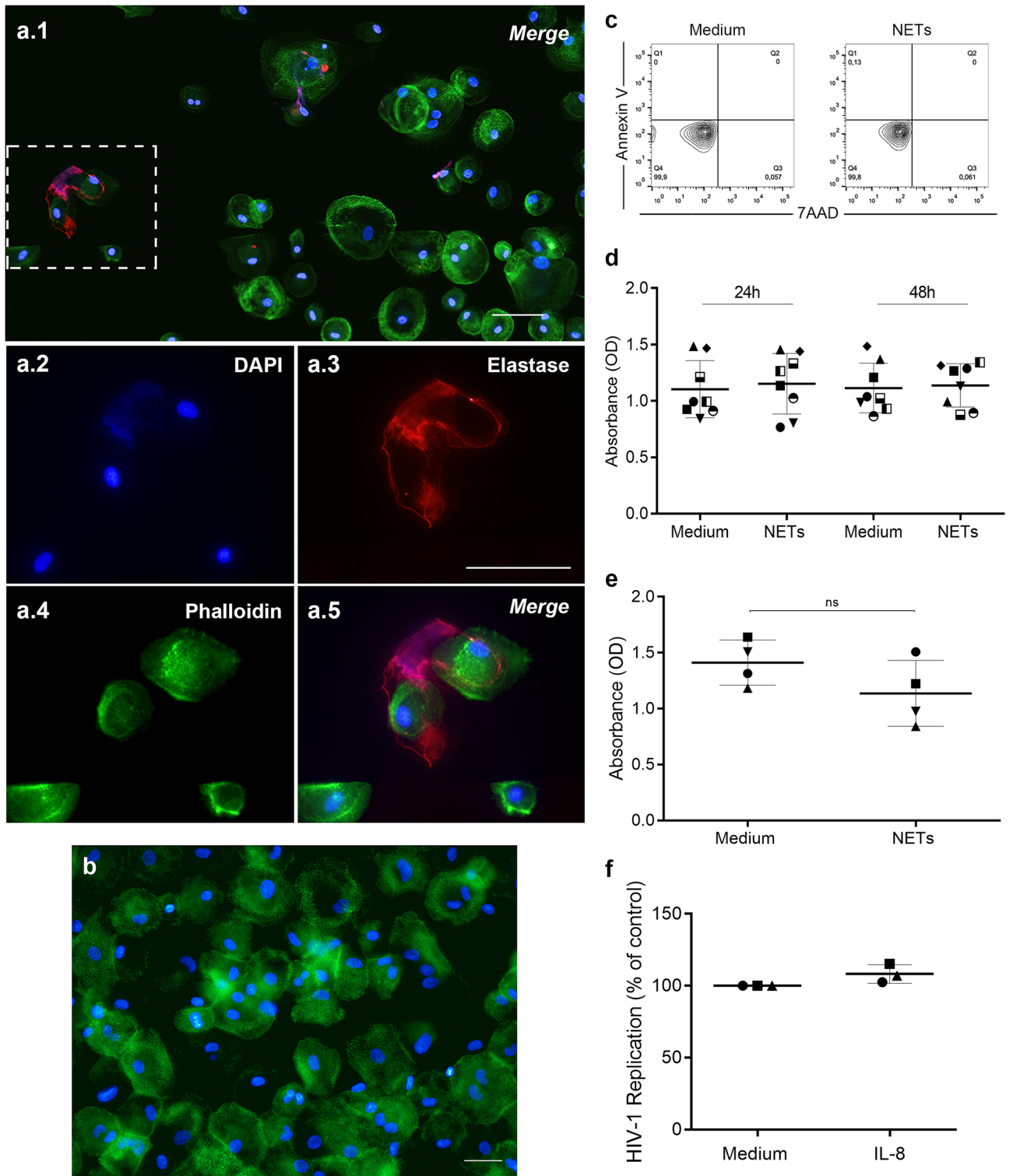


**Figure 1.** NETs inhibit HIV-1 production in macrophages. (a) Macrophages from healthy donors were infected *in vitro* and treated with NETs obtained from different individuals for 3 h, washed and maintained in culture ( $n = 4$ ). (b) HIV-1-infected macrophages were treated with different concentrations of one pool of NETs during 3 h, washed and maintained in culture ( $n = 4$ ). (c) HIV-1-infected macrophages were treated with three different pools of NETs during 3 h, washed and maintained in culture ( $n = 5$ ). (d) One pool of five NETs was centrifuged and recovered using Centricon tubes of 100 kDa; thus, HIV-1-infected macrophages were treated with the original or with the recovered pool, or with the residual supernatant during 3 h; cells were washed and maintained in culture. In all these assays, HIV-1 replication was measured 12–14 days post-infection by quantifying the levels of HIV-1 p24 antigen in culture supernatants by ELISA. Data were analyzed with the Kruskal–Wallis test, with Dunn’s post-test (a,b) and One Way ANOVA, with Turkey post-test (c,d). Each point represents a donor. Data represent means  $\pm$  SD. Viral production in controls (cells incubated only with medium) in ng/mL: (a) =  $13.8 \pm 5.9$ ; (b) =  $17.5 \pm 10.1$ ; (c) =  $14.7 \pm 8.5$ ; (d) =  $13.06 \pm 9.6$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . *ns* non-significant.

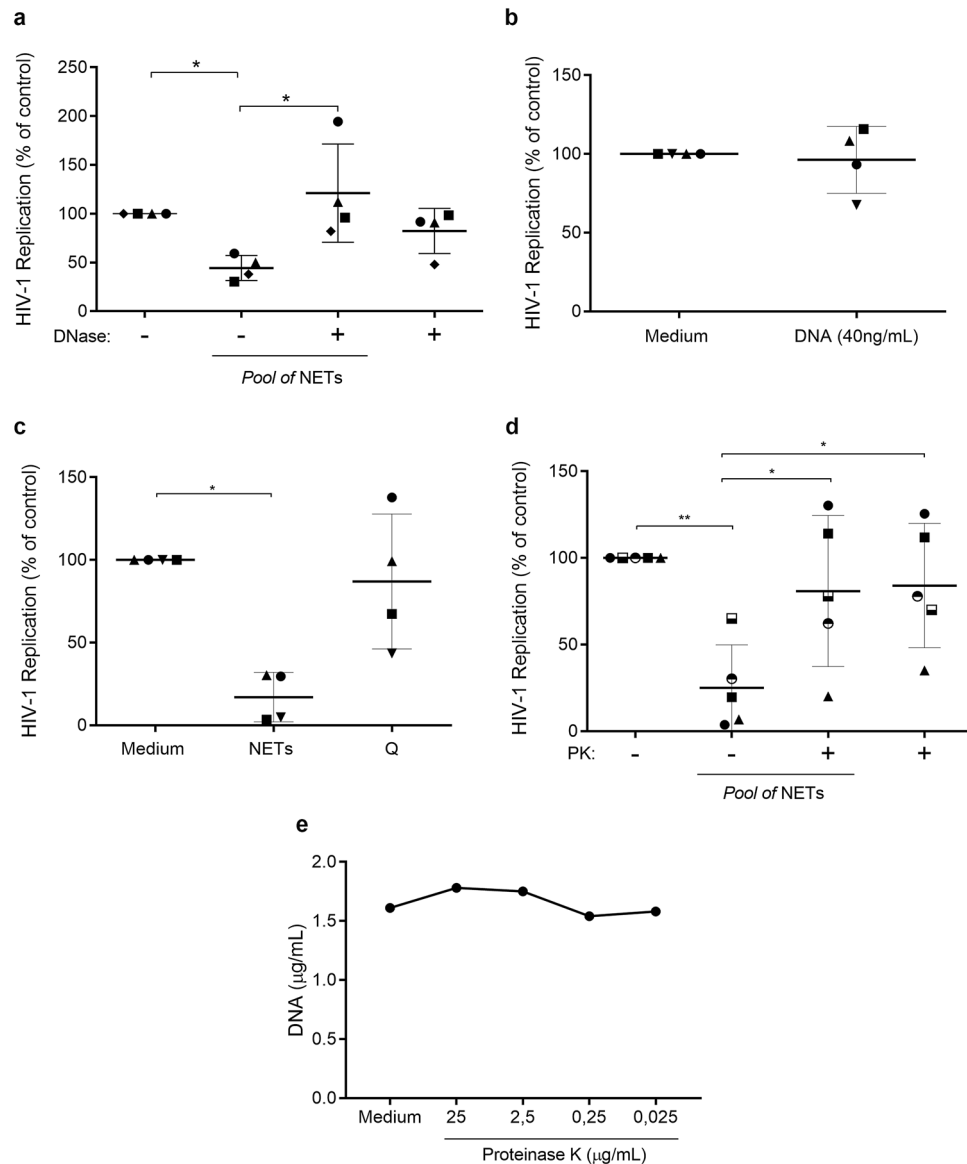
methods, and found that NET treatment did not affect macrophage survival, as assessed up to 14 days after exposure (Fig. 2c–e), indicating that reduction of viral production was not due to impairment of cell viability. Finally, to further ensure that HIV-1 inhibition promoted by NETs was not potentiated by the NET-inducing agent, HIV-1-infected macrophages were treated with IL-8 at a concentration equivalent to that carried over by the induced NETs, and we observed no changes in HIV-1 production in this condition (Fig. 2f).

