

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SABINA VICTORIA MONTERO

**ANÁLISE DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS
RECEPTORES TIPO TOLL 2 (TLR-2) SOBRE
A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM CÉLULAS
PRIMÁRIAS HUMANAS.**

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

Orientador: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2011

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

M778

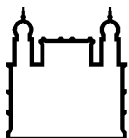
Montero, Sabina Victoria.

Análise do efeito da ativação dos receptores tipo Toll 2 (TLR-2) sobre a replicação do HIV-1 em células primárias humanas. / Sabina Victoria Montero. – Rio de Janeiro, 2011.
xv, 72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.
Bibliografia: f. 59-72

1. HIV. 2. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida . 3. TLRs. 4. β -quimiocinas. 5. IL-10. 6. PKR. I. Título.

CDD 616.979



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Sabina Victoria Montero

**ANÁLISE DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS
RECEPTORES TIPO TOLL 2 (TLR-2) SOBRE A
REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM CÉLULAS
PRIMÁRIAS HUMANAS**

ORIENTADOR: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 08/07/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor - Presidente
Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dra. Maria Bellio

Rio de Janeiro, 19 de julho de 2011

AGRADECIMENTOS

- *Ao Prof. Dumith Chequer Bou-Habib, por ter sido um orientador sempre presente, que me aceitou como aluna sem saber absolutamente nada sobre mim. No transcurso destes dois anos sempre esteve disponível para discutir assuntos no plano profissional, protocolos e resultados, assim como no plano pessoal. Estou agradecida de compartilhar este trajeto do lado de uma pessoa exigente, sensível, educada e com um alto valor ético.*
- *À dinâmica equipe de pesquisadores do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT), Dr. Wilson Savino, Dra. Dea Villa Verde, Dra. Juliana de Meis, Dra. Daniela Arêas, Dr. Ingo Riederer, Dr Dumith Chequer Bou-Habib e Désio Aurélio Farias de Oliveira, que com o trabalho e esforço do dia a dia permitem que o laboratório possua as instalações, equipamentos e reagentes necessários para a realização dos mais diversos trabalhos científicos. Eles incentivam e inspiram a busca por respostas científicas, transmitindo a dedicação, a seriedade e a curiosidade que se deve ter com a ciência.*
- *Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, os quais me permitiram sentir como uma brasileira. Todos contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, proporcionando momentos de discussão científica, e também momentos de grande desconcentração e diversão. Apesar de fazerem todos os dias alguma brincadeira sobre meu sotaque, eles conseguiram me conquistar e sei que devo a todos eles estes dois anos de felicidade; espero não esquecer ninguém: Ailin, Ariany, Carol, Cintia, Daiane, Danielle, Ednéa, Eliane, Fernanda, Flavinha, Heitor, Julia, Juliana, Klaysa, Leandra, Luciana, Luiz, Mariana, Marina, Sidneia, Thiago e Valmir.*
- *Aos amigos-irmãos-colegas do meu grupo específico de trabalho, com os quais compartilhei horas de experimentos, discussões e bate-papos pessoais: Bruno, Eduardo, Jairo, Pedro e Victor. Agradeço à Haynna, ex-estudante de Iniciação Científica deste grupo, que também participou deste projeto.*

- *Agradeço à minha mãe Zully, ao meu pai Miguel, ao meu irmão Matías e à minha avó Lala pelo amor, apoio constante, educação e amizade. Não tenho dúvida de que cada um de nós é produto do que absorve da família que tem, e eu estou orgulhosa disto.*
- *Agradeço aos membros da banca examinadora, Dr. Fernando Augusto Bozza, Dr. Gonzalo José Bello e Dra. Maria Bellio, Dra. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz e Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães, pela leitura criteriosa desta tese, e pelas sugestões oferecidas.*
- *À revisora deste trabalho, Dra. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz, pela análise cuidadosa, a qual gerou excelentes sugestões.*
- *À Dra. Carmen Martins Nogueira, chefe do serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, pelo apoio e fornecimento de bolsas de sangue de doadores saudáveis, material essencial para a realização deste estudo.*
- *Ao NIH AIDS REAGENT PROGRAM (Bethesda, EUA), pelo fornecimento dos isolados virais e outros materiais.*
- *Às agências de fomento financiadoras do estudo, CNPq e Faperj, e ao Instituto Oswaldo Cruz, pelas verbas oriundas do POM e pela concessão de minha bolsa de mestrado.*
- *Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, que me ofereceu a oportunidade de realização do meu Curso de Mestrado.*

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	viii
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).....	1
1.1.1. Estrutura, organização genômica e ciclo replicativo do HIV	3
1.1.2. Reservatórios celulares do HIV.....	7
1.1.3. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1.....	9
1.1.4. Resposta imune contra o HIV-1.....	14
1.1.5. Fatores que influenciam a replicação viral.....	15
1.2. Receptores do tipo <i>toll</i> (TLRs)	17
1.2.1. Estrutura, localização e ligantes de TLRs.....	17
1.2.2. Vias de sinalização dos TLRs.....	18
1.2.3. Receptor tipo toll 2 (TLR-2).....	20
1.2.4. Receptores tipo <i>toll</i> (TLRs) e a infecção pelo HIV-1.....	20
2. HIPÓTESE.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Reagentes e anticorpos	24
4.2. Isolados virais.....	24
4.3. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	25
4.4. Macrófagos Primários Humanos (MDM)	25
4.5. Infecção de PBMCs	26
4.6. Infecção de macrófagos.....	26
4.7. Análise do efeito dos ligantes de TLRs sobre a replicação do HIV-1 em	

PBMCs e macrófagos.....	26
4.8. Dosagem de citocinas e quimiocinas	27
4.9. Análise da expressão dos receptores celulares para o HIV-1	27
4.10. Análise da ativação da proteína quinase R (PKR).....	27
4.11. Análise da participação das β -quimiocinas e da IL-10 na inibição da replicação do HIV-1 mediada por ligantes de TLR-2.....	28
4.12. Ensaio funcional para verificar que o fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado ocorre na ausência de endotoxina.....	28
4.13. Viabilidade celular	28
4.14. Estatística.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Diferentes ligantes de TLRs modulam a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos.	30
5.2. Zymosan, ligante de TLR-2, inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos primários.	31
5.3. Pam3CSK4, ligante de TLR-2, inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos primários.....	32
5.4. Viabilidade celular.....	33
5.5. O tratamento prévio à infecção com Zymosan ou Pam3CSK4 inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos	34
5.6. Zymosan inibe a replicação de isolados primários do HIV-1 em PBMCs.....	35
5.7. O tratamento com Pam3CSK4 não diminui a expressão dos receptores do HIV-1 em PBMCs e macrófagos.	36
5.8. A ativação de TLR-2 induz a produção de β -quimiocinas em PBMCs e macrófagos	41
5.9. A produção de β -quimiocinas por macrófagos é máxima após 24 horas de ativação de TLR-2.....	42
5.10. A ativação de TLR-2 induz a produção de IL-10 em macrófagos.....	44
5.11. Análise da participação de IL-10 no efeito inibitório sobre o HIV-1 mediado pela ativação de TLR-2.....	45
5.12. A inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado é dependente das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5.....	46
5.13. A ativação de TLR-2 com Pam3CSK4 induz ativação da proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA (PKR).....	47

6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	55
8. ANEXO.....	57
8.1. Análise da pureza de culturas de macrófagos primários humanos.....	57
8.2. Ensaio funcional para verificar se o fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado ocorre na ausência de endotoxina.....	57
8.3. Análise da atividade metabólica das células tratadas com os diferentes ligantes de TLRs.....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Representação esquemática de uma partícula madura do HIV.....	3
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura genômica do HIV-1.....	4
Figura 3 – Esquema representando o ciclo replicativo do HIV-1 no linfócito T CD4 ⁺ ..	7
Figura 4 – Esquema representando a replicação do HIV-1 em macrófagos e CDs...	8
Figura 5 – Gráfico mostrando o curso de uma infecção pelo HIV-1.....	10
Figura 6 – Esquema representando a lâmina própria de indivíduos normais e pacientes infectados pelo HIV-1.....	12
Figura 7 – Esquema que representa a localização dos TLRs humanos.....	18
Figura 8 – Esquema que representa as vias de sinalização dos TLRs	19
Figura 9 – Diferentes ligantes de TLRs inibem a replicação de HIV-1 <i>in vitro</i> em macrófagos.....	31
Figura 10 – Pam3CSK4 e Zymosan (ligantes de TLR-2) inibem a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos	33
Figura 11 – O pré-tratamento com Zymosan ou Pam3CSK4 inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos.....	35
Figura 12 – Inibição da replicação viral de isolados primários de HIV-1 pela ativação de TLR-2 por Zymosan.....	35
Figura 13 – O tratamento celular com Pam3CSK4, ligante de TLR-2, não altera a expressão dos receptores celulares CD4, CCR5 e CXCR4, em PBMCs e macrófagos.....	41
Figura 14 – A ativação de TLR-2 mediante o Zymosan e Pam3CSK4 induz a síntese de β -quimiocinas.....	42
Figura 15 – Cinética de produção de β -quimiocinas após ativação de macrófagos por ligantes de TLR-2.....	43
Figura 16 – A ativação de TLR-2 induz o aumento na produção de IL-10.....	44
Figura 17 – A ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 via independente de IL-10.....	46
Figura 18 – A ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 via dependente das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5.....	47
Figura 19 – A ativação de TLR-2 com Pam3CSK4 induz ativação da PKR em PBMCs e macrófagos	48

Figura 1 (Anexo) Expressão de CD68 na cultura de macrófagos derivados de monócitos.....	57
Figura 2 (Anexo) PBMCs infectados pelo HIV-1 foram tratados simultaneamente com Zymosan ou Pam3CSK4 e Polimixina B	57
Tabela 1 (Anexo) Quantificação da atividade metabólica de PBMCs tratados com Pam3CSK4, LPS ou Zymosan.....	58

SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

APC – Célula Apresentadora de Antígeno (*Antigen Presenting Cell*)

APOBEC – Enzima Catalítica da edição de RNA mensageiro para Apolipoproteína B
(*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide*)

Ba-L – *Bronchoalveolar lavage*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

BST2 – *Bone marrow Stromal cell antigen 2*

CA – Capsídeo

CCL – Quimiocina do tipo CC (*Chemokine (C-C motif) ligand*)

CCR – Receptores de Quimiocina do tipo CC (*C-C chemokine receptor*)

CD – Grupo de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

CRF – Formas Recombinantes Circulantes

CTL – Linfócito T Citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte*)

CXCR – Receptor para quimiocina do tipo CXC

DC – Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)

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

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

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

ECL – Quimioluminescência (*Enhanced Chemiluminescence*)

ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Env – Envelope

ER – Retículo Endoplasmático

Gag – Antígeno específico de grupo (*group-specific antigen*)

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

gp – Glicoproteína

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

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immune deficiency Virus*)

IF – Inibidor de Fosfatase

IFN - Interferon

Ig- Imunoglobulina

IL – Interleucina

IN - Integrase

IRAK – *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*

IRF – *IFN-regulatory factor*
LAL – *Limulus Amebocyte Lysate*
LPS - Lipopolisacarídeo
LRR – Repetições ricas em leucinas (*Leucin Rich Repeat*)
LTR – Terminal longo de repetição (*Long Terminal Repeats*)
MALT – Tecido Linfóide Associado a Mucosas
MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*
MDM – Macrófagos Derivados de Monócitos
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
MIF – Fator Inibidor de Macrófagos
MIP - Proteína Inflamatória de Macrófagos (*Macrophage Inflammatory Protein*)
MyD88 – *Myeloid Differentiation primary response gene 88*
Nef - *Negative factor*
NF-κB - *Nuclear factor-κB* ou Fator Nuclear- κB
NGF – Fator do Crescimento do Nervo (*Nerve Growth Factor*)
Pam3CSK4 - N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteine)
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMCs - Células Mononucleares de Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
PBS - Salina Fosfatada Tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)
PHA - Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)
PIC – Complexo de Pré-Integração
PKR – Proteína quinase R dependente de dsRNA (Protein Kinase R)
Pol - *polymerase*
Poly (I:C) – *Polyinosinicpolycytidylic acid*
PR - Protease
RANTES - *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*
Rev – *Regulator of virion*
RNAm - RNA mensageiro.
RT – Transcriptase Reversa
RTC - Complexo de Transcrição Reversa
SDF-1 – Fator Derivado de célula estromal 1 (*stromal cell derived factor-1*)
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SHIV – Vírus da Imunodeficiência / HIV tipo 1 (*Simian Immunodeficiency Virus / HIV type 1*)
SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simiam Immunodeficiency Virus*)
Tat – *Trans-activator of Transcription*
TBST – *Tris-Buffered Saline and Tween 20*

TGPI – *glicosilfosfatidilinositol*

TIRAP – *Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) domain-containing Adaptor Protein*

TLR – *Receptores tipo toll (Toll like Receptors)*

TNF - *Fator de Necrose Tumoral*

TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- β*

TRIM5 α – *Tripartite-Motif-containing 5*

UNAIDS - *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*

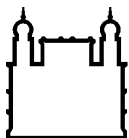
Vif – *Viral Infectivity Factor*

Vpr – *Viral Protein R*

Vpu – *Viral Protein U*

XTT – *Sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Prof. Dumith Chequer Bou-Habib, tendo sido a autora financiada por bolsa de estudos concedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

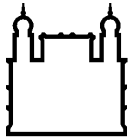
ANÁLISE DO EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES TIPO TOLL 2 (TLR-2) SOBRE A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS HUMANAS.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sabina Victoria Montero

Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam aumentada permeabilidade intestinal, a qual permite a passagem para a circulação sanguínea de produtos microbianos, fenômeno conhecido por translocação microbiana. Dentre os produtos translocados são encontrados vários ligantes dos receptores do tipo Toll (TLR). A ativação de TLR desencadeia uma complexa cascata de sinalização, induz a síntese de diversas citocinas, e modula a função de células dendríticas (CDs), macrófagos e linfócitos, células-alvo da infecção pelo HIV-1. Estudos experimentais mostram que a ativação de TLRs influencia a replicação do HIV-1, como, por exemplo, a ativação de TLR-4 e TLR-3 resulta em diminuição da replicação viral. No entanto, os estudos relacionados à ativação de TLR-2 e HIV-1 são escassos. Assim, em nosso estudo, resolvemos analisar o efeito da ativação de TLR-2 sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos primários humanos infectados *in vitro*. Para isto, PBMCs e macrófagos obtidos de doadores saudáveis foram infectados pelo HIV-1 e em seguida expostos ao Zymosan ou Pam3CSK4, ambos ligantes de TLR-2, e a replicação viral foi avaliada pela detecção da proteína viral p24 nos sobrenadantes de cultura. Vimos que tanto o Zymosan quanto o Pam3CSK4 inibem de forma potente (até 90%) a replicação do isolado Ba-L (trópico para CCR5) de HIV-1 em PBMCs e macrófagos, assim como isolados primários trópicos para CCR5 e CXCR4. O tratamento das células com os ligantes de TLR-2 antes da infecção também induziu a queda da replicação viral. Ambos os ligantes de TLR-2 induziram aumento da produção das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 em macrófagos e PBMCs, e de IL-10 em macrófagos. A imuno-neutralização das β -quimiocinas diminuiu expressivamente o seu efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1, sugerindo que estas moléculas participam da inibição da replicação do HIV-1 resultante da ativação de TLR-2. No entanto, a neutralização do receptor de IL-10 não produziu resultados semelhantes. A expressão dos receptores celulares CD4, CCR5 e CXCR4 não foi alterada quando macrófagos e PBMCs foram tratados com Pam3CSK4. Observamos, ainda, que a proteína quinase R (PKR) é ativada por Pam3CSK4 tanto em macrófagos quanto em PBMCs. Estes resultados mostram que a ativação de TLR-2 resulta em uma potente inibição da replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos, e sugerem que as β -quimiocinas estão envolvidas neste fenômeno. Nossos achados ressaltam o papel anti-HIV-1 resultante da ativação de TLR-2, e indicam que novos estudos devem ser realizados para esclarecer, com maior profundidade, os mecanismos envolvidos neste processo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF THE EFFECT OF TOLL LIKE RECEPTOR 2 (TLR-2) ACTIVATION ON HIV-1 REPLICATION IN PRIMARY HUMAN CELLS.

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCES DISSERTATION

Sabina Victoria Montero

Patients infected with HIV-1 present increased intestinal permeability, which allows the passage of high amounts of microbial products to bloodstream, a phenomenon known as microbial translocation. A large variety of Toll-like receptor (TLR) ligands are found among the products translocated and can trigger a complex signaling cascade, inducing the synthesis of several cytokines, and modulating the function of the HIV-1 target cells, such as macrophages, lymphocytes and dendritic cells. Several results show that activation of some TLRs modulate the replication of HIV-1; for example, HIV-1 replication is inhibited upon activation of TLR-4 and TLR-3. However, specific studies with TLR-2 are scarce. Thus, in our study, we decided to analyze the effect of TLR-2 activation on the HIV-1 replication in *in vitro* infected PBMCs and macrophages obtained from healthy donors. Thus, cells were infected with HIV-1, and then exposed to Zymosan or Pam3CSK4, both TLR-2 ligands, and viral replication was assessed by measuring the viral p24 protein in the culture supernatants. Our results show that both Zymosan and Pam3CSK4 potently inhibited (up to 90%) HIV-1 replication in PBMCs and macrophages infected with the Ba-L strain (CCR5-tropic), and also primary CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 isolates. Cell treatment with TLR-2 ligands prior to HIV-1 infection also induced inhibition of HIV-1 replication. Both TLR-2 ligands induced the production of β -chemokines (CCL3, CCL4 and CCL5) in macrophages and PBMCs, as well as promoted an increased production of IL-10 in macrophages. The immune-neutralization of β -chemokines partially reverted the inhibitory effect of TLR-2 activation on HIV-1 replication, suggesting the participation of these molecules in this phenomenon; however, the neutralization of the IL-10 receptor did not produce similar results. We further observed that TLR-2 activation did not affect the CD4, CCR5 and CXCR4 expression. We observed that the Protein Kinase R (PKR) is activated by Pam3CSK4 in macrophages and PBMCs. Our data show that TLR-2 activation results in a potent inhibition of HIV-1 replication in PBMCs and macrophages, and that β -chemokines are probably involved in this phenomenon. Our findings warrant further studies on the mechanisms underlying the antiretroviral activity resulting from TLR-2 activation, including the role played by PKR in this context.

1. Introdução

1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a qual é caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (Pantaleo & Fauci, 1995; Dybul, 2003). A AIDS consiste em uma pandemia, que é hoje considerada uma preocupação global que tem exigido esforços conjuntos da comunidade científica, dos governos e da sociedade em geral, para a sua efetiva prevenção e controle. De acordo com dados do Programa das Nações Unidas para HIV e AIDS (UNAIDS) estima-se que 33,3 milhões (30,3 – 36,1 milhões) de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o globo terrestre. No Brasil, o Ministério da Saúde informou que os novos números de AIDS, atualizados até junho de 2010, contabilizam 592.914 casos registrados desde 1980. A epidemia permanece estável e a taxa de incidência oscila em torno de 20 casos de AIDS por 100 mil habitantes, e em 2009, foram notificados 38.538 casos da doença.

De acordo com as suas propriedades biológicas e características estruturais, o HIV é classificado como pertencente à família *Retroviridae*, grupo de vírus que possui o ácido ribonucléico (RNA) como material genético e uma DNA polimerase – RNA dependente, denominada transcriptase reversa (RT), que sintetiza ácido desoxirribonucléico (DNA) através de uma fita simples de RNA; além disso, é classificado como um membro da subfamília *Lentivirinae* que estão associados a infecções persistentes com longos períodos de latência clínica, que são conhecidos por causar uma doença lenta e constante em humanos, além de ovinos, equinos e bovinos, e tem como alvo várias linhagens de células hematopoiéticas, principalmente linfócitos e macrófagos diferenciados (Coffin *et al.*, 1986).

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

algumas regiões da Europa e, menos frequentemente, em outras regiões do mundo, como Índia e Estados Unidos (Freed & Martin, 2007).

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

As primeiras análises filogenéticas de isolados do HIV-1 foram realizadas em amostras provenientes da Europa, América do Norte e África. A partir destas foram definidos grupos genéticos ou “clades” do HIV-1, os quais podem ser classificados em: M (*principal*); O (*outlier*), N (não-M, não-O) e P (*putative*). O grupo M do HIV-1, que inclui mais dos 95% dos vírus isolados, consiste em pelo menos nove subtipos ou subgrupos distintos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e 48 formas recombinantes circulantes (CRF), as quais possuem segmentos genômicos derivados de mais de um subtipo de HIV-1 (Hemelaar *et al.*, 2011).

O subtipo C do HIV-1 é o subtipo viral mais prevalente em países com altas taxas de infecção, como a Índia, China e África sub-saariana, sendo responsável por mais de 50% dos casos de infecção no mundo. Os subtipos A, B, D e G são responsáveis por 12%, 11%, 2% e 5%, respectivamente, das infecções mundiais, enquanto que os subtipos F, H, J e K juntos causam menos de 1% das infecções (Hemelaar *et al.*, 2011).

Vários fatores contribuem para a heterogeneidade genética extraordinária do HIV-1: (a) a síntese do DNA viral é propensa a erros durante a transcrição reversa, (b) altas frequências de recombinação acontecem durante a transcrição reversa, (c) os elevados níveis de produção de vírus *in vivo* (10^9 partículas/dia, 150 a 300 ciclos de replicação/ano), e (d) um grande número de indivíduos infectados (Preston *et al.*,

1988, Perelson *et al.*, 1996, Jetzt *et al.*, 2000). Estima-se que em uma pessoa infectada pelo HIV-1 a diversidade genética viral aumenta 1% por ano a partir da cepa do primeiro vírus, durante a fase assintomática da infecção (Shankarappa *et al.*, 1999).

1.1.1 Estrutura, organização genômica e ciclo replicativo do HIV.

A partícula viral infectiva (vírion) é esférica e apresenta um envelope lipoprotéico formado por uma bicamada lipídica (Freed & Martin, 2007) (Figura 1). O capsídeo alberga o genoma do HIV-1, composto por duas cadeias simples de RNA associadas à proteína do nucleocapsídeo (p7) e às enzimas protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), e às proteínas auxiliares Nef (*Negative Factor*), Vpr (*Viral Protein R*) e Vif (*Viral Infectivity Factor*). Este complexo encontra-se envolvido por um capsídeo cônico (CA) que é formado por monômeros de uma proteína de 24 kDa, designada p24. Envolvendo as proteínas do capsídeo se encontra a matriz protéica formada por monômeros da proteína p17. No envelope viral estão inseridas as glicoproteínas organizadas em trímeros. Cada monômero glicoprotéico é formado por duas subunidades, uma glicoproteína de 41 kDa (gp 41), transmembranar, e uma glicoproteína de 120 kDa (gp 120), que está ancorada à gp 41 e localizada externamente à partícula viral (Freed & Martin, 2007) (Figura 1).

