

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

LEONARDO JUDSON GALVÃO DE LIMA

**Infecção por HIV-1 em macrófagos: ativação do
inflamassoma e estratégias de evasão viral da
resposta imune**

Ribeirão Preto
2018

LEONARDO JUDSON GALVÃO DE LIMA

**Infecção por HIV-1 em macrófagos: ativação do
inflamassoma e estratégias de evasão viral da resposta
imune**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de
Teses e Dissertações da USP - BDTD)

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Leonardo Judson Galvão de
Infecção por HIV-1 em macrófagos: ativação do inflamassoma e estratégias de evasão viral da resposta imune. Ribeirão Preto, 2018.
150 p. : il. ; 30cm

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Frantz, Fabiani Gai.

1. Macrófagos. 2. Infecção por HIV-1. 3. Ativação do inflamassoma. 4. Evasão viral.

GALVÃO-LIMA, L. J. Infecção por HIV-1 em macrófagos: ativação do inflamassoma e estratégias de evasão viral da resposta imune. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico a realização deste trabalho à minha esposa, Waleska, aos meus pais, Leonaldo e Magneide, meus irmãos, Júnior e Larissa, além da minha sobrinha, Maria Clara. Ao longo de todos esses anos, o amor e confiança de vocês sempre estiveram ao meu lado e sem eles eu jamais teria conseguido completar esta importante etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, tantas vezes questionado, mas que nunca me abandonou nem deixou de me dar todas as respostas que precisei. Agradeço pelas oportunidades que tive e pelas pessoas que conheci ao longo desta jornada. Ao longo deste período descobri que, mais importante do que achar as respostas certas, a dádiva da vida é construída pelas perguntas que fazemos e pelas pessoas que compartilhamos nosso caminho.

À Dra. Fabiani Frantz, hora fazendo papel de mãe, de grande amiga, de mentora e torcedora incondicional pelo sucesso de seus alunos. Após seis anos sob sua batuta - um ciclo completo de mestrado e doutorado – vejo com outros olhos todos os desafios que superamos ao longo deste período e o quanto amadureci científica e pessoalmente. Sua doçura ao corrigir quando necessário e paciência de ensinar sempre são traços da sua personalidade que pretendo levar comigo para sempre. Muito obrigado pela confiança e amizade de todos estes anos. Espero que nossa colaboração renda muitos frutos!

Aos meus pais, maiores e incondicionais amigos, Leonaldo e Magneide, exemplos de caráter e resiliência. Tudo que vocês construíram e transmitiram com tanto amor jamais será apagado! Agradeço ainda aos meus irmãos, Júnior e Larissa, e Maria Clara (sobrinha-irmã) pelo amor doado durante todos esses anos, por compreender a ausência de tantos anos morando longe e por não me fazer desanimar mesmo quando os maiores desafios se aproximavam. A minha eterna gratidão e amor pela vida que pulsa e irradia de vocês.

À mulher da minha vida, Waleska, minha esposa e melhor amiga, fonte de amor, fibra e perseverança. O brilho que existe em seu olho e sua determinação servem como inspiração para seguir trilhando as mais duras batalhas! Sua disciplina é só mais uma das inúmeras coisas que aprendi com você durante tantos anos de companheirismo! Muito obrigado por seu amor e confiança, por também acreditar na nossa história, mesmo morando tanto tempo longe um do outro. Espero que a nossa vida continue sendo repleta de

felicidades e novos desafios, mas te chamando de esposa e tendo você lado a lado a partir de agora.

À minha família potiguar e paulista por compreenderem a ausência física e nunca deixarem de demonstrar seu amor durante os momentos em que estivemos juntos durante este período. Agradeço especialmente aos meus tios Beto e Galvão, além de suas famílias, que durante todo este tempo foram extensões de mim e da minha casa. Deixo aqui registrado o meu profundo respeito e agradecimento por todo suporte, amizade, carinho e conselhos gentilmente doados durante estes anos.

Agradeço especialmente aos meus queridos avós Inês, Júlio e Luzia (*in memoriam*), agricultores de fibra, de um sertão nordestino tão castigado, e que nunca mediram esforços para educar e cuidar cada um dos seus filhos e netos, inúmeras vezes abdicando de si para não deixar faltar para o outro. Apesar de nunca terem frequentado um banco de faculdade, vocês são exímios professores da vida e, com seu jeito simples, transmitem com amor tudo aquilo que aprenderam durante esta longa jornada.

À minha família em Ribeirão Preto, Hudson, Luiza, André, Jonas, Lucas, Neto, Sumô, Luciano e Antônio por toda amizade, apoio e confiança mútua cultivadas dia a dia durante todos estes anos. Agora teremos mais uma casa espalhada pelo Brasil para ir visitar e relembrar os churrascos, as histórias e todas as vezes que a família de capivaras e o cachorro eram pautas de discussão. Espero possamos realizar os nossos sonhos e nos encontrar muitas vezes pelo mundo, independente dos ventos da vida.

Aos amigos desde os tempos do CEFET e para toda vida: Karime, Luiza, Rafa, Kivhia, Glenn, Talles, Pablo, Nicéforo, Carlos, Fabiana, Ítalo (*in memoriam*), Fernanda, Ceixa e Andrea. Por mais que o tempo passe, parece que foi ontem que tivemos aquela última aula no mini-auditório! Nossa amizade só cresceu durante estes anos! Estarei sempre ao lado de cada um de vocês com a mesma lealdade que vocês estiveram comigo, dando apoio em cada um dos novos desafios da vida.

À Dra. Regina Schirmer Barreto Vianna pelo imenso coração e amizade, além das inúmeras discussões interessantes e generosidade durante esta árdua batalha na ciência.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME) – os novos e os egressos: Milena, Luana, Fabi (Zambs), Priscilla, Verônica, Carol e Ricardo. A experiência de dividir a bancada e as discussões científicas com vocês ao longo desses anos foi profundamente enriquecedora e proveitosa. Agradeço ainda aos nossos co-irmãos e amigos do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP), especialmente à Dra. Lúcia Helena Faccioli, Morgana (Moooooorgs!!!!), Gisele, Karina, Marcela, Cláudia Bittencourt, Márcio, Francisco, Patrícia, Priscila, Ana Paula, Alyne, Carlos e Fabiana. Sem dúvidas, este trabalho não seria o mesmo sem a contribuição de cada um de vocês.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada que ao longo dos anos possibilitaram toda estrutura física e intelectual para o meu amadurecimento científico. Agradeço especialmente à competente secretária do nosso Programa, Ana Cristine, grande amiga de todas as gerações de alunos que já passaram pelo programa. Agradeço ainda aos amigos Morgana Prado, Laís Sacramento, Tiago Medina, Rafael Prado, Lucas Arruda e William Marciel pelas inúmeras discussões científicas (e outras nem tanto) e os momentos de descontração. Agradeço ainda à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por toda estrutura, apoio técnico-científico especializado para realização deste trabalho.

À *Johns Hopkins University – School of Medicine* e aos amigos do *Retrovirus lab* pela extraordinária experiência durante o doutorado sanduíche. Por todas as discussões e desafios científicos, pelo contínuo estímulo à excelência - fazer mais, em menos tempo e melhor do que antes. Agradeço à Dra. Celina Abreu, uma grande amiga que me ensinou muito e com a qual tive o prazer de dividir a bancada e o fluxo durante inúmeras horas, especialmente em dias de necropsia, sempre me forçando a perseguir o seu altíssimo padrão científico. À Shelby Graham por todo apoio técnico e amizade, além das

preciosas dicas para melhorar o meu sotaque! Agradeço especialmente à Dra. Janice Clements e ao Dr. Lúcio Gama, excelentes mentores e valorosos amigos, por me mostrarem uma vez mais que para fazer ciência de vanguarda é preciso trabalhar muito duro, mas que o caminho é muito mais leve quando se tem profissionalismo e cumplicidade no trabalho. Tentarei levar um pouco da competência de cada um de vocês comigo por onde eu for! Espero que possamos nos reencontrar em breve e manter colaborações frutíferas!

Agradeço especialmente ao Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, sempre disponível para grandes discussões científicas e por gentilmente ceder uma parte do seu estoque pessoal de HIV-1_{BaL} para viabilizar a realização inicial deste trabalho. Agradeço ainda à sua equipe no IOC/FIOCRUZ pelo treinamento inicial para expansão e manejo das infecções virais *in vitro*.

Ao Dr. Benedito de Pina Almeida Prado Júnior, ao Hemocentro de Ribeirão Preto e aos doadores de sangue que gentilmente concordaram em colaborar com a realização deste estudo. Ao Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo e Soraya Jabur Badra por disponibilizarem a estrutura do BSL3 do Centro de Pesquisa em Virologia para realização dos experimentos *in vitro*. À professora Dra. Yara Maria Lucisano Valim pelo auxílio durante os experimentos de quimioluminescência. Ao professor Fernando Luís Barroso pelas dicas durante as análises de *docking in silico*. Ao Dr. Valdes Roberto Bollela pelas excelentes discussões científicas, trazendo uma perspectiva clínica do que havíamos encontrado no laboratório, e viabilizar a coleta de amostras clínicas sempre que necessário para execução de diferentes estudos.

Aos membros desta banca de doutorado pela valiosa e pertinente contribuição científica. Certamente os pontos abordados por todos os membros serão de enorme importância para o contínuo aperfeiçoamento deste trabalho.

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

“One thing that I have learned in a long life: that all our Science, measured against reality, is primitive and childlike – and yet it is the most precious thing we have.”

Albert Einstein

“Seja quem você for, seja qualquer posição que você tenha na vida, do nível altíssimo ao mais baixo social, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, porque um dia você chega lá, de alguma maneira você chega lá!”

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

GALVÃO-LIMA, L. J. **Infecção por HIV-1 em macrófagos: ativação do inflamassoma e estratégias de evasão viral da resposta imune.** 2018. 150f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Apesar dos inúmeros avanços no tratamento da infecção por HIV desde o reconhecimento da epidemia, muitas questões permanecem em aberto e dificultam o desenvolvimento de terapias efetivas que auxiliem a manutenção da integridade da resposta imune dos indivíduos infectados. Nesse contexto, ao longo dos anos diversos trabalhos tem evidenciado o papel-chave dos macrófagos durante a patogênese da infecção por HIV-1. Estas células podem atuar como importante reservatório viral ao longo da infecção por HIV, apesar de apresentarem um conjunto complexo de sensores intracelulares, os quais são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou ao perigo. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os mecanismos virais e celulares ativados durante a infecção por HIV-1 que possibilitam a evasão da resposta imune e a persistência da replicação viral em macrófagos humanos. Em paralelo, nós também realizamos a caracterização fenotípica inicial de YSDMs e MDMs, subpopulações de macrófagos ontogenicamente distintos, isoladas do fígado de primatas não-humanos cronicamente infectados por SIV. Nossos resultados indicaram a liberação de IL-1 β e de outras citocinas inflamatórias apenas em MDMs *resting* infectados *in vitro*, mas não em células ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual. De modo semelhante, a expressão gênica e ativação de proteínas não indicou a ativação do inflamassoma em MDMs infectados. Com base nas predições de interação obtidas *in silico* entre proteínas virais e do hospedeiro, a presença de HIV-1 Gag e HIV-1 Vpr seriam fundamentais para o sucesso da infecção viral, uma vez que elas podem interagir com proteínas celulares (como PTGES e BCL2), prejudicando a ativação da resposta imune. Considerando esta hipótese, avaliamos a produção de ROS e liberação de mediadores lipídicos no sobrenadante de MDMs infectados. A análise desses resultados sugere que a infecção por HIV-1 interfere na liberação de ROS de forma distinta entre os estágios de ativação de macrófagos, prejudicando

especialmente a liberação deste mediador por MDMs *resting* ou ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual, mesmo após adição de PMA. De forma semelhante, não foi observado aumento na liberação de *trans*-LTB₄ no sobrenadante de MDMs infectados, mesmo após estímulo com ionóforo de cálcio. A análise por imunofluorescência de MDMs infectados com HIV revelou a ocorrência de alterações estruturais na mitocôndria e maior presença de BIM, proteína relacionada à apoptose pela via mitocondrial. Em conjunto, nossos dados sugerem que proteínas virais (como HIV-1 Gag e Vpr) podem interagir com proteínas do hospedeiro desde as etapas iniciais da infecção viral em macrófagos, prejudicando a ativação do inflamassoma, o desenvolvimento da resposta imune e contribuindo para o sucesso da infecção viral. Adicionalmente, considerando a diferença na ontogênese de macrófagos presentes nos tecidos, sugerimos um novo painel de marcadores que podem ser úteis para diferenciar por citometria de fluxo os MDMs e YSDMs obtidos de primatas não-humanos.

Palavras-chave: Macrófagos. Infecção por HIV-1. Ativação do inflamassoma. Evasão viral.

ABSTRACT

GALVÃO-LIMA, L. J. **HIV-1 infection in macrophages: inflammasome activation and strategies of viral evasion of the immune response.** 2018. 150f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Despite all advances achieved on the treatment of HIV infection since the recognition of the epidemy, several questions remain and impair the development of therapeutic approaches that help maintain the integrity of the immune response of infected patients. In this sense, over the years several papers have evidenced the key-role of macrophages during the HIV-1 pathogenesis. These cells can act as an important viral reservoir during all stages of HIV infection, despite presenting a complex system of intracellular sensors, which are responsible for recognition of pathogens- and danger-associated molecular patterns. In this sense, this study aims to evaluate the viral and cellular mechanisms activated during the HIV-1 infection that allows the viral evasion of the immune response and the persistence of viral replication in human macrophages. In parallel, we also realized the initial phenotypic characterization of YSDMs and MDMs, ontogenically distinct macrophage subpopulations, isolated from the liver of non-human primates chronically infected by SIV. Our results indicated the release of IL-1 β and other inflammatory cytokines only in *in vitro* infected resting MDMs, but not in cultured cells activated in inflammatory or tissue repair-related patterns. Similarly, the analysis of gene expression and protein activation did not indicate the inflammasome activation in infected MDMs. Based on the predictions of interactions obtained *in silico* between viral and host proteins, the presence of HIV-1 Gag and HIV-1 Vpr would be critical to the success of viral infection, since they may interact with cellular proteins (as PTGES and BCL2), impairing the activation of the immune response. Considering this hypothesis, we evaluated the ROS production and release of lipid mediators on the supernatant of infected MDMs. The analysis of these results suggest that the HIV-1 infection interferes in the release of ROS distinctly between the stages of macrophage activation, especially impairing the release of this mediator by resting MDMs or those activated in tissue repair-related pattern, even after addition of PMA. Similarly, we did not observe an increase in trans-LTB₄ released on supernatant from

infected MDMs, even after stimuli with calcium ionophore. The immunofluorescence analysis of infected MDMs revealed the occurrence of structural alterations in mitochondria and increase of BIM, a protein related to apoptosis via the mitochondrial pathway. Taken together, our data suggest that viral proteins (as HIV-1 Gag and Vpr) could interact with host proteins since the early steps of viral infection in macrophages, impairing the inflammasome activation, the development of the immune response and allowing the establishment of viral infection. Additionally, considering the differences in the ontogenesis of macrophages present in tissues, we suggest a new panel of markers that may be useful for differentiating by flow cytometry the MDMs and YSDMs obtained from non-human primates.

Keywords: Macrophages. HIV-1 infection. Inflammasome activation. Viral evasion.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
AIM2	Proteína <i>Absent in melanoma 2</i>
AP-1	Fator de transcrição <i>Activator protein 1</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno
ARV	Antirretrovirais
ASC	Proteína <i>Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain</i>
AUC	Área sob a curva
AZT	Zidovudina
BAK	Proteína <i>Bcl-2 Associated X</i>
BCL-2	Proteína <i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i>
BIM	Proteína <i>Bcl-2-like 11</i>
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CASP-1	Caspase-1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CCR5	Proteína <i>C-C chemokine receptor type 5</i>
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
cMyc	Proteína <i>C-Myelocytomatosis</i>
CPS	Contagem de fótons por segundo
CPSF6	Proteína <i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i>
CXCL10	Proteína <i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CXCR4	Proteína <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DCs	Células dendríticas
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatos

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	Soro fetal bovino
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
Gag	<i>Group-specific antigen</i>
gp41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTLV	Vírus Linfotrófico T Humano
IFI-16	Proteína <i>Gamma-interferon-inducible protein 16</i>
IFN- α 2	Proteína <i>Interferon-α2</i>
IFN- γ	Proteína <i>Interferon-γ</i>
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	Repetições ricas em leucina
MAPK	Proteína <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL-1	Proteína <i>Myeloid Cell Leukemia sequence 1</i>
MCP-1	Proteína <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDMs	Macrófagos derivado de monócitos
MIP-1 α / β	Proteína <i>Macrophage inflammatory protein-1α / β</i>
mL	Mililitros
MMR	Proteína <i>Macrophage mannose receptor</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
NACHT	<i>Neuronal Apoptosis Class 2 Heterokaryon Telomerase-associated protein</i>
Nef	<i>Negative Regulatory Factor</i>
NF- κ B	Proteína <i>Nuclear fator kappa B</i>

ng	Nanogramas
NHP	Primatas não-humanos
NLRP3	Proteína <i>Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing protein 3</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBMCs	Células mononucleares presentes no sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
pg	Picogramas
PMA	<i>Phorbol 12-myristate-13-acetate</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTGES	Enzima <i>Prostaglandin E Synthase</i>
PYD	<i>Pyrin Domain</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa
RANTES	Proteína <i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RI	Resposta Imune
RIG-I	Proteína <i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAMHD1	Proteína <i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
sPLS-DA	<i>Sparse Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i>
SPTBN1	Proteína <i>Spectrin beta, non-erythrocytic 1</i>
STAT1	Proteína <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Proteína <i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	Resposta T <i>helper</i> Tipo 1

Th2	Resposta T <i>helper</i> Tipo 2
TLR	Receptor semelhante a Toll
TNF α	Proteína <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
USP	Universidade de São Paulo
Vpr	<i>Viral Protein R</i>
YSDMs	<i>Yolk Sac-Derived Macrophages</i>

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental realizado durante a execução do estudo no Laboratório de Imunologia e Epigenética da FCFRP – USP.....46
- Figura 2.** Representação esquemática do delineamento experimental realizado durante a execução do estágio de doutorado sanduíche no Retrovirus Lab da Johns Hopkins University – School of Medicine.....47
- Figura 3.** Citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual após infecção *in vitro* por HIV-1.....61
- Figura 4.** Redes de correlação entre citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual antes e após infecção *in vitro* por HIV-1.....62
- Figura 5.** Expressão de genes relacionados à polarização celular, ativação do inflamassoma e restrição da replicação de HIV-1 em macrófagos.....64
- Figura 6.** Expressão de NF- κ B fosforilado, NLRP3 e caspase-1 em MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1.....66
- Figura 7.** Liberação de specks de ASC no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1.....67
- Figura 8.** Validação da estratégia de predição de *docking* molecular a partir da interação entre HIV-1 Gag e APOBEC3G.....69
- Figura 9.** *Docking* molecular das interações entre HIV-1 Gag e proteínas relacionadas à ativação da resposta imune.....70
- Figura 10.** *Docking* molecular das interações entre HIV-1 Vpr e proteínas relacionadas à ativação da resposta imune.....71
- Figura 11.** Liberação de *trans*-LTB4 no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1.....73