**Preservation of DNA–protein scaffold is essential for NET-mediated HIV-1 inhibition.** Because NETs and some NET components possess microbicidal properties<sup>13,39,40</sup>, and based on our analysis showing a firm interaction between these structures and macrophages (Fig. 2a), we assessed how critical the maintenance of NET original chemical and physical structures would be for their action on HIV-1 replication. Thus, NETs were initially treated with DNase I and then added to HIV-1-infected macrophages, and we found that enzymatic DNA digestion significantly diminished the anti-HIV-1 effect of NETs (Fig. 3A). We further verified that purified salmon DNA did not modify the HIV-1 production (Fig. 3B), indicating that DNA is an essential NET component, but not sufficient, to promote HIV-1 inhibition in macrophages.

Heat treatment also abolished the NET anti-HIV-1 effects (Fig. 3c), suggesting that thermolabile NET-associated proteins could play a role in HIV-1 inhibition. We therefore investigated whether the anti-HIV-1 effect was dependent on the preserved structure of NET-associated proteins, and found that the ability of NETs to restrict HIV-1 replication was lost after enzymatic degradation of proteins (Fig. 3d). Before addressing this last hypothesis, proteolytic digestion of NETs was standardized in conjunction with DNA quantification, to assure that the nucleic acid integrity was not damaged during the proteolysis process. Treatment with proteinase K (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min) digested the NET-associated proteins without changing the DNA concentrations (Fig. 3e). These results indicate that the physical support provided by DNA and the structural maintenance of the DNA-associated



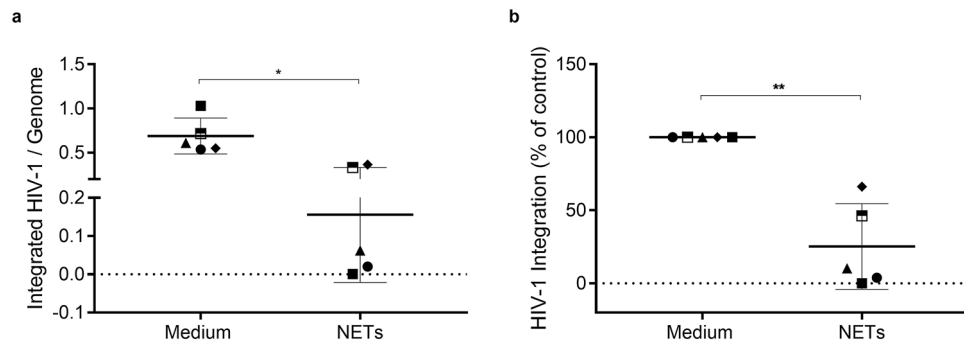
**Figure 2.** NETs interact with macrophages without affecting cell viability. (a) Interaction of NETs with macrophages from HIV-1 infected cultures. HIV-1-infected macrophages were exposed to NETs for 30 min and, after fixation, NETs were labeled with DAPI and anti-NE antibodies, while cells were visualized by phalloidin and DAPI labeling. Images (a.2) to (a.5) depict digital amplification of the area delimited by the dotted lines in (a.1), highlighting NET structures around the cells. Representative images of four different assays. Scale bar = 50  $\mu$ m. (b) Removal of NETs by washing macrophages culture. Macrophages were incubated with NETs during 3 h, washed, fixed and labeled as described above. Observe that NET components were not detected. Representative image of three different assays, obtained after detailed and careful analysis of several microscopic fields by two independent investigators. Scale bar = 100  $\mu$ m. (c) Viability of macrophages exposed to NETs. Macrophages were treated for 3 h with NETs, washed, and cell viability was evaluated 24 h later by flow cytometry (representative image of 2 independent experiments). Additionally (d), cell viability was assessed by XTT method after 24 h and 48 h or (e) in macrophages that had not been washed 14 days after NET treatment. *ns* non-significant. (f) HIV-1-infected macrophages were treated with IL-8 at a concentration equivalent to that carried over by the induced NETs, and no changes in HIV-1 production were observed in this condition.



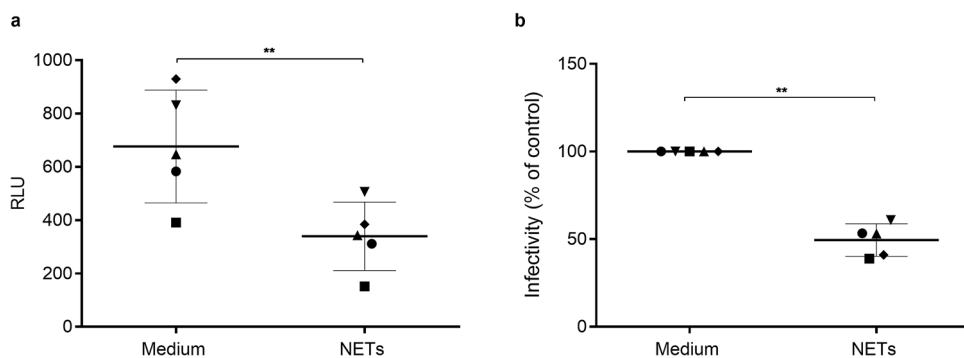
**Figure 3.** The integrity of DNA–protein scaffold is essential for viral inhibition mediated by NETs. HIV-1-infected macrophages were incubated with: (a) NETs treated or not with DNase (10 U/mL) or DNase alone; (b) salmon DNA (40 ng/mL); (c) NETs pre-incubated at 95 °C (Q) for 5 min; (d) NETs treated or not with Proteinase K (2.5 µg/mL) or Proteinase K alone for 30 min. In all these situations, cells were washed after 3 h treatments and kept in culture for 12–14 days, when HIV-1 replication was measured as described in the legend of Fig. 1. Data represent means  $\pm$  SD [n = 4; (a–c) and n = 5 (d)]. Viral production in controls (cells incubated only with medium) in ng/mL: (a) =  $16.5 \pm 17.54$ ; (b) =  $14.4 \pm 3$ ; (c) =  $15.8 \pm 7.3$ ; (d) =  $29.3 \pm 24.4$ . (e) NETs were treated with different concentrations of proteinase K for 30 min and DNA integrity measured with Picogreen (data are representative of three independent experiments). Each point represents a donor. Data were analyzed using Kruskal–Wallis test with Dunn post-test (a,c) and One Way ANOVA test, with Tukey’s test (e). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

proteins as well are critical for the NET inhibitory effect on HIV-1 replication. Studies are in progress in our laboratory to ascertain the contribution of NET-associated proteins to the anti-HIV-1 effects of these structures.