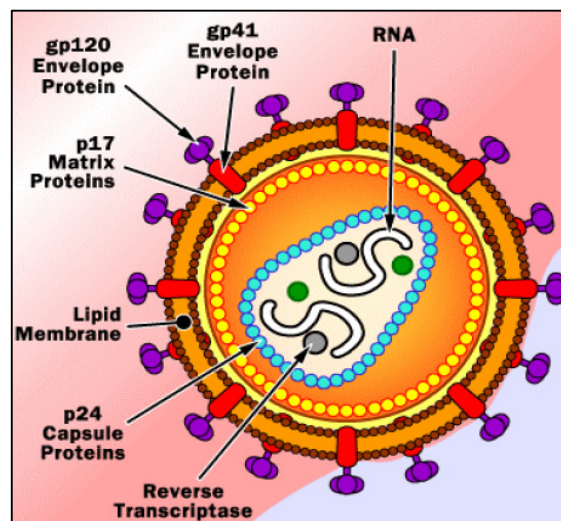


Figura 1. Representação esquemática de uma partícula viral madura do HIV. Esquema modificado de Simon e colaboradores (2006)

O genoma do HIV-1 codifica tanto as proteínas estruturais, que são comuns a todos os retrovírus, quanto as não-estruturais. Analisando o genoma desde 5' a 3' se encontram os genes *gag* (de “group specific antigen”), *pol* (de “polymerase”) e *env* (de “envelope glycoprotein”) (Figura 2). O gene *gag* codifica para uma poliproteína, Pr55^{Gag}, a qual é clivada pela protease viral dando origem às proteínas da matriz (MA ou p17), capsídeo (CA ou p24), e nucleocapsídeo (NC ou p7) e p6. Após a clivagem de Pr55^{Gag} também são gerados dois peptídeos “espaçadores”, p2 e p1. O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora Pr160^{GagPol}, que é clivada gerando as enzimas RT, IN e PR. O gene *Env* codifica para um precursor conhecido como gp160, o qual é clivado por uma protease celular gerando as glicoproteínas gp120 e gp41. A gp120 interage com o receptor e os coreceptores celulares, enquanto que a gp41 tem como função o ancoramento do complexo gp120/gp41 à membrana celular e possui domínios que são fundamentais na fusão do envelope viral com a membrana das células-alvo durante a etapa de entrada do vírus na célula. Além dos genes *gag*, *pol*, *env*, o HIV-1 também codifica outros genes para proteínas reguladoras e acessórias. Por exemplo, a proteína Tat é essencial para a transcrição do HIV-1, Rev desempenha um papel importante no transporte do RNA viral desde o núcleo para o citoplasma; *Vpu*, *Vif*, *Vpr* e *Nef* codificam as proteínas chamadas “acessórias” ou “auxiliares” já que não são uniformemente necessárias para a replicação do vírus (Freed & Martin, 2007).

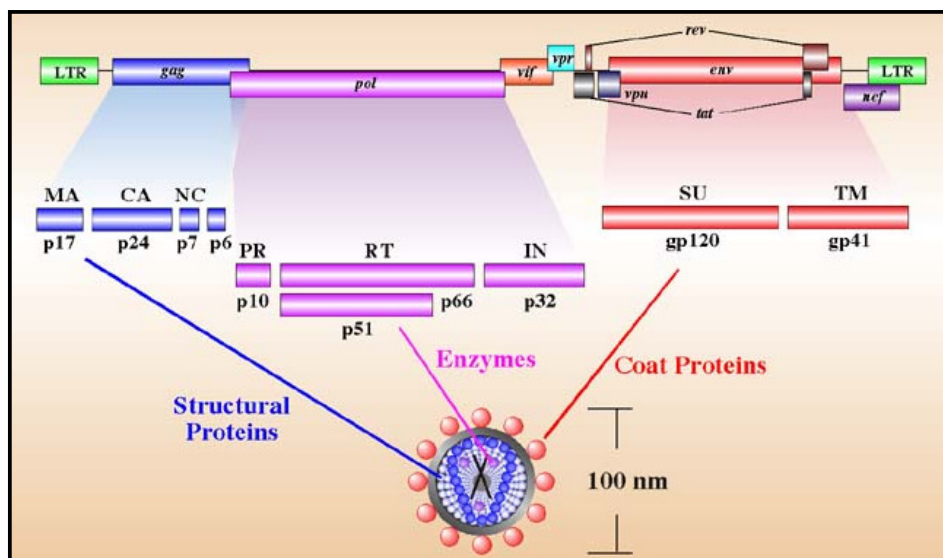


Figura 2. Representação esquemática da estrutura genômica do HIV-1. Esquema modificado a partir de Gonda e colaboradores (1988)

O HIV-1 infecta linfócitos T DC4⁺, macrófagos, DC e, no sistema nervoso central, a microglia (Gartner *et al.*, 1986; Stevenson, 2003), células que expressam a glicoproteína DC4 que serve como receptor do HIV-1 e HIV-2. Assim, a molécula DC4 tornou-se o primeiro receptor retroviral identificado (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1990; Bour *et al.*, 1995).

Após a identificação da molécula DC4 como receptor para o HIV, vários estudos realizados com células primárias e células de linhagem evidenciaram que a molécula DC4 isoladamente não era suficiente para permitir a entrada do vírus na célula-alvo. Em 1996, Feng e colaboradores identificaram um receptor acoplado à proteína G designado como “fusina”, que seria o cofator para a entrada do vírus (Feng *et al.*, 1996). A “fusina” foi mais tarde renomeada como CXCR4, cujo ligante natural é a quimiocina do tipo CXC conhecida como “stromal cell derived factor”/fator derivado de célula estromal (SDF-1) ou CXCL12 (Oberlin *et al.*, 1996). Poucos meses antes da identificação da “fusina”, foi descrita a capacidade das quimiocinas MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) e RANTES (CCL5) de inibir a replicação do HIV-1 com tropismo para macrófagos (M-trópicos) (Cocchi *et al.*, 1995).

Como consequência desta descoberta logo foi descrito que a molécula CCR5 servia como coreceptor para a entrada do HIV trópico para macrófagos (Dragic *et al.*, 1996 ; Deng *et al.*, 1996).

A partir desta descoberta, os isolados de HIV são classificados como trópicos para CCR5 (R5-trópicos), para CXCR4 (X4-trópicos) ou duplo-trópicos (R5X4 trópicos), de acordo com o uso preferencial que apresentem para estas moléculas durante o processo de entrada na célula-alvo (Freed & Martin, 2007). Sabe-se hoje que os isolados R5-trópicos são os mais prevalentes, e podem ser encontrados nos pacientes infectados durante todo o curso clínico da infecção. Os vírions X4 e R5X4 são mais raros, e são vistos em apenas 40-50% dos pacientes, nas fases tardias da infecção (Schuitemaker *et al.*, 1992; Connor *et al.*, 1997).

A importância dos co-receptores *in vivo* é ilustrada por estudos que demonstraram que indivíduos homocigotos para o alelo mutante de CCR5, CCR5/delta 32 (*ccr5* Δ 32), o qual codifica a proteína truncada e não expressa na membrana plasmática, são altamente resistentes à infecção por isolados R5-trópicos (Dean *et al.*, 1996).

A primeira etapa da replicação do HIV-1 é a interação entre a proteína viral gp120 com o DC4 de células-alvo, como linfócitos T DC4⁺, DC e macrófagos (Figura 3). Inicialmente a gp120 se liga ao DC4 o que permite a formação de um complexo ternário

composto de gp120, DC4 e o co-receptor (CXCR4 ou CCR5) (Berger *et al.*, 1999). Logo ocorrem mudanças conformacionais na gp41, que desencadeiam a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática. Esta fusão permite ao nucleocapsídeo ganhar acesso ao citoplasma celular, o que é fundamental para o posterior processo de infecção. Logo após ocorre o processo de “*uncoating*”, durante o qual o nucleocapsídeo é convertido em um complexo conhecido como “Complexo de Transcrição Reversa” (RTC) que tem como principal protagonista a enzima RT, a qual produz uma dupla fita de DNA viral. O produto da ação desta enzima se associa ao complexo de pré-integração (PIC) constituído da dupla fita de DNA, da integrase, da matriz protéica, do Vpr, e da própria RT (Revisado por Freed, 2001). Este complexo é transportado até o núcleo através de microtúbulos transportadores para a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Este processo ocorre a partir da ação da enzima integrase (MCDonald *et al.*, 2002). O DNA viral integrado passa a ser denominado de provírus e permanece na célula enquanto ela estiver viva. As proteínas celulares e virais controlam a expressão gênica do HIV; assim, proteínas virais e os novos genomas serão sintetizados a partir deste “molde” através da utilização da maquinaria da célula infectada para a produção de novos vírions (Stevenson *et al.*, 1990). A última etapa do ciclo replicativo é a maturação e brotamento do vírus, que ocorre à medida que os precursores protéicos se acumulam, associando-se tanto às proteínas do nucleocapsídeo, quanto às glicoproteínas virais. Assim, as partículas virais amadurecerão e brotarão promovendo o fim do ciclo replicativo com o desligamento do vírion da célula hospedeira (Greene & Peterlin, 2003).

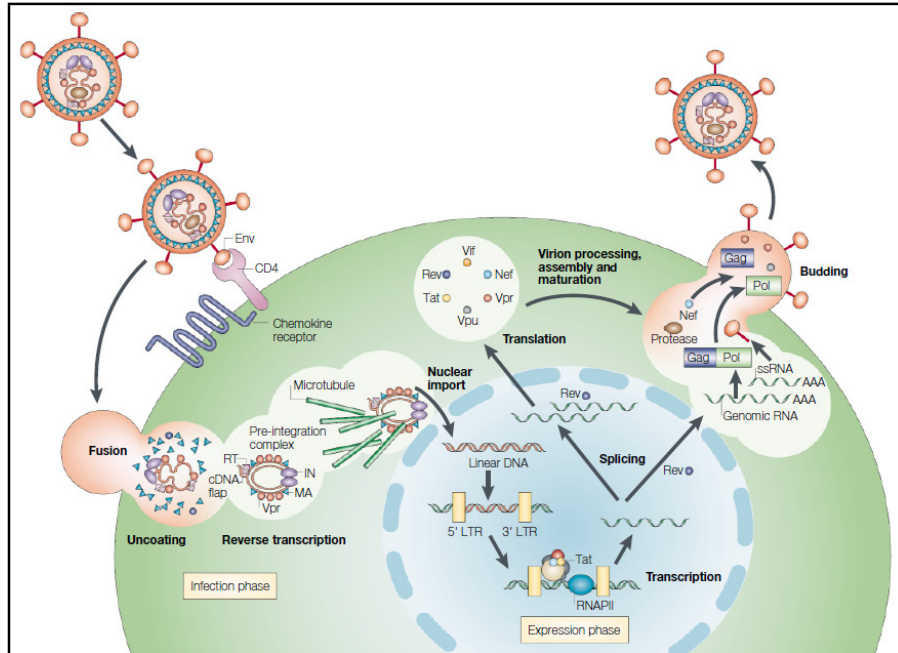


Figura 3. Esquema representando o ciclo replicativo do HIV-1 no linfócito T DC4⁺. Extraído de Peterlin & Trono (2003)

1.1.2 Reservatórios celulares do HIV.

Nos últimos anos, a importância de células T, macrófagos e DC na patogênese da infecção pelo HIV-1 ganhou destaque com a descoberta de que estas células funcionam como importantes reservatórios virais (Revisado por Stevenson, 2003). Em células T ativadas a replicação viral é rápida e eficiente, já que o LTR (“*long terminal repeat*”) viral possui sítios de ligação para fatores celulares que regulam de forma positiva a transcrição do HIV-1 como, por exemplo, o fator de transcrição NF-κB. Além disso, a proteína viral Tat aumenta a própria expressão gênica do HIV (Schwartz *et al.*, 1989; Barry *et al.*, 1991; Demarchi *et al.*, 1996). A infecção pelo HIV-1 em células T ativadas tem efeito citopático (Herbein *et al.*, 1998).

As células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e DC são reservatórios celulares para o HIV-1 e é mediante a permanência dentro destas que o vírus consegue escapar do reconhecimento pelo sistema imune. A infecção dos macrófagos pelo HIV-1 ocorre através do receptor celular DC4 e do coreceptor CCR5 principalmente (Figura 4a) (Balestra *et al.*, 2001; Stevenson, 2003). Estudos em macacos rhesus infectados com “*Simian Immunodeficiency Virus / HIV type 1*” (SHIV), que é um vírus quimérico que contém os genes do envelope viral de um vírus HIV-1

duplotrópico inserido no genoma do SIV, demonstram a importância da infecção dos macrófagos *in vivo*, os quais são responsáveis pela manutenção da viremia após a depleção de células T característica da infecção pelo HIV-1. Estes autores viram que a alta carga viral nestes animais era resultado da maciça infecção de macrófagos nos tecidos linfóides, os quais estavam depletados de linfócitos T DC4⁺ (Igarashi *et al.*, 2001).

Em macrófagos, a produção de vírions maduros ocorre principalmente em corpos multivesiculares, os quais são compartimentos citoplasmáticos ricos em moléculas MHC de tipo II. Os vírions nos corpos multivesiculares podem ser liberados da célula se ocorre fusão destes corpos com a membrana citoplasmática ou, de forma alternativa degradados nos lisossomos (Raposo *et al.*, 2002). Os macrófagos também são responsáveis pela disseminação do vírus para as células T DC4⁺ quando acontece a sinapse imunológica (Revisado por Stevenson, 2003).

O terceiro tipo de reservatório do HIV são as DC, as quais podem ser infectadas diretamente e têm a capacidade de liberar vírions em baixas quantidades (Figura 4b) (Spiegel *et al.*, 1992). Os vírions que se ligam ao receptor celular DC-SIGN podem ser endocitados e degradados em compartimentos ácidos. No entanto, alguns vírions entram em compartimentos não ácidos evitando assim serem degradados. Estes últimos podem infectar células T DC4⁺ em trans logo após a fusão dos endossomos que contêm os vírions com a membrana plasmática da própria DC (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

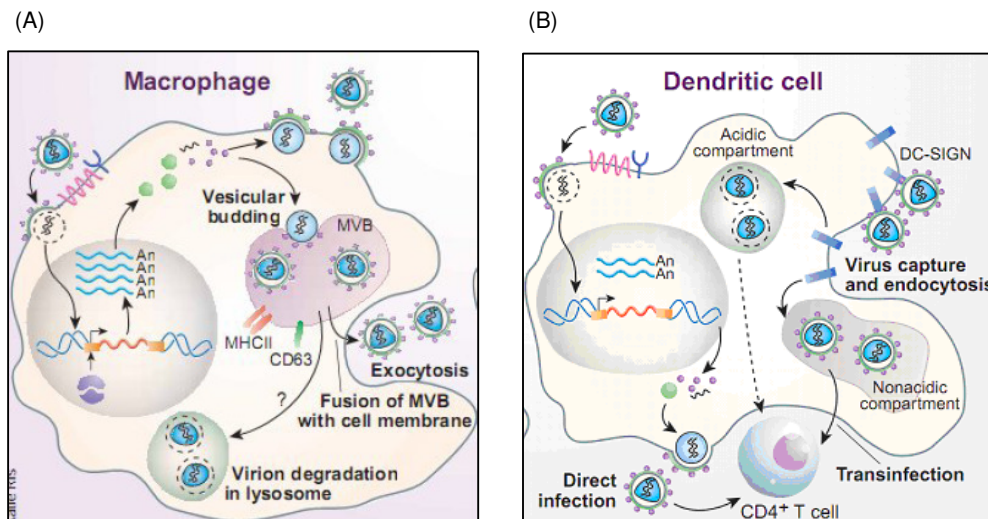


Figura 4. Esquema representando a replicação do HIV-1 em macrófagos (A) e DC (B). Adaptado de Stevenson (2003)

1.1.3 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1.

A infecção aguda ou primária é definida como o período inicial da infecção, determinada entre a detecção do RNA viral no plasma de pacientes infectados pelo HIV, até a formação de anticorpos específicos para o HIV, 3 a 4 semanas após a infecção. Quando a infecção pelo HIV ocorre por transmissão sexual, existe uma fase inicial, antes da detecção de RNA viral no plasma do paciente, chamada de “eclipse”, que se caracteriza pela replicação do HIV no tecido linfóide associado à mucosa vaginal ou retal (Cadogan *et al.*, 2008; McMichael *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostram as consequências imunológicas da infecção pelo HIV-1 e SIV nos tecidos linfóides associados às mucosas, os quais foram realizados principalmente em macacos rhesus infectados com SIV. A principal conclusão destes estudos é que a infecção aguda pelo HIV ou SIV é associada a uma rápida, pronunciada e irreversível depleção de células T de memória na mucosa, principalmente aquelas que expressam o coreceptor viral CCR5. Assim, a grande população de células T de memória/ativadas DC4⁺CCR5⁺ que residem nas mucosas (principalmente na lâmina própria) representa um alvo importante para a replicação viral. Este fenômeno não é observado no sangue periférico nem nos linfonodos, onde as células T residentes são majoritariamente negativas para o coreceptor CCR5, com fenótipo de células em repouso, virgens ou de memória central. A depleção de células T DC4⁺ do trato gastrointestinal é um processo multifatorial, tendo em conta que a perda inicial de células T (após alguns dias de infecção) é provocada diretamente pela infecção viral, e a subsequente perda das células T é causada pela morte induzida pela própria resposta celular citotóxica do indivíduo (Paiardini *et al.*, 2008), além de outras causas, como será descrito mais adiante.

Durante a infecção primária, a viremia aumenta atingindo seu ponto máximo após 21-28 dias de infecção, juntamente com diminuição do número de células T DC4⁺ (Figura 5). Embora a quantidade de células T circulantes retorne a um valor próximo ao normal, o número de células T DC4⁺ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) permanece reduzido (Guadalupe *et al.*, 2003). Essa perda é em grande parte irreversível e tem importantes consequências imunológicas, como falha do sistema imune e progressão para a AIDS durante o transcurso da infecção (Picker *et al.*, 2005). No momento do pico da viremia, os pacientes desenvolvem sintomas gerais, incluindo

síndrome semelhante à gripe, com febre, dor de garganta, linfadenopatias, e exantema (Revisado por Kahn *et al.*, 1998).

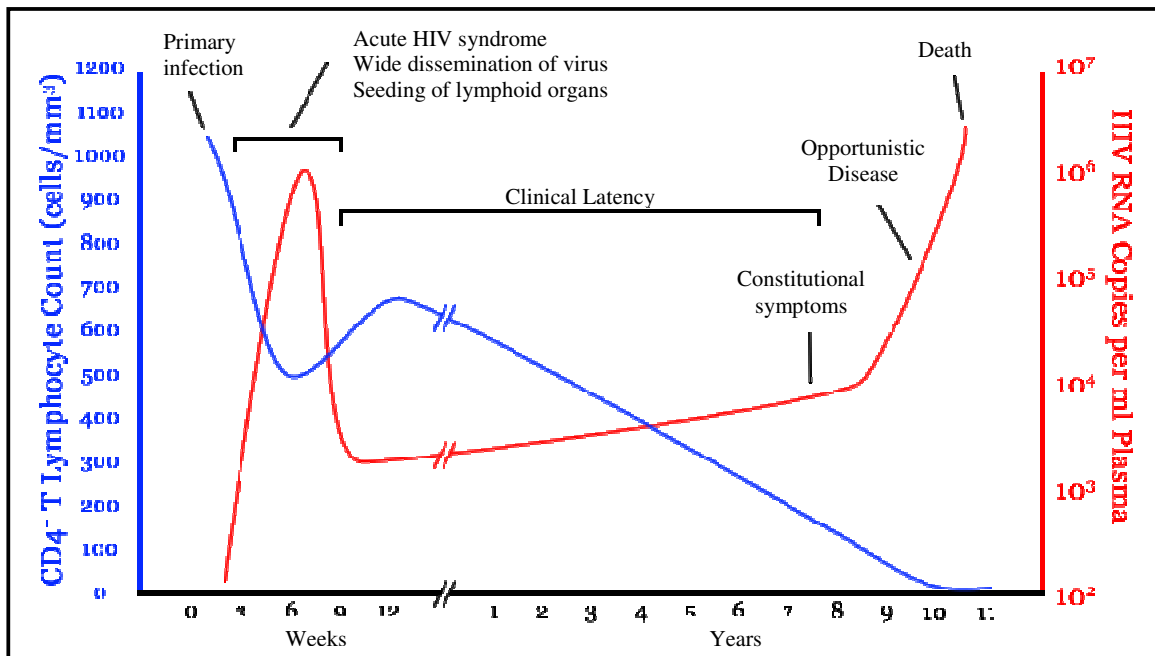


Figura 5. Gráfico mostrando o curso de uma infecção pelo HIV-1. Representa-se a carga viral (em vermelho) e a contagem de células T DC4⁺ (em azul) determinados no plasma de indivíduos infectados não tratados. Esquema reproduzido a partir de Coffin e colaboradores (1997)

Durante a fase crônica da infecção pelo HIV-1, respostas imunes celulares e humorais são desencadeadas, mas podem não ser suficientes para conter a propagação viral e o estabelecimento, mais tarde, do quadro de imunossupressão. Esta fase crônica da infecção também se associa com uma severa depleção de células T DC4⁺ no tecido linfóide associado a mucosas (MALT), principalmente as células T DC4⁺CCR5⁺ que residem na lâmina própria. A homeostase das células T DC4⁺ de memória efetoras residentes nas mucosas depende da produção e migração de novas células, deste modo uma diminuição a nível sistêmico das células T DC4⁺ de memória central resulta no déficit de células T de memória efetoras; este processo está associado à progressão para a AIDS (Paiardini *et al.*, 2008).

A ativação crônica do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV-1 é uma característica da progressão para AIDS. Neste contexto é observado um “turnover” aumentado de células T, um maior número de células T ativadas, e níveis maiores de quimiocinas e citocinas proinflamatórias no soro (Brenchley *et al.*, 2004). O grau de

ativação do sistema imune é considerado por vários pesquisadores como melhor preditor da progressão da doença (Brenchley *et al.*, 2004; Brenchley *et al.*, 2006).

A ativação imune na infecção pelo HIV-1 pode resultar em efeitos benéficos ou nocivos para o paciente. Podemos mencionar algumas consequências benéficas, como a restituição parcial (principalmente nas mucosas) do pool de células T DC4⁺ de memória depletado e restabelecimento transitório da competência imune (Grossman *et al.*, 2002; Douek *et al.*, 2001). Porém, a ativação imune é deletéria. Alguns dos efeitos nocivos incluem destruição da arquitetura dos linfonodos e fibrose (Schacker *et al.*, 2002; Estes *et al.*, 2008), retenção de células T efetoras nos linfonodos, perda da função tímica, drenagem de células virgens para a circulação e, obviamente, a perpetuação da replicação do HIV (Hellerstein *et al.* 1999; Dion *et al.*, 2004; Revisado por Brenchley *et al.*, 2006).