Figura 12. Liberação de ROS no sobrenadante de MDMs <i>resting</i> , ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados <i>in vitro</i> por HIV-1.....	75
Figura 13. Avaliação da estrutura mitocondrial e localização intracelular de Caspase-1 em MDMs 24 horas após a infecção por HIV-1.....	79
Figura 14. Avaliação da estrutura mitocondrial e localização intracelular de BIM em MDMs 24 horas após a infecção por HIV-1.....	80
Figura 15. Localização intracelular de HIV-1 p24 e NLRP3 em MDMs 24 horas após a infecção viral.....	81
Figura 16. Expressão diferencial de marcadores na superfície celular em macrófagos presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV.....	86
Figura 17. Avaliação da atividade fagocítica e expressão de SIV p27 por imunofluorescência em MDMs presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV e submetido à terapia antirretroviral.....	87
Figura 18. Expressão de CD4, CD163, CCR5, MMR (CD209), CD14 e HLA-DR na superfície celular de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640.....	135
Figura 19. Alterações morfológicas em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 e suplementados com diferentes fontes de soro.....	136
Figura 20. Citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com FBS.....	137
Figura 21. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com FBS.....	139
Figura 22. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em DMEM suplementados com diferentes fontes de soro.....	141
Figura 23. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em RPMI 1640 suplementados com diferentes fontes de soro.....	142
Figura 24. Quantificação da replicação de HIV-1 em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640.....	144
Figura 25. Expressão de <i>MxA</i> , <i>Tyk2</i> e <i>IFN-α</i> em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de cultura celular RPMI 1640 e DMEM de acordo com as informações apresentadas pelos fabricantes.....	150
--	-----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	24
1.1	Estado da arte da infecção por HIV.....	25
1.2	História natural da infecção por HIV-1 e desenvolvimento da resposta imunológica.....	27
1.3	Infecção por HIV-1 em macrófagos e sua influência nos padrões de ativação celular.....	31
1.4	Influência da infecção por HIV-1 em vias de sinalização e evasão viral da resposta imune em macrófagos.....	34
1.5	Infecção viral em macrófagos ontogenicamente distintos e uso de primatas não-humanos no estudo da patogênese mediada por vírus teciduais e uso de primatas não-humanos no estudo da patogênese mediada por SIV/HIV-1.....	37
2.	OBJETIVO	42
3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
4.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	Casuística.....	49
4.2	Isolamento de leucócitos totais, purificação da fração CD14+ e diferenciação em macrófagos.....	49
4.3	Polarização de macrófagos nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual.....	50
4.4	Infecção <i>in vitro</i> por HIV-1 e avaliação da replicação viral.....	50
4.5	Deteção de citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante.....	51
4.6	Quantificação de mRNA de macrófagos infectados por HIV-1.....	51
4.7	Quantificação da expressão de marcadores presentes na superfície de macrófagos.....	52
4.8	Ensaio de <i>western blot</i> e quantificação de <i>specks</i> de ASC no sobrenadante de macrófagos infectados <i>in vitro</i>	52
4.9	Predição da interação <i>in silico</i> entre proteínas virais e do hospedeiro.....	53
4.10	Ensaio de imunofluorescência para avaliação da atividade do inflamassoma e localização intracelular de outras proteínas durante a infecção por HIV-1 em macrófagos.....	54

4.11	Liberação de mediadores lipídicos no sobrenadante e quantificação por espectrometria de massas.....	54
4.12	Obtenção de YSDMs e MDMs do fígado de macacos Rhesus infectados por SIVmac251.....	55
4.13	Avaliação da capacidade fagocítica e de liberação de ROS de macrófagos infectados.....	55
4.14	Análise dos resultados obtidos.....	56
5.	RESULTADOS	57
	PARTE I – Estratégias de evasão viral da resposta imune em macrófagos a partir da interação entre HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e proteínas celulares...	58
5.1	Macrófagos <i>resting</i> liberam IL-1 β e outras citocinas pro-inflamatórias no sobrenadante após a infecção <i>in vitro</i> por HIV-1.....	59
5.2	Redes de correlações formadas pelas citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs após a infecção por HIV-1.....	59
5.3	Expressão de genes relacionados à polarização celular, ativação do inflamassoma e fatores de restrição da replicação de HIV-1 em macrófagos.....	63
5.4	Quantificação de NF- κ B fosforilado, NLRP3, Caspase-1 e liberação de <i>specks</i> de ASC no sobrenadante de MDMs infectados <i>in vitro</i> por HIV-1.....	65
5.5	Predição <i>in silico</i> de interações entre proteínas virais e do hospedeiro.....	67
5.6	Quantificação de mediadores lipídicos liberados no sobrenadante de MDMs após a infecção <i>in vitro</i> por HIV-1.....	72
5.7	Liberação de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de MDMs após a infecção por HIV-1.....	73
5.8	Alterações na estrutura das mitocôndrias e localização intracelular de NLRP3 e Caspase-1 em MDMs após a infecção por HIV-1.....	76
	PARTE II – Caracterização inicial e avaliação da formação de reservatórios virais em populações de macrófagos presentes nos tecidos de acordo com a sua origem embrionária.....	82

5.9	Expressão diferencial de marcadores na superfície celular em macrófagos derivados do saco vitelínico ou de monócitos presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV.....	83
5.10	Avaliação da capacidade fagocítica e presença de MDMs infectados por SIV no fígado de macaco Rhesus submetido à terapia antirretroviral.....	84
6.	DISCUSSÃO	88
6.1	Estratégias de evasão viral da resposta imune em macrófagos a partir da interação entre HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e proteínas celulares.....	89
6.2	Caracterização inicial e avaliação da formação de reservatórios virais em populações de macrófagos presentes nos tecidos de acordo com a sua origem embrionária.....	96
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
8.	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estado da arte da infecção por HIV

Dentro de poucos anos completaremos a quarta década desde os primeiros relatos pelo CDC da ocorrência de uma doença infecciosa misteriosa, a princípio predominante entre homens gays, usuários de drogas, profissionais do sexo, haitianos e hemofílicos, geralmente acompanhada pelo desenvolvimento de outras infecções graves (Cdc, 1981; 1982). Essa estranha relação entre os subgrupos populacionais afetados e a frequente rápida evolução para o óbito chamou a atenção das autoridades de saúde de todo mundo. O trabalho integrado de diversos grupos de pesquisa resultou poucos anos depois no isolamento primário do novo agente patogênico, sua classificação viral e o subsequente reconhecimento pela Organização Mundial da Saúde (OMS) da relação entre a infecção por HIV e o desenvolvimento da AIDS (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983). No Brasil, o primeiro relato de isolamento do vírus foi feito pelo grupo liderado pelo Dr. Bernardo Galvão em 1987 e representou um importante marco no desenvolvimento científico do país, especialmente em relação à pesquisa HIV/AIDS e outras doenças infecciosas (Galvao-Castro *et al.*, 1987).

A rápida disseminação mundial da epidemia e o alto índice de mortalidade após o diagnóstico de infecção por HIV impulsionaram o desenvolvimento de novas pesquisas para compreensão dos aspectos virais mais elementares. Um exemplo deste fato consiste no sequenciamento completo do genoma viral poucos anos após a sua identificação (Ratner *et al.*, 1985) e que, aliado ao desenvolvimento de estudos complementares sobre a replicação viral, possibilitaram a identificação de enzimas fundamentais para o sucesso da infecção. Estas enzimas – notadamente a transcriptase reversa, a integrase e protease viral – foram rapidamente selecionadas como potenciais alvos terapêuticos e guiaram inicialmente o desenvolvimento de novas drogas capazes de interferir no ciclo natural de replicação viral. Nesse contexto, a Zidovudina (AZT), um medicamento utilizado anteriormente durante a terapia de leucemias causadas por retrovírus, foi a primeira droga liberada para uso terapêutico durante a infecção por HIV em 1987. Nos anos seguintes, outras classes de medicamentos foram desenvolvidas (inibidores de integrase, da protease viral, da transcriptase reversa de modo análogo ou não-análogo dos nucleosídeos,

inibidores de entrada, inibidores de fusão e antagonistas de CCR5) e progressivamente implementadas na terapêutica combinada utilizada nos dias atuais (Greene, 2007). Atualmente, mais de 25 drogas antirretrovirais com ação em diferentes etapas da replicação viral são licenciadas pelo FDA e estão disponíveis para o tratamento em todo mundo (Avert, 2015).

No entanto, embora os inúmeros avanços conquistados desde então, atualmente a infecção por HIV e progressão para AIDS associadas à ocorrência de infecções oportunistas ainda é uma das principais causas de morte relacionada ao desenvolvimento de doenças infecciosas em todo mundo (Getahun *et al.*, 2010; Ansari *et al.*, 2013). Dados mais recentes da OMS estimam que, desde o reconhecimento da epidemia, mais de 76 milhões de pessoas tenham sido infectadas pelo HIV e aproximadamente 35 milhões tenham morrido em decorrência de comorbidades relacionadas ao HIV neste período, especialmente a coinfeção por *Mycobacterium tuberculosis*. Estimativas mais recentes preveem a manutenção da leve queda observada na taxa de incidência anual e ocorrência de 1,8 milhões de novos casos por ano em todo mundo (Who, 2018).

No entanto, os dados epidemiológicos mais recentes do Brasil parecem ir na contramão da tendência mundial observada nos últimos anos. De acordo com o mais recente boletim epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, desde o início da epidemia, foram notificados mais de 882 mil casos AIDS no Brasil, resultando em mais de 316 mil óbitos no período. Durante os últimos anos as taxas de infecção por HIV têm aumentado significativamente, especialmente entre adultos jovens do sexo masculino e subgrupos populacionais de maior vulnerabilidade, resultando na maior concentração da infecção (2,5 homens: 1 mulher). Ainda durante o ano de 2016 foram notificados 37.884 mil casos novos de infecção por HIV em todo país, representando a alarmante ocorrência de, em média, um caso novo notificado a cada 13 minutos (Brasil, 2017).

Filogeneticamente, o HIV é pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus* e pode ser classificado em dois tipos: HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). Eles diferem entre si nas características genéticas e expressão de antígenos virais, mas, embora os indivíduos infectados por HIV-1 apresentem uma progressão para desenvolvimento da AIDS mais acelerada quando

comparados àqueles infectados apenas com HIV-2, ambos os tipos são igualmente capazes de ocasionar falhas na resposta imunológica do hospedeiro, possibilitando a ocorrência de neoplasias e infecções oportunistas (Buonaguro *et al.*, 2007; Human Immunodeficiency Virus (HIV), 2016).

O HIV-1 é geneticamente mais diverso quando comparado ao tipo 2, amplamente disperso em todo mundo e pode ser subdividido em quatro grupos: grupo M (maior ou principal); grupo O (*outlier* ou secundário); grupo N (não-M e não-O) e o grupo P (derivado da expressão '*pending the identification of further human cases*' cunhada no momento da sua descrição inicial). O HIV-1 grupo M pode ser classificado ainda em diferentes subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K) de acordo com a sequência isolada do vírus (Robertson *et al.*, 2000; Plantier *et al.*, 2009; Vallari *et al.*, 2011). Por outro lado, a dispersão geográfica do HIV-2 ainda é limitada e restrita ao continente africano e ao sudeste asiático. Este tipo é geneticamente menos diverso em relação ao tipo 1 e pode ainda ser subdividido em sete diferentes grupos de acordo com a sequência gênica: A, B, C, D, E, F e G (Santiago *et al.*, 2005). Ao longo deste trabalho serão apresentados resultados provenientes do estudo dos mecanismos de patogênese e evasão viral desencadeados por duas cepas distintas do grupo M de HIV-1, especialmente durante a infecção em macrófagos.

1.2 História natural da infecção por HIV-1 e desenvolvimento da resposta imunológica

A infecção pelo vírus ocorre a partir do contato com sangue ou outros fluídos biológicos contaminados e pode ocorrer durante a prática sexual sem uso de preservativos; através do compartilhamento de seringas e outros objetos (comuns durante o uso de drogas injetáveis); durante a gravidez, parto ou aleitamento materno por mãe contaminada (transmissão vertical); ou ainda a partir da transfusão de sangue e outros hemoderivados contaminados. Outras circunstâncias expõem o indivíduo à maior vulnerabilidade e favorecem a transmissão do vírus: abuso de álcool e outras drogas; situações de reclusão ou a prática sexual com múltiplos parceiros (Sleasman e Goodenow, 2003). Em comum, todas as vias de transmissão inicial da infecção resultam na presença de partículas virais na mucosa tecidual ou nos linfonodos drenantes,

possibilitando o contato do vírus com células suscetíveis à infecção do novo hospedeiro.

Dentre as primeiras células infectadas logo após o contato com as partículas virais, os macrófagos teciduais expressam CD4, CCR5 e CXCR4 em sua superfície – correceptores fundamentais para o sucesso da fusão inicial da partícula viral à membrana celular do novo hospedeiro (Freedman *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). Paralelamente ao acúmulo de evidências sobre o papel dos macrófagos durante a patogênese da infecção por HIV-1, ao longo dos últimos anos diversos autores também têm discutido o papel das células dendríticas (DCs) no processo de replicação viral e disseminação da infecção para outros subtipos celulares. Embora ainda encontrem resistência por parte da comunidade científica especializada na área, estudos recentes sugerem que as DCs, apesar de pouco infectadas por HIV-1, podem originar novas partículas virais infecciosas ou ainda auxiliar na disseminação da infecção para outros subtipos celulares através do mecanismo de *trans*-infecção (Geijtenbeek *et al.*, 2000; Wu e Kewalramani, 2006; Tsunetsugu-Yokota e Muhsen, 2013; Manches *et al.*, 2014).

A etapa inicial da infecção por HIV-1 é caracterizada pela rápida expansão da carga viral e ativação sustentada da resposta imune (RI) inata, resultando na migração das células recém-infectadas para os linfonodos drenantes e liberação de citocinas e quimiocinas, ocasionando o recrutamento de novos subtipos celulares para os tecidos, incluindo outros macrófagos e linfócitos T CD4+. Durante a formação de sinapses imunológicas entre APCs (especialmente macrófagos e DCs) e linfócitos T CD4+ *naïve* nos linfonodos, ocorre, simultaneamente, a formação de sinapses infecciosas, as quais possibilitam a disseminação de novas partículas virais recém-formadas para células não-infectadas (McDonald, 2010). Nesse contexto, apesar de iniciar a resposta imune adaptativa contra a infecção recém-instalada, macrófagos teciduais e DCs desempenham um papel crítico ao longo da patogênese viral, uma vez que possibilitam a expansão inicial das partículas virais e a disseminação sistêmica da infecção, afetando diversos subtipos celulares.

Molecularmente, a etapa de fusão da partícula viral à célula do hospedeiro é caracterizada pela interação entre a proteína viral gp120 e o

receptor CD4, presente na superfície celular. Esta interação inicial permite que a proteína viral gp41 também interaja com um segundo receptor celular – CCR5 ou CXCR4. O conjunto destas interações possibilita a fusão da partícula viral e a membrana celular do hospedeiro, resultando na dissociação parcial das proteínas que compõem o nucleocapsídeo e a consequente liberação do material genético e de outras proteínas virais no citoplasma da célula recém-infectada. Estas proteínas, por sua vez, atuarão no processo de transcrição reversa e síntese do cDNA viral, integração no genoma do hospedeiro e produção de novas partículas virais (Engelman e Cherepanov, 2012).

Em conjunto, as etapas de replicação viral resultam na ativação da RI adaptativa (linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+), ocasionando a produção da primeira onda de anticorpos contra o vírus. O período compreendido desde a infecção inicial até a produção dos primeiros anticorpos acompanhada do pico da viremia inicial determina a fase aguda da infecção por HIV-1, ocorrendo durante as primeiras semanas após o contato com o vírus. Ainda durante esta etapa, o indivíduo infectado pode apresentar os primeiros sintomas clínicos – como sudorese noturna, perda de peso sem razão aparente, cansaço, febres recorrentes e diarreia. Outras características marcantes desta etapa são a intensa disseminação viral para outros órgãos e tecidos (como intestinos, baço, fígado e SNC), redução progressiva no número de linfócitos T CD4+ presentes no sangue periférico e na mucosa intestinal, aumento da carga viral detectada no plasma e a ativação sustentada da resposta imune (Moir *et al.*, 2000).

Após este período inicial ocorre o desenvolvimento da fase crônica da infecção, caracterizada muitas vezes pela ausência de sintomas clínicos importantes, a massiva colonização viral dos tecidos e ativação sustentada da resposta imunológica inata e adaptativa. Esta fase pode durar meses ou mesmo vários anos sem que o indivíduo infectado apresente outras coinfeções oportunistas e progrida para o desenvolvimento da síndrome (Crowe e Sonza, 2000).

A terceira fase da infecção por HIV é caracterizada pelo desenvolvimento da AIDS, geralmente cursando com a ocorrência de infecções oportunistas secundárias à intensa imunossupressão causada após a infecção viral. Neste período, os pacientes infectados apresentam intensa imunossupressão e

comprometimento geral do seu quadro, sendo necessário a implementação de diversas terapias de resgate. Comumente, a maior parte dos trabalhos presentes na literatura relacionam o desenvolvimento da AIDS com a redução brusca dos níveis de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, alta carga viral encontrada no plasma e exaustão da resposta adaptativa decorrente da ativação imune sustentada (Barasa, 2011).

Nesse contexto, durante vários anos os trabalhos presentes na literatura sugeriam que a redução do número de linfócitos T CD4+ observada após a infecção por HIV-1 era ocasionada pela ativação de vias apoptóticas, resultando na liberação de poucos sinais pro-inflamatórios e pequeno recrutamento adicional de células para os tecidos. No entanto, recentemente o trabalho de Greene e colaboradores modificou este paradigma ao evidenciar que a morte dos linfócitos T CD4+ nos órgãos linfóides secundários ocorre principalmente por piroptose, e não apoptose, mediada pela intensa ativação da caspase-1 e IFI16 (Doitsh *et al.*, 2014; Monroe *et al.*, 2014). Estes achados são particularmente importantes, uma vez que este tipo de morte celular amplificaria os sinais pro-inflamatórios gerados ao longo de todo curso da infecção e possibilitaria a ativação sustentada da resposta imunológica, apesar da redução progressiva do número de linfócitos T CD4+ presentes no sangue periférico e nos tecidos.

Este desequilíbrio gerado na ativação da resposta imunológica, associado às deficiências funcionais encontradas em macrófagos infectados, afeta diretamente a integridade do epitélio intestinal, permitindo a translocação da microbiota e a consequente liberação de diversos PAMPs na corrente sanguínea (Marchetti *et al.*, 2013). O reconhecimento dessas moléculas por células da imunidade inata induz a ativação sistêmica da resposta imunológica, a partir da liberação de diversas citocinas e quimiocinas no plasma, resultando em um fenômeno conhecido como hiperativação continuada do sistema imune, ou metainflamação, que influencia diretamente o desenvolvimento sustentado do padrão de resposta no perfil Th1 (Kamat *et al.*, 2012). Aliado à intensa translocação da microbiota intestinal, estes eventos contribuem para a ativação crônica do sistema imune, resultando na exaustão e consequente indução do estado de anergia/senescência da resposta imunológica. Este estado de “*inflammaging*” (ativação persistente que resulta na senescência da sistema

imunológico) foi descrito inicialmente a partir da observação da resposta imune de indivíduos infectados na década de 1990 e que, aproximadamente 10 anos após a infecção, apresentavam desordens metabólicas e imunológicas compatíveis ao envelhecimento precoce destes sistemas (Antiretroviral Therapy Cohort, 2008).

1.3 Infecção por HIV-1 em macrófagos e sua influência nos padrões de ativação celular

Ao abordar este tópico é fundamental ter em mente que, classicamente, o termo “macrófagos” é usado para fazer referência de forma direta a um conjunto de células, muitas vezes com morfologia e funções distintas entre os tecidos, mas que em comum apresentam notória capacidade fagocítica de micro-organismos e debrís celulares; produção de citocinas e quimiocinas nos tecidos, fundamentais para o recrutamento e ativação de outros subtipos celulares; assim como capacidade de atuar como células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), fazendo a conexão entre a ativação da resposta imune inata e adaptativa. Além da sua notória importância para o funcionamento do sistema imune, macrófagos são fundamentais também durante o remodelamento tecidual em condições fisiológicas e manutenção da homeostase (Wynn e Vannella, 2016; Bosurgi *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2018).

No entanto, o uso desta nomenclatura genérica parece não definir adequadamente a complexidade dessas células, uma vez que ao longo dos últimos anos diversos trabalhos evidenciaram por mecanismos distintos que estas células não representam uma população homogênea. Alguns macrófagos derivam de populações com capacidade de auto-replicação presentes nos tecidos desde as etapas iniciais da embriogênese (*Yolk Sac-Derived Macrophages* – YSDMs), enquanto outros macrófagos derivam diretamente de monócitos sanguíneos (*Monocyte-Derived Macrophages* – MDMs) (Schulz *et al.*, 2012). Além disso, macrófagos residentes de diferentes órgãos apresentam diferentes perfis de transcrição gênica e expressam marcadores de superfície específicos para cada tecido (Gautier *et al.*, 2012). A maioria dos estudos envolvendo macrófagos e HIV baseiam-se em experimentos realizados com MDMs, o que representa apenas um dos vários fenótipos encontrados em

humanos. No entanto, já foi evidenciado que também os YSDMs presentes em diferentes órgãos podem ser eficientemente infectados por várias cepas de HIV-1 e atuar como importantes reservatórios virais, uma vez que podem proliferar e sobreviver por longos períodos mesmo após a infecção (Hufert *et al.*, 1993; Corboy e Garl, 1997; Kootstra e Schuitemaker, 1998).