**NETs decrease HIV-1 DNA integration.** Because NETs inhibit HIV-1 production when added to HIV-1-infected macrophages just after the cellular infection, we asked whether NETs would be interfering in a post-entry event. We thus investigated the ability of NETs to modulate the integration of the HIV-1 proviral DNA to macrophage genome, an early step of the HIV-1 replicative cycle. Therefore, HIV-1 integration was analyzed by nested PCR at 72 h after NET addition, as described by Liszewski et al.<sup>41</sup>, and we found a significant decrease in the levels of integrated HIV-1 provirus in NET-treated HIV-1-infected cells (Fig. 4). This result suggests that the



**Figure 4.** NETs decrease integrated HIV-1 provirus. HIV-1-infected macrophages were treated with NETs (40 ng/mL) for 3 h, and HIV-1 proviral integration was assessed by nested PCR 72 h later. (n = 5). **(a)** Number of integrated provirus per genome; data represent means  $\pm$  SD of each treatment. **(b)** Normalized data of **(a)**. Data were analyzed using Paired t-test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 5.** NETs reduce HIV-1 replication fitness. TZM-bl cells were exposed to standard concentrations of viral particles obtained after 12 days culture of HIV-1-infected macrophages exposed or not to NETs (40 ng/ml). After 48 h, TZM-bl cells were lysed and luciferase activity measured. **(a)** Relative luminescence units (RLU); data represent means  $\pm$  SD. (n = 5). **(b)** Normalized data of **(a)**. Each point represents a donor. Data were analyzed using Student's t test. \*\* $p < 0.01$ .

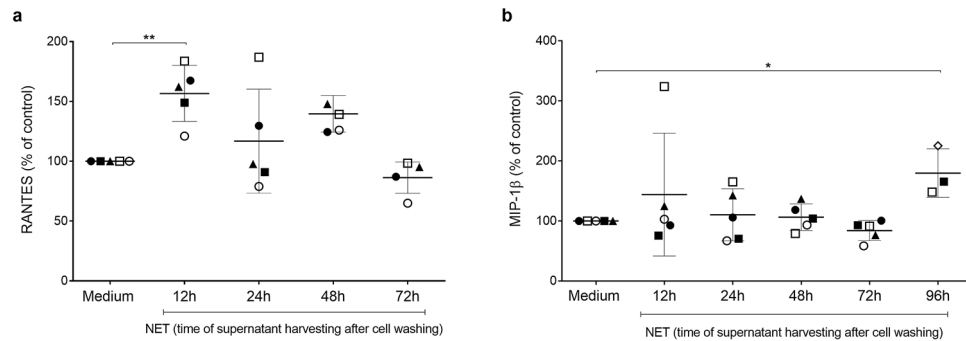
NET-inhibition of HIV-1 production in macrophages can be explained, at least in part, by their ability to reduce the integration of HIV-1 DNA into the cell genome.

**NETs reduce HIV-1 replication fitness.** We next asked whether the residual viruses released by macrophages exposed to NETs retained their infective capacity unchanged. To address this issue, standardized amounts of viral particles were added to TZM-bl cells for evaluation of viral infectivity. We observed that virions that emerged from macrophages exposed to NETs showed significant loss of their infective capacity (Fig. 5). Based on this finding, we believe that NET-mediated inhibition of HIV-1 infection relies not only on the reduction of virus production, but also on the concomitant loss of virus fitness, which can lead, eventually, to the weakening of virus propagation.

**NETs increase  $\beta$ -chemokine production by macrophages.** We evaluated whether NETs would induce macrophage secretion of  $\beta$ -chemokines, taking into consideration that these mediators are potent inhibitors of HIV-1 infection<sup>36</sup>. Indeed, NETs enhanced macrophage release of Rantes and MIP-1 $\beta$ , whose production peaked 12 h and 96 h after NETs addition to cells, respectively (Fig. 6). These data, although showing some variability and moderate effects, suggest that both molecules contribute to NET-elicited restriction of HIV-1 production in macrophages.

**Neutrophils from HIV-1-infected patients release NETs, which are present in the patients' plasma.** HIV-1 infection leads to disruption of the intestinal mucosal barrier, with the consequent translocation of bacterial products to the circulation, local inflammation, and chronic activation of the immune system<sup>27</sup>. Considering that bacterial products and inflammatory mediators can activate neutrophils and induce NET release, we investigated whether HIV-1-infected patients present elevated plasma levels of NETs, and whether neutrophils from HIV-1-infected patients release NETs upon activation in vitro with pro-inflammatory mediators. In fact, we found that neutrophils from HIV-1-infected patients do release NETs, as can be observed through immunofluorescence staining showing extracellular DNA fibers colocalizing with NE (Fig. 7a), in a similar way to healthy subjects (Fig. 7b), and by the significant amount of NET DNA released upon neutrophil





**Figure 6.** NETs elicit macrophage production of Rantes and MIP-1 $\beta$ . HIV-1-infected macrophages were left untreated (medium) or treated with NETs (40 ng/mL) for 3 h, washed and maintained in culture during the indicated times. Supernatants were then collected, and the concentrations of Rantes (a) and MIP-1  $\beta$  (b) were measured by ELISA. Each point represents a donor. Data represent means  $\pm$  SD, which were analyzed using Kruskal–Wallis test with Dunn post-test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

activation with IL-8 (Fig. 7c) or TNF- $\alpha$  (Fig. 7d). Also, pronounced amounts of DNA-NE complexes were found in patients' plasma samples, relative to plasma from healthy individuals, regardless whether their HIV-1 viral loads were detectable or not (Fig. 7e). Altogether, these findings suggest that neutrophils from HIV-1-infected patients are prone to release NETs, which can be found in their blood. Table 1 shows the viral load, CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T cell counts and treatment status of the HIV-1-infected patients at the time of blood sampling.

**NETs released by neutrophils of HIV-1-infected patients reduce HIV-1 replication in macrophages.** Based on our findings that NETs released by neutrophils from healthy individuals inhibit HIV-1 replication (Fig. 1), and that the NETs have been detected in intimate contact with HIV-1 target cells<sup>28</sup>, we analyzed whether NETs from neutrophils of HIV-1-infected patients would also be able to restrict HIV-1 production. Using the same protocol as described for Fig. 1, we found that these NETs are indeed endowed with the ability to restrain HIV-1 replication in macrophages (Fig. 8). Of note, NETs from two infected individuals reduced HIV-1 replication in their own macrophages (Fig. 8c). These results obtained with clinical samples suggest that NETs may contribute to diminish viral production by HIV-1-infected macrophages, thus preventing HIV-1 dissemination to other HIV-1 target cells.