A ativação imune causa depleção de células T DC4⁺ durante a infecção pelo HIV, e contribui com a morbidade relacionada à infecção, determinando a progressão para AIDS (Giorgi *et al.*, 1999; Moanna *et al.*, 2005). A ativação imune pode estar diretamente relacionada à replicação viral ou não, no entanto se presume que um dos principais responsáveis pela ativação imune é o próprio vírus (Alter *et al.*, 2007; Meier *et al.*, 2007; Nazli *et al.*, 2010). A Terapia Anti-Retroviral Altamente Potente (HAART) diminui a carga viral e a ativação do sistema imune (Benito *et al.*, 2002; Guadalupe *et al.*, 2003). Também contribui para a persistente ativação do sistema imune a passagem de produtos microbianos do lúmen do intestino para a circulação, processo conhecido como translocação microbiana, que ocorre durante o curso clínico da infecção (Revisado por Brenchley *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009).

Tem sido descrito que as citocinas próinflamatórias liberadas pelo sistema imune quando ativado pelas proteínas virais, ou pelo próprio vírion, são uma consequência importante da ativação imune (Chang *et al.*, 2010). Além disso, a infecção das células T DC4⁺ reguladoras leva à sua própria depleção e pode agravar o estado de ativação imune (Eggena *et al.*, 2005; Moreno-Fernandez *et al.*, 2009). À exceção destes efeitos relacionados diretamente com o vírus, também existem causas indiretas como, por exemplo, a acentuada destruição do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT), a qual induz uma translocação aumentada da flora intestinal para a circulação e uma subsequente ativação imune (Figura 6) (Brenchley *et al.*, 2006; Brenchley *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2009).

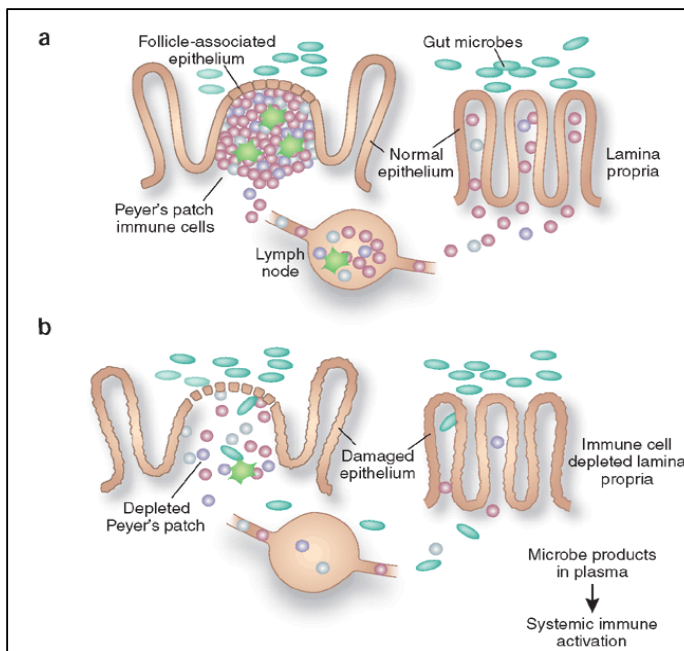


Figura 6. Esquema representando a lâmina própria de indivíduos normais (a) e pacientes infectados pelo HIV-1 (b) nos quais ocorre o fenômeno de translocação microbiana. Esquema reproduzido a partir de Brenchley e colaboradores (2006)

Os destacados pesquisadores Daniel Douek e Jason Brenchley (2006) propuseram um possível mecanismo que liga a ativação imune generalizada característica da fase crônica das infecções patogênicas de HIV ou SIV com a perda inicial e persistente de células T DC4⁺. Os autores demonstraram que os níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que pode ser usado como indicador da translocação microbiana desde o lúmen do intestino à circulação, estão significativamente aumentados em indivíduos cronicamente infectados com HIV e em macacos rhesus infectados com SIV. Neste estudo, os autores identificaram que os níveis plasmáticos de LPS se correlacionam com os níveis de ativação imune nos pacientes infectados com HIV (Brenchley *et al.*, 2006). Baseado nestes resultados, foi proposto que os defeitos no sistema imune associado às mucosas, relacionados com a perda das células T DC4⁺ no MALT, se correlacionam com a ativação imune observada durante a infecção por HIV ou SIV (Revisado por Brenchley *et al.*, 2006).

A depleção significativa de células T DC4⁺ residentes no trato intestinal, que leva à perda da função imune do tecido linfóide associado à mucosa, induz a ruptura da

barreira física e biológica da mucosa, tendo como resultado a translocação de produtos microbianos (LPS e outros) desde o intestino até a circulação (Figura 6). Estes produtos microbianos, por sua vez, causam uma ampla ativação do sistema imune quando se ligam aos receptores tipo toll (TLRs) e, como consequência, ativam diferentes células do sistema imune (Estes *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2010; Nixon *et al.*, 2010).

Há diversas evidências que apóiam o racional anterior, por exemplo: i) enteropatias com aumento de apoptose de enterócitos em pacientes infectados com HIV e AIDS (Revisado por Kotler, 2005), ii) altos níveis de replicação viral e depleção de células T DC4⁺ em GALT se correlacionam com uma menor expressão dos genes que regulam a manutenção da barreira epitelial e uma maior expressão daqueles associados à ativação imune e inflamação (Sankaran *et al.*, 2008), iii) a translocação microbiana tem sido mostrada em pacientes com a doença autoimune de Bowel e durante o acondicionamento para o transplante hematopoiético (Caradonna *et al.*, 2000; Cooke *et al.*, 2002).

Pelo antes descrito, conclui-se que a ruptura da barreira da mucosa intestinal com estimulação das células do sistema imune pelos produtos microbianos é um dos principais mecanismos que provocam ativação do sistema imune durante a infecção pelo HIV. Porém, é necessário aprofundar o conhecimento em alguns pontos chave deste mecanismo. Por exemplo, é fundamental obter evidências diretas que indiquem que a translocação microbiana provoca ativação imune. Isto poderia ser obtido manipulando-se o nível de translocação microbiana em estudos com primatas não humanos infectados com SIV. Não está definido ainda se a translocação microbiana é causada pela perda de células T DC4⁺, por outros problemas no sistema imune da mucosa, ou por um dano direto nas células epiteliais (Nazli *et al.*, 2010). Um terceiro ponto chave é o conhecimento real de como diferentes ligantes dos TLRs, como o LPS, levam à ativação do sistema imune dos pacientes infectados com HIV. A elucidação destas questões facilitaria o entendimento da patogênese da infecção pelo HIV e talvez a definição de novas estratégias terapêuticas, além da HAART (Revisado por Paiardini *et al.*, 2008).

1.1.4 Resposta imune contra o HIV-1.

A resposta imune humoral tem um papel fundamental em muitas infecções virais, porém não é sempre capaz de eliminar definitivamente o vírus. Foi observado que os anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo HIV-1 têm uma capacidade de neutralização (*in vitro*) muito débil para isolados primários de HIV-1 (Bou-Habib *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Moog *et al.*, 1997; Pognard *et al.*, 1999; Montefiori *et al.*, 2009).

Os primeiros anticorpos neutralizantes encontrados em indivíduos infectados pelo HIV-1 são específicos para a região hipervariável V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral (“V3 loop”) (Javaherian *et al.*, 1989). Diversos estudos sugerem que em pacientes nos quais a infecção está bem estabelecida os anticorpos neutralizantes têm uma contribuição mínima no controle da replicação do HIV-1 pois são dirigidos principalmente para epítomos que não são expostos na partícula viral (Bou-Habib *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Richman *et al.*, 2003).

Em relação à resposta imune celular, reconhece-se a participação fundamentalmente dos linfócitos T citotóxicos DC8⁺ (LTCs) no controle da replicação do HIV-1 (Saksena *et al.*, 2008). Tanto nos pacientes infectados pelo HIV-1 quanto em macacos infectados pelo SIV demonstrou-se a existência de LTCs em número variado e em diversos compartimentos anatômicos, como por exemplo, no sangue, espaço brônquio-alveolar, linfonodos, baço, pele, fluido cerebrospinal, sêmen e tecidos de mucosa vaginal e gastrointestinal (Revisado por Letvin & Walker, 2003).

Os linfócitos T DC8⁺ inibem a replicação do HIV-1 *in vitro*, e muitos mecanismos, tanto citotóxicos como não citotóxicos, têm sido associados com este efeito antiviral (Walker *et al.*, 1991; Saksena *et al.*, 2008; Killian *et al.*, 2011). Os CTLs lisam as células infectadas pelo HIV-1 *in vitro* bloqueando assim a propagação da infecção (Koup *et al.*, 1994). Do mesmo modo estas células efectoras também produzem fatores solúveis como, por exemplo, as β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 que medeiam esse efeito (Walker *et al.*, 1991; Mackewicz *et al.*, 1992; Cocchi *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1998; Tomaras *et al.*, 2001). Durante os primeiros dias após a infecção pelo HIV-1 há um controle da replicação viral que se correlaciona com o aparecimento de uma resposta de LTCs DC8⁺ específicos contra o HIV-1 (Streeck *et al.*, 2009). Este fenômeno foi demonstrado pela associação entre o aparecimento de populações celulares efectoras capazes de lisar células-alvo que expressam proteínas virais, e a diminuição do RNA viral plasmático

numa infecção primária pelo HIV-1 (Koup *et al.*, 1994; Borrow *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1999; Streeck *et al.*, 2010).

Apesar das respostas imunes celulares e humorais serem desencadeadas após uma infecção pelo HIV-1, a replicação viral não é contida e, como consequência, é observada uma progressiva supressão do sistema imune. A causa do chamado “Escape Imune” são as mutações nos epítomos virais, que são alvos das repostas celulares e humorais (Jones *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos de escape para evadir a resposta humoral podem ser mencionadas as mudanças nos carboidratos do envelope viral que protegem os sítios de ligação dos anticorpos (Wei *et al.*, 2003). Um dos mecanismos de escape para evadir a resposta dos LTCs são as mutações em um único aminoácido de epítomos em sítios essenciais para o reconhecimento do MHC de classe I ou do receptor da célula T (TCR), ou mutações nas regiões que as flanqueiam, que podem afetar o processamento antigênico (Jones *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011).

1.1.5 Fatores que influenciam a replicação viral.

A replicação do HIV-1 nas células alvo é influenciada por diferentes fatores, como o tipo de célula infectada, assim como do microambiente celular. Este também influencia o estado metabólico da célula alvo, regulando a expressão de receptores celulares e a produção de citocinas e quimiocinas, as quais podem ter efeito positivo ou negativo sobre a replicação do HIV-1 (Kedzierska *et al.*, 2003).

Várias citocinas são descritas como capazes de induzir o aumento da replicação do HIV-1. Por exemplo, o TNF- α , assim como a IL-1 β , promovem a replicação viral induzindo a ligação do fator de transcrição NF-kB ao gene promotor da replicação do HIV-1, o LTR (Ito *et al.*, 1989; Swingler *et al.*, 1994). Também podem promover o aumento da replicação do HIV-1 as citocinas IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-6, IL-8, TGF- β , e a quimiocina CCL2. Este fenômeno pode ocorrer através de diferentes mecanismos, como por exemplo, o aumento da transcrição viral, assim como a indução de citocinas pró-inflamatórias (Alfano & Poli, 2005). Recentemente, o nosso grupo descreveu que o Fator Inibidor de Macrófagos (MIF) (Regis *et al.*, 2010), assim como o Fator do Crescimento do Nervo (NGF) (Souza *et al.*, 2011) são também fortes indutores da replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos, respectivamente.

Entretanto, existem citocinas que podem promover a diminuição da replicação viral, como o IFN do tipo I (IFN- α/β), IL-10 e a IL-27. São vários os mecanismos pelos quais ocorre este fenômeno, dentre eles, inibição da entrada do HIV-1, inibição da iniciação da transcrição reversa, assim como a inibição de diversos procesos tardios no ciclo replicativo do HIV-1, por exemplo, síntese e processamento das proteínas virais, assim como montagem do vírus (Montaner *et al.*, 1994; Saville *et al.*, 1994; Cremer *et al.*, 2000; Greenwell-Wild *et al.*, 2009; Goujon *et al.*, 2010).

Recentemente foram descobertos vários fatores celulares intrínsecos, induzidos pelo interferon, que possuem a capacidade de restringir a replicação do HIV-1, como a APOBEC3G/3F (“*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*”), BST2/DC317 (“*tetherin/bone marrow stromal cell antigen 2*”) e TRIM5- α (“*tripartite-motif-containing 5 α* ”) (Neil *et al.*, 2009; Strebel *et al.*, 2009; Goujon *et al.*, 2010). A proteína BST-2 restringe o brotamento das partículas maduras do HIV-1 mediante a retenção das mesmas na superfície da célula infectada, efeito este que é contra-balanceado pela proteína viral Vpu (Neil *et al.*, 2009). TRIM5 α é uma proteína que, mediante a formação de multímeros, tem a capacidade tanto de bloquear o acúmulo de DCNA na célula infectada, como de impedir o transporte de DCNA ao núcleo da mesma (Revisado por Luban, 2007; Nakayama *et al.*, 2010). Vários membros da família de enzimas citidinas-deaminases, APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3A, têm sido descritos como potentes inibidores da replicação do HIV-1. As proteínas APOBEC3G/3F são incorporadas à partícula viral em brotamento, e provocam um grande número de mutações hiper-somáticas no DNA pró-viral durante o processo de transcrição reversa, através da desaminação da desoxi-citosina, com conseqüente formação da desoxi-uracila. Este acúmulo de mutações G \rightarrow A gera vírions não-infectivos, impedindo com isso novos ciclos de infecção. A proteína viral Vif possibilita ao HIV-1 o escape deste mecanismo celular, marcando a APOBEC3A, 3F e 3G para a degradação nos proteassomas via ubiquitinação (Maddon *et al.*, 2009; Strebel *et al.*, 2009).

1.2 Receptores do tipo Toll (TLRs).

1.2.1 Estrutura, localização e ligantes dos TLRs.

Os TLRs são receptores celulares, descobertos na década de 1990, que reconhecem componentes de diversos tipos de patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Akira *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2004). Este tipo de receptor foi denominado inicialmente como Receptor Toll, descrito na mosca *Drosophila melanogaster*, o qual era necessário para o estabelecimento correto da polaridade dorso-ventral e o desenvolvimento embrionário adequado do inseto (Hashimoto *et al.*, 1988).

Charles Janeway e Ruslan Medzhitov (1997) identificaram a presença de receptores homólogos no genoma humano, que foram denominados “Receptores tipo Toll” (“*Toll-like receptors*”). Estes receptores foram descritos primeiramente em componentes celulares da imunidade inata que, quando estimulados pelos seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células (Medzhitov *et al.*, 1997). Atualmente são reconhecidos 12 membros da família de TLR em camundongos e 10 membros de TLR no genoma humano (Revisado por Kawai & Akira, 2010). Os TLRs são glicoproteínas transmembranares compostas por três domínios: extracelular, transmembranar e o domínio intracitoplasmático de sinalização. O domínio extracelular está composto de repetições ricas em leucinas (LRR) e está envolvido na ligação direta, ou através de moléculas acessórias, aos PAMPs. O domínio transmembranar de passagem única, e o domínio intracitoplasmático homólogo ao receptor da interleucina-1, TIR, são essenciais para que ocorra a sinalização intracelular através de moléculas adaptadoras (Jin & Lee, 2008). Os TLRs são divididos em dois subgrupos em função da sua localização celular e dos ligantes respectivos. Um dos grupos é composto por TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11, que são expressos na superfície celular e reconhecem componentes da membrana microbiana, principalmente lipídeos, lipoproteínas e proteínas (Figura 7); o outro grupo é composto por TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9, que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, como o retículo endoplasmático (ER), endossomos, lisossomos e

endolisosomos; estes reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Figura 7) (Revisado por Kawai & Akira, 2010).

O TLR-4 foi o primeiro membro da família dos TLRs a ser isolado e reconhece uma enorme variedade de PAMPs, dentre eles o lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano, componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998; Akira *et al.*, 2006). A flagelina, maior constituinte do flagelo de bactérias, como por exemplo *Salmonella typhimurium*, é reconhecida pelo TLR-5 (Hayashi *et al.*, 2001). Os receptores TLR-3 e TLR-9 se associam ao reconhecimento viral através dos ligantes, dsRNA e DNA (sequências CpG não-metiladas presentes no DNA bacteriano), respectivamente. O TLR-7 e TLR-8 reconhecem ssRNA e são expressos em vesículas endocíticas e compartimentos lisossômicos (Revisado por Beutler, 2009).

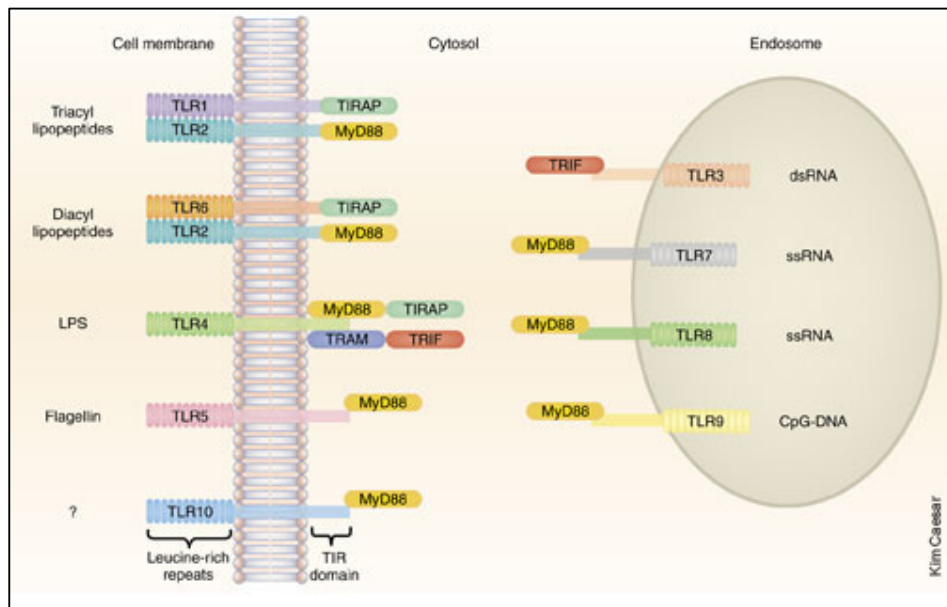


Figura 7. Esquema que representa a localização dos TLRs humanos. Adaptado de Kawai & Akira (2010)

1.2.2 Vias de sinalização dos TLRs.

A ativação dos TLRs desencadeia uma complexa cascata de sinalização intracelular, provocando ativação nas células que os expressam, como DC, macrófagos e linfócitos, tendo como resultado final a translocação para o núcleo de vários fatores de transcrição, dentre eles o NF- κ B.

A sinalização intracelular que ocorre quando os TLRs são ativados requer diversas moléculas adaptadoras, como por exemplo, MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF. A sinalização dependente da proteína MyD88 é compartilhada por todos os tipos de TLRs, exceto o TLR-3 (Takeuchi *et al.*, 2000). Esta cascata inicia-se com a ativação do próprio MyD88, levando ao recrutamento das enzimas IRAK4, IRAK1, IRAK2 e/ou IRAK-M. IRAK4 tem um papel essencial na ativação do NF- κ B e na via de sinalização de MAPK. A ativação de forma sequencial das proteínas IRAK1 e IRAK2 resulta na interação com TRAF6, que cataliza a ubiquitinação de NEMO, o qual induz em última instância a ativação do NF- κ B, por meio de fosforilação e subsequente degradação das proteínas I κ B (Yamamoto *et al.*, 2006, Revisado por Kawai & Akira, 2010).

Na via de ativação independente da proteína MyD88 o sinal proveniente do TLR ativa NF- κ B através de outras duas moléculas adaptadoras como TRIF e TRAM. A via dependente de TRIF pode atuar também via outros fatores de transcrição (além de NF- κ B) como o IRF3, IRF5, IRF7 que culminam com a ativação dos genes que codificam IFN- α / IFN- β (Doyle *et al.*, 2006; Revisado por O'Neill, 2008; Revisado por Kawai & Akira, 2010) (Figura 8).

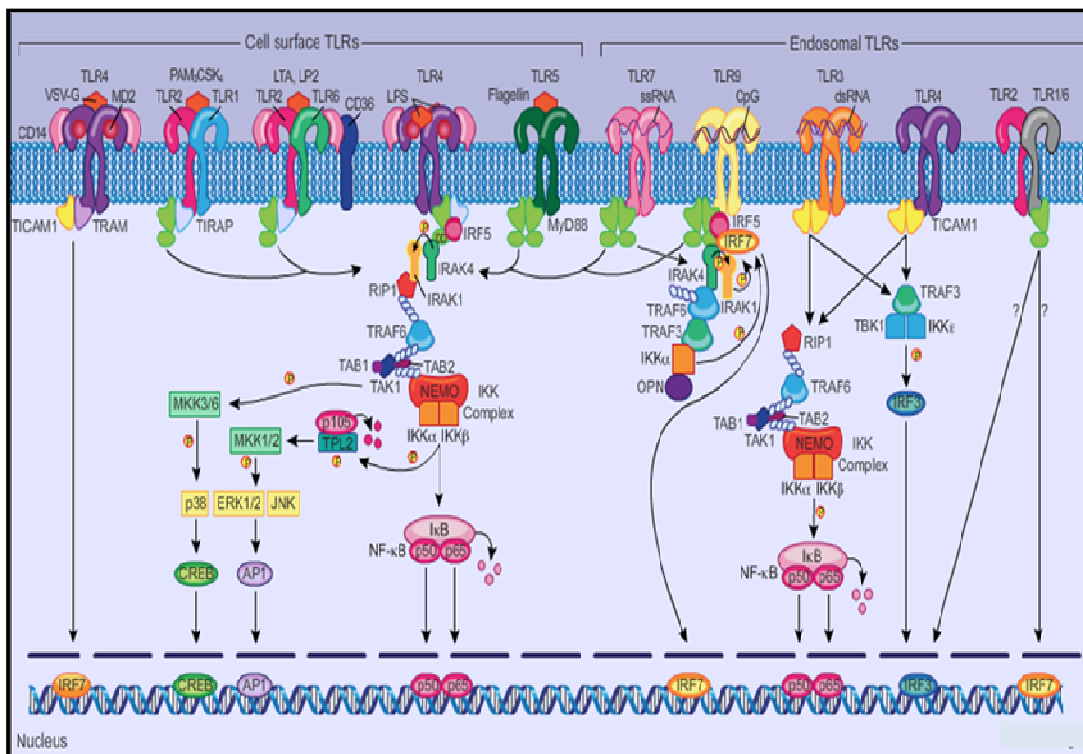


Figura 8. Esquema que representa as vias de sinalização dos TLRs. Adaptado de Kumar e colaboradores (2009)

1.2.3 Receptor tipo toll 2 (TLR-2).

O TLR-2 reconhece uma ampla variedade de PAMPS derivados de bactérias, fungos, parasitos e vírus como, por exemplo, lipopeptídeos de bactérias, peptidoglicanos e ácido lipoteicóico de bactérias Gram positivas, lipoarabinomananos de micobactérias, zymosan (componente da parede celular de fungos), tGPI-mucina (glicosilfosfatidilinositol) de *Trypanosoma cruzi* e hemaglutininas do vírus do sarampo (Takeuchi *et al.*, 2000; Quesniaux *et al.*, 2004; Revisado por Underhill, 2003; Ropert *et al.*, 2004).