No contexto da infecção por HIV-1, o estudo do papel dos macrófagos foi bastante negligenciado ao longo dos anos, a despeito da sua importância para o desenvolvimento da patogênese viral. De fato, a ativação crônica da resposta imune após a infecção e a disseminação viral nos tecidos e órgãos linfóides secundários mediada por estas células contribui diretamente para o sucesso da infecção sistêmica.

No entanto, uma diferença importante relacionada ao mecanismo de patogênese viral observada entre linfócitos T CD4+ e macrófagos consiste na capacidade de resistência celular após a infecção. Enquanto a maioria dos linfócitos T CD4+ é rapidamente encaminhada para morte celular por diversos mecanismos após a infecção, os macrófagos são mais resistentes à indução da morte celular e conseguem sobreviver vários meses após a infecção. Essa característica é fundamental para formação de reservatórios virais e, aliada a capacidade de produção de novas partículas infecciosas, possibilita a disseminação da infecção por longos períodos, a persistência da inflamação sistêmica e o comprometimento de novas células do sistema imune, mesmo durante o uso contínuo de ARVs (Clapham e Mcknight, 2002; Benaroch *et al.*, 2010; Cunningham *et al.*, 2010).

Ao longo dos anos, diversos trabalhos evidenciaram que os monócitos são menos permissivos à infecção quando comparado aos macrófagos (Rich *et al.*, 1992; Sonza *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2006; Alexaki *et al.*, 2008; Collini *et al.*, 2010). No entanto, após tornarem-se infectados nos tecidos e capazes de produzir novas partículas virais, MDMs permanecem viáveis e apresentam diversas deficiências funcionais relacionadas à apresentação de antígenos, produção de citocinas/quimiocinas após o reconhecimento de PAMPs e a menor atividade fagocítica - como observada em macrófagos alveolares (Sperber *et al.*, 1993; Jambo *et al.*, 2014; Galvao-Lima *et al.*, 2017).

Durante a ativação da resposta imunológica inata, os macrófagos são capazes de reconhecer PAMPs/DAMPs e, em conjunto com as citocinas presentes no microambiente celular, resultam na ativação dessas células em padrões distintos: um com perfil mais inflamatório e outro relacionado ao reparo tecidual. O processo de ativação celular ocorre de forma dinâmica e permite a transição entre os padrões, de acordo com as citocinas presentes no microambiente tecidual (Novak e Koh, 2013; Wynn e Vannella, 2016; Bosurgi *et al.*, 2017).

A ativação de macrófagos no padrão inflamatório está relacionada ao reconhecimento de citocinas pró-inflamatórias (como INF- γ e TNF- α) no microambiente celular e induz amplificação da resposta imune, com intensa liberação de citocinas e quimiocinas (como IL-12 e CXCL10), alta capacidade microbicida e de eliminação de células tumorais, relacionando-se diretamente ao desenvolvimento da resposta Th1 observada em linfócitos T CD4+. Por outro lado, a ativação de macrófagos no padrão relacionado ao reparo tecidual diverge em relação ao anterior pelo conjunto de citocinas (como IL-4, IL-13 ou TGF- β) reconhecidas por estas células no microambiente tecidual, resultando na maior liberação de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10 e TGF- β), maior capacidade fagocítica e de apresentação de antígenos. A ativação de macrófagos neste padrão também está relacionada a ativação da resposta imune contra infecções parasitárias, atividade imunorreguladora e desenvolvimento e progressão tumoral, assemelhando-se ao padrão de resposta Th2 observado em linfócitos T CD4+ (Ishii *et al.*, 2009; Lawrence e Natoli, 2011; Sica e Mantovani, 2012).

Nesse contexto, o reconhecimento das citocinas e de PAMPs no microambiente tecidual induz alterações epigenéticas, as quais resultam em perfis distintos de expressão gênica e ativação/silenciamento de importantes vias de sinalização (Kittan *et al.*, 2013). Trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram que macrófagos obtidos de pacientes infectados por HIV-1 virgens de tratamento ou em uso regular da terapia antirretroviral e ativados *in vitro* nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual liberam menores níveis de citocinas e quimiocinas (como IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, RANTES, CXCL10 e MCP-1) após estímulo com agonistas de TLR4 e TLR2/Dectin-1, sugerindo que os MDMs obtidos de pacientes cronicamente infectados

apresentam alterações epigenéticas e funcionais que não são revertidas mesmo durante o uso regular de ARVs (Espindola *et al.*, 2015; Galvao-Lima *et al.*, 2017). Estas alterações também foram observadas nos monócitos obtidos destes pacientes, sugerindo que a infecção por HIV-1 provavelmente ocorre nas células progenitoras presentes na medula óssea e que, possivelmente, estas células infectadas ao migrarem para os tecidos e diferenciarem-se em macrófagos manterão este *imprint* epigenético, o qual não é revertido pelos protocolos terapêuticos atuais (Espindola *et al.*, 2018). Dessa forma, com base nestes achados e outros publicados na literatura, consideramos a ocorrência de alterações no processo fisiológico de sinalização celular em macrófagos de pacientes infectados por HIV-1 como um evento crítico para o sucesso da replicação viral, evasão da resposta imune e o estabelecimento da infecção sistêmica (Kogan e Rappaport, 2011; Koppensteiner *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014).

1.4 Influência da infecção por HIV-1 em vias de sinalização e evasão viral da resposta imune em macrófagos

Diferentes autores sugeriram que as proteínas virais presentes nas etapas iniciais da infecção poderiam interferir também na ativação de vias de sinalização durante a infecção em macrófagos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de evasão viral da resposta imune e o estabelecimento da infecção crônica (Gougeon, 2003; Diget *et al.*, 2013; Mashiba e Collins, 2013).

Nesse sentido, Chihara e colaboradores demonstraram *in vitro* que macrófagos ativado no padrão relacionado ao reparo tecidual, ao reconhecerem proteínas solúveis de HIV-1 (Tat, Vpr, gp120 e Nef), ativam as vias dependentes de MAPK, AP-1 e NF-κB e são reprogramados para o padrão inflamatório de ativação (Herbein *et al.*, 2010; Chihara *et al.*, 2012), enquanto o reconhecimento de proteínas virais por macrófagos não polarizados induz a liberação de estímulos pro-inflamatórios dependentes da ativação de NF-κB, MAPK e STAT1, além de inibir a expressão de CD36 na superfície celular (Federico *et al.*, 2001; Olivetta *et al.*, 2003; Varin *et al.*, 2003; Olivetta *et al.*, 2014).

A ação de proteínas virais na inativação ou escape da ação de fatores de restrição da replicação viral em macrófagos tem sido extensivamente demonstrada (Cobos Jimenez *et al.*, 2012; Malim e Bieniasz, 2012; Dragin *et al.*, 2013; Pauls *et al.*, 2013). No entanto, poucos estudos exploram os efeitos das proteínas virais liberadas no citoplasma durante os estágios iniciais da infecção e como elas interferem no metabolismo celular e recrutamento/degradação de proteínas, permitindo a replicação viral e a ocorrência de falhas no desenvolvimento da resposta imune (Herbein *et al.*, 2010; Datta *et al.*, 2016)

Em uma situação ideal de ativação da resposta imune inata, o reconhecimento de uma possível infecção viral ocorre a partir da interação entre os PAMPs virais e os PRRs presentes na superfície ou no meio intracelular, desencadeando a ativação de vias de sinalização intracelulares e a indução do estado antiviral celular com objetivo de controlar a infecção (Jacobs e Damania, 2012). Durante estes processos, um dos principais mecanismos utilizados para ativação da resposta antiviral em macrófagos é a ativação das vias do complexo de sinalização do inflamassoma. Descrito inicialmente por Martinon, Burns e Tschopp, esse mecanismo está relacionado ao reconhecimento de PAMPs e DAMPs intracelulares e desenvolvimento da resposta imunológica, resultando na ativação de fatores de transcrição gênica, produção de citocinas/quimiocinas e ativação de vias de sinalização relacionadas à sobrevivência celular (Martinon *et al.*, 2002; Lamkanfi e Dixit, 2012).

Dentre os principais mecanismos de sinalização relacionadas à ativação do inflamassoma, as vias de sinalização dependentes de NLRP3, AIM2 e RIG-I são particularmente importantes para o desenvolvimento da resposta imunológica durante as etapas iniciais de infecções virais (Poeck *et al.*, 2010; Rathinam *et al.*, 2010; Rajan *et al.*, 2011; Ermler *et al.*, 2014; Tam e Jacques, 2014). Estruturalmente, o sensor RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*, também denominado de *DDX58*) é formado por 3 heterodomínios: o primeiro é composto por duas regiões responsáveis pela interação e ativação com as caspases na porção N-terminal (*Caspase Activation and Recruitment Domains*; CARD); o segundo domínio é composto por uma região capaz de interagir com o RNA exógeno (DEAD Helicase); e o terceiro, presente na porção C-terminal, está relacionado ao processo de autorregulação da ativação do RIG-I (*Repressor*

Domain - RD; *C-terminal Domain* – CTD). Fisiologicamente, este sensor é ativado após o reconhecimento de RNAs não-próprios no citoplasma, comuns durante os estágios iniciais de diversas infecções virais. Por sua vez, a molécula de AIM2 (*Absent in melanoma 2*) é composta por dois domínios distintos: o primeiro, PYD, presente na porção N-terminal é responsável pela interação com o domínio semelhante da molécula adaptadora ASC durante a ativação desta via de sinalização; e o segundo, HIN-200, presente na porção C-terminal da proteína é responsável pelo reconhecimento de moléculas de DNA dupla fita no citoplasma celular do hospedeiro. Durante as etapas de sinalização desta via é fundamental a presença de ASC para completa ativação das caspases, produção de IFN-tipo I e indução do estado antiviral celular (Yoneyama *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2008; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009; Rathinam *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2012).

Por outro lado, a sinalização mediada por NLRP3 que resulta na ativação do inflamassoma ocorre a partir do reconhecimento de uma ampla variedade de estímulos potencialmente perigosos para célula, como a presença de PAMPs virais e bacterianos, influxo de Ca^{2+} , efluxo de K^+ a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante o metabolismo mitocondrial. Estruturalmente, a molécula de NLRP3 é composta de 3 domínios distintos: o primeiro na porção C-terminal é composto por uma região rica em leucina (*Leucine-rich repeat*, LRRs); o segundo, NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*; também conhecido como *NACHT*), é responsável pelo reconhecimento e interação com os PAMPs e DAMPs, assim como pela oligomerização adequada da proteína; e o terceiro domínio presente na porção N-terminal é formado por PYD e, a exemplo do observado com AIM2, é responsável pela interação com a molécula adaptadora ASC, uma proteína composta por um domínio PYD e outro CARD, para ativação das caspases intracelulares (Davis e Ting, 2010; Tschopp e Schroder, 2010; Latz *et al.*, 2013).

Em comum, a ativação isolada ou em conjunto de cada uma dessas vias resulta na formação do inflamassoma – um complexo multiproteico responsável pelo recrutamento e clivagem da pro-caspase 1 na sua forma ativa. A ativação das caspases no meio intracelular ocasiona a clivagem da pro-IL-1 e da pro-IL-18, liberando-as nas respectivas formas ativas - IL-1 α , IL-1 β e IL-18.

Adicionalmente, ocorre a ativação NF- κ B, a indução de genes pro-inflamatórios e a ativação da resposta imune (Rathinam *et al.*, 2010; Tschopp e Schroder, 2010; Gross *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012; Latz *et al.*, 2013).

Considerando os diversos sensores intracelulares e as etapas necessárias para replicação do HIV-1, em teoria, a infecção em macrófagos deveria não conseguir ser estabelecida, uma vez que diferentes vias de sinalização do inflamassoma seriam ativadas, o que resultaria na morte celular por piroptose, além da ativação de um estado antiviral nas células subjacentes após o reconhecimento das citocinas pro-inflamatórias liberadas. No entanto, considerando os achados obtidos em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, os quais comprovam o sucesso da infecção em macrófagos, claramente a infecção viral consegue subverter o funcionamento da resposta imune e mesmo entrar em latência por longos períodos.

Os mecanismos de ativação do inflamassoma durante infecções virais tem sido evidenciados (Rehwinkel *et al.*, 2010; Rajan *et al.*, 2011; Lupfer *et al.*, 2013; Ermler *et al.*, 2014; Chen e Ichinohe, 2015), no entanto, poucos estudos exploram o reconhecimento/ativação do inflamassoma em células da imunidade inata durante a infecção por HIV-1. Dessa forma, dada a relevância da ativação do inflamassoma para ativação da resposta imune e controle de diversas infecções e, por outro lado, a capacidade dos macrófagos serem infectados por HIV-1 e produzir novas partículas virais ao longo do curso natural da doença, nossa hipótese inicial de trabalho foi que o sucesso de infecção viral e a ocorrência de alterações funcionais em macrófagos infectados por HIV-1 poderia estar relacionada às falhas induzidas nos mecanismos de ativação da resposta imune inata, especialmente na ativação do inflamassoma, as quais possibilitariam a evasão viral da resposta imunológica e a produção viral por longos períodos, mesmo durante o uso regular da terapia antirretroviral.

1.5 Infecção viral em macrófagos ontogenicamente distintos e uso de primatas não-humanos no estudo da patogênese mediada por SIV/HIV-1

Até poucos anos atrás, o termo “macrófago” era utilizado para designar uma população de células presentes em diversos tecidos, mas que

apresentavam em comum a capacidade de fagocitar patógenos e outros debris celulares, apresentar antígenos e recrutar outras células para os tecidos após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs. No entanto, o recente acúmulo sucessivo de novas evidências sobre a ontogênese dual desta população celular foi decisivo para quebra deste paradigma e a subsequente reavaliação do papel destas células na manutenção da homeostase tecidual e durante a patogênese de diversas doenças.

Durante as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, uma primeira onda de macrófagos é originada a partir de células progenitoras presentes no saco vitelínico (*Yolk Sac-derived macrophages* – YSDMs), a qual será responsável pela colonização inicial dos tecidos. A partir dessas células ocorre o remodelamento tecidual, crítico durante a embriogênese, a partir da fagocitose de células apoptóticas e liberação de citocinas e quimiocinas, fundamentais para a migração e diferenciação de células progenitoras. Ao contrário dos MDMs, YSDMs apresentam capacidade de autoproliferação na periferia e, de forma semelhante, são capazes de fagocitar *debris* celulares, liberar citocinas e quimiocinas, além de reconhecer PAMPs e DAMPs teciduais.

Adicionalmente, os YSDMs podem dar origem a macrófagos teciduais especializados (como a micróglia no SNC), os quais persistem mesmo durante a fase adulta em alguns tecidos. No entanto, em outros tecidos (como no fígado, pele e coração), essa primeira onda de macrófagos é parcialmente ou completamente substituída por MDMs (*Monocyte-derived macrophages*) ao longo do desenvolvimento, os quais irão colonizar esses tecidos durante a fase adulta (Ginhoux e Guilliams, 2016; Ginhoux *et al.*, 2016). Paralelamente, macrófagos teciduais têm sido relacionados à formação de reservatórios virais durante a infecção por HIV e SIV (Clayton *et al.*, 2017; Gama *et al.*, 2018), no entanto, sem explicitar a influência de cada subpopulação de macrófago considerando as suas diferenças ontogênicas durante a patogênese viral, evidenciando a necessidade de novos estudos nesta área.

Entretanto, apesar dessas lacunas ainda existentes, os recentes avanços conquistados ao longo dos últimos anos no estudo dos mecanismos básicos de replicação viral e relacionados à patogênese do HIV aceleraram a descoberta de estratégias efetivas de prevenção da infecção, o desenvolvimento

de novos antirretrovirais e alteraram drasticamente o destino de milhões de pacientes infectados, possibilitando maior sobrevida e com mais qualidade de vida, além de impedir milhares de novas infecções a cada ano. Dentre os principais marcos científicos revolucionários, o isolamento viral e o desenvolvimento das primeiras terapias capazes de controlar a replicação viral e causar menos efeitos colaterais foram decisivos para o rápido avanço do conhecimento científico na área.

Embora não exista até os dias atuais um protocolo terapêutico que alcance a cura definitiva da infecção por HIV, ao longo dos anos as terapias antirretrovirais empregadas foram continuamente aprimoradas, como pelo desenvolvimento de novas classes de medicamentos, aumento da eficiência terapêutica com a utilização de um número menor de comprimidos diariamente e redução dos efeitos colaterais observados durante a terapia. Em conjunto, todos os avanços conquistados na pesquisa de HIV/AIDS contribuíram para a alteração do status da doença ao longo dos anos: de uma eminente sentença de morte durante as décadas de 1980 e a primeira metade da década de 1990 para o enfrentamento desta infecção como uma doença crônica grave que requer atenção especial e tratamento diário, mas bem diferente do panorama observado no começo da epidemia.

Apesar destes avanços no tratamento e manejo da doença, outros desafios ainda se impõem sobre os cientistas da área, médicos e pacientes. Dentre eles, talvez o mais intrigante seja a capacidade do vírus formar reservatórios teciduais e muitas vezes entrar em latência durante a terapia antirretroviral, fazendo com que a carga viral seja indetectável no plasma dos pacientes com boa adesão ao tratamento. No entanto, a suspensão por poucos dias ou semanas do uso de ARVs resulta, na vasta maioria dos casos, no retorno da carga viral detectável no soro/plasma deste paciente e da capacidade de transmissão da infecção para outros indivíduos.

Nesse sentido, fica claro que, além das células presentes no sangue periférico, a infecção por HIV-1 também afeta outros subtipos celulares presentes nos tecidos, como linfócitos T CD4+, macrófagos e células da micróglia (Avalos *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2016; Gama *et al.*, 2017). A infecção crônica destes subtipos celulares, associada a baixa biodisponibilidade tecidual

dos ARVs, possibilitam a manutenção de um *pool* de células infectadas e viáveis por longos períodos. Estes reservatórios virais presentes em diversos tecidos (como SNC, baço e medula óssea) podem ser constituídos por células infectadas em estado de latência (cujo genoma viral está integrado ao do hospedeiro, mas que não apresentam sinais de replicação viral ativa) e por aquelas com taxa de replicação viral basal. Apesar de ser suficientemente baixa a ponto da sua presença não ser detectada em amostras de sangue periférico de pacientes em uso regular dos ARVs, a replicação viral observada nos tecidos a partir destas células que compõem os reservatórios é fundamental para disseminação da infecção para células não infectadas e a consequente manutenção dos reservatórios virais a longo prazo (Chun *et al.*, 1995; Chun, Stuyver, *et al.*, 1997; Micci *et al.*, 2014).

Ao longo dos últimos anos diversos estudos têm buscado compreender quais os fatores determinantes para a quebra da latência de células infectadas e a reativação da replicação viral *in vivo*, assim como quais os mecanismos celulares ativados durante a infecção que contribuem para evasão para evasão viral da resposta imune. Diante deste fato, diferentes métodos tem sido desenvolvidos para quantificação da latência e ativação viral em diferentes tecidos (Chun, Carruth, *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 2002; Queen *et al.*, 2011; Avalos *et al.*, 2016; Gama *et al.*, 2017).

Paradoxalmente ao observado na maioria dos linfócitos T CD4+ infectados no sangue periférico, macrófagos e uma parcela dos linfócitos T CD4+ presentes nos tecidos são mais resistentes e suportam por longos períodos a infecção por HIV-1, mesmo em estados de replicação viral ativa. Dentre os possíveis mecanismos diferencialmente ativados entre esses dois subtipos celulares, a maior ação de mecanismos protetores e de reparo associados à produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação de proteínas celulares durante a replicação viral podem ajudar a compreender a formação dos reservatórios nos tecidos, evitando a morte das células infectadas (Stephensen *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2016).