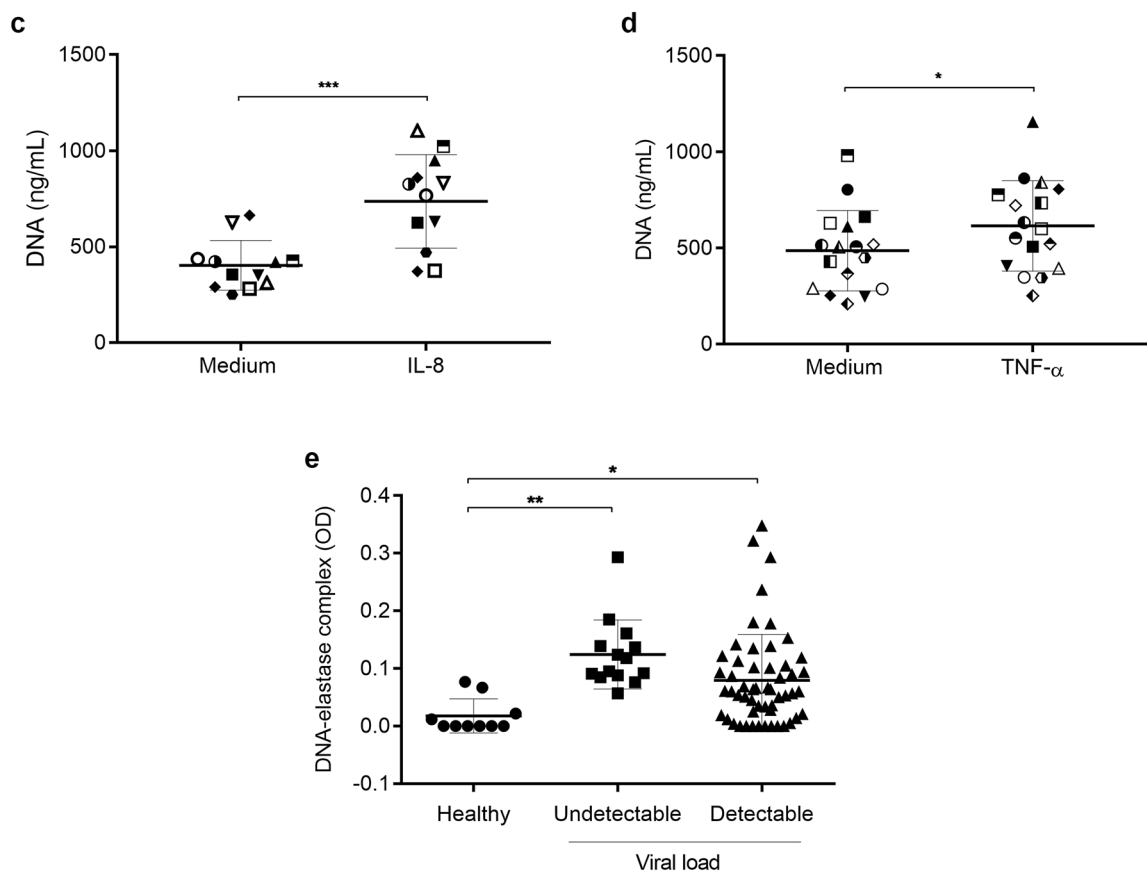
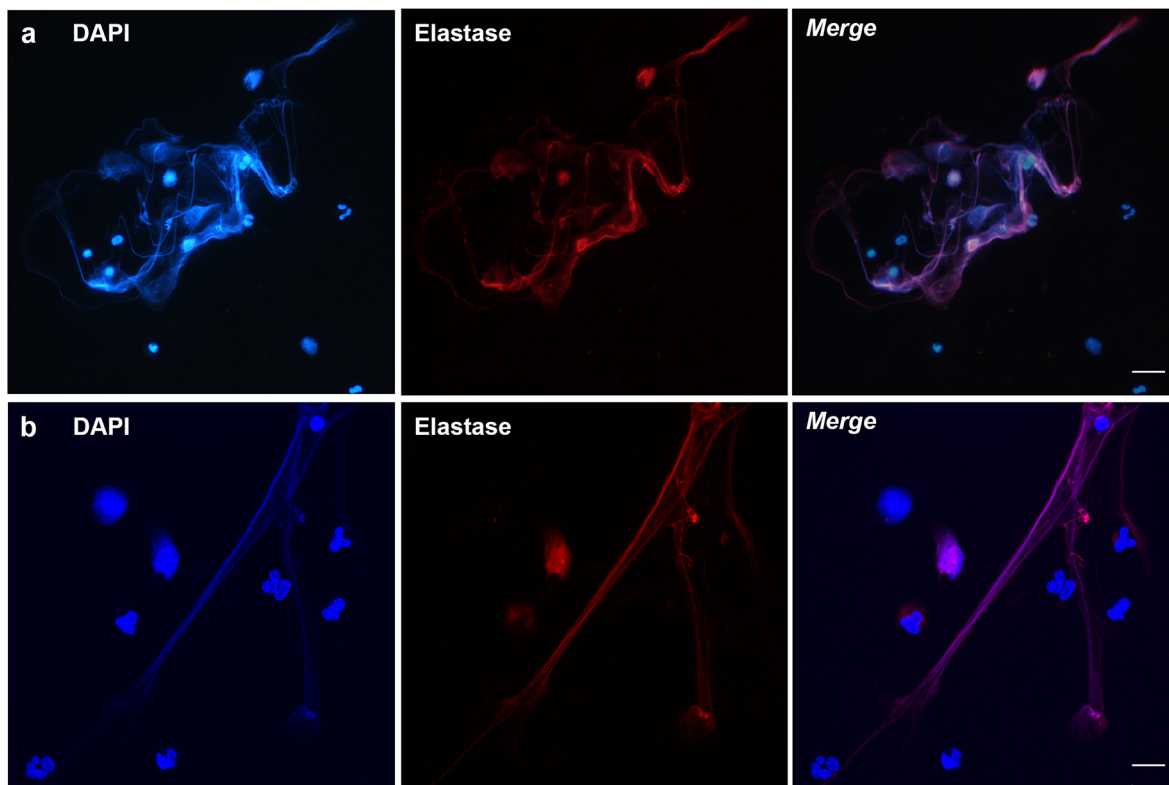
## Discussion

The involvement of NETs in different inflammatory or infectious scenarios has widely been documented, conveying detrimental or beneficial effects to the host. In fact, it has been suggested that aberrant production of NETs might be implicated in the development of pathological outcomes, such as autoimmune diseases, cancer, thrombosis and tissue damage<sup>42</sup>. On the other hand, NETs have been shown to control the growth and propagation of a variety of pathogens, such as bacteria<sup>1,23,39,43,44</sup>, parasites<sup>7,45,46</sup>, fungi<sup>2,47–49</sup>, and viruses<sup>8,28,50–55</sup>.

Regarding the possible impact of NETs on HIV-1 infection, the only two published studies up to now, to our knowledge, limited their observations to the NETs effects on the viability of the HIV-1 particles. Thus, Saitoh et al.<sup>8</sup> reported that HIV-1 virions induce NET release from neutrophils of healthy individuals and that these structures trap and render the virus non-infective. More recently, Barr et al.<sup>56</sup> described that neutrophils from female genital tract release NETs that capture and inactivate HIV-1 particles, thus preventing new infections of CD4 $^+$  T cells.

Here, we explored the effect of NETs on viral replication upon treatment of HIV-1-infected macrophages with these structures. We found that individual NETs or NETs combined in pools, either from healthy donors or from HIV-1-infected patients, inhibited viral growth. Importantly, the maintenance of the NET DNA-proteins structural composition was essential in this phenomenon. We believe that the NET-induced reduction of HIV-1 provirus integration and the loss of viral infectivity explain the diminished virus production by macrophages, with the contribution of  $\beta$ -chemokines. Given the different experimental approaches between our work and the two studies mentioned above (direct exposure of virion particles to NETs<sup>8,56</sup>), we believe that our study brings novel and significant findings upon describing the impact of NETs on the control of HIV-1 replication in one of its target cells.

Macrophages can acquire microbicidal activity against intracellular pathogens following uptake of neutrophil granules<sup>19,57</sup>, or after interaction with molecules present in these compartments<sup>17,21,58</sup>. Therefore, once detecting HIV-1 inhibition by NET-containing supernatants, we asked whether other products spontaneously secreted by neutrophils in the culture supernatants, but not associated with the released NETs, would have contributed to the observed anti-HIV-1 effect. Thus, infected macrophages were exposed to NETs previously recovered on 100 kDa filters, and we found that the concentrated NETs (that might contain other molecules larger than 100 kDa) preserved their ability to inhibit HIV-1 replication, while the NET-free fraction had no effect on viral growth. We then assumed that, in our system, the NET modulating effect on HIV-1 production in macrophages depends only on NET interaction with infected macrophages, without any apparent contribution of neutrophil soluble molecules.