O TLR-2 forma heterodímeros com TLR-1 (TLR-2/TLR-1) e TLR-6 (TLR-2/TLR-6) o que lhe confere a capacidade de discriminar entre diferentes componentes microbianos (Jin *et al.*, 2007). O heterodímero TLR-2/TLR-1 reconhece lipopeptídeos triacilados de bactérias Gram-negativas (Takeda *et al.*, 2002), enquanto que o heterodímero TLR-2/TLR-6 é capaz de reconhecer lipopeptídeos diacilados de bactérias Gram-positivas e mycoplasmas (Kang *et al.*, 2009; Quesniaux *et al.*, 2004).

Diferentes estudos forneceram informações sobre os mecanismos pelos quais estes heterodímeros discriminam entre as estruturas das lipoproteínas. Quando ocorre o reconhecimento do ligante pelo heterodímero TLR-2/TLR-1, duas das três cadeias do lipopeptídeo triacilado (por exemplo, Pam3CSK4) interagem com o TLR-2, enquanto que a terceira cadeia se liga ao canal hidrofóbico do TLR-1. Assim é facilitado o reconhecimento dos lipopeptídeos triacilados. No entanto o TLR-6 não possui o canal hidrofóbico, o que impede que o complexo TLR-2/TLR-6 reconheça lipopeptídeos triacilados, porém é capaz de reconhecer lipopeptídeos diacilados (Jin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Quando os heterodímeros TLR-2/TLR-1 ou TLR-2/TLR-6 são ativados, estes induzem a via de sinalização celular dependente da proteína adaptadora MyD88, como descrito anteriormente.

1.2.4 Receptores tipo toll (TLRs) e a infecção pelo HIV-1.

Diversos estudos têm demonstrado o papel fundamental dos TLRs na detecção da presença de vírus num indivíduo, e a subsequente resposta antiviral desencadeada pelo próprio sistema imune (Takeda *et al.*, 2003). Foi observado que a sinalização dos TLRs é essencial na remoção das infecções virais, como por exemplo, vírus da

estomatite vesicular, citomegalovírus e hepatite B *in vitro* (Tabeta *et al.*, 2004; Isogawa *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). A ativação de TLRs culmina numa cascata de sinalização intracelular que induz uma resposta inflamatória, modulando assim a função de DC, macrófagos e linfócitos, células-alvo da infecção pelo HIV-1 (Trinchieri *et al.*, 2007; Revisado por Kawai & Akira, 2010).

A ativação do TLR-4, através do ligante clássico LPS, inibe a replicação do HIV-1 em células T e macrófagos derivados de monócitos (MDM) (Kornbluth *et al.*, 1989; Verani *et al.*, 1997). Este fenômeno ocorre através de diferentes mecanismos, como por exemplo, a produção de β -quimiocinas como CCL3, CCL4 e CCL5 liberados pelos próprios macrófagos infectados (Verani *et al.*, 1997). Outro mecanismo descrito foi a diminuição da expressão do receptor de quimiocina, CCR5, na superfície da célula (Franchin *et al.*, 2000).

A estimulação do TLR-3 através do ligante sintético Poly (I:C) também leva à inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos derivados de monócitos (MDM) (Zhou *et al.*, 2010), DC (Trapp *et al.*, 2009) e tecidos linfóides humanos (amídalas) (Brichacek *et al.*, 2010). Estes mecanismos ocorrem através da via do IFN do tipo I, com a participação da proteína APOBEC3G (A3G) (Trapp *et al.*, 2009), assim como, da indução de fatores antivirais como as β -quimiocinas, que bloqueiam a entrada do vírus na célula.

Por sua vez, a proteína Flagelina, ligante de TLR-5, aumenta a replicação do HIV-1 em tecidos linfóides humanos (amídalas) infectados *in vitro* (Brichacek *et al.*, 2010). Também foi descrito que a estimulação de TLR-5 é capaz de aumentar a transmissão do HIV-1 desde as DC infectadas para as células T DC4⁺, além de reativar o HIV-1 que está latente em células T DC4⁺ quiescentes (Thibault *et al.*, 2009).

2. Hipótese

Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam aumentada permeabilidade intestinal, a qual permite a passagem para a circulação sanguínea de elevada quantidade de produtos microbianos, fenômeno conhecido por translocação microbiana (Brenchley *et al.*, 2006; Brenchley *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). A translocação microbiana induz crônica ativação do sistema imune nestes pacientes que, acredita-se, é um dos principais mecanismos indutores da queda do número de linfócitos T DC4⁺ nos pacientes infectados pelo HIV-1 (Giorgi *et al.*, 1999; Moanna *et al.*, 2005). Dentre os produtos translocados podem ser encontrados vários ligantes dos TLRs (Brenchley *et al.*, 2006). A ativação de TLR desencadeia uma complexa cascata de sinalização, induz a síntese de diversas citocinas, e modula a função de DC, macrófagos e linfócitos, células-alvo da infecção pelo HIV-1 (Trinchieri *et al.*, 2007; Revisado por Kawai & Akira, 2010). Assim, altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, ligante do TLR-4, foram encontrados em amostras de plasma de pessoas infectadas com HIV-1 e foram correlacionados com os índices de ativação imune, tanto inata quanto adaptativa (Brenchley *et al.*, 2006). Sabe-se, inclusive, que a replicação do HIV-1 pode ser inibida pelo LPS (Franchin *et al.*, 2000; Verani *et al.*, 1997). Considerando-se que a aumentada permeabilidade intestinal permite a translocação de diversos ligantes de TLRs, dentre eles, ligantes de TLR-2, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da ativação de TLR-2 sobre a infecção pelo HIV-1 *in vitro*, e formular a hipótese de que esta estimulação resultaria na modulação da replicação viral em macrófagos e PBMCs humanos infectados *in vitro* pelo HIV-1.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Analisar o efeito da ativação de TLR-2 sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos (MDM) e PBMCs, e estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na modulação da replicação do HIV-1 por ligantes de TLR-2.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar se a ativação de TLR-2, com os ligantes Zymosan e Pam3CSK4:
 - Modula a replicação viral em macrófagos (MDM) e PBMCs infectados *in vitro* pelo HIV-1;
 - Induz a produção de β -quimiocinas (CCL3, CCL4 e CCL5), moléculas que inibem a entrada do HIV-1, em PBMCs e macrófagos (MDM);
 - Estimula a produção da citocina IL-10, a qual possui propriedades antiretrovirais, em macrófagos (MDM);
 - Altera a expressão dos receptores (DC4) e co-receptores (CCR5 e CXCR4) para o HIV-1, em macrófagos (MDM) e PBMCs;
 - Induz a ativação da proteína quinase R dependente de dsRNA (PKR), em macrófagos (MDM) e PBMCs.

4. Materiais e Métodos

4.1 Reagentes e anticorpos

Os diferentes ligantes de TLRs, como Zymosan, Pam3CSK4 e Poly(I:C) foram adquiridos da InvivoGen (San Diego, CA, USA). O LPS (*E. coli*) foi comprado da SIGMA Aldrich (St. Louis, MO, USA). Zymosan é um componente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, composto principalmente por polisacarídeos (β -glucanas e mananas). Pam3CSK4 (N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteine) (Pam3CysSerLys4) é uma lipoproteína triacilada sintética. Poly(I:C) (*Polyinosinic-polycytidylic acid*) é um análogo sintético de uma dupla fita de RNA (dsRNA). LPS é uma preparação de lipopolissacarídeo obtido a partir de *E.coli*. O conteúdo de endotoxina (LPS) nas amostras dos ligantes de TLR-2 e TLR-3 utilizados neste estudo foi avaliado pelo método LAL (BioWhittaker, Maryland, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as amostras analisadas a concentração de LPS foi menor a 80 pg/mL.

Para os estudos de citometria de fluxo, os anticorpos monoclonais anti-DC4-PE, anti-CCR5-FITC e anti-CXCR4-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), assim como os isotipos-controle anti-IgG2a-FITC e anti-IgG2b-PE (BD, San Jose, CA, USA), foram usados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para o estudo da ativação de PKR, o anticorpo policlonal anti-P-PKR (Thr451) foi adquirido da Millipore (Temecula, CA, USA).

4.2 Isolados virais

Neste estudo foi utilizado o isolado Ba-L, com tropismo para CCR5, que nos foi doado pelo *National Institute of Health* (NIH) AIDS Reagent Program (NIH, Bethesda, MD), para infecções em PBMCs e macrófagos. Este isolado viral foi expandido em culturas de PBMCs, para obtenção de estoques suficientes para a execução do estudo. Também foram utilizados os isolados primários 95BRRJ10 (trópico para CXCR4) e 95BRRJ21 (trópico para CCR5) os quais foram obtidos e caracterizados pelo nosso grupo (Ferraro *et al.*, 2001).

4.3 Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

PBMCs foram obtidas a partir de bolsas de sangue (“*buffy coat*”) de indivíduos soronegativos para o HIV-1, doadas pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os PBMCs foram purificados por centrifugação em gradiente de densidade em Ficoll-hypaque 1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), a 400g, 20°C durante 30 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo corante vital Azul de Trypan, considerando-se própria para uso uma viabilidade acima de 90%. Os PBMCs foram, então, estimulados pelo mitógeno fito-hemaglutinina (2 µg/ml; PHA, Sigma) durante dois a três dias, em RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, HyClone, Logan, UT, USA), penicilina (100 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), numa suspensão de 2.0×10^6 células/ml. As células ativadas foram mantidas em meio de cultura suplementado com 5 u/ml de interleucina-2 recombinante humana (rh-IL-2, Sigma) para os futuros ensaios de infecção viral, a 37°C, 5% de CO₂. PBMCs igualmente estimulados com PHA foram também utilizados para análise da expressão dos receptores do HIV-1 (como descrito abaixo).

4.4 Macrófagos Primários Humanos (MDM)

Para obtenção de macrófagos derivados de monócitos (MDM), PBMCs foram distribuídos em placas de 48 poços (Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA ou JET BIOFIL, Canadá), em meio DMEM-Low glucose (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro humano (Milipore), penicilina (100 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), numa suspensão de 2.0×10^6 células/poço, durante 6 a 7 dias para diferenciação em macrófagos. Posteriormente, as células não-aderentes foram removidas, e meio completo foi readicionado aos macrófagos remanescentes. As culturas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C, 5% de CO₂ para os ensaios de infecção pelo HIV-1. A pureza dos macrófagos foi superior a 94%, como avaliada por citometria de fluxo utilizando-se anticorpo anti-DC68 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) (Figura 1 Anexo).

4.5 *Infecção de PBMCs*

PBMCs previamente estimulados com PHA, e mantidos na presença de IL-2, foram incubados com os isolados de HIV-1 já mencionados (10 ng/mL de antígeno p24) durante 2 a 3 horas em estufa úmida, a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as células foram lavadas para a remoção das partículas virais que não foram internalizadas. As células infectadas foram, então, ressuspensas em meio de cultura completo, cultivadas em placas de 96 poços, a 37°C e 5% CO₂. Sobrenadantes de cultura foram colhidos após sete dias para avaliação da replicação viral, a qual foi medida pela detecção do antígeno p24 do HIV-1 pelo método de ELISA (Zeptomatrix Inc. Buffalo, NY, USA)

4.6 *Infecção de macrófagos*

Macrófagos foram expostos ao isolado Ba-L (10 ng/mL de antígeno p24), durante 16 a 18 horas, a 37°C e a 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS em temperatura ambiente, para remoção de vírus residual, realimentadas com meio de cultura fresco, e mantidas em cultura durante 12-14 dias. Após esse período, para avaliar a replicação do HIV-1, sobrenadantes de cultura foram coletados para avaliação da replicação viral, como descrito acima.

4.7 *Análise do efeito dos ligantes de TLRs sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos*

PBMCs ou macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados com diferentes concentrações de Zymosan ou Pam3CSK4. Também, macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados, de forma independente, com uma concentração única de Poly (I:C) e LPS. Logo após a infecção, tais reagentes foram adicionados à cultura apenas uma vez, e mantidos ao longo de todo o período experimental. Após 7 dias (PBMCs) ou 12-14 dias (macrófagos), a replicação do HIV-1 foi medida nos sobrenadantes de cultura pela detecção do antígeno p24 do HIV-1 pelo método de ELISA, como descrito pelo fabricante.

Em alguns experimentos, PBMCs ou macrófagos foram tratados com os ligantes de TLR-2 durante as 24 horas anteriores à infecção pelo HIV-1. Após esse período, as células foram lavadas para a remoção dos ligantes, e então, infectadas com HIV-1,

como descrito. Em seguida, as células foram lavadas, realimentadas com meio de cultura, e mantidas em cultura durante 12-14 dias. A replicação viral foi avaliada como descrito acima.

4.8 *Dosagem de citocinas e quimiocinas*

Para a dosagem das citocinas IL-10 e das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5, culturas de macrófagos e PBMCS foram tratadas com Zymosan ou Pam3CSK4, e os sobrenadantes foram coletados em diferentes tempos. Após a adição dos ligantes de TLR-2, a concentração das proteínas solúveis nos sobrenadantes foi avaliada pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (R&D System). Nestes estudos o LPS, ligante de TLR-4, foi utilizado como controle positivo para a indução da síntese daqueles fatores solúveis.

4.9 *Análise da expressão dos receptores celulares para o HIV-1*

Esta análise foi realizada por citometria de fluxo. Para tal, macrófagos (cuja obtenção foi realizada em garrafas de cultura de 25 cm², e removidos destas para realizar o ensaio), ou PBMCs (previamente estimulados com PHA) foram tratados com Pam3CSK4 (1 μ g/mL) por 18 horas. As células foram tratadas com o “*Fc blocking reagent*” para evitar a ligação inespecífica dos anticorpos, e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-DC4-PE, anti-CCR5-FITC e anti-CXCR4-APC; de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% e a expressão das moléculas DC4, CCR5 e CXCR4 foi analisada por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD, San Jose, CA,USA) utilizando o programa Summit para a análise dos dados.

4.10 *Análise da ativação da proteína quinase R (PKR)*

Esta análise foi realizada pela técnica de Western blotting. Para tal, macrófagos e PBMCs foram tratados com Pam3CSK4 (1 μ g/mL) em diferentes tempos. A análise da ativação de PKR foi realizada através da detecção de PKR fosforilada (P-PKR). Assim, o extrato celular foi obtido utilizando-se tampão de lise, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método

de BSA (Pierce). As amostras foram aplicadas e separadas por SDS-PAGE e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A seguir, as membranas foram bloqueadas com TBST-Leite desnatado (Molico) (3 a 5%). Após lavagens consecutivas neste tampão, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-P-PKR, e logo após 12 horas, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A seguir, as membranas foram lavadas com TBST 0,1%, e a revelação foi realizada por ensaio de quimioluminescência (ECL).

4.11 Análise da participação das β -quimiocinas e da IL-10 na inibição da replicação do HIV-1 mediado por ligantes de TLR-2

Para avaliar a participação das β -quimiocinas (CCL3, CCL4 e CCL5) no fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 mediado por ligantes de TLR-2, macrófagos foram infectados pelo HIV-1 e mantidos em cultura durante 4-5 dias. Então, estas células foram tratadas simultaneamente com anticorpos anti-CCL3 (2 μ g/mL), -CCL4 (2 μ g/mL), -CCL5 (2 μ g/mL) (Peptotech, NJ, USA) e Pam3CSK4 (1 μ g/mL), ou Zymosan (10 μ g/mL). Após 7-9 dias, a replicação do HIV-1 foi avaliada no sobrenadante de cultura, como já descrito.

Para avaliar a participação da IL-10, repetimos o mesmo procedimento descrito acima, no entanto com adição de anticorpo anti-receptor da IL-10 (ABCam). Em todos estes ensaios foram também utilizados anticorpos inespecíficos (isotipos).

4.12 Ensaio funcional para verificar que o fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado ocorre na ausência de endotoxina

PBMCs infectados pelo HIV-1 foram tratados simultaneamente com Zymosan ou Pam3CSK4 e Polimixina B (Bedford Laboratories). Após 7 dias a replicação do HIV-1 foi medida nos sobrenadantes de cultura pela detecção do antígeno p24 do HIV-1 pelo método de ELISA, como descrito (Figura 2, Anexo).

4.13 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular nas amostras tratadas com os ligantes de TLRs foi feita por dois métodos:

Atividade por reação com XTT: esta é uma análise funcional, na qual os sais de tetrazolium utilizados penetram rapidamente nas células intactas e nas membranas dos componentes celulares ativos (mitocôndria), e são convertidos em derivados de formazam. A quantificação destes derivados nos sobrenadantes celulares é avaliada por espectrofotometria (Scudiero *et al.*, 1988) (Tabela 1, Anexo).

Incorporação do corante azul de Trypan: Este método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (Konopka *et al.*, 1996). Assim, foi realizada a contagem do número de células viáveis.

4.14 Estatística

A coleção de dados foi analisada pelo método do teste *t* de “Student” pareado, e os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.1 (GraphPad software).

5. Resultados

Resultados publicados por outros autores mostram que a ativação de receptores do tipo Toll influencia a replicação do HIV-1 (Kornbluth *et al.*, 1989; Verani *et al.*, 1997; Lawn *et al.*, 2001; Báfica *et al.*, 2003; Trapp *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Em geral, observa-se, *in vitro*, que a replicação do HIV-1 é inibida quando as células infectadas são expostas aos ligantes dos diversos receptores do tipo Toll. No entanto, os estudos específicos relacionados ao TLR-2 são escassos e inconclusivos. Assim, em nosso estudo, resolvemos analisar o efeito da ativação de receptores tipo Toll 2 sobre a replicação viral em PBMCs e macrófagos primários humanos infectados *in vitro* pelo HIV-1, e encontramos que a ativação de TLR-2 promove potente inibição da replicação do HIV-1 nestas células.

5.1 *Diferentes ligantes dos TLRs modulam a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos*

Inicialmente, nós analisamos se a replicação do HIV-1, em nosso sistema experimental, seria afetada por diferentes ligantes de TLR. Já está descrito que a ativação de TLR-3 (Zhou *et al.*, 2010) e TLR-4 inibe a replicação do HIV-1 (Kornbluth *et al.*, 1989; Verani *et al.*, 1997). Coerente com os achados de outros autores, verificamos que os ligantes de TLR-4 (LPS), TLR-3 (Poly I:C) e TLR-2 (Zymosan e Pam3CSK4) inibem fortemente a replicação do HIV-1 (Figura 9).

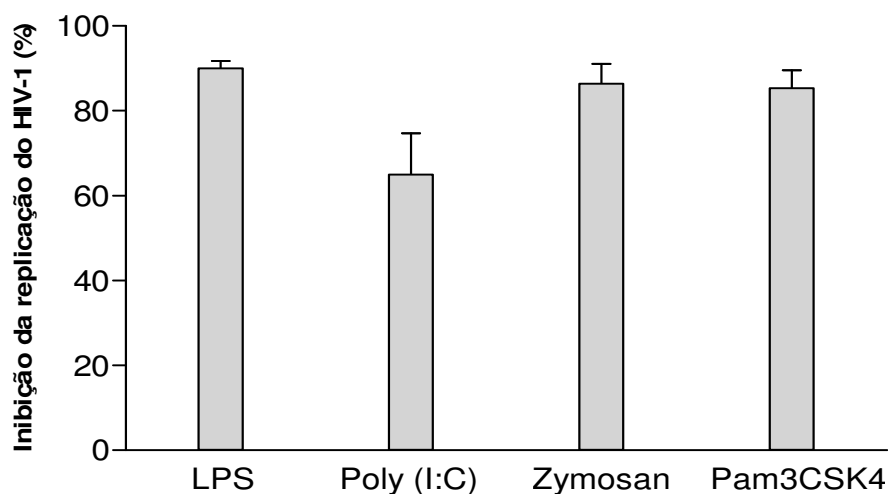


Figura 9. Pam3CSK4, Zymosan, Poly (I:C) e LPS inibem a replicação do HIV-1 *in vitro*. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (isolado trópico para R5) como descrito, e estimulados com ligante de TLR-4 (LPS, 20 ng/mL; n = 3), de TLR-3 (Poly (I:C), 5 µg/mL, n=3) e de TLR-2 (Zymosan, 10 µg/mL, n=6; Pam3CSK4, 1 µg/mL, n=7). A replicação viral foi avaliada 14 dias após a infecção.

A inibição promovida por ambos os ligantes de TLR-2 foi igualmente potente, e comparável ao efeito induzido por LPS. A partir destes estudos iniciais, centralizamos as nossas análises no efeito da ativação de TLR-2 sobre a replicação do HIV-1.

5.2 *Zymosan, ligante de TLR-2, inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos primários*

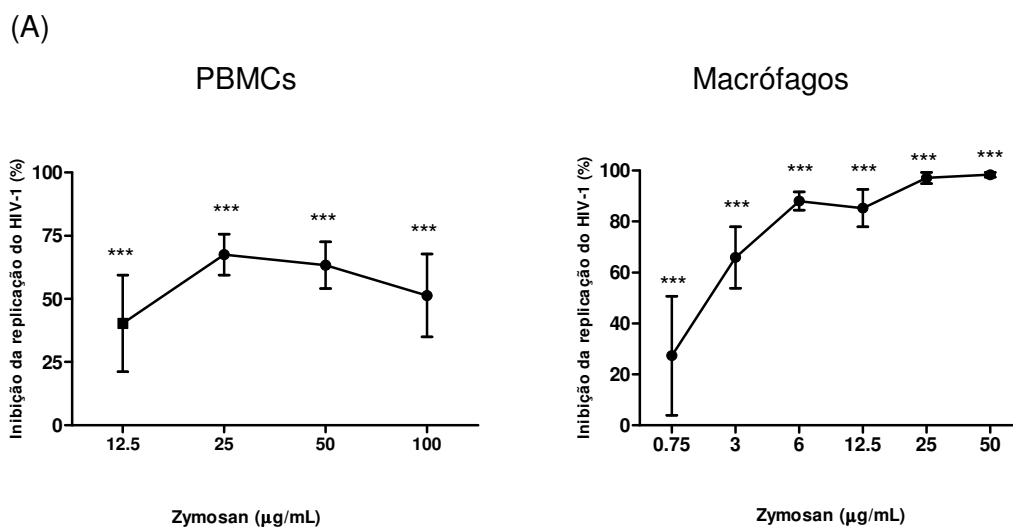
Com o propósito de avaliar de forma mais abrangente o efeito da ativação de TLR-2 sobre a replicação do HIV-1 em nosso modelo, PBMCs e macrófagos primários, infectados *in vitro* pelo HIV-1, foram expostos, imediatamente após a infecção, a diferentes concentrações de Zymosan. Observamos que ocorre uma forte inibição da replicação viral, em concentrações crescentes de Zymosan (Figura 10 A), atingindo 75% e 90% da inibição da replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos, respectivamente.