Nesse contexto, de forma a viabilizar a realização destes estudos, o emprego de modelos animais, especialmente de primatas não-humanos (NHP), tem se apresentado como uma importante ferramenta durante para a

compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese viral (como a disseminação tecidual, formação de reservatórios e indução de latência em células infectadas), o desenvolvimento de novas drogas antirretrovirais e vacinas que sejam eficazes na prevenção e/ou tratamento da infecção e que apresentem poucos efeitos colaterais (Hu, 2005; Pace *et al.*, 2011; Evans e Silvestri, 2013; Lynch *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos, o uso de macacos Rhesus e Pigtales tem se demonstrado um bom modelo para estudo dos mecanismos de patogênese de SIV/HIV, especialmente por apresentarem boa capacidade de treinamento e relativa facilidade no manejo mesmo dos animais infectados, além de grande similaridade fisiopatológica durante a infecção por SIV/HIV aos achados observados durante a infecção em humanos (Alexander *et al.*, 1999; Henning *et al.*, 2011; Cohen, 2018). Dessa forma, considerando os aspectos éticos relacionados e a dificuldade de obtenção de amostras teciduais de seres humanos infectados por HIV-1, o uso dos modelos animais adequados possibilitou o avanço das pesquisas em HIV/AIDS, especialmente daquelas relacionadas à patogênese viral e o desenvolvimento de novos medicamentos para serem utilizados durante a terapia. Apesar destes avanços, o atual status crônico da infecção e a ausência de uma estratégia terapêutica que resulte na cura efetiva requer a realização de novos estudos, seja diretamente em seres humanos ou em modelos animais, para que seja realizado o aprimoramento contínuo da terapia e da qualidade de vida dos indivíduos infectados, visando o desenvolvimento de uma estratégia de tratamento definitiva para a infecção por HIV (Gardner e Luciw, 2008; Estes *et al.*, 2018; Sato e Sasaki, 2018).

Nesse sentido e diante do exposto anteriormente, a realização do presente estudo é necessária para melhor compreensão dos mecanismos celulares ativados durante a infecção por HIV-1 em macrófagos e que contribuem para evasão viral da resposta imune inata, assim como diferentes subpopulações de macrófagos presentes nos tecidos contribuem para formação de reservatórios virais ao longo de todo curso da infecção, mesmo após o início da terapia antirretroviral.

2. *OBJETIVO*

- 2.1 Avaliar os mecanismos relacionados à ativação do inflamassoma durante a infecção *in vitro* por HIV-1 em macrófagos humanos derivados de monócitos e como eles contribuem para evasão viral da resposta imunológica inata.

- 2.2 Realizar a caracterização fenotípica inicial para isolamento de macrófagos de diferentes origens embrionárias, os YSDMs e MDMs, isolados do fígado de primatas não-humanos, cronicamente infectados por SIV.

3. *DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL*

Para alcançar o objetivo proposto foram traçados os seguintes delineamentos experimentais:

Durante os experimentos realizados no Laboratório de Imunologia e Epigenética da FCFRP/USP, foram reaproveitadas as câmaras LRS™ de leucorredução do sistema de aférese automatizada Trima Accel™, utilizados durante a coleta especial de plaquetas no Hemocentro de Ribeirão Preto. A utilização desta câmara possibilitou a obtenção de uma fração altamente concentrada de leucócitos sem a necessidade de uma nova coleta ou qualquer prejuízo para a produção normal dos hemocomponentes. Deste modo, os monócitos CD14+ foram purificados utilizando-se sistema de *microbeads* magnéticas, diferenciados em macrófagos e utilizados nos experimentos posteriores, conforme representado na figura 1.

Durante o desenvolvimento do estágio de Doutorado Sanduíche, os experimentos foram executados no Retrovirus Lab da Johns Hopkins University – School of Medicine. Para realização dos experimentos envolvendo modelos animais, o fígado de macacos Rhesus infectados com SIV e regularmente tratados com ARVs foi coleado durante as necropsias previamente agendadas para realização simultânea de outros estudos. Os macrófagos derivados do saco vitelínico (YSDMs) ou de monócitos (*MDMs*) foram isolados baseado no protocolo descrito por Cassetta e colaboradores (Cassetta *et al.*, 2016). Em seguida, as células MMR+ ou CD11b+ foram purificadas utilizando-se sistema de *microbeads* magnéticas, plaqueadas e utilizadas em ensaios posteriores (Fig. 2).



Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental realizado durante a execução do estudo no Laboratório de Imunologia e Epigenética da FCFRP – USP.

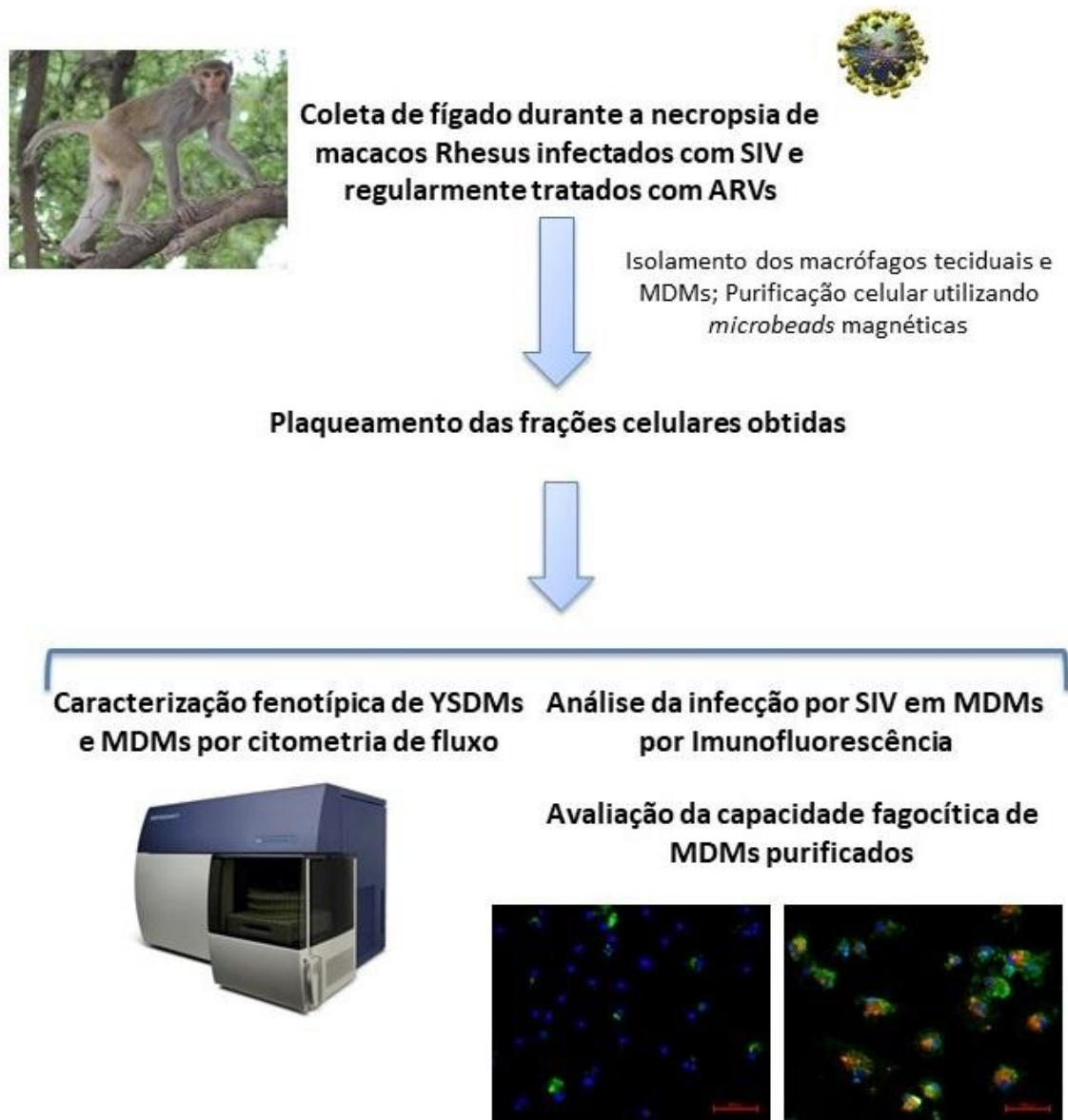


Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental realizado durante a execução do estágio de doutorado sanduíche no Retrovirus Lab da Johns Hopkins University – School of Medicine.

4. *CASUÍSTICA, MATERIAL E
MÉTODOS*

4.1 Casuística

Durante a fase de execução dos experimentos no Brasil foram recrutados voluntariamente 60 doadores de sangue atendidos no Hemocentro de Ribeirão Preto. Foram excluídos do estudo doadores de sangue com idade inferior à 18 ou superior a 65 anos; aqueles considerados inaptos após a triagem clínica ou que apresentaram reatividade sorológica para infecções por HIV-1 e 2, HTLV-I e II, doença de Chagas, Sífilis ou Hepatites B e C. Os indivíduos considerados aptos, de ambos os sexos, manifestaram a sua concordância em participar deste projeto após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HC-FMRP/USP (processo HCRP n° 18492/2014). Cada participante concordou em doar a câmara LRS™ do sistema de leucorredução presente no kit após a doação regular de plaquetas por aférese, realizada no Hemocentro de Ribeirão Preto. O número de integrantes do estudo e o método de análise estatística dos resultados foram determinados baseados nos trabalhos relacionados publicados na literatura e considerando o tempo de realização do projeto.

De forma semelhante, a inclusão e utilização dos órgãos de animais infectados durante o período de Doutorado Sanduíche seguiu todas as normas estabelecidas pelo comitê de ética em pesquisa animal da Johns Hopkins University – School of Medicine. Todos os animais utilizados durante a execução do presente estudo já participavam de outras propostas complementares do *Retrovirus Lab*, de modo que foi preciso realizar apenas um adendo à lista de órgãos analisados durante as necropsias previamente programadas (NA 00015485). Ao longo deste estudo não foi necessário a inclusão de outros animais além daqueles previstos anteriormente.

4.2 Isolamento de leucócitos totais, purificação da fração CD14+ e diferenciação em macrófagos

A partir da fração sanguínea retida na câmara LRS™ do sistema de leucorredução dos circuitos do kit utilizado durante a doação de plaquetas por aférese, as células mononucleares presentes nas amostras foram isoladas utilizando os tubos BD Vacutainer® CPT™ com heparina, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, os monócitos (fração CD14+) foram

purificados utilizando sistema de seleção imunomagnética positiva com kit específico (Milteny Biotec, USA). O precipitado celular obtido foi incubado com anticorpos monoclonais anti-CD14 complexados às *microbeads* magnéticas e em seguida aplicado à coluna de separação (LS column MACS™, Miltenyi Biotec), acoplada à um suporte contendo um campo magnético (QuadroMACS™, Miltenyi Biotec). Deste modo, após a remoção da coluna de separação do suporte, apenas células CD14+ foram purificadas e cultivadas em placas de alta aderência. O meio de cultura foi substituído após 3 dias de cultura para remoção de debris e células não aderentes. Após este período, as células foram incubadas novamente por mais 2 dias em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

4.3 Polarização de macrófagos nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual

Após 5 dias em cultura, os macrófagos em cultura foram estimulados com GM-CSF e IFN- γ (20 e 10 ng/mL, respectivamente; R&D Systems e Millipore) e mantidos em cultura por 72 horas para ativação no padrão inflamatório. De modo semelhante, os macrófagos foram estimulados durante 72 horas com IL-4 e IL-13 (50 ng/mL de cada; R&D Systems) para ativação no padrão relacionado ao reparo tecidual. Macrófagos foram cultivados pelo mesmo período adicional apenas com meio de cultura suplementado com 10% de FBS e antibiótico como controle negativo (*resting* MDMs) da ativação.

4.4 Infecção *in vitro* por HIV-1 e avaliação da replicação viral

Durante a execução dos experimentos foram utilizadas duas cepas de HIV-1 distintas: HIV-1_{Ba-L} e HIV-1 89.6, ambas com tropismo CD4/CCR5 para infecção em monócitos/macrófagos. A primeira cepa viral foi gentilmente cedida ao nosso laboratório pelo professor Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, enquanto os experimentos realizados no *Retrovirus lab* (Johns Hopkins University) foram conduzidos utilizando a cepa HIV-1 89.6.

Após a polarização dos macrófagos em cultura, as células foram incubadas com as respectivas suspensões virais - 20 ng/mL (p24) de HIV-1_{Ba-L} ou MOI 0.001 de HIV-1 89.6 – em meio OptiPro (ThermoFischer). Em seguida,

as células foram espinoculadas (1200 x G; 120 minutos; temperatura ambiente) e, após este período o sobrenadante foi removido para remoção das partículas virais livres no sobrenadante e as células foram incubadas em meio fresco por mais 16 horas (Lima *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2011).

A replicação viral após infecção *in vitro* foi quantificada pela presença de RNA viral ou p24 de HIV-1 no sobrenadante das células em cultura. No primeiro caso, o sobrenadante foi coletado em diferentes períodos, o material genético viral foi extraído utilizando o QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Qiagen) e quantificado por qRT-PCR, conforme descrito previamente (Avalos *et al.*, 2016). Paralelamente, a presença de p24 no sobrenadante foi quantificada por ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (Sino Biological Inc., UK).

4.5 Detecção de citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante

Após 48 horas da infecção *in vitro* por HIV-1, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFN- α 2, TNF- α , CXCL10, MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β) liberadas após infecção *in vitro*, utilizando kits multiplex (HCYTOMAG-60K, Milliplex® kit, Merck Millipore, Germany). Seguindo as recomendações do fabricante, as amostras foram adicionadas em placas específicas para o ensaio e diluídas em tampão fornecido no kit e, após a incubação com microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura, quantificadas utilizando o *software* Milliplex Analyst 5.1®, com auxílio de curva padrão para cada um dos analitos e encaixe cúbico em escala de *log* durante as análises. As análises de correlação das citocinas liberadas foram realizadas utilizando o teste de Spearman bimodal e os gráficos foram realizados utilizando o *software* Cytoscape (v.3.2.0), classificando as interações de acordo com a seguinte razão: negativa ($r < 0$); fraca ($r < 0,36$); moderadas ($0,36 < r < 0,67$); ou fortes ($r > 0,67$). Em todas as condições analisadas, $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.6 Quantificação de mRNA de macrófagos infectados por HIV-1

O RNA total dos macrófagos em cultura foi extraído 8 horas após infecção *in vitro* (Chattergoon *et al.*, 2014), utilizando o kit PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen Corporation) e quantificado utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer

(Life Technologies). Em seguida, o cDNA das amostras foi sintetizado utilizando o kit MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Life Technologies) e realizado o PCR quantitativo com sondas TaqMan® para análise da expressão dos seguintes genes: *AIM2* (#Hs00915710_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); *ALOX15* (#Hs00993765_g1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); *CPSF6* (#Hs00199668_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); *CXCL10* (#Hs.PT.58.3790956.g; sonda FAM; IDT® Inc.); *NLRP3* (#Hs00918082_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); *RIG-I* (#Hs00204833_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); *SAMHD1* (#Hs00210019_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies); e *SPTBN1* (#Hs00199668_m1; sonda VIC-MGB; Life Technologies). A expressão de β -actina (#Hs.PT.39a.22214847; sonda HEX; IDT® Inc.) foi utilizada como controle constitutivo das amostras analisadas.

4.7 Quantificação da expressão de marcadores presentes na superfície de macrófagos

Para análise da expressão de marcadores presentes na superfície celular de YSDMs e MDMs foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD3 (clone #sp34-2; BD Biosciences); anti-CD4 (clone #A161A1; Biolegend); anti-CD11b (clone #Bear1; Beckman Coulter); anti-CD14 (clone #63D3; Biolegend); anti-CD64 (clone #CD6428; Invitrogen); Anti-CD163 (clone #GHI/61; Biolegend); anti-MMR (clone #15-2; Biolegend); anti-CCR5 (clone #HEK/1/85a; Biolegend) e anti-HLA-DR (clone #L243, Biolegend). Todas as amostras foram quantificadas por citometria de fluxo (BD LRSFortessa™; BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados com auxílio do software FlowJo® (V.10.3, Tree Star, Inc).

4.8 Ensaios de *western blot* e quantificação de specks de ASC no sobrenadante de macrófagos infectados *in vitro*

Para realização dos ensaios de *western blot*, macrófagos ativados nos padrões M0, M1 ou M2a foram incubados por 8 horas com 20 ng/mL de p24 de HIV-1_{Ba-L}, conforme descrito previamente (Lima *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2011). Após este período, todas as amostras (macrófagos em cultura ou sobrenadante) foram incubadas com o tampão de lise do *Qproteome Mammalian Protein Prep*

Kit (Qiagen) contendo inibidores de proteases e de fosfatases (SigmaAldrich). Em seguida, as proteínas totais presentes nas amostras foram quantificadas utilizando o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (BIO-RAD; #5000201). Todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida/bis-acrilamida 10% (Life Technologies), transferidas para membranas *Immun-Blot®* PVDF (BIO-RAD) e incubadas a 4°C com os respectivos anticorpos primários (NF-κB fosforilado – #04-1000; NLRP3 - #ABF23; ASC - #AB3607; Caspase-1 - #AB1871; MerckMillipore) durante 18 horas. A expressão de β-actina (#MAB1522; MerckMillipore) foi utilizada como controle constitutivo. Em seguida, a membrana foi incubada com os respectivos anticorpos secundários conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente. A fluorescência resultante emitida por esta reação foi quantificada com auxílio do sistema UVITEC CAMBRIDGE™ de fotodetecção. As imagens obtidas foram tratadas e as intensidades das respectivas bandas foram quantificadas utilizando o *ImageJ software* (v. 1.8.0).

4.9 Predição de interação *in silico* entre proteínas virais e do hospedeiro

Durante as análises de predição da interação entre proteínas virais e de macrófagos humanos foram utilizadas quatro plataformas de predição com algoritmos distintos. Inicialmente, a plataforma BioGRID 3.4 (<https://thebiogrid.org/>) foi utilizada para realização de meta-análise dos dados presentes na literatura. Esses resultados iniciais foram refinados a partir da exclusão de trabalhos publicados que não evidenciaram por meio de ensaios funcionais/biológicos a interação física entre qualquer uma das 18 proteínas virais e todas aquelas catalogadas no proteoma humano. O grande volume de dados obtidos após essa etapa foi novamente refinado considerando-se apenas a interação entre proteínas virais e aquelas que tenham função conhecida no desenvolvimento da resposta imunológica (tabela não mostrada).

Aplicando-se esse novo filtro de dados, os resultados obtidos na etapa anterior foram validados utilizando outras três plataformas de predição entre proteínas: GWIDD (<http://gwidd.compbio.ku.edu/>); ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) e Haddock (<http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2/haddock.php>). Os

resultados gerados por cada uma dessas plataformas foram agrupados de maneira independente e adotou-se a política de consenso entre os resultados gerados para admissão das interações com maior valor preditivo, considerando o estado conformacional proteico de menor energia livre como a forma de ocorrência mais provável na natureza.

4.10 Ensaios de imunofluorescência para avaliação da atividade do inflamassoma e localização intracelular de outras proteínas durante a infecção por HIV-1 em macrófagos

Para realização dos ensaios de imunofluorescência, as células polarizadas e infectadas *in vitro* serão fixadas após 6 horas em cultura, permeabilizadas e incubadas com os anticorpos NF- κ B total; NLRP3, AIM2; RIG-I; ASC; Caspase-1 (Santa Cruz Biotechnology) e HIV-1 p24 (Millipore) e secundários conjugados a FITC ou PE, conforme descrito anteriormente (Marechal *et al.*, 1998). A marcação de F-actina foi realizada com auxílio do kit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (#A12379; Invitrogen), enquanto a marcação das mitocôndrias foi realizada com auxílio do MitoTracker™ Red (#M7512; ThermoFischer) e o núcleo celular foi corado com DAPI/Nucblue (#R37605; ThermoFischer), todos seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas no microscópio confocal (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) do laboratório multiusuário da FCFRP/USP.