◀**Figure 7.** Neutrophils from HIV-1 patients release NETs, which are present in patients' plasma. **(a)** Neutrophils from HIV-1 patients or **(b)** from healthy donors were activated with IL-8 (50 ng/mL) for 3 h at 37 °C, fixed and labeled with DAPI and anti-NE antibodies. Merged images show the colocalization of the two markers and the network morphology of NETs. Images are representative of at least 6 (HIV-1 patients) or 4 (healthy donors) assays. Scale bar, 10  $\mu$ m. **(c,d)** Neutrophil from HIV-1 patients were stimulated with IL-8 (50 ng/mL; n = 12) or TNF- $\alpha$  (20 ng/mL; n = 17) and NET release was quantified with the Picogreen dsDNA kit. Each point represents a donor. Data were analyzed using paired Student's t test. **(e)** Quantification of DNA-elastase complexes in the plasma of HIV-1-infected patients. Data were analyzed using ANOVA. Viral loads in HIV-1 RNA copies/mL: Undetectable: < 40; Detectable: > 40. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001.

Consistent with findings reported by other groups showing that human primary macrophages and THP-1-derived macrophages treated with NETs produced the  $\beta$ -chemokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and Rantes<sup>13,59</sup>, we observed that primary macrophages exposed to NETs released increased amounts of Rantes and MIP-1 $\beta$ . Taking into account that we and other authors have shown the potent anti-HIV-1 effect of  $\beta$ -chemokines<sup>35,36,60</sup>, this result suggests that NETs not only can activate the macrophages, but also that these anti-HIV-1 agents probably contribute to the restricted HIV-1 production in macrophages exposed to these structures (of note, NETs did not enhance macrophage release of IL-10, a cytokine also able to inhibit HIV-1 replication in macrophages<sup>35,60</sup>; data not shown). How NETs elicit macrophage production of  $\beta$ -chemokines is not clear, but it might be due to the cellular response to one or more NET constituents, since other authors showed, for example, that  $\alpha$ -defensin induces MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  synthesis in human macrophages<sup>61</sup>.

We found that the maintenance of original chemical and physical structures of NETs is essential for their capacity to mediate HIV-1 inhibition, as heat, DNase or proteinase K treatments abolished this effect. Similar observations have been made by other authors who have highlighted that the NET's DNA is an important scaffold for active proteins, concentrating these molecules in a punctual manner instead of being freely diffused in the aqueous environment<sup>40,62</sup>. Regarding the effect of NET-associated proteins, investigations are currently in progress in our laboratory to determine their possible contribution for the NET-mediated inhibition of HIV-1 infection, as described here.

HIV-1 replication shows different dynamics in macrophages compared to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, in part due to the low levels of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) pools caused by the activity of the restriction factor Sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain protein 1 (SAMHD1<sup>63</sup>). In accordance with Bejarano et al.<sup>64</sup>, the HIV-1 entry in macrophages occurs around 8 h post infection, while the reverse transcription and nuclear import of the HIV-1 genome are completed between 60 and 72 h post-infection. Since NETs are added to cells after HIV-1 entry, the marked decline in viral production observed 12–14 days post treatment is, naturally, a consequence of a disruption in a different step of the cycle. The viral integration into the cell genome is a crucial early step in the HIV-1 replicative cycle and is required for productive infection. Considering that *Alu* is a repeated element in the human genome that favors HIV-1 DNA integration<sup>65,66</sup>, we adopted the method described by Liszewski et al.<sup>41</sup> to evaluate this phenomenon in NET-treated HIV-1-infected cells. The reduced levels of HIV-1 integration observed at 72 h post infection show that the infection process was affected in an early post-entry stage of the viral cycle, explaining, at least partially, the diminished HIV-1 production observed in our model. Additional studies should be done to elucidate the mechanisms by which NETs reduce the levels of HIV-1 integration, such as, for example, whether NETs act during the reverse transcription and/or nuclear import of the viral genome, or even directly on the proviral integration process.

During HIV-1 infection, virtually all cells of the immune system undergo functional changes<sup>67,68</sup>. In fact, neutrophils may exhibit abnormalities, such as impaired chemotaxis, phagocytosis and oxidative capacity, and negative regulation of IL-8 receptors on plasma membrane<sup>69</sup>. Given these potential defects, we then considered as relevant to evaluate the NET production in this infection scenario and collected a group of data indicating that neutrophils from HIV-1-infected patients release NETs. Furthermore, we detected increased levels of DNA-NE complexes in plasma samples from HIV-1-infected patients, similarly to what has been observed in pathological conditions<sup>62</sup> and in several infectious diseases<sup>9,10,12,70–72</sup>. Likewise NETs released by neutrophils of healthy donors, NETs from neutrophils of HIV-1-infected patients also restrain HIV-1 production in macrophages. Overall, our data suggest that NET formation can occur in HIV-1-infected patients, and, once released in tissues containing infected macrophages, can potentially restrict HIV-1 production and then viral dissemination for other target cells. In this sense, Sivanandham et al.<sup>28</sup> reported that isolated neutrophils of SIV-infected nonhuman primates released NETs, which were observed interacting with immune cells, including macrophages, in several tissues of these animals.

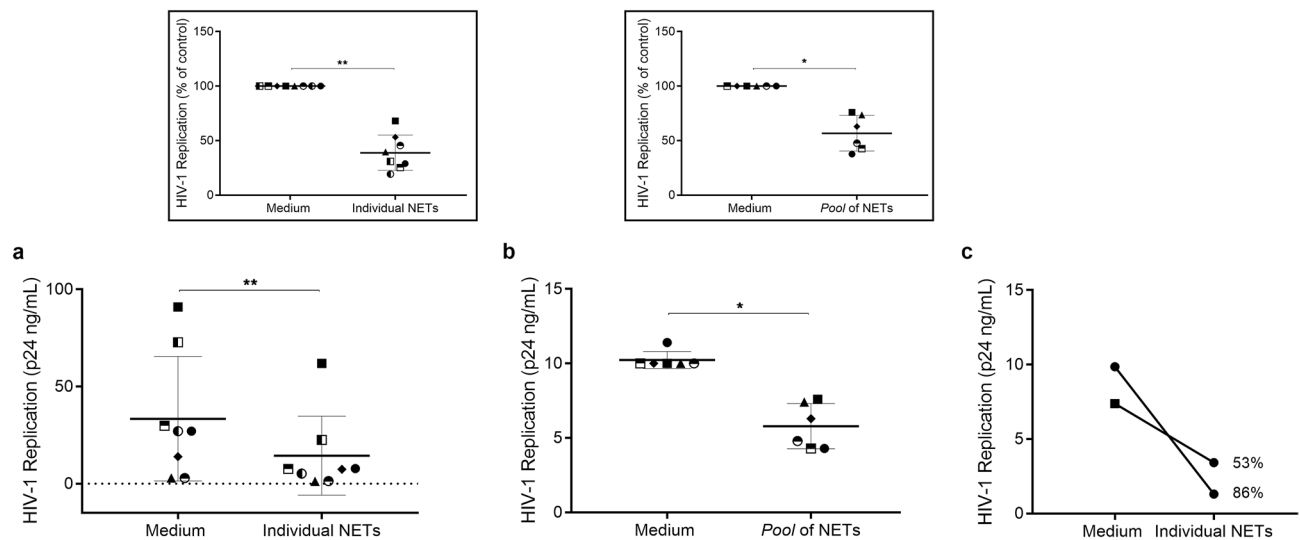
An open question remains, to be solved with more studies, whether NET formation is beneficial to the HIV-1 host, as can be inferred from studies showing that NETs trap and destroy HIV-1 particles<sup>8,56</sup> and inhibit HIV-1 replication (our present findings), or detrimental, as can be reasoned by investigations reporting that NETs capture and kill immune cells<sup>28</sup>. We suppose that both situations can occur, depending on a balance between a moderate or an excessive NET formation in tissues in which HIV-1-infected cells are actively producing viral particles. The plasma and local concentration of NETs may vary according to the number of neutrophils infiltrating the inflamed site (neutrophil swarming<sup>73</sup>) and the neutrophil population releasing NETs. In other words, regarding HIV-1 infection, the NET concentration will depend on the magnitude of neutrophil swarming in tissues where HIV-1-infected cells are producing and releasing viruses.