Tendo em vista que o TLR-2 forma heterodímeros tanto com o TLR-6 como com TLR-1, e que o Zymosan liga-se ao heterodímero TLR-2/6 e a dectina-1, pareceu-nos importante verificar se a ativação do heterodímero TLR-2/1 através do Pam3CSK4 promoveria um efeito semelhante ao do Zymosan.

5.3 Pam3CSK4, ligante de TLR-2, inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos primários

Como pode ser visto na Figura 10 B, Pam3CSK4 inibiu a replicação do HIV-1 em ambas as células, nas diversas concentrações testadas. Em PBMCs a inibição encontrada foi de 60% a 80%, e de 40% a 90% em macrófagos. Este resultado reproduz o efeito mediado por Zymosan, e mostra que a ativação tanto do heterodímero TLR-2/6 como TLR-2/1 resulta no mesmo fenômeno, isto é, a diminuição da replicação do HIV-1. Tendo em vista estes resultados, planejamos realizar ensaios semelhantes utilizando moléculas que se ligam apenas à dectina-1 (Curdlan ou Zymosan depletado), ou apenas ao heterodímero TLR-2/6 (Pam2CSK4), com o intuito de discriminar os receptores envolvidos neste fenômeno.

A representação dos resultados de inibição da replicação do HIV-1 foi realizada através da normalização dos dados em relação ao controle. Esta normalização é adequada porque existe uma grande variação na produção de HIV-1 entre os diferentes doadores durante os ensaios de infecção de células primárias pelo HIV-1. Devido a esta variação, a representação de níveis de p24 absolutos resultaria na perda de significância estatística, e em uma incorreta interpretação dos achados.



(B)

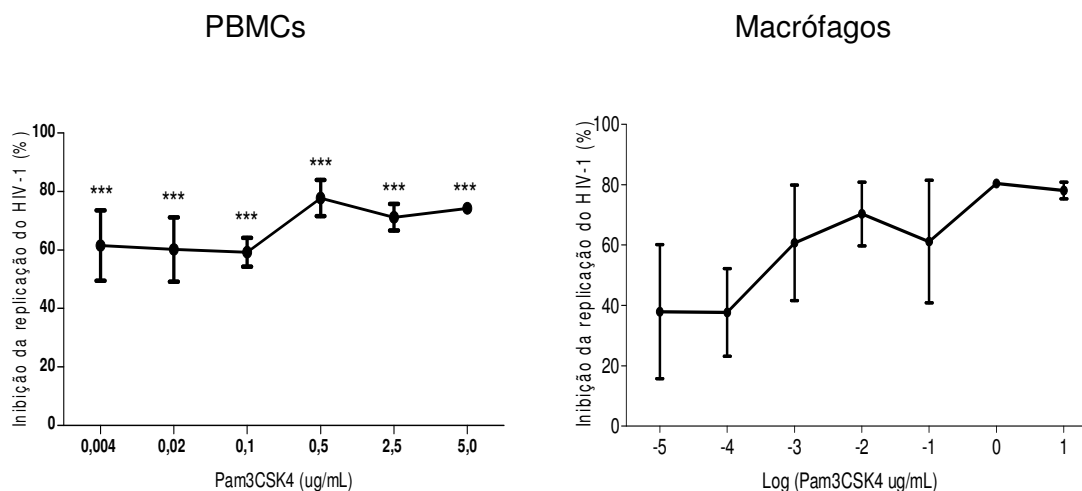


Figura 10. Pam3CSK4 e Zymosan (ligantes de TLR-2) inibem a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos. Estas células foram infectadas com HIV-1 (isolado trópico para R5) e tratadas com diferentes concentrações de Zymosan (A) ou Pam3CSK4 (B). A replicação viral foi medida 7 dias (PBMCs) ou 14 dias (macrófagos) após a infecção. *** $p < 0,001$. Figura A (n=3); Figura B (PBMCs n=3 e macrófagos n=2).

De acordo com os resultados descritos nas Figuras 10A e 10B, e também considerando-se a viabilidade celular, definimos as seguintes concentrações de trabalho para nossos próximos estudos: Zymosan, 25 $\mu\text{g/ml}$ para PBMCs e 10 $\mu\text{g/ml}$ para macrófagos; Pam3CSK4, 1 $\mu\text{g/ml}$ para ambas as células.

5.4 Viabilidade celular

Paralelamente à realização dos ensaios acima descritos, analisamos se as concentrações utilizadas dos respectivos ligantes alteravam a viabilidade celular. Esta análise foi feita por dois métodos, isto é, pela exclusão do corante azul de Trypan e pelo método XTT. A viabilidade celular avaliada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan das culturas celulares tratadas independentemente com todos os ligantes de TLRs, isto é, Pam3CSK4, Zymosan, LPS, Poly (I:C), nas concentrações utilizadas em nosso estudo, foi superior a 95%.

Para avaliar a atividade metabólica das células tratadas com os diferentes ligantes de TLRs foi realizado o método de XTT. Obtivemos um valor de absorbância igual a 0.50 nas culturas sem tratamento, e tal valor foi também encontrado nas culturas

celulares tratadas com os diferentes ligantes de TLRs, nas concentrações utilizadas em nosso estudo, o que demonstra que as células permanecem metabolicamente ativas na presença das concentrações utilizadas dos ligantes de TLRs (Figura 3, Anexo).

5.5 O tratamento prévio à infecção com Zymosan ou Pam3CSK4 inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos

Em seguida, analisamos se o efeito inibitório sobre a infecção pelo HIV-1, como descrito acima, ocorre mesmo quando a célula é tratada com os ligantes de TLR-2 antes da infecção pelo HIV-1. Assim, PBMCs foram tratados com Zymosan por 24 horas e, após exaustiva lavagem para remoção do excesso destes compostos, seguimos nossos protocolos de infecção das células. Verificamos que a inibição observada é equivalente a 75% a 80% em PBMCs e macrófagos, respectivamente (Figura 11).

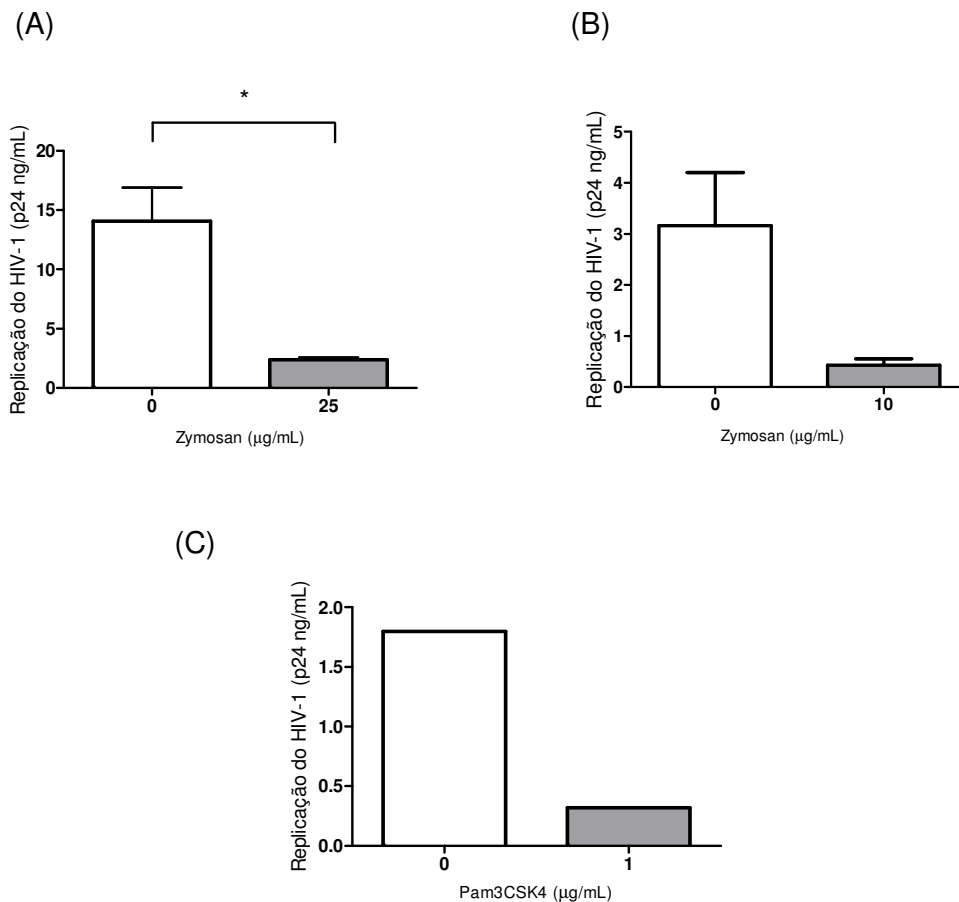


Figura 11. O pré-tratamento com Zymosan ou Pam3CSK4 inibe a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos. PBMCs (A) e macrófagos (B) foram tratados com Zymosan (25 µg/mL para PBMCs e 10 µg/mL para macrófagos) por 24hs; ou macrófagos (C) foram tratados com Pam3CSK4 (1 µg/mL) por 24hs. Em seguida, estas células foram lavadas, e infectadas com HIV-1 (isolado trópico para R5). A replicação viral foi medida 7 dias (PBMCs) ou 14 dias (macrófagos) após a infecção (Figura A: n=4, p<0,05; Figura B: n=2; Figura C: n=1).

5.6 Zymosan inibe a replicação de isolados primários do HIV-1 em PBMCs

Todos os resultados descritos acima foram obtidos utilizando o isolado clonado, trópico para CCR5, Ba-L, que inclusive, já sofreu algumas passagens em células primárias, para sua própria expansão. Assim, achamos importante verificar se a ativação de TLR-2 também resultaria na inibição de isolados primários, obtidos de pacientes, e não clonados. Então, PBMCs infectados com os isolados primários 95BRRJ10 (RJ10, X4-trópico), ou 95BRRJ21 (RJ21, R5-trópico) foram tratados com Zymosan (25 µg/mL) e verificamos que este ligante de TLR-2 inibiu em 75% a 65% a replicação dos isolados RJ10 e RJ21, respectivamente. Este resultado, além de demonstrar a capacidade inibitória do Zymosan sobre vírus primários, indica outra importante consequência da ativação destes receptores, isto é, a inibição da replicação também de isolados trópicos para CXCR4 (Figura 12).

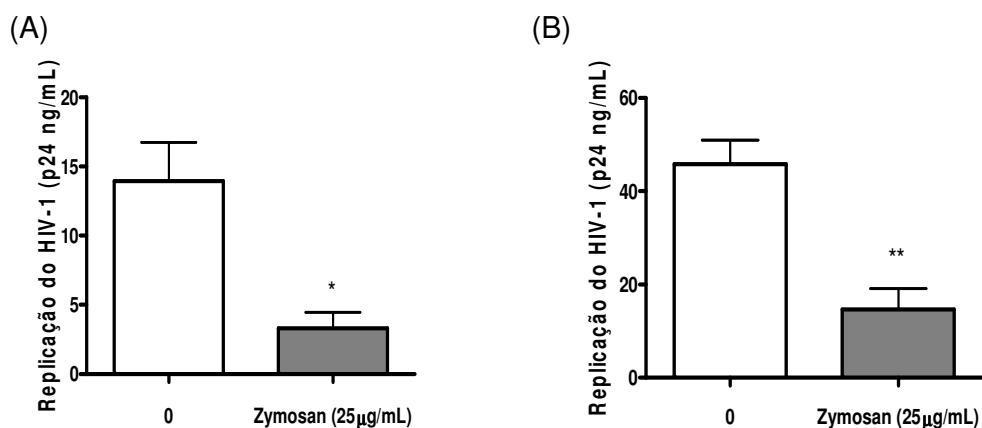
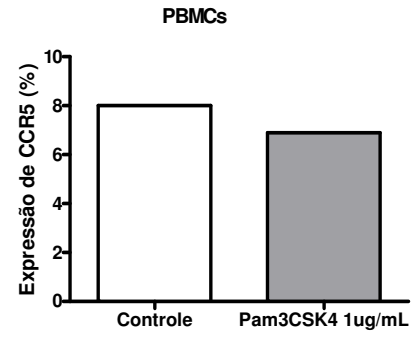
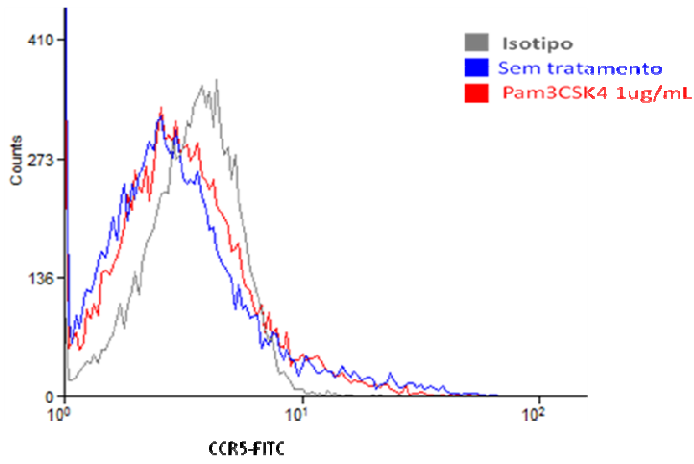


Figura 12. Inibição da replicação viral de isolados primários de HIV-1 pela ativação de TLR-2 por Zymosan. PBMCs estimulados com PHA foram infectados com os isolados primários de HIV-1 RJ10, X4 trópico (A) ou RJ21, R5 trópico (B) e, em seguida, tratados com Zymosan (25µg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 7 dias após infecção e a replicação viral foi avaliada por ELISA para o antígeno viral p24, (*p< 0.05, **p<0.01; n=4).

5.7 *O tratamento com Pam3CSK4 não altera a expressão dos receptores do HIV-1 em PBMCs e macrófagos*

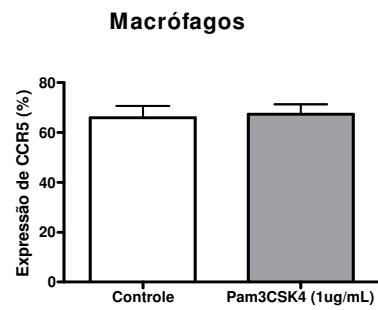
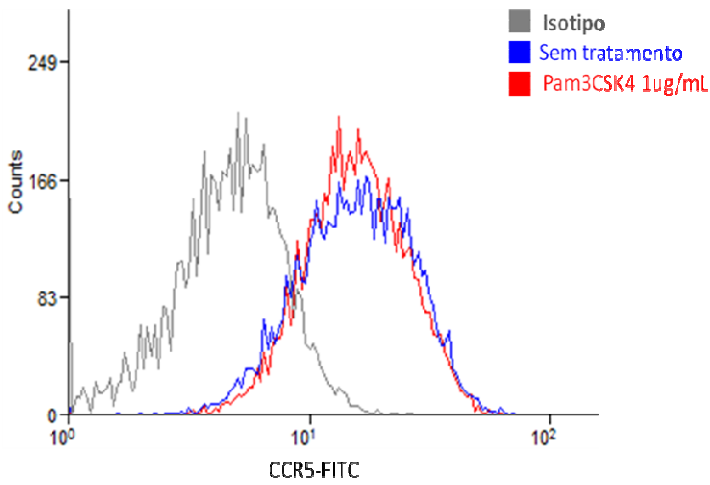
Como descrito acima, o tratamento celular com ligantes de TLR-2 antes da infecção pelo HIV-1 também inibe a replicação viral, sugerindo que, entre outras possibilidades, a ativação de TLR-2 inibe a entrada do vírus na célula-alvo. Portanto, verificamos se a ativação de TLR-2 alteraria a expressão dos receptores celulares para o HIV-1. Não observamos modulação da expressão celular de CCR5, DC4 nem de CXCR4 em macrófagos e PBMCs tratados com Pam3CSK4. Isto é, não foi alterado o número de células positivas para ditos receptores assim como a intensidade média de fluorescência (Figura 13). Esses resultados permitem inferir que o efeito inibitório sobre o HIV-1 mediado pela ativação de TLR-2 não pode ser explicado pela diminuição da expressão destes receptores celulares.

(A)

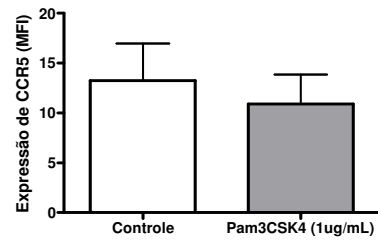


	MFI
Sem tratamento	4,26
Pam3CSK4 (1ug/mL)	4,06

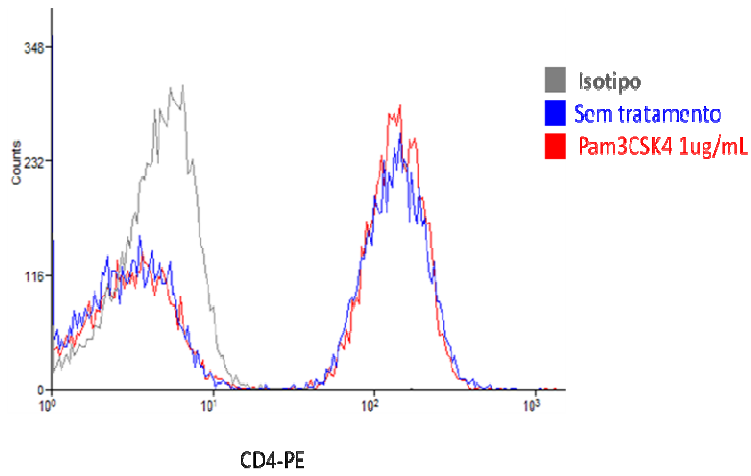
(B)



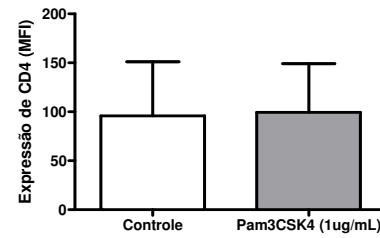
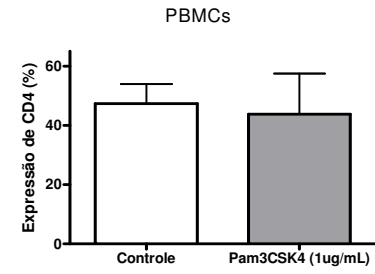
	MFI
Sem tratamento	23,43
Pam3CSK4 (1ug/mL)	19,39



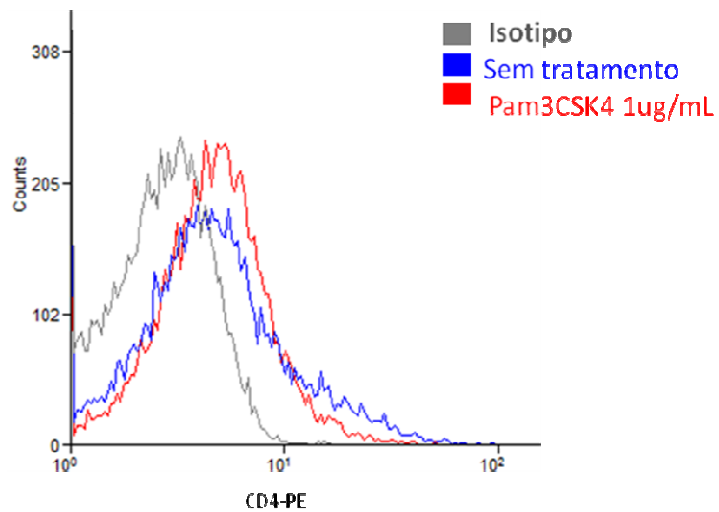
(C)



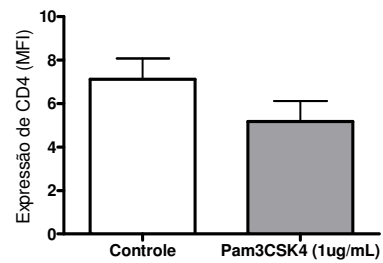
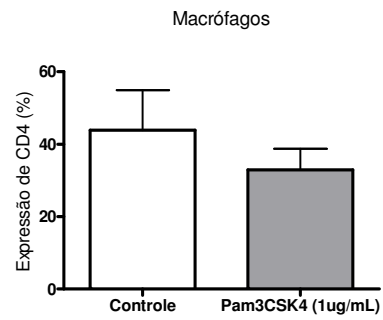
	MFI
Sem tratamento	150,90
Pam3CSK4 (1ug/mL)	149,15



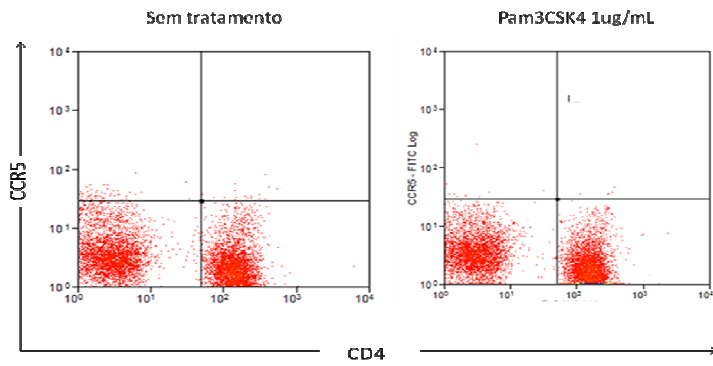
(D)



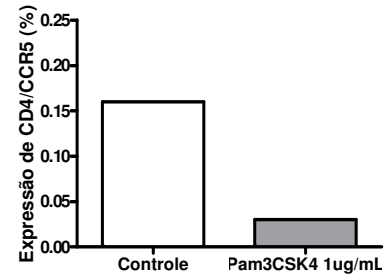
	MFI
Sem tratamento	6,51
Pam3CSK4 (1ug/mL)	5,46



(E)

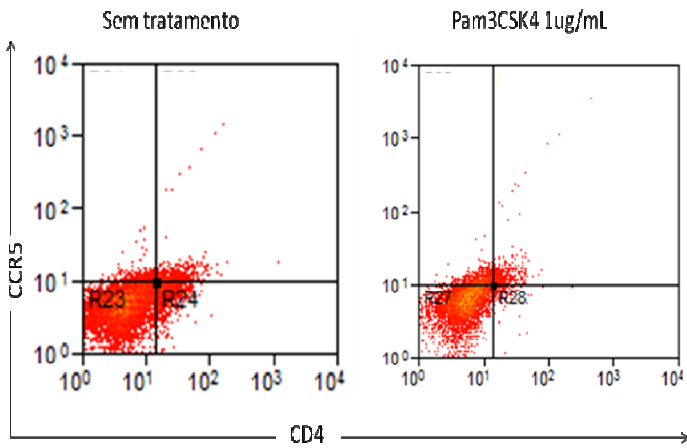


PBMCs

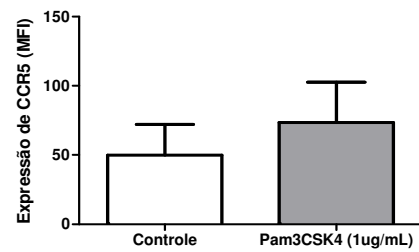
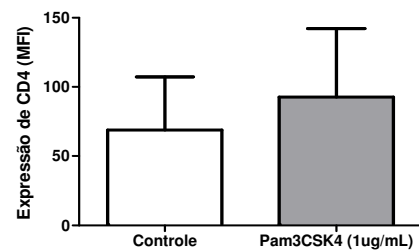
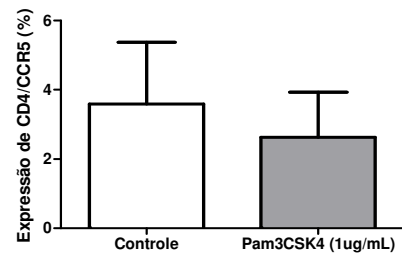