4.11 Liberação de mediadores lipídicos no sobrenadante e quantificação por espectrometria de massas

Quarenta e oito horas após infecção *in vitro* por HIV-1_{Ba-L} dos macrófagos, o sobrenadante das células em cultura foi coletado para quantificação dos mediadores lipídicos presentes na amostra. Como controle positivo, as células foram estimuladas com 20 μ M ionóforo de cálcio A23187 (SigmaAldrich) em triplicadas durante 20 minutos para estimular a liberação dos mediadores lipídicos. Após este período, metanol gelado (v/v) foi adicionado as amostras para parar a reação. O sobrenadante foi coletado e diluído em água MilliQ para reduzir a concentração de metanol até 10% do volume da amostra. A extração de eicosanoides foi realizada baseado no método SPE (*solid phase*

extraction), conforme descrito por Galvão e colaboradores (Galvao *et al.*, 2016). A quantificação de 23 mediadores lipídicos distintos foi realizada utilizando o sistema de HPLC (Shimadzu) com interface do espectrômetro de massas Triple TOF 5600 e equipado com uma fonte de electrospray (Sciex). A separação cromatográfica dos eicosanoides foi realizada utilizando colunas Ascentis Express C18 (100×30mm, 2.7 µm; Supelco® SigmaAldrich). Os *softwares* PeakView 2.0 e MultiQuant 3.0 foram utilizados para aquisição e processamento dos resultados.

4.12 Obtenção de YSDMs e MDMs do fígado de macacos Rhesus infectados por SIVmac251

Para obtenção de YSDMs e MDMs, macacos Rhesus foram infectados com SIVmac251 e tratados com antirretrovirais por pelo menos seis meses para que fosse obtida a supressão da carga viral detectada no plasma (Mankowski *et al.*, 2002). Após esse período, os animais foram submetidos à eutanásia antes da manifestação de qualquer sintoma clínico relacionado a infecção por HIV e submetidos a necropsia para coleta de diferentes tecidos. As células hepáticas totais foram isoladas utilizando gentleMACS Dissociator e gentleMACS C Tubes (#130-093-235 e #130-093-237; Miltenyi Biotec) e liberase DL e TL (ambas Roche) e DNase I (Applichem), conforme descrito anteriormente (Cassetta *et al.*, 2016). Em seguida, a suspensão celular obtida foi purificada utilizando o kit EasySep™ Magnet (StemCell Technologies) e *microbeads* magnéticas conjugadas a anticorpos anti-MMR ou anti-CD11b (BioLegend). O isolamento das subpopulações de YSDMs e MDMs foi confirmado por citometria de fluxo. Após esta etapa, as células obtidas foram plaqueadas em placas de 24 poços, conforme descrito anteriormente, e cultivadas durante 7 dias em DMEM + 10% FBS antes da realização dos ensaios posteriores.

4.13 Avaliação da capacidade fagocítica e de liberação de ROS de macrófagos infectados

Os macrófagos infectados *in vitro* também foram avaliados quanto a capacidade de fagocitose de produtos bacterianos e liberar espécies reativas de oxigênio (ROS). Durante a realização dos ensaios de fagocitose, as células

cultivadas foram expostas ao pHrodo Red® e incubadas em estufa durante 60 minutos (ThermoFischer). Este método é baseado no uso de partículas de *E. coli* recobertas por corante que fluoresce apenas sob pH baixo (encontrado nos endossomos e fagossomos). A análise das partículas fagocitadas foi realizada por imunofluorescência (Gama *et al.*, 2012).

Para quantificação das espécies reativas de oxigênio liberadas, os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços de fundo branco e 48 horas após a infecção viral a liberação de ROS no sobrenadante foi quantificada por quimiluminescência, conforme descrito anteriormente (Andrade *et al.*, 2013). Esta reação foi mantida a 37°C e monitorada durante 2 horas em luminômetro de microplacas (AutoLumat Plus LB 953, EG&G Berthold, Germany), com adição de luminol (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; SigmaAldrich, St. Louis, USA) para amplificação da luminescência liberada durante a reação. Células não infectadas foram utilizadas como controle negativo deste experimento para determinar a produção basal de ROS, enquanto a adição de *phorbol 12-myristate-13-acetate* (10^{-7} mol L^{-1} ; PMA – SigmaAldrich, USA) foi utilizada como controle positivo. A emissão luminosa foi obtida em contagem de fótons por segundo (CPS). Os resultados obtidos foram expressos em área sob a curva (AUC) de quimiluminescência.

4.14 Análise dos resultados obtidos

Todos os resultados obtidos neste estudo foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0. As análises estatísticas do presente estudo foram realizadas utilizando o teste pareado de Wilcoxon. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão e a comparação entre os grupos foram consideradas significativamente estatísticas quando o valor de $p < 0.05$ ($p \leq 0.05 = *$; $p \leq 0.01 = **$; $p \leq 0.001 = ***$).

5. *RESULTADOS*

*PARTÉ I - Estratégias de evasão
viral da resposta imune em
macrófagos a partir da interação
entre HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e
proteínas celulares*

5.1 Macrófagos *resting* liberam IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante após a infecção *in vitro* por HIV-1

A ativação do inflamassoma é classicamente caracterizada pela liberação de IL-1 β e IL-18 após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs. Nesse sentido, foi observado que macrófagos *resting* após a infecção *in vitro* por HIV-1 liberam maiores quantidades de IL-1 β no sobrenadante quando comparado ao grupo não infectado, enquanto macrófagos ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual liberam níveis semelhantes desta citocina (Figura 3A), indicando que apenas em macrófagos *resting* ocorre a ativação final do complexo de proteínas do inflamassoma, resultando na liberação desta citocinas no sobrenadante.

De modo semelhante, macrófagos *resting* infectados liberam maiores quantidades de outras citocinas pro-inflamatórias no sobrenadante (IL-6, IL-12p70, IL-17A, IFN- α 2, TNF- α , MIP-1 α e CXCL10) em relação ao observado em macrófagos *resting* não infectados (Figura 3B-K). Por sua vez, macrófagos ativados no padrão inflamatório infectados apresentam menor quantidade de MCP-1 liberada no sobrenadante e níveis semelhantes das outras citocinas e quimiocinas avaliadas em relação aos macrófagos ativados no mesmo padrão e não infectados. Curiosamente, macrófagos ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual e infectados apresentam maiores quantidades de IL-17A e MIP-1 β no sobrenadante, mas níveis semelhantes das demais citocinas e quimiocinas em relação ao grupo ativado neste padrão e não infectado. Estes resultados nos fornecem indícios que a infecção por HIV-1 consegue ser reconhecida pelos sensores da imunidade inata presentes em macrófagos e desencadear um padrão de liberação de citocinas de acordo com a polarização celular previamente induzida *in vitro*.

5.2 Redes de correlações formadas pelas citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs após a infecção por HIV-1

Com intuito de compreender melhor o perfil de liberação de citocinas e quimiocinas e de que forma elas se relacionam com a infecção por HIV-1, redes de correlações entre os analitos foram traçadas utilizando o *software* Cytoscape (v.3.2.0) a partir dos dados obtidos da quantificação destes analitos no

sobrenadante de macrófagos infectados *in vitro*, conforme descrito anteriormente (Espindola *et al.*, 2015).

A análise dos resultados obtidos do sobrenadante de macrófagos *resting* não infectados indicou a presença de poucas correlações e com interações moderadas entre as citocinas (Figura 4A). No entanto, após a infecção por HIV-1 foi observado um rearranjo no perfil de liberação destes analitos, intensificando-se as interações entre as citocinas pro-inflamatórias - como IL-1 β , IFN- α 2 e TNF- α (Figura 4B). Macrófagos ativados no padrão inflamatório não infectados apresentam uma complexa rede de interações entre as citocinas, composta principalmente por IL-1 β , TNF- α , CXCL10 e MIP-1 α , a qual é alterada após a infecção viral, aumentando o número de correlações relacionadas às citocinas pro-inflamatórias e diminuindo o número de interações relacionadas à liberação de IL-10 no sobrenadante (Figura 4C e D). De modo semelhante, macrófagos ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual não infectados apresentam grande número de correlações fortes dependentes de IL-1 β , IFN- α 2 e TNF- α , as quais são reduzidas após a infecção *in vitro* por HIV-1 (Figura 4E e F).

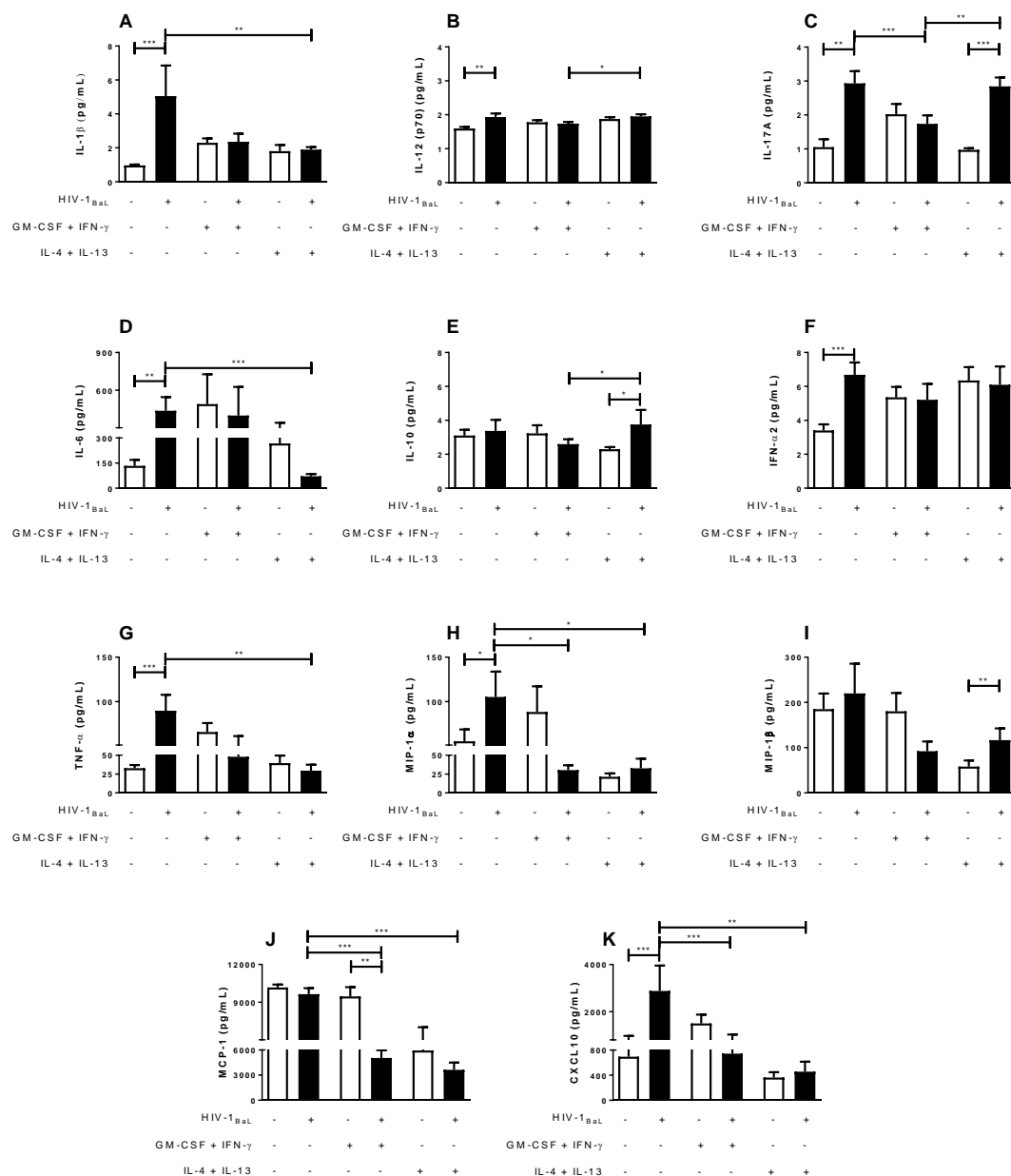


Figura 3. Citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual após infecção *in vitro* por HIV-1. MDMs foram diferenciados e mantidos em repouso (*resting*) ou ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual durante 3 dias e em seguida incubados com HIV-1_{BaL} (20 ng/mL de p24) por 48 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e as citocinas e quimiocinas presentes na amostra foram quantificadas com auxílio de microbeads magnéticas (Milliplex® MAP Human Cytokine/Chemokine; Millipore). As barras brancas representam as células não infectadas e as pretas representam as células infectadas *in vitro* por HIV-1. Os resultados obtidos ($n=15$) representam a média \pm desvio padrão e foram expressos em pg/mL. Os dados foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon pareado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

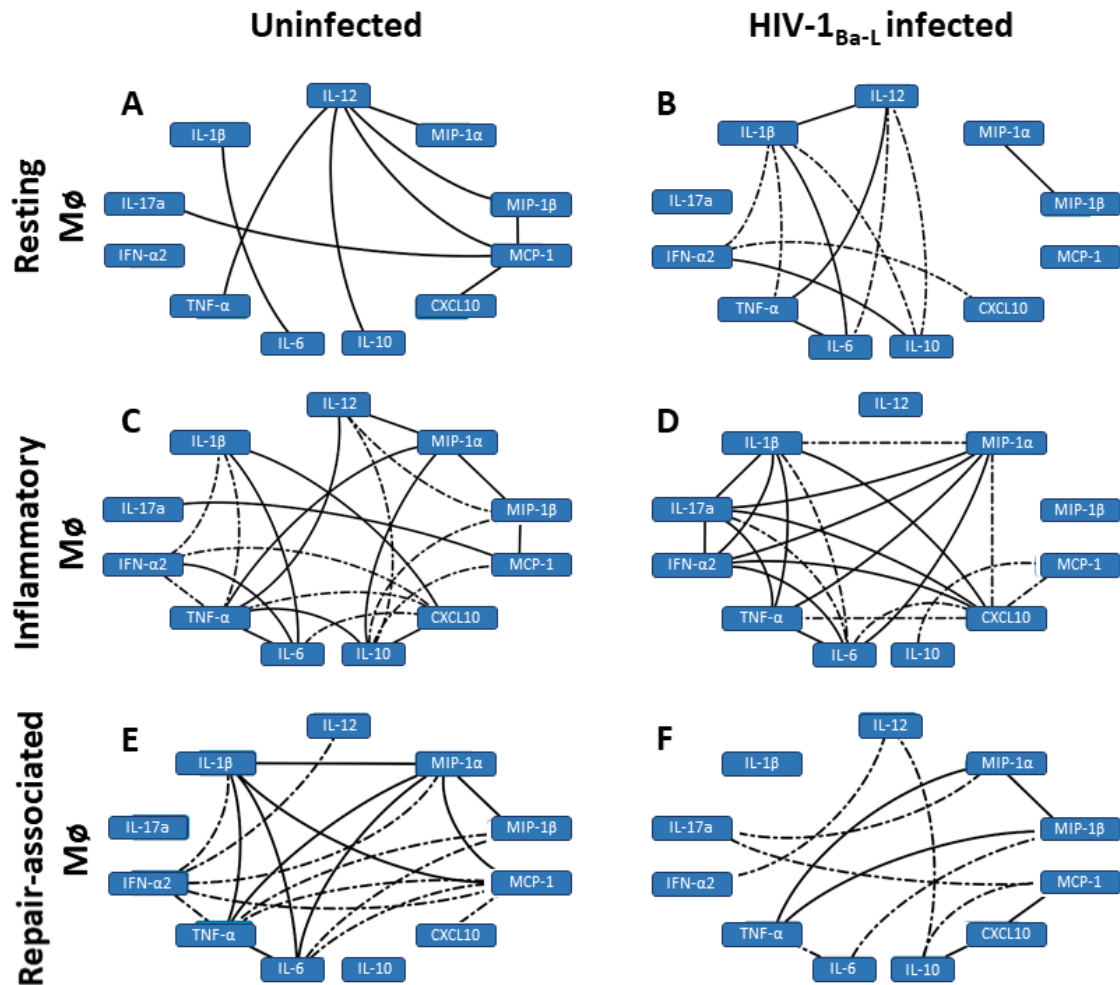


Figura 4. Redes de correlação entre as citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual antes e após infecção *in vitro* por HIV-1. A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, foram realizadas análises de correlação entre as amostras estudadas utilizando o teste de Spearman (two-tailed). As redes de interação entre as citocinas e quimiocinas foi construída utilizando o programa Cytoscape (v.3.2.0), considerando as seguintes taxas de interação para classificar as interações: negativa ($r < 0$); fraca ($r < 0,36$); moderada ($0,36 < r < 0,67$; linhas tracejadas); ou forte ($r > 0,67$; linhas contínuas).

5.3 Expressão de genes relacionados à polarização celular, ativação do inflamassoma e fatores de restrição da replicação de HIV-1 em macrófagos

Considerando-se os resultados obtidos nos experimentos anteriores, quantificamos a expressão de genes relacionados à polarização celular, ativação do inflamassoma e fatores de restrição da replicação viral em macrófagos. Dezoito horas após a infecção *in vitro*, foi observado o aumento na expressão de *CXCL10* em macrófagos *resting* e aqueles ativados no padrão inflamatório quando comparado aos respectivos controles não infectados. O nível de expressão deste gene em macrófagos *resting* infectados também foi significativamente maior quando comparado aos macrófagos ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual pós infecção *in vitro* (Figura 5A). Níveis maiores de *ALOX15* e *CPSF6* foram expressos em macrófagos ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual, permanecendo semelhantes à expressão constitutiva de β -actina em macrófagos *resting* e aqueles ativados no padrão inflamatório, mesmo após a infecção viral *in vitro* (Figura 5B-C). De forma interessante, a expressão de *NLRP3*, um receptor clássico relacionado à ativação do inflamassoma, foi semelhante entre todos os macrófagos não infectados, mas significativamente reduzida em macrófagos ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual infectados quando comparado à expressão observada em macrófagos *resting* ou ativados no padrão inflamatório após a infectados (Figura 5D). A expressão de *AIM2* e *RIG-I*, duas importantes vias de ativação do inflamassoma, foi semelhante entre os grupos avaliados, mesmo após a infecção *in vitro* (Figura 5E-F). Por sua vez, *SAMHD1*, um importante *Interferon-Stimulated Gene* com capacidade de restringir a replicação viral, foi expresso de forma semelhante entre os grupos observados mesmo 18 horas após a infecção por HIV-1_{Ba-L} (Figura 5G). Finalmente, a expressão de *SPTBN1*, um importante componente do citoesqueleto, foi semelhante entre todos os macrófagos não infectados, mas significativamente reduzida em macrófagos ativados no padrão inflamatório 18 horas após a infecção quando comparado ao seu grupo controle (Figura 5H).