Finally, our findings indicate that more studies should be performed to explore whether NETs contribute to control infection and viral replication in other HIV-1-target cells, such as dendritic and CD4<sup>+</sup> T cells, and also



HIV-1 viral load	N	Viral load (mean $\pm$ SD)	CD4 <sup>+</sup> T cell count (mean $\pm$ SD)	CD8 <sup>+</sup> T cell count (mean $\pm$ SD)	Sex (F:M)
Undetectable	14	–	592 $\pm$ 206	823 $\pm$ 227	9:5
Low	14	831 $\pm$ 917	505 $\pm$ 347	1.312 $\pm$ 680	5:9
Medium	21	36.646 $\pm$ 20.679	220 $\pm$ 155	904 $\pm$ 372	13:8
High	18	453.459 $\pm$ 975.020	77 $\pm$ 60	768 $\pm$ 446	7:11

**Table 1.** Laboratory features of HIV-1-infected individuals. Healthy donors were selected to match the age and sex distribution of the patients. All the patients were under combined antiretroviral treatment. *F* female, *M* male.



**Figure 8.** NETs released by neutrophils from HIV-1-infected patients inhibit HIV-1 replication in macrophages. Macrophages from healthy donors were infected *in vitro* and treated for 3 h with (a) individual NETs obtained from HIV-1 patients, or (b) a pool of these NETs, washed and maintained in culture during 12–14 days, when HIV-1 replication was measured as described in the legend of Fig. 1. Inserts represent normalized data from (a) and (b). (c) Macrophages from two HIV-1-infected patients were infected *in vitro* and exposed to NETs obtained from their own neutrophils; the following procedures were the as described above. Numbers mean percentage of inhibition relative to respective control. (a,b) Data were analyzed using paired Student's t test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

for characterizing further mechanisms underlying the ability of these structures to restrain HIV-1 production in infected cells.

## Methods

**HIV-1 isolates, reagents and ELISA kits.** HIV-1 infections were performed using the CCR5-dependent isolate HIV-1<sub>Ba-L</sub> (donated by the AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, Bethesda, MD), as we described elsewhere<sup>74</sup>. Recombinant IL-8 was purchased from BioLegend, and the anti-neutrophil elastase (NE) antibodies were acquired from Calbiochem. The DNase I and salmon sperm DNA were obtained from Promega, the proteinase K was purchased from Invitrogen, and the anti-DNA peroxidase-conjugated antibody from Immunotools. The HIV-1 p24 ELISA kits were acquired from Sino Biological, and Rantes, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  ELISA kits from R&D Systems.

**Isolation and culture of primary human neutrophils, macrophages, and cell lines.** Human neutrophils were obtained from buffy coats of healthy adult blood donors by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare Life Sciences). Neutrophils were further separated from erythrocytes by spontaneous sedimentation through 3% dextran 500 (Sigma), followed by hypotonic lysis of remaining red cells. Purified neutrophils (>95% as determined by flow cytometry analysis using anti-CD16; data not shown) were resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) and kept in ice until use. Human monocyte-derived macrophages were prepared from peripheral mononuclear cells (PBMCs) through adherence onto plastic plates, as we described elsewhere<sup>35</sup>. Briefly, after density gradient centrifugation from buffy coats, PBMCs were plated onto 96-well plates (Costar) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; LGC Bio) containing 10% normal human serum (Sigma) and penicillin–streptomycin (Gibco) during 7–10 days for monocyte differentiation into macrophages. Next, non-adherent cells were removed, and the macrophages were maintained in standard

conditions in DMEM supplemented with 5% human serum. Macrophage purity was >90%, as determined by flow cytometry analysis using anti-CD3 and anti-CD68 monoclonal antibodies (BD Bioscience). TZM-bl cells (obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu and Tranzyme Inc) were maintained with DMEM low-glucose with 10% heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics. Neutrophils, macrophages and plasma from HIV-1-infected patients were obtained using the same protocols as above, after collecting 8–10 mL of peripheral blood by venipuncture.

**NET induction.** Neutrophils ( $2 \times 10^6$ /well/400  $\mu$ L) from healthy blood donors or from HIV-1-infected patients were stimulated with IL-8 (50 ng/mL) or with TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) for 3 h at 37 °C in RPMI 1640 medium, without serum. Then, supernatants containing NETs were removed through extensive pipetting, centrifuged at  $400 \times g$  for five min to remove residual neutrophils, and NET DNA was quantified by using Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen). The retrieved NETs were preserved at –80 °C until further use.

**Immunofluorescence assays.** Neutrophils ( $5 \times 10^5$ /well in Permanox chamber slides (Nalge Nunc) were stimulated with IL-8 and immediately fixed with 4% formaldehyde (FA, Merck) for 30 min and rinsed three times with PBS. Next, samples were blocked with human serum for 1 h and incubated with anti-elastase monoclonal antibodies (1:250; Calbiochem) for two hours. Samples were washed and incubated with secondary antibodies coupled to Alexa546 (Life Technologies) for 30 min, rinsed twice with PBS and mounted with ProLong Diamond anti-fade containing DAPI (Life Technologies). For NET-macrophage interaction assays, these cells were exposed to NETs (500 ng/mL) for 30 min, fixed with FA (4%, 30 min), washed and blocked as described above. Samples were then stained with anti-elastase and Alexa 546-labeled secondary antibodies and Phalloidin-488 (Invitrogen) for 30 min, and then mounted on medium containing DAPI, as above. All staining processes were performed at room temperature (RT). Slides were examined using confocal (Leica DMI8) and fluorescence (Zeiss Axio) microscopes, and LasX and AxioVision softwares, respectively. Brightness, contrast and color of digital images were adjusted with Adobe Photoshop CS5 v12.0 program (Adobe Systems Inc.).

**HIV-1 infection and effects of NETs on HIV-1 replication.** Macrophages were exposed overnight to viral suspensions containing 5–10 ng/mL of HIV-1 p24 Ag, as we described previously<sup>35</sup>. Cell monolayers were washed, replenished with fresh medium and maintained under standard culture conditions. Viral replication was measured 12–14 days post-infection by quantifying the levels of HIV-1 p24 antigen in culture supernatants using ELISA kits (Sino Biological). To evaluate the effects on HIV-1 production, individual NETs or pool of NETs (5–6 individual NETs/pool) were added to HIV-1-infected macrophages immediately after infection for 3 h in the absence of serum, and then cells were washed to remove residual NETs and kept in culture for 12–14 days, when viral replication was quantified. In another set of experiments, HIV-1-infected macrophages were treated with NETs recovered after centrifugation in Centricon 100 tubes (Millipore), and viral replication was evaluated as already described. As a control, equivalent amounts of IL-8 possibly carried over by NETs were added to infected macrophages.

**Cell viability assays.** The viability of macrophages treated with NETs was determined using the 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT, Sigma) method, as described elsewhere<sup>75</sup>, and also through Annexin-V binding and Propidium Iodide (PI) staining, followed by flow cytometry using a BD Canto II cytometer equipped with BD software FACSDiva (BD Bioscience, USA). The data obtained were analyzed using FlowJo v10 software, Tree Star Inc.