	MFI (DC4;CCR5)
Sem tratamento	222;38
Pam3CSK4 (1ug/mL)	284;38

(F)

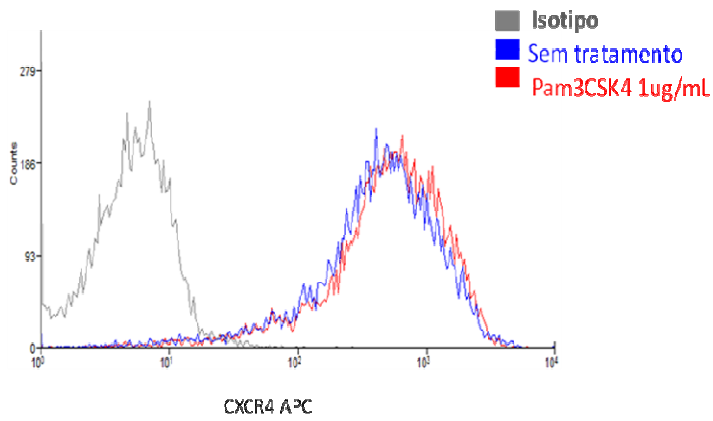


Macrófagos

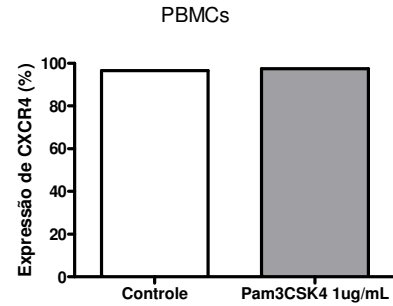


	MFI (DC4;CCR5)
Sem tratamento	37;23
Pam3CSK4 (1ug/mL)	24;29

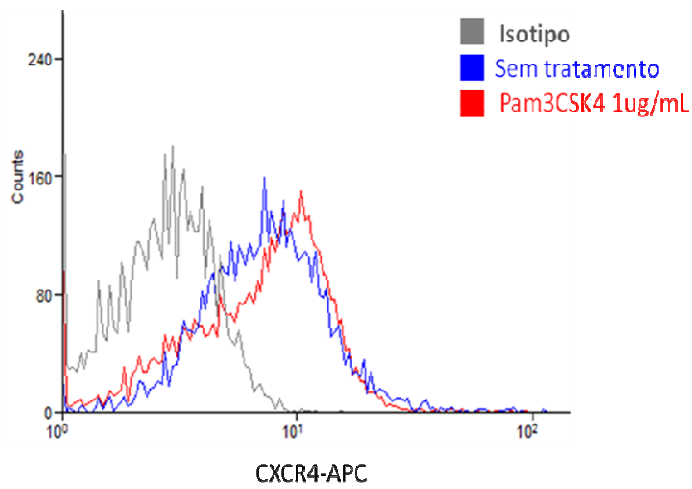
(G)



	MFI
Sem tratamento	661,88
Pam3CSK4 (1ug/mL)	741,59



(H)



	MFI
Sem tratamento	9,24
Pam3CSK4 (1ug/mL)	8,64

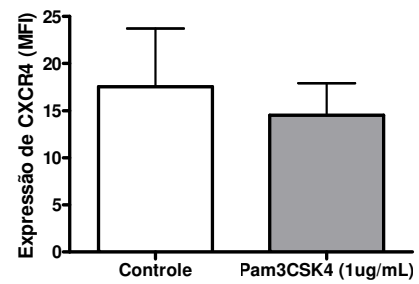
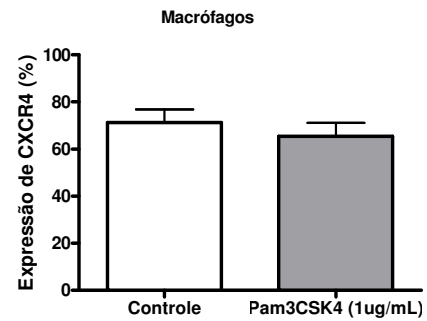
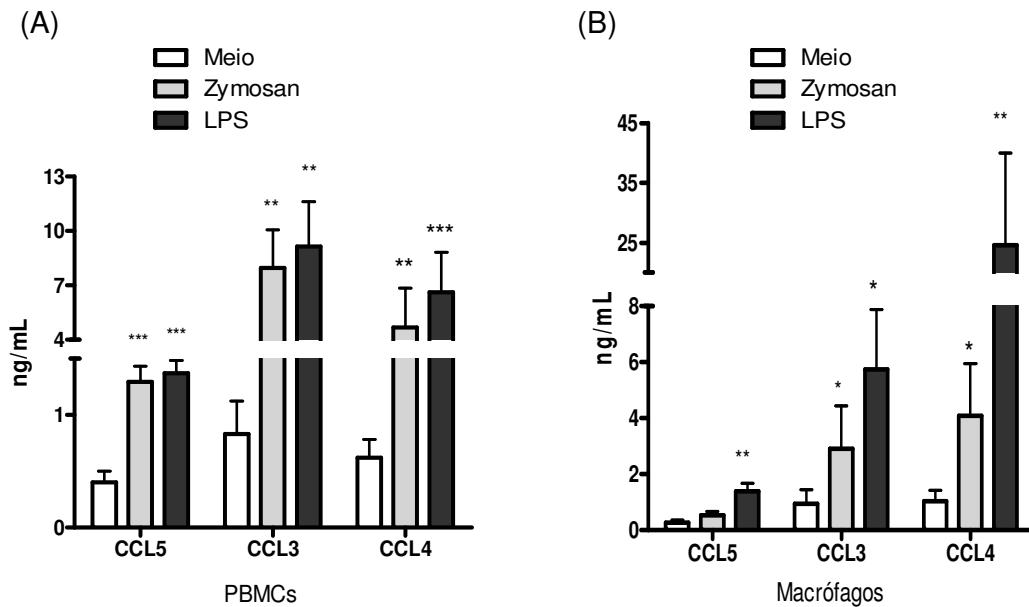


Figura 13. O tratamento celular com Pam3CSK4, ligante de TLR-2, não altera a expressão dos receptores celulares DC4, CCR5 e CXCR4, em PBMCs e macrófagos. Estas células foram tratadas com Pam3CSK4 durante 18 horas, e a análise feita utilizando a técnica de citometria de fluxo (A, E e G n=1; C n=2; B, D, F e H n=4).

5.8 A ativação de TLR-2 induz a produção de β -quimiocinas em PBMCs e macrófagos

Tendo em vista que pré-tratamento com os ligantes de TLR-2 resulta em inibição da infecção pelo HIV-1, analisamos se o Zymosan e o Pam3CSK4 induzem o aumento da síntese de β -quimiocinas, tais como CCL3, CCL4 e CCL5, as quais são capazes de inibir a entrada do HIV-1 nas células-alvo (Cocchi *et al.*, 1995). Com este objetivo, culturas de macrófagos ou PBMCs, não infectadas pelo HIV-1, foram tratadas com Zymosan ou Pam3CSK4, e a síntese daqueles fatores foi avaliada após 24 horas (LPS de *E. coli* foi utilizado como controle positivo; Verani *et al.*, 1997). Como pode ser observado na Figura 14, o Zymosan promove o aumento da produção de CCL3, CCL4 e CCL5 em macrófagos e PBMCs, assim como o Pam3CSK4 estimula a produção de CCL3 e CCL5 em macrófagos. É interessante observar que a indução da produção de β -quimiocinas quando TLR-2 é ativado é quase tão potente quanto a resultante da ativação de TLR-4 pelo LPS. Este resultado sugere que as β -quimiocinas poderiam participar do efeito inibitório sobre a infecção pelo HIV-1 mediado por ligantes de TLR-2.



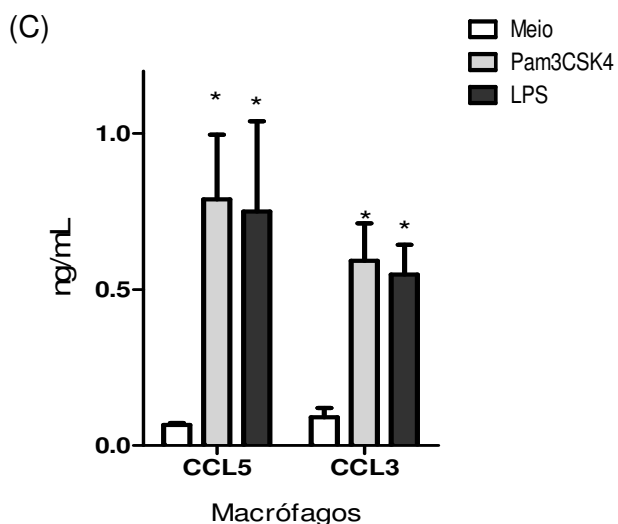
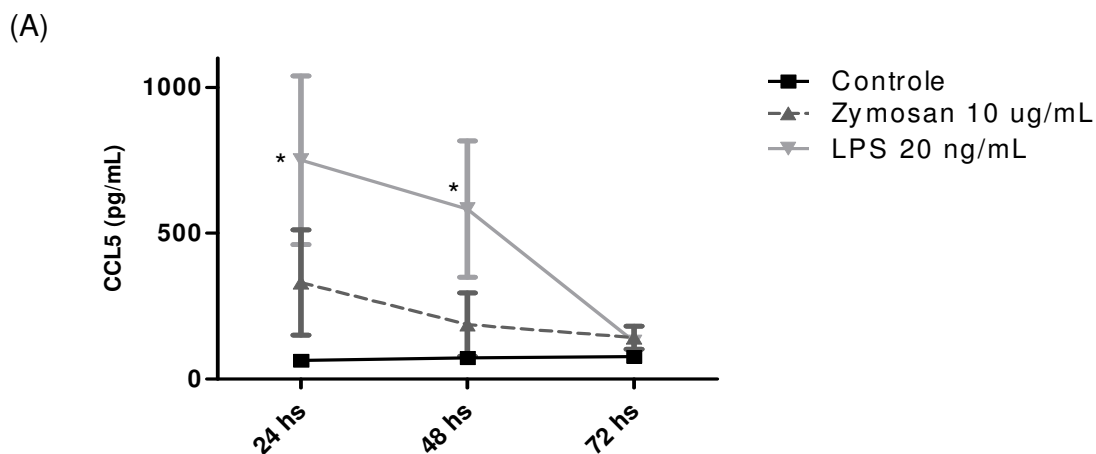
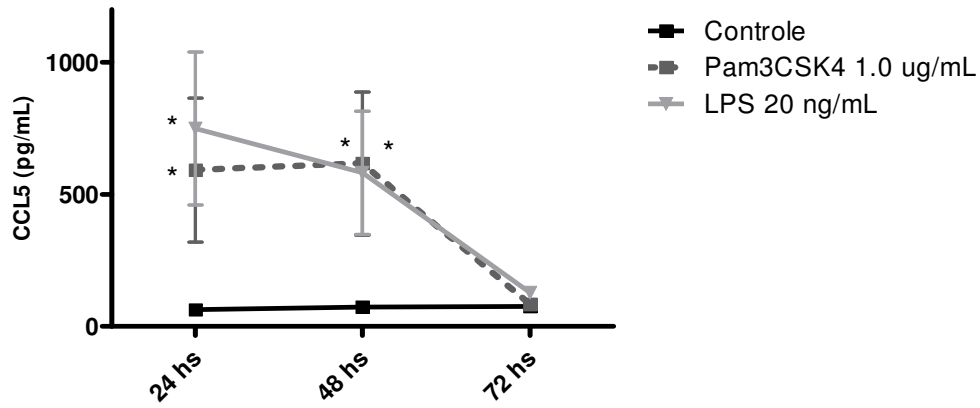


Figura 14. A ativação de TLR-2 mediante o Zymosan e Pam3CSK4 induz a síntese de β -quimiocinas. PBMCs (A) e macrófagos (B) foram tratados com Zymosan (10 μ g/mL para macrófagos e 25 μ g/mL para PBMCs); ou macrófagos (C) foram tratados com Pam3CSK4 (1 μ g/mL) durante 24hs. A produção de CCL3, CCL4 e CCL5 foi analisada pelo método de ELISA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Figura A, $n=7$; B, $n=6$; C, $n=5$).

5.9 A produção de β -quimiocinas por macrófagos é máxima após 24 horas de ativação de TLR-2

Como mostrado na Figura 14, a ativação de TLR-2 induz um aumento na produção de β -quimiocinas. Assim, em seguida, analisamos a cinética de produção destas moléculas, nesta condição. Como pode ser visto na Figura 15, o pico de produção de CCL3 e de CCL5 em macrófagos, nos pontos analisados, ocorreu após 24 horas de estímulo, tanto com Zymosan quanto com Pam3CSK4.





(B)

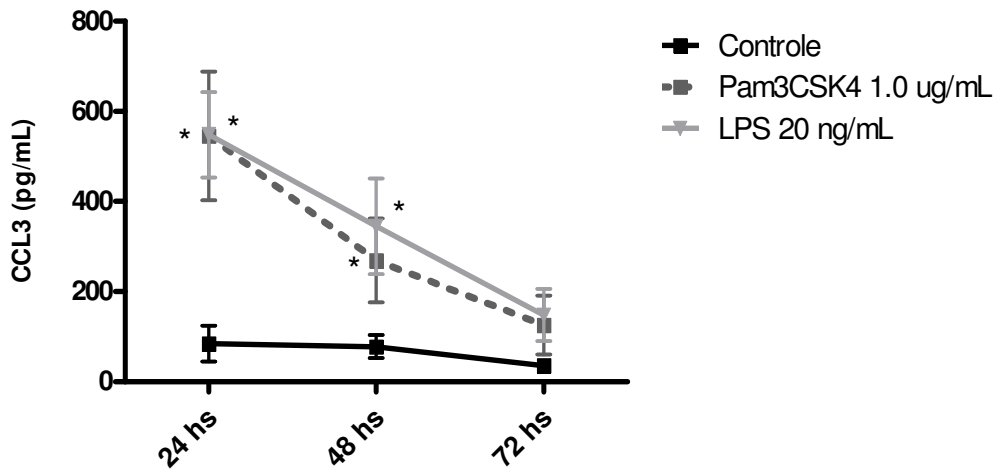
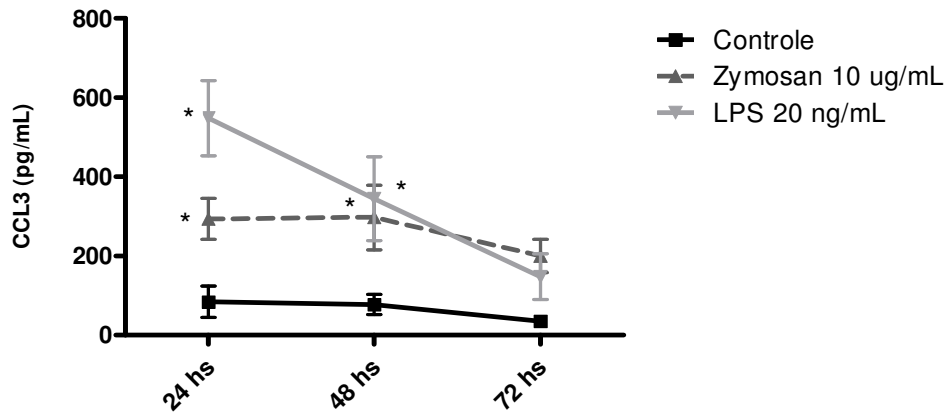


Figura 15. Cinética de produção de β -quimiocinas após ativação de macrófagos por ligantes de TLR-2. Macrófagos foram tratados com Zymosan, Pam3CSK4 ou LPS e os sobrenadantes das culturas foram coletados nos tempos indicados para análise da produção de CCL5 (A) ou CCL3 (B) por ELISA (n=4 para 24 hs e 48 hs; n=2 para 72 hs)

5.10 A ativação de TLR-2 induz a produção de IL-10 em macrófagos

Está descrito na literatura que a ativação de TLR-2 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, e também de IL-10 (Ghosh *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2009), a qual tem a capacidade de inibir a replicação do HIV-1 *in vitro* (Saville *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, 1994). Assim, testamos se, nas concentrações utilizadas em nosso estudo para a inibição da replicação do HIV-1, os ligantes de TLR-2 induzem a produção de IL-10. Culturas de macrófagos foram tratadas com Zymosan ou Pam3CSK4. Nossos resultados indicam que ambos os ligantes de TLR-2 promovem significativo aumento na produção de IL-10 por macrófagos (Figura 16).

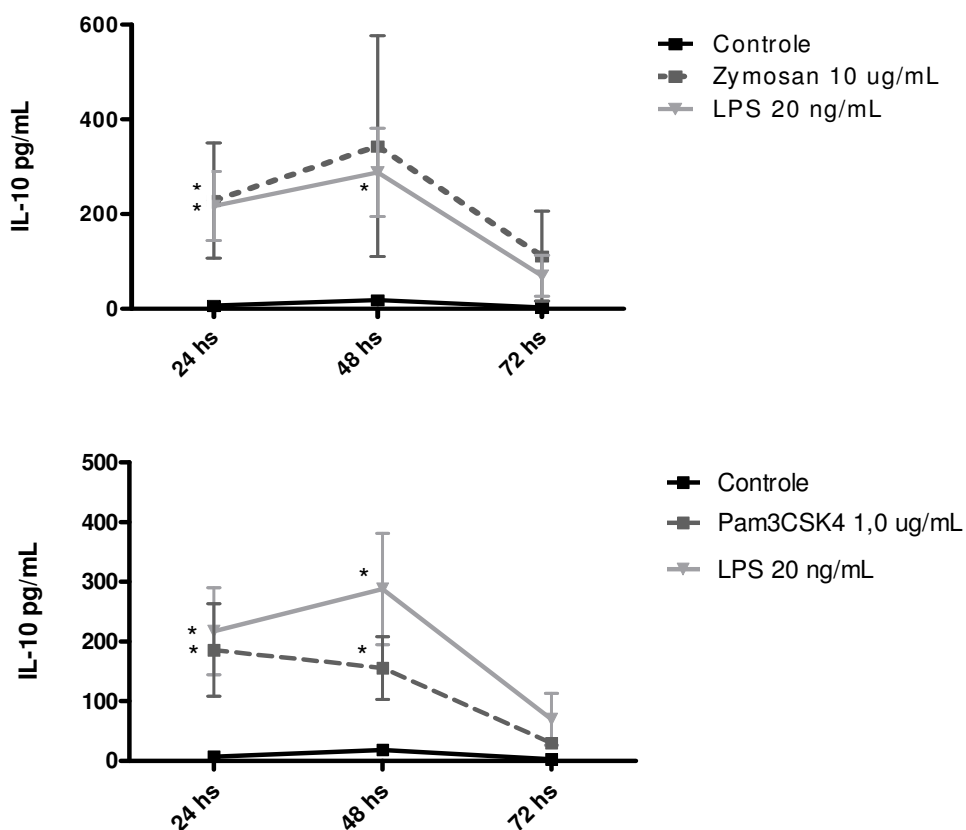


Figura 16. A ativação de TLR-2 induz o aumento na produção de IL-10. Macrófagos foram tratados com Zymosan, Pam3CSK4 ou LPS, e os sobrenadantes das culturas foram coletados nos tempos indicados para análise da produção de IL-10 por ELISA. n=7 (24hs), n=4 (48hs), n=2 (72hs)

5.11 Análise da participação de IL-10 no efeito inibitório sobre HIV-1 mediado pela ativação de TLR-2

Com o objetivo de verificar se IL-10 participa na inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado, macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados simultaneamente com anticorpo anti-receptor de IL-10 e Pam3CSK4 ou Zymosan, 5 dias após a infecção, isto é, quando a infecção já é produtiva. Como pode ser observado na Figura 17, o bloqueio do receptor de IL-10 não foi capaz de reverter a inibição da replicação do HIV-1 mediada por Pam3CSK4 ou Zymosan. Diante destes resultados podemos inferir que o mecanismo pelo qual a ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos não é majoritariamente dependente de IL-10.