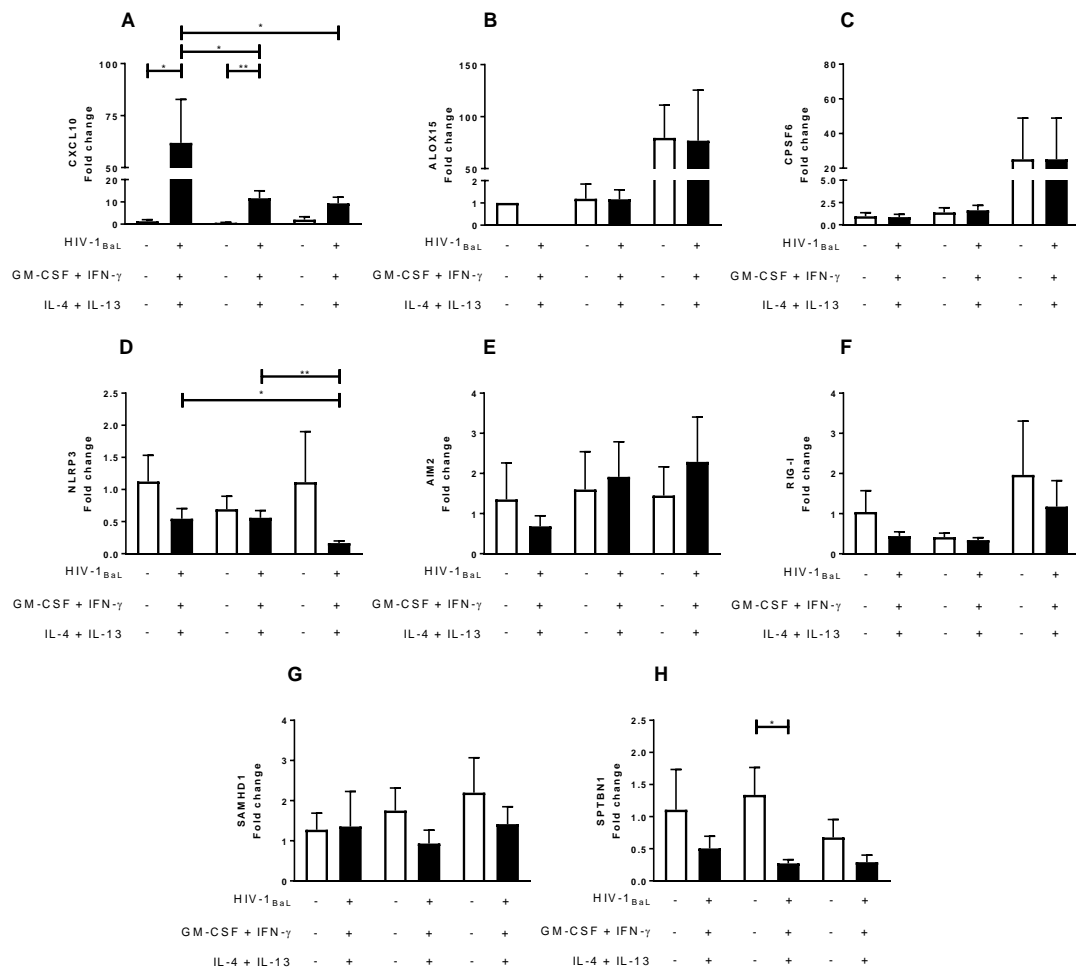


Figura 5. Expressão de genes relacionados à polarização celular, ativação do inflamassoma e restrição da replicação de HIV-1 em macrófagos. MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados por 18 horas com HIV-1_{BaL} para infecção *in vitro*. Após este período, as células foram lisadas, o RNA total foi extraído, quantificado e o cDNA sintetizado para posterior análise por qPCR com sondas TaqMan® para quantificação da expressão de (A) *CXCL10*; (B) *ALOX15*; (C) *CPSF6*; (D) *NLRP3*; (E) *AIM2*; (F) *RIG-I*; (G) *SAMHD1*; e (H) *SPTBN1*. A expressão de β -actina foi utilizada como controle constitutivo de cada amostra. As barras brancas representam as células não infectadas e as pretas representam as células infectadas *in vitro* por HIV-1. Os resultados obtidos ($n=10$) foram analisados utilizando o teste t não pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4 Quantificação de NF- κ B fosforilado, NLRP3, Caspase-1 e liberação de *specks* de ASC no sobrenadante de MDMs infectados *in vitro* por HIV-1

Oito horas após a infecção *in vitro* por HIV-1_{Ba-L}, os macrófagos mantidos em cultura foram lisados e a expressão de NF- κ B fosforilado, NLRP3 e Caspase-1 foi quantificada por *western blot*. A expressão de β -actina foi utilizada como controle constitutivo de todas as amostras. A Figura 6A representa as bandas obtidas durante a eletroforese e posterior quantificação por *western blot* das respectivas proteínas. De modo interessante, a análise dos resultados indicou a expressão em níveis semelhantes das frações de NF- κ B fosforilado, NLRP3 e Caspase-1 entre os macrófagos em cultura, mesmo após a infecção por HIV-1 (Figura 6B-D).

Conforme inicialmente demonstrado por Franklin e colaboradores, além da liberação de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, a ativação do inflamassoma também pode resultar na liberação de *specks* de ASC no sobrenadante (Franklin *et al.*, 2014). A liberação desta proteína no meio extracelular é reconhecida como um DAMP e pode indicar a ocorrência de estágios iniciais de morte celular após ativação do inflamassoma (piroptose). O reconhecimento dessa proteína por células vizinhas amplifica o sinal inflamatório e a liberação de novas citocinas. Considerando estes fatos, avaliamos se, apesar de não haver a liberação de IL-1 β , ativação de NLRP3 e Caspase-1 durante os períodos analisados, a infecção por HIV-1 em MDMs poderia resultar na liberação de *specks* de ASC no sobrenadante de MDMs, sugerindo que estas células poderiam estar iniciando o processo de morte celular 48 horas após a infecção viral. No entanto, semelhante ao observado anteriormente, os níveis de *specks* de ASC observados no sobrenadante foram similares entre os grupos analisados, mesmo após a infecção por HIV-1 (Figura 7).

RESULTADOS – PARTE I

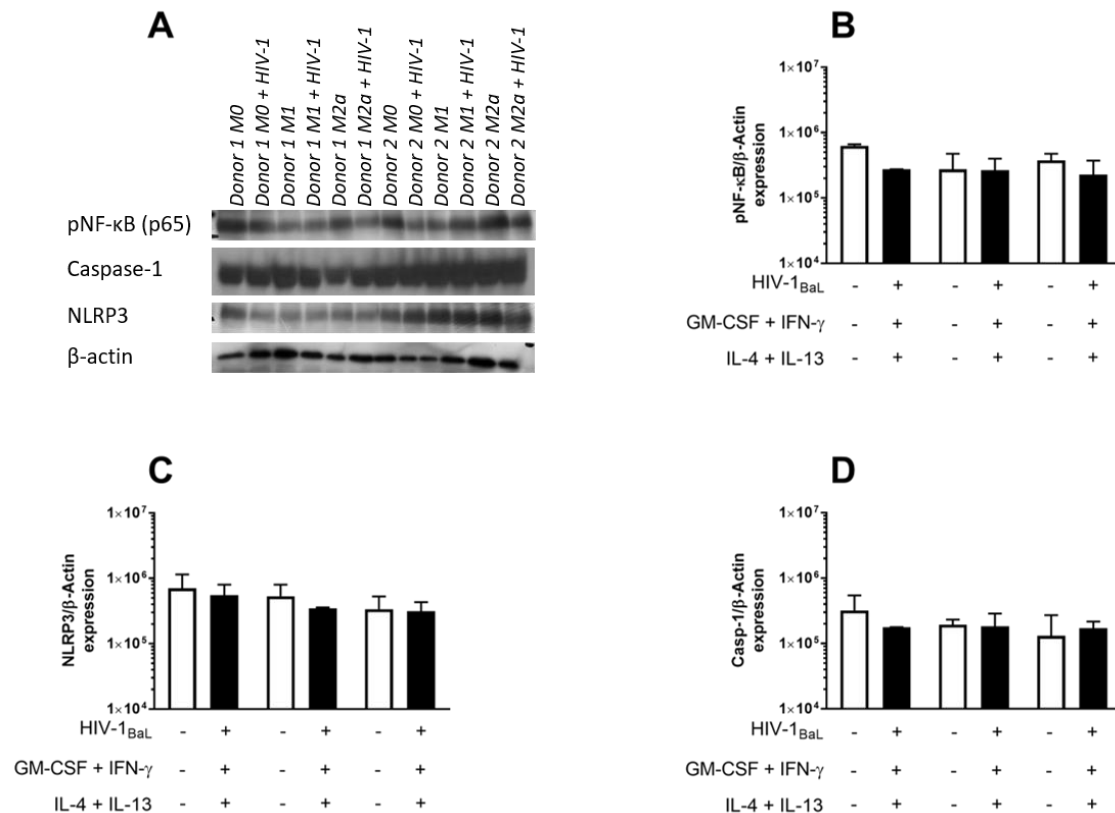


Figura 6. Expressão de NF-κB fosforilado, NLRP3 e caspase-1 em MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1. Macrófagos *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com HIV-1_{BaL} (20 ng/mL) durante 8 horas para estabelecimento da infecção inicial *in vitro*. Após este período, o lisado celular total foi coletado para a realização dos ensaios de *western blot*. (A) Representação das bandas obtidas durante *western blot* para posterior quantificação utilizando o *ImageJ software*. (B) Expressão de NF-κB fosforilado; (C) NLRP3; e (D) Caspase-1 em macrófagos após a infecção por HIV-1. As barras brancas representam a expressão observada em células não infectadas e as pretas naquelas infectadas *in vitro*. Os resultados obtidos ($n=4$) foram representados pela média \pm desvio padrão e quantificados em função da expressão constitutiva de β -actina de cada amostra.

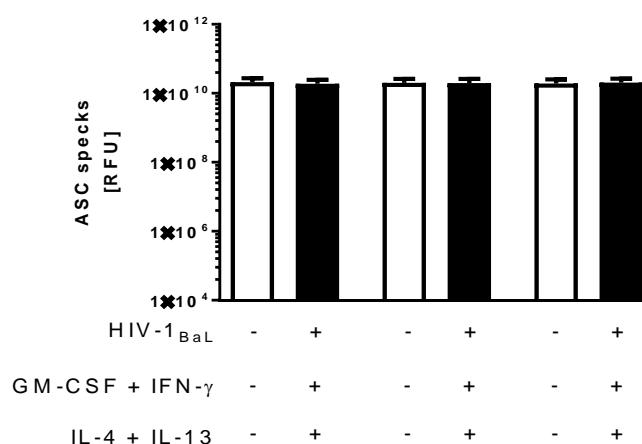


Figura 7. Liberação de specks de ASC no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1. Macrófagos *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram infectados por HIV-1_{BaL} durante 48 horas, conforme descrito anteriormente. Após este período, o sobrenadante das amostras foi coletado e a liberação de specks de ASC foi quantificada por *western blot*, conforme descrito por Franklin e colaboradores (Franklin *et al.*, 2014). As barras brancas representam a expressão de ASC observada no sobrenadante de macrófagos não infectados, enquanto as pretas representam a expressão observada no sobrenadante de células infectadas *in vitro*. Os resultados obtidos ($n=5$) foram representados pela média \pm desvio padrão e foram expressos em unidade relativa de fluorescência (RFU) observada.

5.5 Predição *in silico* de interações entre proteínas virais e do hospedeiro

Com base nos resultados obtidos anteriormente e a liberação de proteínas virais no citoplasma celular desde os estágios iniciais da infecção, consideramos a hipótese de que proteínas do HIV-1 poderiam estar interagindo com outras proteínas celulares e prejudicando o reconhecimento da partícula infectante e ativação adequada da resposta imune, permitindo a evasão viral e a formação de reservatórios virais em macrófagos.

Para testar esta hipótese, inicialmente realizamos ensaios *in silico* para predição de interação entre proteínas utilizando quatro plataformas independentes e algoritmos distintos. A triagem inicial dos dados foi realizada com auxílio da plataforma BioGRID 3.4, a qual realizou uma meta-análise dos dados anteriormente publicados. Considerando a complexidade dos genomas humano e viral, refinamos as possíveis interações inicialmente preditas nesta etapa a partir da exclusão de interações com baixo valor preditivo (com alto potencial de energia livre conformacional) entre as proteínas virais e o proteoma

humano. Mesmo após este processamento inicial dos dados, o grande número de interações preditas resultante foi novamente refinado e classificado de acordo com as funções biológicas da proteína alvo do hospedeiro, utilizando desta etapa em diante os resultados preditos de interação entre proteínas virais e aquelas relacionadas ao desenvolvimento da resposta imunológica (tabela não mostrada).

Aplicando-se este novo filtro de dados, as possíveis interações entre proteínas foram novamente analisadas *in silico* utilizando outras três plataformas de predição: GWIDD, ClusPro e Haddock. Os resultados reportados por cada uma destas plataformas foram agrupados de modo independente e, em seguida, adotamos uma política de consenso para admissão das possíveis interações entre proteínas virais e do hospedeiro. Essa estratégia de análise dos dados foi baseada no maior valor preditivo de cada uma das plataformas de modo independente e considerando-se o estado conformacional proteico de menor energia livre como a forma de maior probabilidade de ocorrência na natureza .

Para validar *in silico* essa estratégia global de análise dos dados, avaliamos se essa metodologia poderia prever a interação entre HIV-1 Gag e APOBEC3G, classicamente descrita na literatura e comprovada através de métodos bioquímicos e imunológicos tradicionais (como co-immunoprecipitação ou cristalografia) (Cen *et al.*, 2004; Friew *et al.*, 2009; Shandilya *et al.*, 2010). Aplicando-se esta metodologia foi possível observar que as três plataformas reportaram, de modo independente, a ocorrência desta interação *in silico* (Figura 8), validando, portanto, essa estratégia de análise dos dados.

Dentre os resultados preditos, as interações entre HIV-1 Nef e diversos alvos celulares do hospedeiro são amplamente descritas e validadas utilizando sistemas biológicos, evidenciando, por exemplo, importância desta proteína para inibição da apoptose mediada por p53, expressão de receptores CD4 em células infectadas e produção de novas partículas virais infecciosas (Poon e Chen, 2003; Goepfert *et al.*, 2008; Pollack *et al.*, 2017). Nesse sentido, priorizamos a análise das interações preditas baseadas em HIV-1 Gag e HIV-1 Vpr, presentes no citoplasma ainda durante as etapas iniciais da infecção e replicação viral, por sugerirem interações com proteínas-chave para o desenvolvimento da resposta imune.

Dessa forma, com base nesses dados, foi predita a interação entre HIV-1 Gag, especialmente a sua porção N-terminal, e IFI16, HLA-DRB5, PPIA, PPIB, PTGES e NLRP3 (Figura 9A-F). Por outro lado, de acordo com essa estratégia, HIV-1 Vpr seria capaz de interagir com BCL2, Caspase-1, Caspase-3, Caspase-9 e PPIA (Figura 10A-E). Em conjunto, estes resultados sugerem que diversas proteínas celulares podem interagir com proteínas viriais presentes desde as etapas iniciais da infecção, podendo resultar em falhas na ativação da resposta imunológica de células infectadas e o estabelecimento da infecção viral.

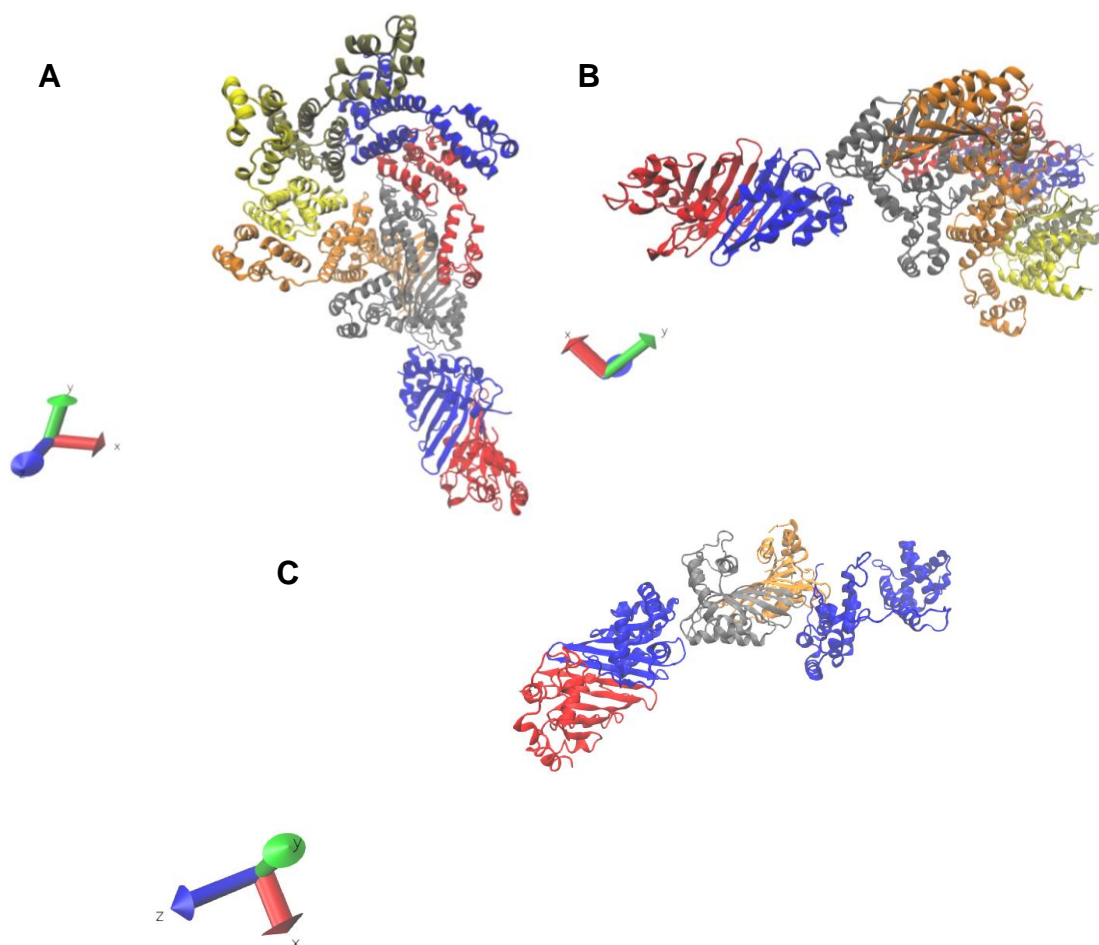


Figura 8. Validação da estratégia de predição de *docking* molecular a partir da interação entre HIV-1 Gag e APOBEC3G. Seguindo a estratégia descrita de mineração dos dados e predição de *docking* entre proteínas de interesse, a interação entre HIV-1 Gag e APOBEC3G também foi predita *in silico*. Esta interação já havia sido descrita na literatura e comprovada por métodos bioquímicos e imunológicos tradicionais, validando a metodologia de análise dos dados *in silico*. (A) Vista frontal da interação na conformação de menor energia livre entre o peptídeo completo de HIV-1 Gag (superior) e APOBEC3G (inferior, em azul e vermelho). (B) Vista lateral da interação entre o peptídeo completo de HIV-1 Gag (direita) e APOBEC3G (esquerda, em azul e vermelho). (C) Vista lateral da interação entre a fração N-terminal de HIV-1 Gag (direita) e APOBEC3G (esquerda, em azul e vermelho). Representação extraída da modelagem obtida a partir da plataforma ClusPro 2.0 e representadas com auxílio do *software* VMD 1.9.3.