**Degradation of NET components and HIV-1 replication assays.** For DNA digestion, NETs were incubated with DNase I (10 U/mL) for 30 min at 37 °C. Then, enzymatic digestion was stopped by adding EDTA (2.4 mM), and DNA degradation was confirmed by Picogreen method. Protein degradation was performed by treating NETs with proteinase K for 30 min, and protein digestion was verified by electrophoresis on polyacrylamide gels (SDS/PAGE) and then revealed by silver staining. To assess DNA preservation after NET treatment with proteinase K, samples were also analyzed using Picogreen method. Then, DNase- or proteinase K-treated NETs were added to HIV-1-infected macrophages, and viral replication was evaluated as above. As an additional control, HIV-1 production was also evaluated in HIV-1 infected macrophages exposed to salmon sperm DNA (40 ng/ml).

**Effects of NETs on HIV-1 DNA integration.** To assess this effect, HIV-1-infected macrophages were treated or not with NETs for three hours, washed and maintained in culture for more 72 h. Next, total DNA was isolated using AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen) and quantified by Qubit, using Qubit dsDNA HS Assay Kit. First, we generated a standard curve with J-lat cells, which are Jurkat-based cell line containing a full-length integrated HIV-1 genome<sup>76</sup>, for beta-globin and integrated HIV-1. Next, to evaluate HIV-1 integration per cell, we determined the number of human genomes in our samples by real-time quantitative PCR (qPCR) for beta-globin and performed a nested-PCR, as described by Liszewski et al.<sup>41</sup>. The qPCR for beta-globin was performed using PrimeTime Gene Expression Master Mix 2X (Integrated DNA Technologies) with the specific pair of primers:  $\beta$ -Globin (Forward) 5'-CCC TTG GAC CCA GAG GTT CT-3';  $\beta$ -Globin (Reverse) 5'-CGA GCA CTT TCT TGC CAT GA-3' and  $\beta$ -Globin Probe 5'-GCG AGC ATC TGT CCA CTC CTG ATG CTG TTA TGG GCG CTC GC-3'. The qPCR was performed in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher) using the following cycling protocol: 95 °C for three min, then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for one min. The first round of PCR for HIV-1 integration was performed using one primer that anneals to *Alu* (Forward: 5'

GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3') and other that anneals to HIV *gag* (nucleotides 1505–1486; Reverse: 5' GTT CCT GCT ATG TCA CTT CC-3'). The PCR conditions were: 94 °C for two min, then 40 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 3 min 30 s. The second round of PCR quantifies HIV-1-specific products by using primers that anneals to the regions R and U5 in the HIV long terminal repeat. In order to do so, a qPCR was performed as described above, using the specific primers: RU5 (R Forward) nt 518–539: 5'-TTA AGC CTC AAT AAA GCT TGC C-3'; RU5 (U5 Reverse) nt 647–628: 5'-GTT CGG GCG CCA CTG CTA GA-3'; RU5 wild type Probe nt 584–559: 5'-CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA-3. Then, the HIV-1 integration was calculated based on the standard curve established with J-lat cells considering DNA mass.

**Infectivity assays.** To address whether NETs interfere with HIV-1 replication fitness, HIV-1-infected macrophages were treated with NETs for three hours in 6-well culture plates, washed and, after 12 days, culture supernatants were collected, centrifuged at 3000 × g and filtered on membranes with 0.45 µm pores. The HIV-1-containing supernatants were then centrifuged on Centricon filter devices with YM-100 membranes (Millipore) to concentrate and quantify viral particles by p24 ELISA. Then, this viral suspension (10 ng/mL p24 Ag) was added to TZM-bl cells (10<sup>5</sup> cells/well/96-well plate) in the presence of DEAE-Dextran (15 µg/mL; Sigma). Viral multiplication was analyzed 48 h later, through measuring luciferase activity with the Bright-Glo reagent (Promega), following the manufacturer's instructions.

**Production of β-chemokines by NET-treated macrophages.** Macrophages were treated with NETs and kept in culture under standard conditions, and cell culture supernatants were harvested at different time-points to measure the production of Rantes, MIP-1α and MIP-1β by ELISA (R&D Systems).

**Plasma and macrophages from HIV-1-infected patients.** Plasma and blood samples from HIV-1-infected patients were obtained at the Nova Iguaçu General Hospital (RJ, Brazil), which is a referral center from the Ministry of Health for the treatment, care and follow up of people living with HIV. Plasma samples were stored at –80 °C immediately after collection, and macrophages were obtained from patients' PBMCs by density gradient, as described above. Table 1 shows the viral load, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts and treatment status of the HIV-1-infected patients at the time of blood sampling.

**Quantification of plasma DNA-elastase complexes.** These complexes were quantified using capture ELISA. Briefly, 96-well microtiter plates were coated with 2.5 µg/mL of anti-NE antibodies (Calbiochem, Cat-No.481001) overnight at 4 °C. Wells were washed with PBS, blocked in BSA 2% for 2 h at RT and washed again. Then, plasma samples diluted 1:2 in sterile PBS were added to the wells and incubated overnight at 4 °C. Next, wells were washed with Tween 20 (0.05%) in PBS and 1.5 µg/mL of anti-DNA-peroxidase conjugated antibody (Immunotools, Cat-No. 21227778) was added. After 2 h of incubation at RT on a shaker, samples were washed before the addition of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine. Optical density was read at 450 nm wavelength after 20 min incubation.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed according to the methods indicated in the legends of each figure, using Prism software 6 (GraphPad Software, USA), which was also used for figure design. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

**Ethics statement.** Experimental procedures involving cells from healthy donors were performed with blood samples obtained after written informed consent, and were approved by the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) under the number 397-07. Plasma and whole blood samples from HIV-1-infected patients were obtained after written informed consent that was approved by the Human Research Ethics Committee of the General Hospital of Nova Iguaçu, Rio de Janeiro (ID: 008/2010). All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations of both Research Ethics Committee cited above.

Received: 3 July 2020; Accepted: 14 October 2020  
Published online: 11 November 2020

## References

1. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
2. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000639 (2009).
3. Yang, H. *et al.* New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Front. Immunol.* **7**, 1–8 (2016).
4. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun.* <https://doi.org/10.1159/000489829> (2018).
5. Hoppenbrouwers, T. *et al.* In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS ONE* **12**, 1–29 (2017).
6. Remijsen, Q. *et al.* Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* **18**, 581–588 (2011).
7. Guimaraes-Costa, A. B. *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 6748–6753 (2009).
8. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116 (2012).