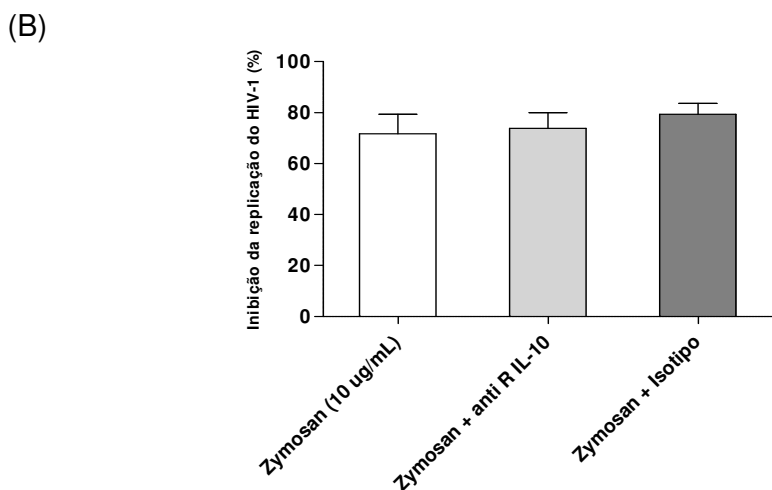
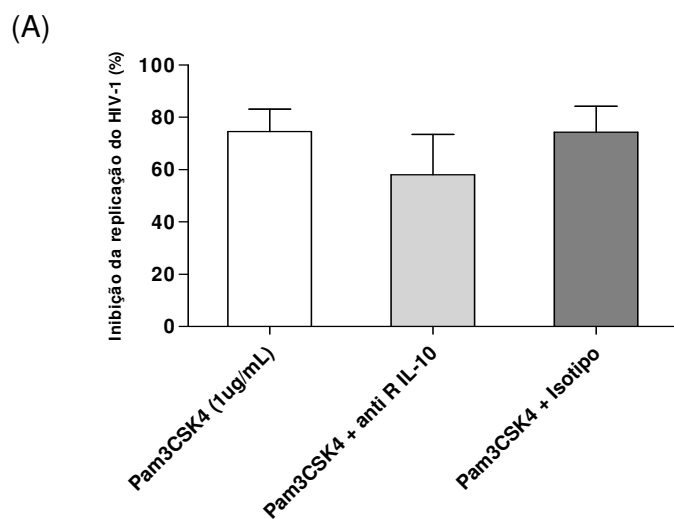
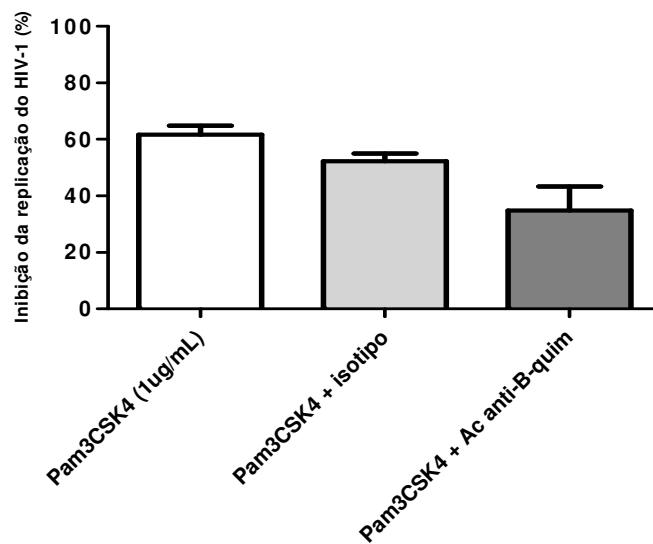


Figura 17. A ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 via independente de IL-10. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (isolado trópico para R5) e após 5 dias tratados com anticorpo anti-receptor de IL-10 (2.5 µg/mL) ou anticorpo inespecífico (isotipo) e simultaneamente tratados com Pam3CSK4 (1 µg/mL) (A) ou Zymosan (10 µg/mL) (B). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 12-14 dias após infecção e a replicação viral foi avaliada por ELISA para o antígeno viral p24 (n=7)

5.12 A inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado é parcialmente dependente das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5

Com o objetivo de verificar se as β -quimiocinas participam na inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado, macrófagos infectados *pe*lo HIV-1 foram tratados simultaneamente com um conjunto de anticorpos anti β -quimiocinas, e Pam3CSK4 ou Zymosan, 5 dias após a infecção, isto é, quando a infecção já é produtiva. Como pode ser observado na Figura 18, a neutralização destas moléculas foi capaz de reverter em aproximadamente 45% a inibição da replicação do HIV-1 mediada por Pam3CSK4 ou Zymosan. Diante destes resultados podemos inferir que o mecanismo pelo qual a ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos é dependente parcialmente das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5.

(A)



(B)

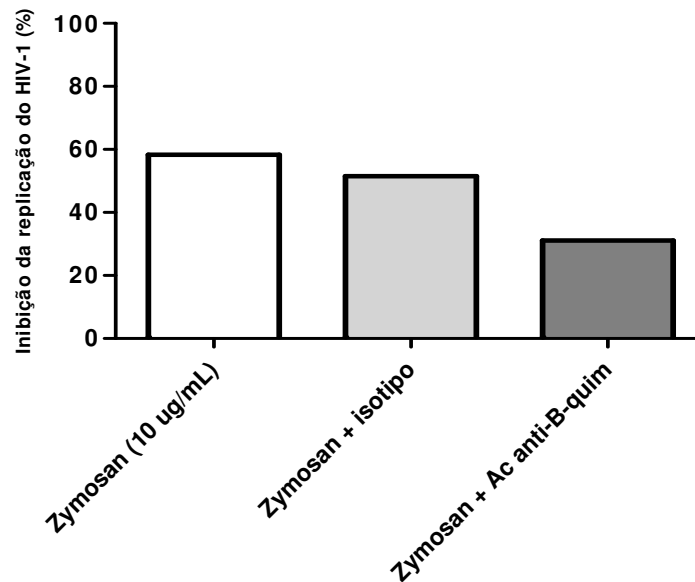


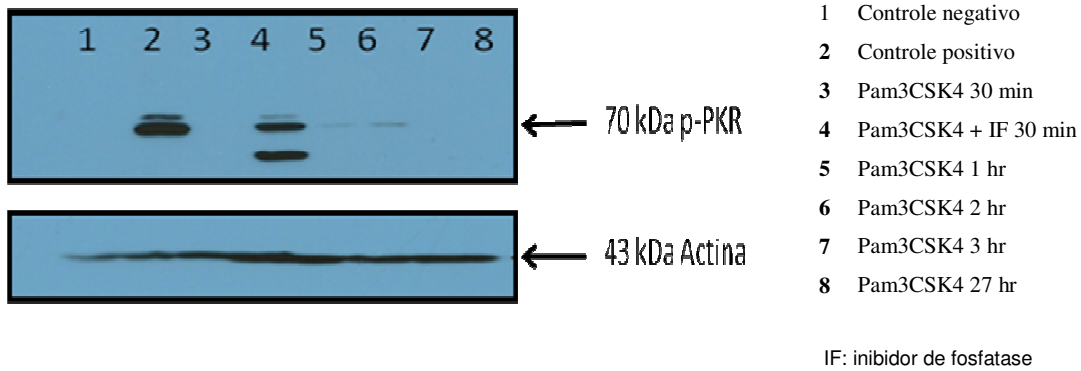
Figura 18. A ativação de TLR-2 inibe a replicação do HIV-1 via dependente das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (isolado trópico para R5) e após 5 dias tratados com anticorpo anti-CCL3, -CCL4 e -CCL5 (2.0 μ g/mL específico para cada β -quimiocina) ou anticorpo inespecífico (isotipo) e simultaneamente tratados com Pam3CSK4 (1 μ g/mL) (A) ou Zymosan (10 μ g/mL) (B). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 12-14 dias após infecção e a replicação viral foi avaliada por ELISA para o antígeno viral p24 (A: n=2; B: n=1).

5.13 A ativação de TLR-2 com Pam3CSK4 induz ativação da proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA (PKR)

A PKR é uma enzima ubiquamente expressa que regula vias de transdução de sinais através do controle transcricional e traducional (Williams, 2001). A PKR é capaz de fosforilar o fator de iniciação traducional eIF2- α , o que previne a reciclagem do mesmo, levando à inibição traducional (Balachandran *et al.*, 2000). Tendo em conta o antes mencionado, e que a replicação de muitos vírus envolve a produção de dsRNA, o qual é reconhecido por PKR, esta tem a qualidade de ser um agente anti-viral (Goh *et al.*, 2000). Além disso, PKR é reconhecida como proteína chave na sinalização celular quando TLR-4 e TLR-3 são ativados (Goh *et al.*, 2000). Maciej Cabanski e colaboradores (2008) descreveram que a ativação de TLR-4 (com LPS) assim como a de TLR-2 (com Pam3CSK4) leva à ativação de PKR *in vitro*, em macrófagos alveolares murinos (Cabanski *et al.*, 2008). Portanto, pareceu-nos interessante avaliar se a mesma

ativação seria detectada em nosso modelo de estudo. Além disso, foi descrito que, tanto a síntese de IL-10 (Lin *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010), como a de CCL5 (Melchjorsen *et al.*, 2001) por diversos estímulos, era dependente de PKR. Como pode ser visto na Figura 19, Pam3CSK4 ativa PKR (ativação detectada pela presença de p-PKR) em macrófagos e PBMCs, em tempos tão precoces como 30 minutos em PBMCs quanto 60 minutos em macrófagos.

(A)



(B)

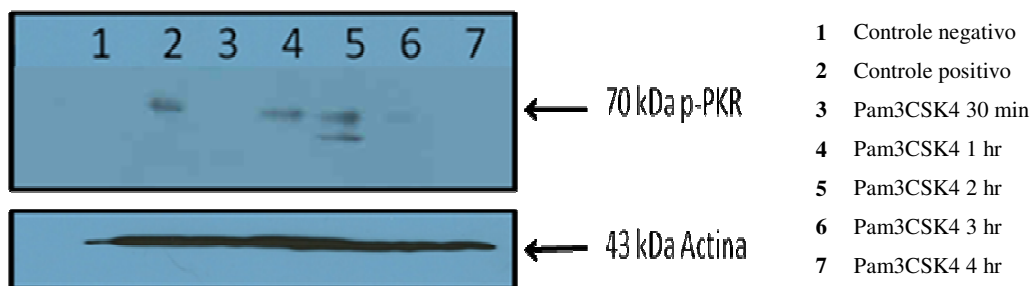


Figura 19. Ativação de TLR-2 com Pam3CSK4 induz ativação da PKR em PBMCs (A) e macrófagos (B). Estas células foram estimuladas com Pam3CSK4 (1 µg/mL) em diferentes tempos, e a ativação de PKR (PKR fosforilada) foi analisada por Western blotting. Controle positivo: Poly (I:C) 5 µg/mL. n=2 (PBMCs), n=1 (macrófagos).

6. Discussão

Há três décadas, desde os relatos dos primeiros casos clínicos em junho de 1981, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vem desafiando a ciência, destacando-se como um dos problemas principais de saúde pública mundial. Os avanços alcançados na compreensão da biologia da infecção pelo HIV-1 auxiliam a esclarecer de forma satisfatória os mecanismos patogênicos associados a esta infecção. Porém, novos estudos ainda são necessários para elucidar a imunopatogênese da infecção pelo HIV-1. Foram descritas várias disfunções do sistema imunológico associadas à infecção pelo HIV-1, e vários mecanismos patogênicos participam na síndrome de imunodeficiência. Como já foi mencionado anteriormente, a infecção pelo HIV-1 é caracterizada por uma ativação crônica do sistema imune, a qual é um dos principais fatores que determinam a progressão da doença (Brenchley *et al.*, 2004). Uma das principais causas da ativação crônica do sistema imune é o fenômeno chamado de translocação microbiana, que é observado nos indivíduos infectados pelo HIV-1 que apresentam aumentada permeabilidade intestinal (Giorgi *et al.* 1999; Moanna *et al.*, 2005). Estes produtos microbianos translocados para a circulação reagem com diversos receptores, como por exemplo, os receptores tipo toll (TLRs) (Brenchley *et al.*, 2004).

Os TLRs têm um papel fundamental na resposta imune inata a patógenos porque têm a capacidade de reconhecer PAMPs de diversos tipos de agentes infecciosos (Akira *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2004). Este reconhecimento ativa cascatas de sinalização nas células que os possuem, como, DC, macrófagos e linfócitos T, todas estas células alvo da infecção pelo HIV-1 (Trinchieri *et al.*, 2007; Revisado por Kawai & Akira, 2010).

Baseado nas evidências de que a ativação de diferentes TLRs é capaz de modular a replicação do HIV-1 *in vitro*, e na carência de trabalhos que exploram a participação do TLR-2 na regulação da replicação do HIV-1, nós decidimos realizar um estudo com o intuito de avaliar se a ativação de TLR-2 em PBMCs e macrófagos teria a capacidade de alterar a replicação do HIV-1 nestas células, e quais fenômenos poderiam estar relacionados com tal possível modulação.

Em nossas primeiras análises, o objetivo foi avaliar o efeito da ativação de diversos tipos de TLRs sobre a replicação viral em macrófagos infectados *in vitro* pelo HIV-1. Assim, encontramos resultados similares aos já descritos na literatura, demonstrando que a ativação de TLR-3 (Trapp *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010) e de TLR-

4 (Verani *et al.*, 1997; Franchin *et al.*, 2000) promove a inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos primários. O achado promissor para nosso trabalho foi que a ativação de TLR-2 também inibe potentemente a replicação do HIV-1, em macrófagos primários, fenômeno ainda não descrito por outros autores (Figura 9). Assim, vimos que, quando macrófagos infectados pelo HIV-1 foram expostos ao Pam3CSK4 ou Zymosan, ambos ligantes de TLR-2, houve uma queda de 90% da replicação do HIV-1 (Figura 9).

Em nossos primeiros estudos, nós vimos que Poly (I:C) (ligante de TLR-3) promove uma inibição da replicação do HIV-1 de 60%; resultados que estão de acordo com os relatados pelo grupo de Zhou (2010), que encontrou uma inibição da replicação do HIV-1 de 90% em macrófagos primários tratados com Poly (I:C). No nosso sistema experimental, obtivemos uma inibição da replicação do HIV-1 de 80% quando macrófagos derivados de monócitos (MDM) infectados *in vitro* foram tratados com LPS (20 ng/mL), ligante de TLR-4. De forma semelhante, Verani e colaboradores (1997), utilizando o mesmo modelo, descreveram uma inibição da replicação do HIV-1 de 70% a 80%, quando trataram MDMs com 10-100 ng/mL de LPS.

Procurando realizar o nosso objetivo específico de avaliar o efeito da ativação de TLR-2 sobre a modulação da replicação do HIV-1 *in vitro*, e tendo em conta o resultado descrito (Figura 9), focalizamos nossos estudos na ativação de TLR-2 em dois tipos celulares, macrófagos e PBMCs primários. Como descrito anteriormente, o TLR-2 tem a capacidade formar heterodímeros com TLR-1 (TLR-2/TLR-1) e TLR-6 (TLR-2/TLR-6), o que lhe confere a capacidade de discriminar entre diferentes componentes microbianos (Jin & Lee, 2008). Assim, julgamos importante diferenciar o efeito da ativação de ambos os heterodímeros sobre a replicação do HIV-1, utilizando ligantes específicos para cada heterodímero. Verificamos que o tratamento de macrófagos, assim como de PBMCs, com concentrações crescentes de Zymosan, ligante do heterodímero TLR-2/TLR-6, inibe a replicação do HIV-1, variando de 40% a 75% (em PBMCs) e de 20% a 90% (em macrófagos). O mesmo fenômeno foi observado quando utilizamos o ligante sintético do heterodímero TLR-2/TLR-1, Pam3CSK4, resultando numa inibição da replicação do HIV-1 que foi desde 60% a 80% (em PBMCs) e de 40% a 80% (em macrófagos). Portanto, podemos inferir que a inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado independe da constituição do heterodímero.

Com o objetivo de tentar alguma aproximação com o que ocorre *in vivo*, avaliamos o efeito da ativação de TLR-2 em PBMCs infectados com isolados primários, isto é, que não tenham sido clonados nem sofrido extensivas passagens *in vitro*. Assim,

utilizamos no nosso estudo os isolados primários 95BRRJ10 e 95BRRJ21, que apresentam tropismos para os co-receptores CXCR4 e CCR5, respectivamente (Ferraro *et al.*, 2001). Estes isolados virais podem ser considerados como semelhantes aos isolados que circulam em pacientes infectados, já que foram submetidos a poucas passagens em cultivo celular. Nós encontramos que a replicação do HIV-1 em PBMCs infectados pelos isolados primários 95BRRJ21 e 95BRRJ10, e tratados com Zymosan diminui 65% a 75% respectivamente. Assim, verificamos que a adição de Zymosan inibe a replicação destes isolados de maneira semelhante à inibição verificada em PBMCs infectados com o isolado Ba-L.

Verificamos em nosso modelo experimental que o tratamento de macrófagos e PBMCs com Zymosan ou Pam3CSK4, antes das células serem infectadas pelo HIV-1, também inibe 80% a 90% a replicação viral. Estes resultados sugerem que a queda da replicação do HIV-1, mediante a ativação de TLR-2, poderia ocorrer através do bloqueio da entrada do vírus na célula-alvo; ou a uma diminuída permissividade celular à entrada do HIV-1. Estas possibilidades seriam decorrentes da síntese de β -quimiocinas ao coreceptor para o HIV-1, ou da diminuição da expressão destes. Vale resaltar que Franchin e colaboradores (2000) observaram o mesmo efeito de inibição da replicação viral, quando TLR-4 é ativado em MDM infectados pelo HIV-1, que foram previamente tratados com LPS.

Com isto, nós formulamos a hipótese de que a queda da replicação do HIV-1 observada quando TLR-2 é ativado é causada pela inibição da entrada do vírus na célula-alvo, mediada por β -quimiocinas produzidas após a ativação de TLR-2. Nossos resultados demonstram que tanto Zymosan como Pam3CSK4 são capazes de induzir a síntese de β -quimiocinas (CCL3, CCL4 e CCL5) em macrófagos e PBMCs (Figura 14). Sabe-se que as β e a α -quimiocina CXCL12 inibem a entrada do HIV-1 como consequência da sua interação com seus receptores naturais (respectivamente, CCR5 e CXCR4), que também funcionam como co-receptores para a entrada do HIV-1 (Cochi *et al.*, 1995, Berger *et al.*, 1999). Heggelund e colaboradores (2004) relataram que a ativação de TLR-2 em PBMCs de pacientes infectados pelo HIV-1, tratados com Pam3CSK4 (utilizado no nosso estudo), induz a síntese das β -quimiocinas CCL3 e CCL5 tanto a nível de mRNA como de proteína (Heggelund *et al.*, 2004). Os nossos resultados, que indicam que há produção de β -quimiocinas quando TLR-2 é ativado, portanto, se assemelham aos de Heggelund assim como com os dados publicados por Verani e colaboradores (1997), que descreveram que a ativação de TLR-4 tem efeito

inibitório sobre a replicação do HIV-1 através da produção de β -quimiocinas, CCL3, CCL4 e CCL5 pelos macrófagos infectados.

As quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 são importantes fatores de restrição da replicação do HIV-1 *in vitro*, porque são capazes de bloquear a entrada de isolados de HIV, trópicos para CCR5, por competir com a ligação da gp120 ao receptor CCR5. Em nosso estudo verificamos que a ativação de TLR-2 induziu um aumento significativo de β -quimiocinas, CCL3, CCL4 e CCL5, em PBMCs e macrófagos. Assim, entendemos importante avaliar se estas moléculas participariam do fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado. Com este objetivo, realizamos experimentos nos quais macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados com Zymosan ou Pam3CSK4, na presença de anticorpos neutralizantes para estas β -quimiocinas. O resultado demonstra que o tratamento com os anticorpos neutralizantes foi capaz de diminuir aproximadamente 45% a capacidade inibitória dos ligantes de TLR-2 sobre a replicação do HIV-1. Assim podemos concluir que as β -quimiocinas, CCL3, CCL4 e CCL5, participam do fenômeno de inibição da replicação quando TLR-2 é ativado por Zymosan ou Pam3CSK4. No entanto, como não houve reversão total do fenômeno, podemos inferir que outros mecanismos anti-HIV-1 podem estar envolvidos. Isto é, numa infecção com vírus trópicos para CCR5, poderíamos sugerir que a IL-10 participa do fenômeno de inibição da replicação viral somado à síntese de β -quimiocinas. Para demonstrar qual é o papel real da IL-10 em este fenômeno, realizaremos ensaios de neutralização simultânea das β -quimiocinas e da IL-10.

Os nossos resultados, de síntese de β -quimiocinas quando TLR-2 é ativado, explicariam a inibição da replicação viral quando são estudados isolados virais trópicos para CCR5. Em nosso estudo, por exemplo, foram utilizados os vírus Ba-L e 95BRRJ21. No entanto, esta não seria a causa de inibição da replicação do HIV-1 quando os cultivos celulares são infectados com vírus com tropismo para CXCR4, como vimos para o isolado primário BRRJ10 (Figura 12). Neste caso, a inibição deste fenótipo ocorreria ou pela produção de CXCL12 (estudo que não realizamos), ou por interferência em pontos mais tardios do ciclo replicativo do HIV-1, como veremos adiante.

Vários autores demonstram que a ativação de TLR-2 utilizando diversos ligantes, isto é Zymosan, HKLM (Heat Killed *Listeria monocytogenes*) e Pam3CSK4 (Ghosh *et al.*, 2006), mmLDL (minimally modified low-density lipoprotein) (Chávez-Sánchez *et al.*, 2010) e β -glicanos particulados como o Glyc101 (Roy *et al.*, 2011) induz a síntese da interleucina 10 (IL-10) em macrófagos humanos. Esta citocina é também conhecida

pelas suas propriedades anti-HIV-1 *in vitro* (Saville *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, 1994; Alfano & Poli, 2005). Em nossos estudos, vimos que a ativação de TLR-2, tanto por Zymosan quanto por Pam3CSK4, induziu um aumento na produção de IL-10, sendo máxima esta produção 48 horas ou 24 a 48 horas após o estímulo, respectivamente. Diante destes resultados, poderíamos imaginar que a inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos ativados por ligantes de TLR-2 poderia ser dependente também da síntese de IL-10. Para confirmar esta hipótese, realizamos experimentos avaliando a inibição da replicação do HIV-1 mediado por Zymosan ou por Pam3CSK4, na presença de anticorpos que bloqueiam o receptor de IL-10. Obtivemos um resultado inesperado, entretanto muito interessante, isto é, o tratamento com ditos anticorpos não foi capaz de reverter o efeito inibitório sobre a replicação viral exercido pelos ligantes de TLR-2. Isto demonstra que a IL-10 teria uma significância mínima sobre o efeito inibitório da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado, já que o dito efeito poderia ser mascarado pelo efeito das β -quimiocinas sobre a inibição da replicação viral, como vimos anteriormente. No entanto, é possível que um efeito mais proeminente da IL-10 seja detectado em ensaios nos quais anticorpos anti- β -quimiocinas e anti-receptor da IL-10 sejam adicionados simultaneamente, ao lado dos ligantes de TLR-2.

Em seguida, verificamos se a ativação de TLR-2 induz diminuição da expressão do receptor CCR5, o que poderia explicar porque o tratamento com ligantes de TLRs prévio à infecção resulta na inibição da replicação do HIV-1. Para isto realizamos a análise da expressão deste receptor utilizando a técnica de citometria de fluxo. Verificamos que o tratamento com Pam3CSK4 não alterou o número de células positivas para este receptor nem a intensidade média de fluorescência, em macrófagos e PBMCs. Este resultado é semelhante ao descrito por Fox e colaboradores (2010), que demonstram que a ativação de macrófagos primários humanos, assim como de linfócitos, com o ligante de TLR-2, LTA, não diminui a expressão de CCR5 (Fox *et al.*, 2011). No entanto, os autores observaram uma diminuição de 30% da expressão de CCR5 em monócitos. Por sua vez, Franchin e colaboradores (2000) demonstraram que a diminuição da expressão de CCR5 é um dos mecanismos pelos quais ocorre a inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos humanos tratados com LPS.

Como já observamos, a proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA (PKR) é um agente antiviral, além de ser reconhecida como proteína chave na sinalização celular quando TLR-4 e TLR-3 são ativados (Goh *et al.*, 2000). Em vista disto, avaliamos se a ativação de TLR-2 mediante Pam3CSK4 levaria a uma ativação de PKR.