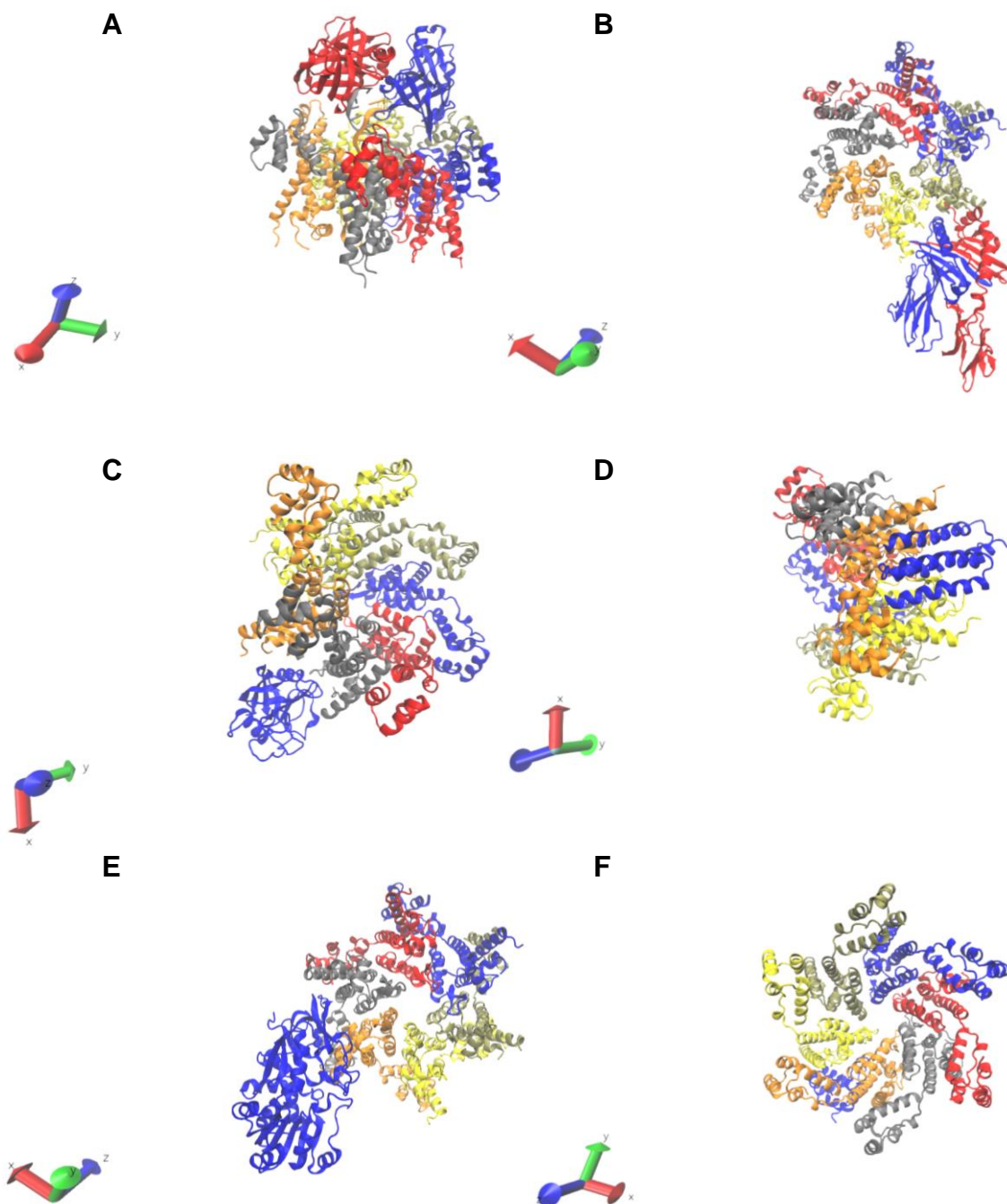


Figura 9. Docking molecular das interações entre HIV-1 Gag e proteínas relacionadas à ativação da resposta imune. Adotando a estratégia de mineração e análise dos dados descrita anteriormente, as interações entre o peptídeo completo de HIV-1 Gag e diferentes proteínas relacionadas à ativação da resposta imune foram previstas *in silico* nas respectivas conformações de menor energia livre. (A) Interação entre HIV-1 Gag (região inferior) e IFI16 (acima; em azul e vermelho); (B) Interação entre HIV-1 Gag (centro) e HLA-DRB5 (inferior; em azul e vermelho); (C) Interação entre HIV-1 Gag (centro) e PPIA (azul; abaixo); (D) Interação entre HIV-1 Gag e PPIB (azul; vista lateral); (E) Interação entre HIV-1 Gag (centro) e PTGES (azul; abaixo); (F) Interação entre HIV-1 Gag (centro) e NLRP3, domínio PYD (em vermelho, na lateral). Representação extraída da modelagem obtida a partir da plataforma ClusPro 2.0 e representadas com auxílio do software VMD 1.9.3.

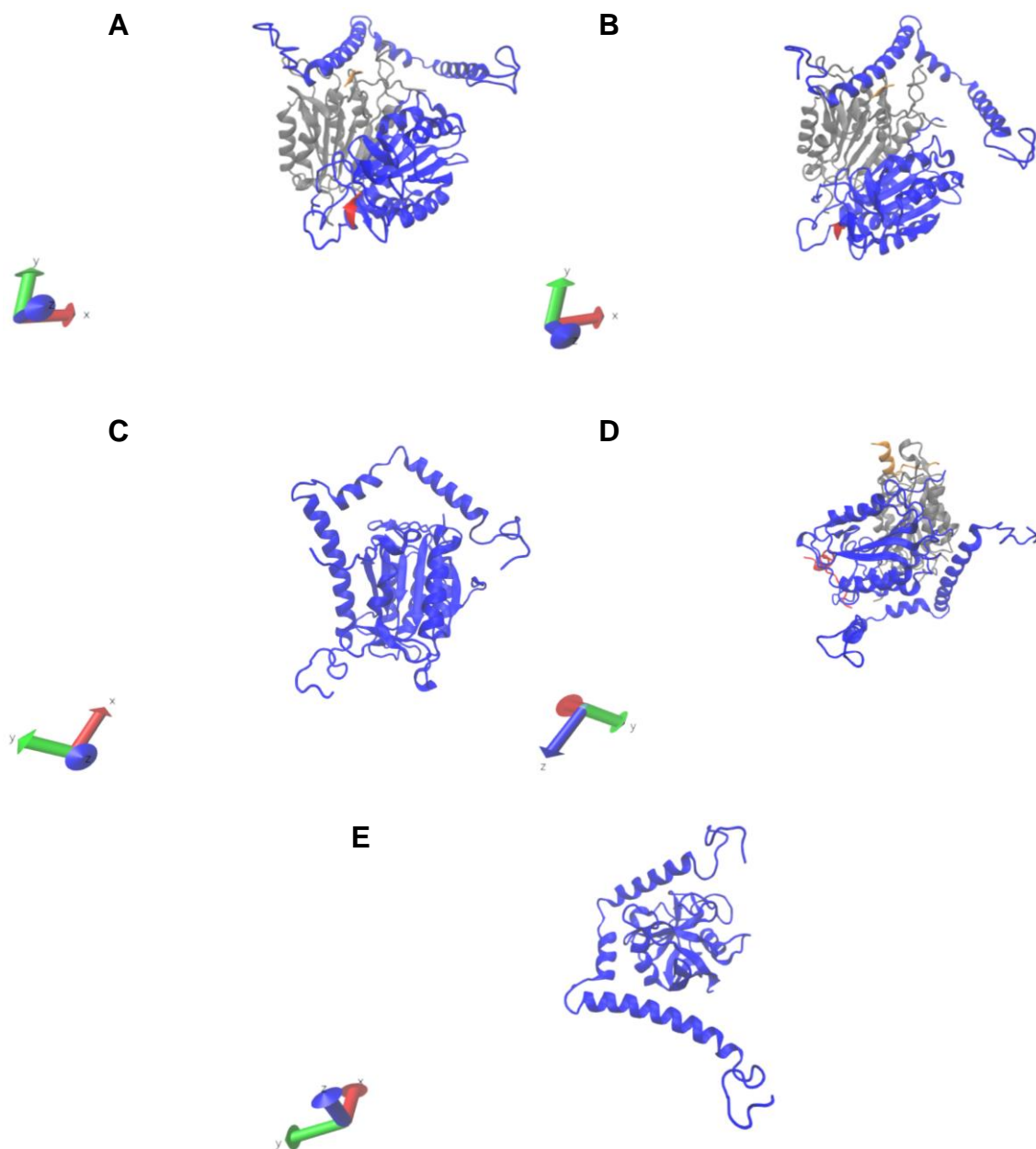


Figura 10. Docking molecular das interações entre HIV-1 Vpr e proteínas relacionadas à ativação da resposta imune. Adotando a estratégia de mineração e análise dos dados descrita anteriormente, as interações entre o peptídeo completo de HIV-1 Vpr e diferentes proteínas relacionadas à ativação da resposta imune foram previstas *in silico* nas respectivas conformações de menor energia livre. (A) Interação entre HIV-1 Vpr (azul; região superior) e BCL2 (abaixo); (B) Interação entre HIV-1 Vpr (acima) e Caspase-1 (inferior; em azul e cinza); (C) Interação entre HIV-1 Vpr (acima) e Caspase-3 (centro); (D) Interação entre HIV-1 Vpr (abaixo) e Caspase-9 (acima); (E) Interação entre HVI-1 Vpr (esquerda) e PPIA (centro). Representação extraída da modelagem obtida a partir da plataforma ClusPro 2.0 e representadas com auxílio do software VMD 1.9.3.

5.6 Quantificação de mediadores lipídicos liberados no sobrenadante de MDMs após a infecção *in vitro* por HIV-1

Considerando os resultados obtidos *in silico* durante as predições de interação entre proteínas, especialmente a interação entre HIV-1 Gag e a enzima Prostaglandina E Sintase (PTGES) e dada a importância desta via para ativação do inflamassoma (Zoccal *et al.*, 2016), questionamos se a liberação de mediadores lipídicos poderia ser afetada durante a infecção por HIV-1, auxiliando no escape da ativação da resposta imunológica. Para testar esta hipótese, MDMs foram mantidos em contato com a suspensão viral por 48 horas e após este período o sobrenadante foi coletado para extração dos mediadores lipídicos e quantificação utilizando espectrômetro de massas, conforme metodologia descrita anteriormente (Galvao *et al.*, 2016).

A avaliação dos resultados obtidos revelou que MDMs *resting* infectados *in vitro* por HIV-1 liberam *trans*-LTB4 em concentrações semelhantes à basal observado no sobrenadante de MDMs *resting* não infectados. De modo interessante, mesmo a adição de ionóforo de cálcio no meio de cultura de MDMs *resting* infectados não induziu o aumento da liberação de *trans*-LTB4, enquanto o estímulo com esse agonista em MDMs *resting* não infectados resultou na maior liberação de *trans*-LTB4 no sobrenadante (Figura 11). Paralelamente, foi observado que MDMs ativados no padrão inflamatório, infectados ou não, liberam níveis basais de *trans*-LTB4, semelhante ao observado no sobrenadante de MDMs *resting* não infectados. Porém, o estímulo com ionóforo de cálcio em MDMs ativados no padrão inflamatório e infectados induziu o aumento da liberação deste mediador, em quantidade semelhante ao observado em MDMs ativados no mesmo padrão, não infectados e estimulados com ionóforo. Por fim, observamos ainda que MDMs ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual liberam níveis basais de *trans*-LTB4 em todas as condições experimentais avaliadas, semelhantes ao observado no sobrenadante de MDMs *resting* não infectados. Curiosamente, não foi possível detectar a presença de PGE2 no sobrenadante de MDMs, mesmo após a infecção por HIV-1 e estímulo adicional com ionóforo de cálcio.

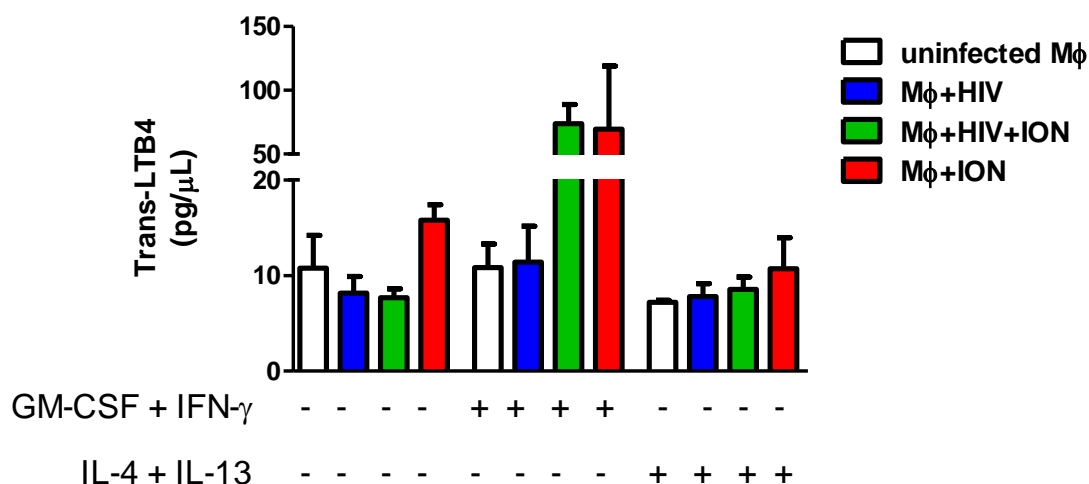


Figura 11. Liberação de *trans*-LTB4 no sobrenadante de MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados *in vitro* por HIV-1. Macrófagos *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com 20 ng/mL de HIV-1Ba-L por 48 horas. Após este período, as células em cultura foram estimuladas com ionóforo de cálcio por 5 minutos para liberação máxima dos mediadores lipídicos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, os mediadores lipídicos presentes na amostra foram extraídos e quantificados por espectrometria de massas (Galvao *et al.*, 2016). Os resultados obtidos ($n=8$) foram expressos em pg/mL e representam a média \pm desvio padrão observada durante a realização de três experimentos independentes.

5.7 Liberação de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de MDMs após a infecção por HIV-1

Com base nesses resultados, avaliamos se a infecção por HIV-1 em macrófagos, além de não induzir a produção de *trans*-LTB4 e a ativação do inflamassoma em MDMs ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual, poderia interferir no metabolismo mitocondrial e prejudicar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), possibilitando a ocorrência de falhas nos mecanismos de ativação do inflamassoma após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs.

A produção destes radicais livres deriva diretamente do metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória para produção de ATPs durante a fosforilação oxidativa. O mecanismo direto de ação das ROS está relacionado à peroxidação de lipídica e formação de poros nas membranas dos patógenos após a sua fagocitose pelos macrófagos ou mesmo seu reconhecimento por sensores presentes na membrana celular que desencadeiam a liberação destas moléculas para o meio extracelular. Entretanto, ao longo dos últimos anos

também foram descritos mecanismos indiretos de ação das ROS que induzem a ativação do inflamassoma, auxiliando a eliminação dos patógenos e ativação da resposta imune (Martinon, 2010; Heid *et al.*, 2013; Abderrazak *et al.*, 2015).

Nesse sentido, reconhecendo a liberação desses radicais livres como importante mecanismo microbicida e para reciclagem de proteínas celulares, além da sua atuação como gatilho para ativação do inflamassoma, consideramos que um possível bloqueio nas vias de produção de ROS durante a infecção viral poderia contribuir para a inativação do inflamassoma e favorecer a evasão da resposta imune em macrófagos. Essa hipótese foi reforçada pelos achados encontrados durante as análises de predição *in silico*, de acordo com os quais pode ocorrer a interação entre HIV-1 Vpr e BCL-2, uma proteína celular relacionada ao controle da permeabilidade da membrana mitocondrial, ativação/inibição de mecanismos de morte celular e bloqueio da ativação do inflamassoma (Chipuk e Green, 2008; Lindsay *et al.*, 2011). Dessa forma, para responder essa pergunta avaliamos a liberação de ROS por MDMs (*resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual) 48 horas após a infecção por HIV-1_{Ba-L}. Após este período, a liberação de ROS no sobrenadante foi quantificada utilizando método de luminescência, conforme descrito anteriormente (Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

A análise dos resultados obtidos durante estes experimentos revelou que MDMs *resting* infectados por HIV-1 tendem a liberar menor quantidade de ROS espontaneamente no sobrenadante quando comparado ao grupo controle (Figura 12). A adição de PMA aos MDMs *resting* infectados restaurou a liberação de ROS a níveis semelhantes aqueles observados em MDMs *resting* não infectados. Entretanto, a adição deste estímulo aos macrófagos em repouso na ausência de infecção não resultou na maior liberação de ROS além dos níveis observados anteriormente. Por sua vez, MDMs ativados no padrão inflamatório, infectados ou não por HIV-1, liberam níveis semelhantes ao basal observado em MDMs *resting* não infectados. Em contrapartida, MDMs ativados no padrão inflamatório, infectados e estimulados com PMA liberam grande quantidade de ROS no sobrenadante, semelhante ao observado em MDMs ativados no mesmo padrão, não infectados e estimulados. Curiosamente, os resultados obtidos a partir do sobrenadante de MDMs ativados no padrão relacionado ao reparo

tecidual indicou a liberação espontânea de ROS por células não infectadas e não estimuladas em níveis semelhantes ao observado em MDMs *resting* não infectadas e não estimuladas. No entanto, MDMs ativadas neste padrão e infectadas por HIV-1 apresentam uma tendência de menor liberação de ROS, a qual permanece inalterada mesmo após o estímulo com PMA. A adição deste estímulo em MDMs ativadas neste padrão não resultou na maior liberação de ROS no sobrenadante para níveis acima daqueles observados anteriormente a partir da liberação espontânea de MDMs não infectados. De forma geral, podemos concluir que a infecção por HIV-1 interfere na liberação de ROS de forma distinta entre os estágios de ativação de macrófagos, prejudicando especialmente a liberação deste mediador por MDMs *resting* ou ativadas no padrão relacionado ao reparo tecidual, mesmo após adição de PMA.

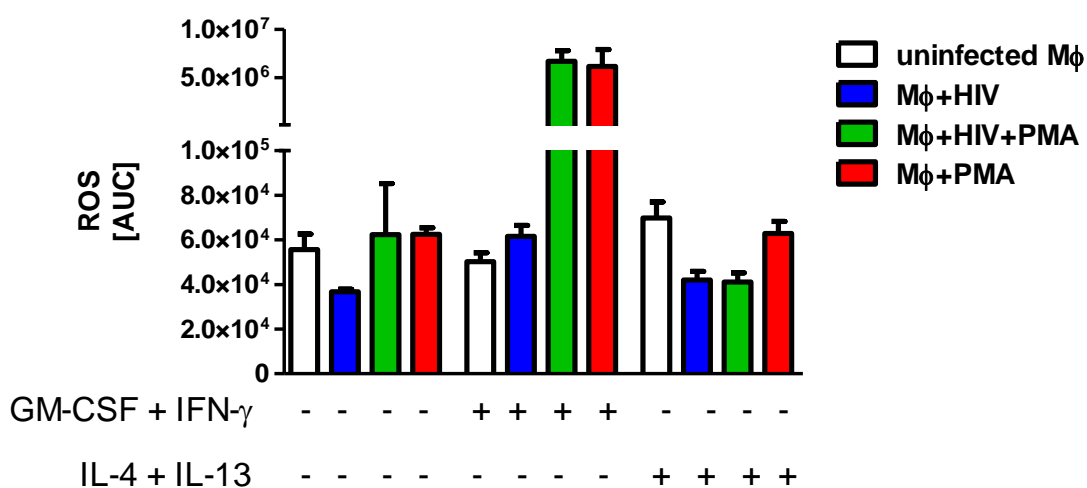


Figura 12. Liberação de ROS no sobrenadante de MDMs *resting*, ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectadas *in vitro* por HIV-1. Macrófagos *resting*, ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com 20 ng/mL de HIV-1_{Ba-L} por 48 horas. Em seguida, as células foram estimuladas com PMA e as ROS liberadas no sobrenadante foram quantificadas por luminescência. As barras brancas representam as células não infectadas; as azuis, MDMs infectadas por HIV-1; as verdes, MDMs infectadas por HIV-1 e estimuladas com PMA; e as vermelhas, MDMs não infectadas e apenas estimuladas com PMA. Os resultados obtidos ($n=8$) representam a área sob a curva medida no luminômetro após 2 horas de leitura.

5.8 Alterações na estrutura das mitocôndrias e localização intracelular de NLRP3 e Caspase-1 em MDMs após a infecção por HIV-1

Durante o processo de sinalização mitocondrial que contribui para sobrevivência celular, a neutralização de BIM a partir da interação com os receptores MCL-1 e BCL-2 e a fosforilação mediada por ERK 1/2 para posterior degradação via proteassoma são fundamentais para manutenção da integridade mitocondrial e da viabilidade celular. No entanto, quando BAK passa a interagir com os receptores MCL-1 e BCL-2 ocorre a liberação de citocromo c para o citoplasma, resultando na ativação de mecanismos apoptóticos (Hendrickson *et al.*, 2008). Recentemente, Castellano e colaboradores demonstraram que macrófagos e células da micróglia infectadas por HIV são capazes de sobreviver a fase aguda da infecção a partir do recrutamento de BIM no interior da mitocôndria, bloqueando a liberação do citocromo c e ativação de mecanismos apoptóticos (Castellano *et al.*, 2017). Nesse sentido, considerando os resultados anteriores e a interação predita entre HIV-1 Vpr e BCL-2, avaliamos se este mecanismo dependente de BIM também poderia interferir na estrutura mitocondrial e contribuir para sobrevivência por longos períodos de MDMs infectados.

Paralelamente, dentre os principais mecanismos necessários para ativação do inflamassoma, a sinalização dependente de NLRP3 é particularmente importante uma vez que é capaz de reconhecer uma ampla variedade de sinais de perigo e associados a presença de microrganismos no interior celular - como formação de poros na membrana, efluxo de potássio e liberação de ROS – podendo resultar na morte celular (Guo *et al.*, 2015; Broz e Dixit, 2016). Diante desse contexto, considerando os resultados anteriores da predição entre HIV-1 Gag e NLRP3, avaliamos ainda se, de fato, esta interação ocorre *in vitro* / *in vivo* e quais as possíveis consequências para complexação de proteínas, montagem e ativação do inflamassoma, especialmente dependente de NLRP3, em MDMs infectados por HIV-1. Para testar estas duas hipóteses, MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com as suspensões virais durante 24 horas e, em seguida, permeabilizados e submetidos a análise por imunofluorescência para

avaliar a localização intracelular de NLRP3, Caspase-1 e BIM, além da estrutura mitocondrial.