9. Middleton, E. A. *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* **136**, 1169–1179 (2020).
10. Veras, F. P. *et al.* SARS-CoV-2 – triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* **217**, 12 (2020).
11. Radermecker, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J. Exp. Med.* **217**, 12 (2020).
12. Skendros, P. *et al.* Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI141374> (2020).
13. Nakazawa, D. *et al.* The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J. Autoimmun.* **67**, 19–28 (2016).
14. Tillack, K., Breiden, P., Martin, R. & Sospedra, M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* **188**, 3150–3159 (2012).
15. Guimarães-Costa, A. B., Rochael, N. C., Oliveira, F., Echevarria-Lima, J. & Saraiva, E. M. Neutrophil extracellular traps reprogram IL-4/GM-CSF-induced monocyte differentiation to anti-inflammatory macrophages. *Front. Immunol.* **8**, 523 (2017).
16. Barrientos, L. *et al.* Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **193**, 5689–5698 (2014).
17. Lincoln, J. A. *et al.* Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 3042–3047 (1995).
18. Wan, M. *et al.* Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 1–11 (2014).
19. Tan, B. H. *et al.* Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J. Immunol.* **177**, 1864–1871 (2006).
20. Ribeiro-Gomes, F. L. *et al.* Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J. Immunol.* **179**, 3988–3994 (2007).
21. Soehnlein, O., Kenne, E., Rotzius, P., Eriksson, E. E. & Lindbom, L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 139–145 (2008).
22. Farrera, C. & Fadeel, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* **191**, 2647–2656 (2013).
23. Braian, C., Hoge, V. & Stendahl, O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J. Innate Immun.* **5**, 591–602 (2013).
24. Miedema, F. *et al.* Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Front. Immunol.* **4**, 1–14 (2013).
25. Doitsh, G. *et al.* Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* **505**, 509–514 (2014).
26. Yaseen, M. M., Abuharfeil, N. M., Yaseen, M. M. & Shabsoug, B. M. The role of polymorphonuclear neutrophils during HIV-1 infection. *Arch. Virol.* **163**, 1–21 (2018).
27. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **12**, 1365–1371 (2006).
28. Sivanandham, R. *et al.* Neutrophil extracellular trap production contributes to pathogenesis in SIV-infected nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* **128**, 5178–5183 (2018).
29. Brown, A., Zhang, H., Lopez, P., Pardo, C. A. & Gartner, S. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1127–1135 (2006).
30. Duncan, C. J. A. *et al.* High-multiplicity HIV-1 infection and neutralizing antibody evasion mediated by the macrophage-T cell virological synapse. *J. Virol.* **88**, 2025–2034 (2014).
31. Bristow, C. L., Mercatante, D. R. & Kole, R. HIV-1 preferentially binds receptors copatched with cell-surface elastase. *Blood* **102**, 4479–4486 (2003).
32. Moriuchi, H., Moriuchi, M. & Fauci, A. S. Cathepsin G, a neutrophil-derived serine protease, increases susceptibility of macrophages to acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **74**, 6849–6855 (2000).
33. Chochola, J. A. N. *et al.* Virucidal effect of myeloperoxidase on human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 969–972 (1994).
34. Münk, C. *et al.* The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**, 875–881 (2003).
35. Victoria, S., Temerozo, J. R., Gobbo, L., Pimenta-Inada, H. K. & Bou-Habib, D. C. Activation of Toll-like receptor 2 increases macrophage resistance to HIV-1 infection. *Immunobiology* **218**, 1529–1536 (2013).
36. Verani, A. *et al.* C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J. Exp. Med.* **185**, 805–816 (1997).
37. Zhou, Y. *et al.* A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology* **131**, 40–49 (2010).
38. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 181–218 (2014).
39. Halverson, T. W. R., Wilton, M., Poon, K. K. H., Petri, B. & Lewenza, S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* **11**, e1004593 (2015).
40. Stephan, A. *et al.* LL37:DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages. *Immunology* **148**, 420–432 (2016).
41. Liszewski, M. K., Yu, J. J. & O'Doherty, U. Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. *Methods* **47**, 254–260 (2009).
42. Jorch, S. K. & Kubers, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* **23**, 279–287 (2017).
43. Berends, E. T. M. *et al.* Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun.* **2**, 576–586 (2010).
44. Lappann, M. *et al.* In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Mol. Microbiol.* **89**, 433–449 (2013).
45. Thomaz-Tobias, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS ONE* **10**, e0139569 (2015).
46. Gardinassi, L. G. *et al.* Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* **10**, 285 (2017).
47. Rocha, J. D. B. *et al.* Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci. Rep.* **5**, 8008 (2015).
48. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* **8**, 668–676 (2006).
49. Branzk, N. *et al.* Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.2987> (2014).
50. Wardini, A. B. *et al.* Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Gen. Virol.* **91**, 259–264 (2010).
51. Schönrich, G., Krüger, D. H. & Raftery, M. J. Hantavirus-induced disruption of the endothelial barrier: Neutrophils are on the payroll. *Front. Microbiol.* **6**, 1–9 (2015).



52. Raftery, M. J. *et al.*  $\beta$ 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **211**, 1485–1497 (2014).
53. Jenne, C. N. *et al.* Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–180 (2013).
54. Funchal, G. A. *et al.* Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS ONE* **10**, e0124082 (2015).
55. Hiroki, C. H. *et al.* Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. *Front. Immunol.* **10**, 1–11 (2020).
56. Barr, F. D., Ochsenbauer, C., Wira, C. R. & Rodriguez-Garcia, M. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0045-0> (2018).
57. Jena, P. *et al.* Azurophil granule proteins constitute the major mycobactericidal proteins in human neutrophils and enhance the killing of mycobacteria in macrophages. *PLoS ONE* **7**, e50345 (2012).
58. Soehnlein, O. *et al.* Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.* **118**, 3491–3502 (2008).
59. Lazzaretto, B. & Fadeel, B. Intra- and extracellular degradation of neutrophil extracellular traps by macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* **203**, 2276–2290 (2019).
60. Temerozo, J. R., Joaquim, R., Regis, E. G., Savino, W. & Bou-Habib, D. C. Macrophage resistance to HIV-1 infection is enhanced by the neuropeptides VIP and PACAP. *PLoS ONE* **8**, e67701 (2013).
61. Guo, C.-J., Tan, N., Song, L., Douglas, S. D. & Ho, W.-Z. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS* **18**, 1217–1218 (2004).
62. Albregues, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* **361**, 1353 (2018).
63. Hollenbaugh, J. A. *et al.* dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. *Retrovirology* **11**, 1–12 (2014).
64. Bejarano, D. *et al.* Detailed characterization of early HIV-1 replication dynamics in primary human macrophages. *Viruses* **10**, 620 (2018).
65. Schröder, A. R. W. *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529 (2002).
66. Kok, Y. L. *et al.* Monocyte-derived macrophages exhibit distinct and more restricted HIV-1 integration site repertoire than CD4 + T cells. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
67. Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15035 (2015).
68. Espindola, M. S. *et al.* HIV infection: Focus on the innate immune cells. *Immunol. Res.* **64**, 1118–1132 (2016).
69. Heit, B. *et al.* HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: Immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **177**, 6405–6414 (2006).
70. Zhu, L. *et al.* High level of neutrophil extracellular traps correlates with poor prognosis of severe influenza A infection. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jix475> (2018).
71. Schechter, M. C. *et al.* Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. *PLoS ONE* **12**, 6–13 (2017).
72. Maruchi, Y. *et al.* Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit. Care* **22**, 1–10 (2018).
73. Lämmermann, T. In the eye of the neutrophil swarm-navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 55–63 (2016).
74. Lima, R. G. *et al.* The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J. Infect. Dis.* **185**, 1561–1566 (2002).
75. Scudiero, D. A. *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827–4833 (1988).
76. Jordan, A., Bisgrove, D. & Verdin, E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.* **22**, 1868–1877 (2003).

## Acknowledgements

We thank the Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) and the Bonsucesso General Hospital (Rio de Janeiro, Brazil) for providing buffy coats, and the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, Bethesda, MD) for providing the HIV-1 isolate Ba-L and the TZM-bl cells. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq; Grant # 475958/2011-0, to DCBH; Grants #424301/2016-4 and 307379/2017-5, to EMS); Carlos Chagas Filho Rio de Janeiro Research Foundation (FAPERJ, Grant # E-26/010.001895/2015, to DCBH; E-26/202.788/2017, to EMS); Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz/PAPES VI; Grant # 407557/2012-1, to DCBH), and Mercosur Fund for Structural Convergence (FOCEM; Grant # 03/11, to Laboratory on Thymus Research). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Author contributions

Conceived the study: A.M., B.S.G., J.R.T., E.M.S., D.C.B.H. Designed the experiments: A.M., B.S.G., J.R.T., V.G., A.H., R.S.A., J.H.P., E.M.S., D.C.B.H. Performed the experiments: A.M., B.S.G., B.C.A., V.G., A.H. Analyzed the data: A.M., B.S.G., J.R.T., A.H., B.C.A., R.S.A., J.H.P., E.M.S., D.C.B.H. Wrote the paper: A.M., B.S.G., J.R.T., E.M.S., D.C.B.H. All authors reviewed and approved the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to E.M.S. or D.C.B.-H.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020