Obtivemos uma ativação precoce de PKR, 30 minutos a 60 minutos, em PBMCs e macrófagos tratados com o ligante de TLR-2, respectivamente. Este resultado está de acordo com os dados relatados por Cabanski e colaboradores (2008) que descreveram que a ativação TLR-2, com Pam3CSK4, leva à ativação de PKR em macrófagos alveolares murinos. O resultado obtido no nosso estudo permite visualizar futuros estudos, nos quais se avaliaria a participação de PKR no fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado. Estes ensaios poderiam ser realizados tratando células infectadas pelo HIV-1 com inibidores específicos da ativação de PKR, ou através do silenciamento gênico da proteína. Baseado nos estudos que descreveram que tanto a síntese de IL-10 (Lin *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010) como a síntese de CCL5 (Melchjorsen *et al.*, 2001) por diversos estímulos era dependente de PKR, e tendo em conta que ambas as moléculas têm a capacidade de inibir a replicação do HIV-1, nós pretendemos realizar ensaios de avaliação da síntese de IL-10 e CCL5 utilizando inibidores da ativação de PKR.

A translocação de produtos microbianos, dentre eles vários ligantes de TLRs, induz crônica ativação do sistema imune, a qual promove o aumento da carga viral nos pacientes infectados pelo HIV-1. Considerando este fenômeno, nossos resultados de inibição da replicação do HIV-1, *in vitro*, quando TLR-2 é ativado, poderiam sugerir um possível paradoxo. Nós interpretamos que ambas as situações possam ocorrer simultaneamente, isto é, o efeito sistêmico da ativação do sistema imune provocaria aumento da carga viral, enquanto que no micro-ambiente celular a replicação do HIV-1 seria inibida nas células infectadas ativadas por ligantes de TLRs. No entanto não é possível imaginar, baseado em nossos atuais estudos, qual dos fenômenos prevaleceria em pacientes infectados pelo HIV-1. Ainda assim, poderíamos ousar dizer que, se fosse possível restringir o efeito da ativação de TLR-2 somente às células infectadas pelo HIV-1, o desfecho seria favorável ao paciente.

Finalmente, nós podemos concluir que a ativação do TLR-2 provoca uma potente inibição da replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos, e nossos dados sugerem que as β -quimiocinas podem estar envolvidas neste fenômeno. É possível que a IL-10, assim como a proteína quinase PKR, desempenhem um papel importante na inibição do HIV-1 mediada pela ativação de TLR-2. Nossos achados justificam estudos mais aprofundados sobre os mecanismos subjacentes à atividade anti-retroviral resultante da ativação do TLR-2.

7. Conclusões e Perspectivas

De maneira geral, o conjunto de resultados apresentados nesta dissertação nos permite concluir que:

- A ativação de TLR-2 por Zymosan e Pam3CSK4 resulta na inibição da replicação do isolado clonado Ba-L do HIV-1, tanto em macrófagos como em PBMCs infectados *in vitro*. Este mesmo fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 também foi observado quando PBMCs foram infectados com isolados primários do HIV-1, tanto R5- como X4-trópicos.
- A ativação de TLR-2 por Zymosan e Pam3CSK4 em macrófagos e PBMCs antes das células serem infectadas pelo HIV-1 também inibe a replicação viral.
- A ativação de TLR-2 induz a produção das β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 em macrófagos e PBMCs, moléculas estas que inibem a entrada do HIV-1 na célula-alvo.
- A ativação de TLR-2 induz a produção de IL-10 em macrófagos, citocina com propriedades anti-HIV-1.
- O efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1, quando TLR-2 é ativado, é parcialmente dependente de CCL3, CCL4 e CCL5. A IL-10 tem uma significância aparentemente mínima no fenômeno observado.
- O tratamento de macrófagos com Pam3CSK4 não altera a expressão dos receptores celulares DC4, CCR5 e CXCR4.
- A ativação de TLR-2 com Pam3CSK4 induz a ativação da proteína quinase R dependente de dsRNA (PKR), em macrófagos e PBMCs.

A realização deste estudo permite traçar várias perspectivas, dentre as quais podemos citar:

- Analisar se a ativação de TLR-2 (mediante Zymosan ou Pam3CSK4) modula a síntese ou a atividade da proteína celular APOBEC3G, fator endógeno de restrição à replicação do HIV-1.

- Analisar a participação de PKR no fenômeno inibitório da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado, assim como avaliar a participação de PKR na síntese de IL-10 e β -quimiocinas.
- Investigar se a ativação de TLR-2 induz a síntese da α -quimiocina CXCL12, que bloqueia a entrada do vírus trópicos para CXCR4.
- Realizar ensaios funcionais para demonstrar que a inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado por Zymosan é independente de Dectina-1.

8. Anexo

8.1 Análise da pureza de culturas de macrófagos primários humanos.

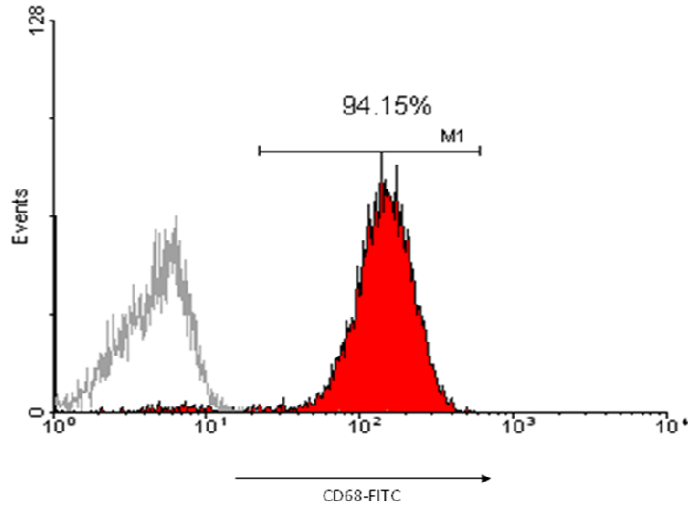


Figura 1. Expressão de DC68 na cultura de macrófagos derivados de monócitos. Se realizou citometria de fluxo utilizando-se anticorpo anti-DC68 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Histograma representativo de 3 experimentos; cinza: anticorpo controle, vermelho: anticorpo anti-DC68-FITC.

8.2 Ensaio funcional para verificar se o fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 quando TLR-2 é ativado ocorre na ausência de endotoxina.

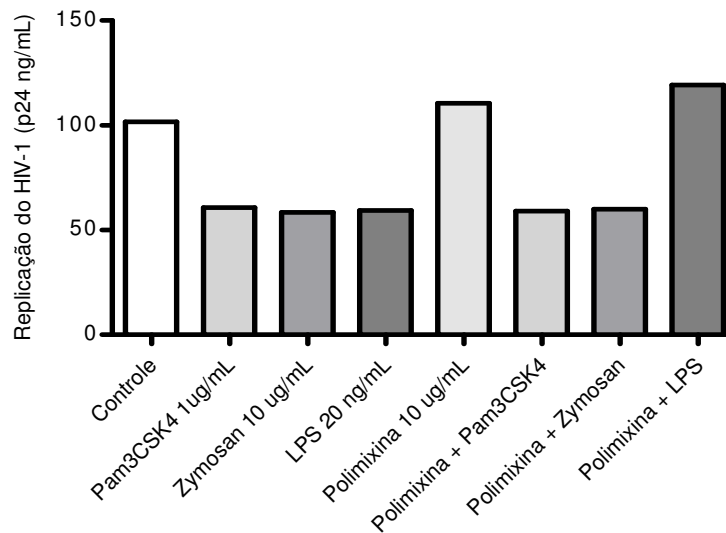


Figura 2. PBMCs infectados pelo HIV-1 foram tratados simultaneamente com Zymosan ou Pam3CSK4 e Polimixina B (10 µg/mL). A replicação viral foi medida 7 dias após a infecção.

8.3 *Análise da atividade metabólica das células tratadas com os diferentes ligantes de TLRs.*

	Absorbância
Sem tratamento	0,50
Zymosan 50 µg/mL	0,49
Pam3CSK4 10 µg/mL	0,50
LPS 40 ng/mL	0,49
Poly (I:C)	0,51

Tabela 1. Quantificação da atividade metabólica de PBMCs tratados com Pam3CSK4, LPS ou Zymosan. Análise realizada através da reação com o composto XTT; valores correspondentes à média de 2 doadores, expressos em absorbância.

9. Referencias Bibliográficas

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

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

Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol*. 2005; 42(2):161-82.

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

Alvarez Y, Municio C, Alonso S, Sánchez Crespo M, Fernández N. The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2. *J Immunol*. 2009; 183(2):1471-9.

Báfica A, Scanga CA, Schito ML, Hieny S, Sher A. Cutting edge: in vivo induction of integrated HIV-1 expression by mycobacteria is critically dependent on Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2003; 171(3):1123-7.

Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR, Barber GN. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*. 2000; 13(1):129-41.

Balestra E, Perno CF, Aquaro S, Panti S, Bertoli A, Piacentini M, Forbici F, D'Arrigo R, Calió R, Garaci E. Macrophages: a crucial reservoir for human immunodeficiency virus in the body. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001; 15(3):272-6.

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

Barry PA, Pratt-Lowe E, Unger RE, Luciw PA. Cellular factors regulate transactivation of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1991; 65:1392-1399.

Benito JM, López M, Martín JC, Lozano S, Martínez P, González-Lahoz J, Soriano V. Differences in cellular activation and apoptosis in HIV-infected patients receiving protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002; 18(18):1379-88.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17:657-700.

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

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific DC8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994; 68(9):6103-10.

Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol.* 1994; 68(9):6006-13.

Bour S, Geleziunas R, Wainberg MA. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DC4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev.* 1995; 59(1):63-93.

Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2008; 3(3):356-61.

Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, Kuruppu J, Yazdani J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol.* 2004; 78(3):1160-8.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12(12):1365-71.

Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. DC4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004; 200(6):749-59.

Brichacek B, Vanpouille C, Kiselyeva Y, Biancotto A, Merbah M, Hirsch I, Lisco A, Grivel JC, Margolis L. Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PLoS One.* 2010; 5(9). pii: e12831.

Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. PKR regulates TLR2/TLR-4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 38(1):26-31.

Cadogan M, Dalglish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8(11):675-84.

Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res.* 2000; 6(3):205-14.

Chang JJ, Altfeld M. Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl 2:S297-301.

Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, Montoya-Díaz E, Tesoro-Cruz E, Madrid-Miller A, Blanco-Favela F. The activation of DC14, TLR-4, and TLR-2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:117.

Clavel F, Brun-Vézinet F, Guétard D, Chamaret S, Laurent A, Rouzioux C, Rey M, Katlama C, Rey F, Champelinaud JL, et al. LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa. *C R Acad Sci III.* 1986; 302(13):485-8.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by DC8+ T cells. *Science.* 1995; 270(5243):1811-5.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986; 232(4751):697.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

Connor, H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J. Virol.* 1992; 66(3):1354–60.

Connor, RI, Sheridan, KE, Ceradini, D, Choe, S. & Landau, N.R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1–infected individuals. *J. Exp. Med.* 1997; 185(4):621–8.

Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara JL. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res.* 2002; 8(6):441-8.

Cremer I, Vieillard V, De Maeyer E: Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of CCL5 production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J Immunol.* 2000, 164:1582-1587.

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The DC4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984; 312(5996):763-7.

Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science.* 1985; 228(4704):1201-4.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort

Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996; 273(5283):1856-62.

Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M. Activation of transcription factor NF- κ B by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1996; 70:4427-4437.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996; 381(6584):661-6.

Ding J, Rapista A, Teleshova N, Mosoyan G, Jarvis GA, Klotman ME, Chang TL. *Neisseria gonorrhoeae* enhances HIV-1 infection of primary resting DC4+ T cells through TLR-2 activation. *J Immunol*. 2010; 184(6):2814-24.

Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, Dalloul A, Boulassel MR, Debré P, Routy JP, Grossman Z, Sékaly RP, Cheynier R. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*. 2004; 21(6):757-68.

Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol*. 2001; 167(11):6663-8.

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(9):1102-13.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into DC4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996; 381(6584):667-73.

Dybul M FA. Immunology of HIV infection in: *Fundamental Immunology*. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers; 2003. p. 1285-318.

Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol*. 2005; 174(7):4407-14.

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

Estes J, Baker JV, Brenchley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, Reilly CS, Beilman GJ, George ME, Douek DC, Haase AT, Schacker TW. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis*. 2008; 198(4):456-64.

Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, Barclay GR, Smedley J, Pung R, Oliveira KM, Hirsch VM, Silvestri G, Douek DC, Miller CJ, Haase AT, Lifson J, Brenchley JM. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8). pii: e1001052.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional DCNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996; 272(5263):872-7.

Ferraro GA, Mello MA, Sutmöller F, Van Weyenbergh J, Shindo N, Galvão-Castro B, Bou-Habib DC; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. Biological characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001; 17(13):1241-7.

Fox JM, Letellier E, Oliphant CJ, Signoret N. TLR-2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes. *Blood.* 2011; 117(6):1851-60.

Franchin G, Zybarth G, Dai WW, Dubrovsky L, Reiling N, Schmidtayerova H, Bukrinsky M, Sherry B. Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5. *J Immunol.* 2000; 164(5):2592-601.

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

Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* 2001 Nov; 26(1-6):13-33.

Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Betts RF, Popovic M. Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *JAMA.* 1986; 256(17):2365-71.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000; 100(5):587-97.

Ghosh TK, Mickelson DJ, Fink J, Solberg JC, Inglefield JR, Hook D, Gupta SK, Gibson S, Alkan SS. Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cell Immunol.* 2006; 243(1):48-57.

Giorgi, J.V., Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(4):859-70.

Goh KC, deVeer MJ, Williams BR. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J.* 2000; 19(16):4292-7.

Gonda Ma. Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *J. Electron Microsc.* 1988; 8(1):17-40.

Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, Estes JD, Paiardini M, Frank I, Silvestri G. Disruption of intestinal DC4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic DC4+ T cell activation in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2010; 185(9):5169-79.

Goujon C, Malim MH. Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. *J Virol.* 2010; 84(18):9254-66.

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

Greenwell-Wild T, Vázquez N, Jin W, Rangel Z, Munson PJ, Wahl SM. Interleukin-27 inhibition of HIV-1 involves an intermediate induction of type I interferon. *Blood.* 2009; 114(9):1864-74.

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. DC4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?. *Nat Med.* 2002; 8(4):319-23.

Guadalupe, M., Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. Severe DC4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2003; 77(21):11708–17.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988; 52(2):269-79.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001; 410(6832):1099-103.

Heggelund L, Damås JK, Yndestad A, Holm AM, Müller F, Lien E, Espevik T, Aukrust P, Frøland SS. Stimulation of toll-like receptor 2 in mononuclear cells from HIV-infected patients induces chemokine responses: possible pathogenic consequences. *Clin Exp Immunol.* 2004; 138(1):116-21.

Hellerstein, M. Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med.* 1999; 5(1): 83–9.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011; 25(5):679-89.

Herbein G, Van Lint C, Lovett JL, Verdin E. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes. *J Virol*. 1998; 72(1):660-70.

Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989; 339(6223):389-92.

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

Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, Hirsch V, Martin MA. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of DC4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(2):658-63.

Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*. 2005; 79(11):7269-72.

Ito M, Baba M, Sato A, Hirabayashi K, Tanabe F, Shigeta S, De Clercq E. Tumor necrosis factor enhances replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158(1):307-12.

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

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

Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis*. 2009; 199(8):1177-85.

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

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

Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD. Dramatic rise in plasma

viremia after DC8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 1999; 189(6):991-8.

Jones NA, Wei X, Flower DR, Wong M, Michor F, et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary DC8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med*. 2004; 200:1243.

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

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

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

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

Killian MS, Johnson C, Teque F, Fujimura S, Levy JA. Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory DC8+ T cells. *J Virol*. 2011; 85(4):1696-705.

Klatzmann DR, MDCougal JS, Maddon PJ. The DC4 molecule and HIV infection. *Immunodeficiency Rev*. 1990; 2(1):43-66.

Konopka K., Pretzer E., Felgner P.L., Duzques S, N. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996; 1312(3):186-96.

Kornbluth RS, Oh PS, Munis JR, Cleveland PH, Richman DD. Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. *J Exp Med*. 1989; 169(3):1137-51.

Kotler DP. HIV infection and the gastrointestinal tract. *AIDS*. 2005; 19(2):107-17.

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

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

Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(4):753-77.

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

Lin SS, Lee DC, Law AH, Fang JW, Chua DT, Lau AS. A role for protein kinase PKR in the mediation of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1-induced IL-6 and IL-10 expression. *Cytokine*. 2010; 50(2):210-9.

Liu Y, McNevin JP, Holte S, McElrath MJ, Mullins JI. Dynamics of viral evolution and CTL responses in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2011; 6(1):e15639.

Luban J. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2007; 81(3):1054-61.

Mackewicz C, Levy JA. DC8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992; 8(6):1039-50.

Maddon PJ, Dalgleish AG, MDCougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R, Malim MH. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364(1517):675-87.

MDConald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*. 2002; 159(3):441-52.

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

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

Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, Teigen N, Streeck H, Stellbrink HJ, Hellman J, van Lunzen J, Altfeld M. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol*. 2007; 81(15):8180-91.

Melchjorsen J, Pedersen FS, Mogensen SC, Paludan SR. Herpes simplex virus selectively induces expression of the CC chemokine RANTES/CCL5 in macrophages through a mechanism dependent on PKR and ICP0. *J Virol*. 2002; 76(6):2780-8.

Moanna A, Dunham R, Paiardini M, Silvestri G. DC4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire?. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2005; 2(1):16-23.

Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. Interleukin -10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J Gen Virol*. 1994; 75 (Pt 12): 3393-400.

Montefiori DC, Mascola JR. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need?. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009; 4(5):347-51.

Moog C, Spenlehauer C, Fleury H, Heshmati F, Saragosti S, Letourneur F, Kirn A, Aubertin AM. Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997; 13(1):19-27.

Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, Robinson J, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol*. 1995; 69(1):101-9.

Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chougnet CA. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol*. 2009; 83(24):12925-33.

Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol*. 2010; 20(2):77-92.

Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4):e1000852.

Neil S, Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(9):569-80.

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

Nixon DE, Landay AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5(6):498-503.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 384(6606):288.

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

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

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

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

Pereira RM, Teixeira KL, Barreto-de-Souza V, Calegari-Silva TC, De-Melo LD, Soares DC, Bou-Habib DC, Silva AM, Saraiva EM, Lopes UG. Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. *FASEB J*. 2010; 24(2):617-26.

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

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

Picker LJ, Maino VC. The DC4(+) T cell response to HIV-1. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12(4):381-6.

Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity*. 1999; 10(4):431-8.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science*. 1998; 282(5396):2085-8.

Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1988; 242(4882):1168-71.

Quesniaux V, Quesniaux C, Fremont M, Jacobs S, Parida D, Nicolle V, Yeremeev F, Bihl F, Erard T, Botha M, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*. 2004; 6(10):946-59.

Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*. 2002; 3(10):718-29.

Regis EG, Barreto-de-Souza V, Morgado MG, Bozza MT, Leng L, Bucala R, Bou-Habib DC. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the plasma of HIV-1-infected patients and in HIV-1-infected cell cultures: a relevant role on viral replication. *Virology*. 2010; 399(1):31-8.

Richman DD, Wrinn T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7):4144-9.

Roport C, Gazzinelli RT. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin Res*. 2004; 10(6):425-30.

Roy S, Dickerson R, Khanna S, Collard E, Gnyawali U, Gordillo GM, Sen CK. Particulate β -glucan induces TNF- α production in wound macrophages via a redox-sensitive NF- κ B-dependent pathway. *Wound Repair Regen*. 2011; 19(3):411-9.

Saksena NK, Wu JQ, Potter SJ, Wilkinson J, Wang B. Human immunodeficiency virus interactions with DC8+ T lymphocytes. *Curr HIV Res*. 2008; 6(1):1-9.

Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, Dandekar S. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J Virol*. 2008; 82(1):538-45.

Saville MW, Taga K, Foli A, Broder S, Tosato G, Yarchoan R. Interleukin-10 suppresses human immunodeficiency virus-1 replication in vitro in cells of the monocyte/macrophage lineage. *Blood*. 1994; 83(12): 3591-9.

Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, Haase AT. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest*. 2002; 110(8):1133-9.

Schuitmaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*. 1992; 66(3):1354-60.

Schwartz S, Felber BK, Fenyö EM, Pavlakis GN. Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T-cell and monocyte cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(18):7200-3.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988; 48(17):4827-33.

Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1999; 73(12):10489-502.

Sharp PM, Hahn BH. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010; 365(1552):2487-94.

Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *Lancet*. 2006; 368(9534):489-504.

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

Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss HD, Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of DC4+ T-helper cells. *Am J Pathol.* 1992; 140(1):15-22.

Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 1990; 9(5):1551-60.

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

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

Streeck H, Jolin JS, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson RC, Kwon DS, Addo MM, Brumme C, Routy JP, Little S, Jessen HK, Kelleher AD, Hecht FM, Sekaly RP, Rosenberg ES, Walker BD, Carrington M, Altfeld M. Human immunodeficiency virus type 1-specific DC8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of DC4+ T cells. *J Virol.* 2009; 83(15):7641-8.

Streeck H, Nixon DF. T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl 2:S302-8.

Swingler S, Morris A, Easton A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta induce specific subunits of NFkB to bind the HIV-1 enhancer: characterisation of transcription factors controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression in neural cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 203(1):623-30.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(10):3516-21.

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

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:335-76.

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

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.* 2000; 12(1):113-7.

Takeuchi, O., Hoshino, K. and Akira, S., TLR-2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 2000; 165: 5392–5396.

Thibault S, Imbeault M, Tardif MR, Tremblay MJ. TLR5 stimulation is sufficient to trigger reactivation of latent HIV-1 provirus in T lymphoid cells and activate virus gene expression in central memory DC4+ T cells. *Virology*. 2009; 389(1-2):20-5.

Tomaras GD, Greenberg ML. DC8+ T cell mediated noncytolytic inhibition of human immunodeficiency virus type I. *Front Biosci*. 2001; 6:D575–98.

Trapp S, Derby NR, Singer R, Shaw A, Williams VG, Turville SG, Bess JW Jr, Lifson JD, Robbiani M. Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *J Virol*. 2009; 83(2):884-95.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(3):179-90.

UNAIDS. AIDS Epidemic Update: World Health Organization (WHO) 2008.

Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res*. 2003; 9(3):176-80.

Verani A, Scarlatti G, Comar M, Tresoldi E, Polo S, Giacca M, Lusso P, Siccardi AG, Vercelli D. C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med*. 1997; 185(5):805-1.

Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, Luster AD. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*. 1998; 391(6670):908-11.

Walker CM, Erickson AL, Hsueh FC, Levy JA. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected DC4+ cells by DC8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol*. 1991; 65(11):5921–7.

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003; 422(6929):307-12.

Williams BR. Signal integration via PKR. Williams BR. *Sci STKE*. 2001; 2001(89):re2.

Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*. 2004; 40(12):861-8.

Zhou S, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, Wang JP, Cerny AM, Chan M, Finberg RW. Role of MyD88 in route-dependent susceptibility to vesicular stomatitis virus infection. *J Immunol*. 2007; 178(8):5173-81.

Zhou Y, Wang X, Liu M, Hu Q, Song L, Ye L, Zhou D, Ho W. A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology*. 2010; 131(1):40-9.