A análise dos nossos resultados indicou que ocorre um discreto aumento no sinal detectado de Caspase-1, uniformemente disperso no citoplasma, em MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual e infectados quando comparado aos respectivos controles (Figura 13A-F). Por outro lado, a adição de Mitotracker™ Red CMXRos revelou a presença de alterações morfológicas e na dispersão citoplasmática de mitocôndrias de MDMs 24 horas após a infecção por HIV-1.

Com base nesses achados, investigamos se a infecção por HIV-1 interfere na sinalização mitocondrial mediada por BIM, uma proteína capaz de interagir com MCL-1/BCL-2 e impedir a liberação de sinais pro-apoptóticos. A manutenção desta via de sinalização ativa, apesar do reconhecimento por sensores citoplasmáticos da infecção viral, pode estar relacionada à manutenção da viabilidade celular de MDMs infectados e formação de reservatórios virais nos tecidos. Nesse sentido, os nossos resultados indicaram a maior presença de BIM em MDMs infectados ativados nos três padrões distintos (*resting*, inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual) em relação aos respectivos controles não infectados (Figura 14A-F). Em conjunto, estes dados sugerem que outras proteínas poderiam estar interagindo com MCL-1/BCL-2 – como HIV-1 Vpr, predita anteriormente *in silico* – alterando a arquitetura mitocondrial e impedindo a neutralização de BIM, possibilitando a sua detecção por imunofluorescência. A ativação deste mecanismo, no entanto, não resultaria na liberação do citocromo c para o citoplasma dos MDMs infectados e na ativação de mecanismos apoptóticos.

Paralelamente, avaliamos ainda o efeito da infecção viral na distribuição celular de NLRP3 em MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual. A análise dos resultados obtidos indicou a presença de grande quantidade de HIV-1 p24, um peptídeo derivado da clivagem de HIV-1 Gag, disperso no citoplasma e na região perinuclear de MDMs 24 horas após o contato com a suspensão viral, evidenciando que, de fato, estas células tornaram-se infectadas (Figura 15A-C). De modo interessante, observamos ainda a redistribuição de NLRP3 no citoplasma de MDMs infectados, passando

a concentrar-se na região perinuclear e próximo a agregados de HIV-1 p24. Em conjunto, estes dados sugerem que MDMs conseguem reconhecer a infecção viral desde as etapas iniciais, evidenciado pela redistribuição citoplasmática de NLRP3 após a infecção. No entanto, de acordo com os dados obtidos durante as predições de interação *in silico*, proteínas virais atuam para neutralizar a ativação do inflamassoma ou de vias que resultem na morte celular induzida por apoptose/piroptose em MDMs infectados.

Dessa forma, apesar de permanecerem viáveis por longos períodos, MDMs infectados são capazes de liberar citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de outros subtipos celulares *in vivo*, mas apresentam deficiências funcionais importantes – como durante a produção de ROS, mediadores lipídicos e ativação do inflamassoma. Em conjunto, a indução desse conjunto de falhas nos sensores intracelulares prejudica o desenvolvimento adequado da resposta imune inata e a morte celular mediada por apoptose/piroptose, possibilitando o estabelecimento da infecção crônica por HIV-1 em MDMs, a formação de reservatórios virais e a disseminação para outros subtipos celulares.

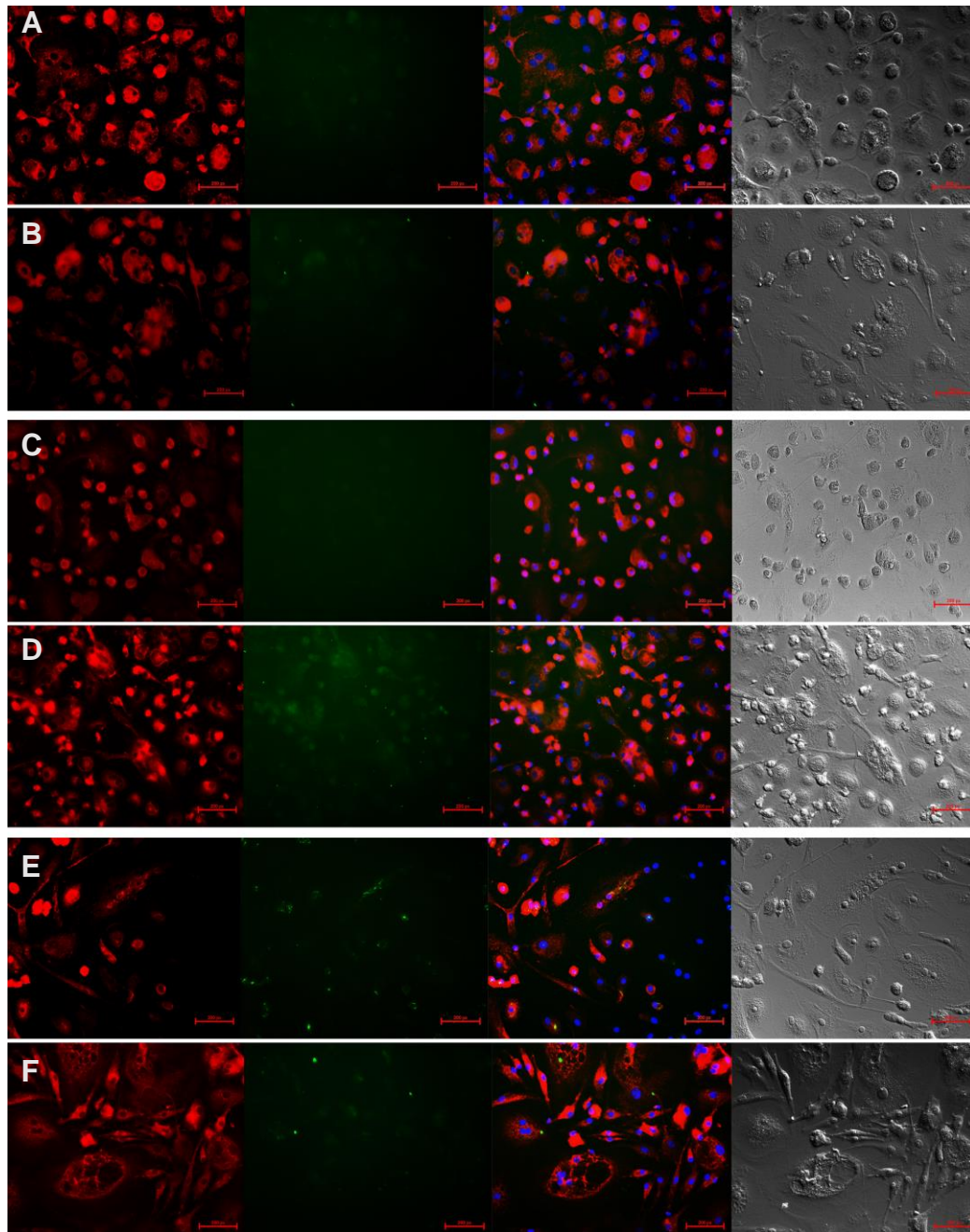


Figura 13. Avaliação da estrutura mitocondrial e localização intracelular de Caspase-1 em MDMs 24 horas após a infecção por HIV-1. MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com HIV-1 por 24 horas, permeabilizados e incubados com Mitotracker™ Red CMXRos para avaliação da estrutura mitocondrial (vermelho) e anticorpo anti-Caspase-1 (verde) por imunofluorescência. O núcleo foi corado com NucBlue (azul). Resultados obtidos em (A) e (B) MDMs *resting* não infectados e infectados, respectivamente; (C) e (D) MDMs ativados no padrão inflamatório não infectados e infectados, respectivamente; (E) e (F) MDMs ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual não infectados e infectados, respectivamente. A primeira coluna de imagens ilustra morfologia mitocondrial após 24 horas de infecção *in vitro*; A segunda, a localização intracelular de Caspase-1 após este período; A terceira, o *merge* das imagens adquiridas utilizando objetiva de 40x; e, por fim, a imagem em campo claro ilustrando a morfologia geral das células analisadas.

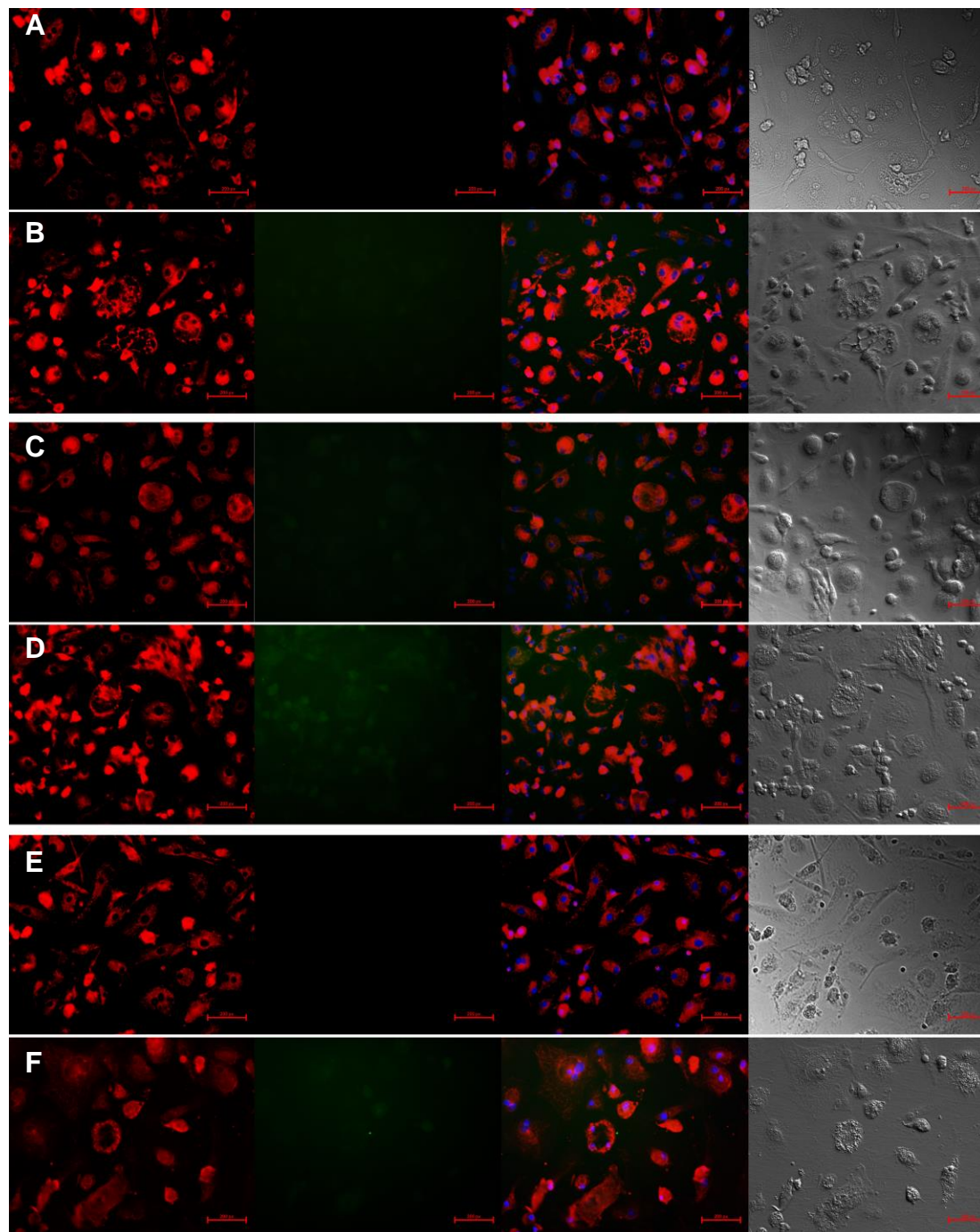


Figura 14. Avaliação da estrutura mitocondrial e localização intracelular de BIM em MDMs 24 horas após a infecção por HIV-1. MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual foram incubados com HIV-1 por 24 horas, permeabilizados e incubados com Mitotracker™ Red CMXRos para avaliação da estrutura mitocondrial (vermelho) e anticorpo anti-BIM (verde) por imunofluorescência. O núcleo foi corado com NucBlue (azul). Resultados obtidos em (A) e (B) MDMs *resting* não infectados e infectados, respectivamente; (C) e (D) MDMs ativados no padrão inflamatório não infectados e infectados, respectivamente; (E) e (F) MDMs ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual não infectados e infectados, respectivamente. A primeira coluna de imagens ilustra morfologia mitocondrial após 24 horas de infecção *in vitro*; A segunda, a localização intracelular de BIM após este período; A terceira, o *merge* das imagens adquiridas utilizando objetiva de 40x; e, por fim, a imagem em campo claro ilustrando a morfologia geral das células analisadas.

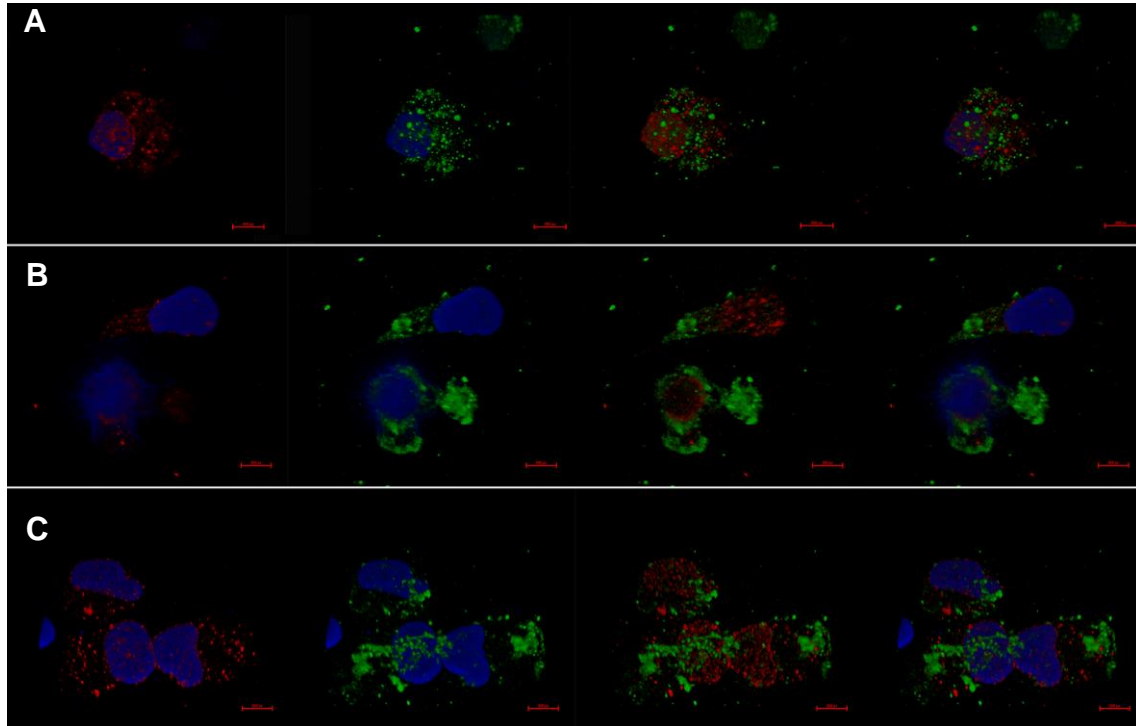


Figura 15. Localização intracelular de HIV-1 p24 e NLRP3 em MDMs 24 horas após a infecção viral. MDMs *resting*, ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual ($n=2$) foram incubados com HIV-1 por 24 horas, permeabilizados e incubados com anticorpos para identificação da localização intracelular de HIV-1 p24 (vermelho) e NLRP3 (verde) por imunofluorescência. O núcleo foi corado com DAPI (azul). Resultados obtidos em (A) MDMs *resting*; (B) MDMs ativados no padrão inflamatório; e (C) MDMs ativados no padrão relacionado ao reparo tecidual. A primeira coluna de imagens ilustra a localização de HIV-1 p24 em relação ao núcleo; a segunda, NLRP3 em relação ao núcleo; a terceira, a localização de HIV-1 p24 e NLRP3 simultaneamente; e, por fim, o *merge* de todas as imagens adquiridas utilizando objetiva de 100x.

*PARTÉ II - Caracterização
inicial e avaliação da formação
de reservatórios virais em
populações de macrófagos
presentes nos tecidos de acordo
com a sua origem embrionária*

5.9 Expressão diferencial de marcadores na superfície celular em macrófagos derivados do saco vitelínico ou de monócitos presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV

Ao longo dos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado que o conjunto de células genericamente denominado de “macrófagos” são originados de células progenitoras distintas, compondo um conjunto de duas subpopulações celulares presente nos tecidos durante a fase adulta. Muito além das semelhanças entre a atividade fagocítica e produção de citocinas e quimiocinas, trabalhos recentes evidenciaram que estas células apresentam perfis transcricionais complexos e que resultam nas diferenças observadas entre a distribuição tecidual e funções específicas dessas subpopulações (Ginhoux e Williams, 2016; Ginhoux *et al.*, 2016).

Ontogenicamente, YSDMs são derivados de células progenitoras do saco vitelínico, ainda durante as primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, e são responsáveis pela remodelação dos órgãos e tecidos em formação. Em alguns tecidos, no entanto, estas células são progressivamente substituídas por MDMs, derivados das células progenitoras da medula óssea, portanto, durante o desenvolvimento da fase adulta. Em comum, estas duas subpopulações de macrófagos apresentam a capacidade de fagocitar patógenos e outros debris celulares, apresentar antígenos e recrutar outras células para os tecidos após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs. No entanto, considerando o papel dos MDMs no contexto da infecção por HIV-1, ainda não está claro qual o papel dos YSDMs no estabelecimento da infecção e sua contribuição para formação de reservatórios virais nos tecidos.

Diante desse contexto, avaliamos a expressão de diversas proteínas presentes na superfície celular por citometria de fluxo e buscamos encontrar marcadores diferencialmente expressos que fossem úteis para distinguir as duas subpopulações de macrófagos de acordo com a sua origem embrionária. Para realização deste experimento foi coletada uma pequena biopsia de fígado proveniente de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV e virologicamente supresso por 8 meses com uso de antirretrovirais.

Traçando-se a *gate* de análise inicial na região compatível com a presença de células mononucleares, identificamos a presença de duas

subpopulações celulares expressando CD11b+CD64+HLA-DR+, mas divergindo na expressão de CD163 e MMR (CD209) na superfície celular (Figura 16). Os pontos vermelhos representados nos *dotplots* identificam as células com tamanho e complexidade compatíveis aos macrófagos, enquanto os azuis representam as demais células mononucleares presentes na *gate* inicial. Dessa forma, considerando os resultados obtidos durante os nossos experimentos utilizando células de primatas não-humanos e comparando com os resultados presentes na literatura, os quais foram obtidos principalmente utilizando camundongos, sugerimos que a população de MDMs seja caracterizada pela expressão de CD11b+ MMR^{neg} HLA-DR+ CD64+ CD163^{low/neg}, enquanto a população de YSDMs seja caracterizada pela expressão de CD11b+ MMR+ HLA-DR+ CD64+ CD163^{hi}.

5.10 Avaliação da capacidade fagocítica e presença de MDMs infectados por SIV no fígado de macaco Rhesus submetido à terapia antirretroviral

Com intuito de confirmar a funcionalidade e a capacidade de tornarem-se infectados por longos períodos, YSDMs e MDMs foram purificados de acordo com o perfil de expressão dos marcadores descritos anteriormente, plaqueados e mantidos em repouso por 3 dias para permitir a aderência das células em cultura. Após este período, observamos que os YSDMs plaqueados não estavam mais viáveis, prosseguindo-se o experimento apenas com os MDMs.

Dessa forma, após 7 dias em cultura, avaliamos a funcionalidade dos MDMs mantidos em cultura através da capacidade fagocítica. Para tanto, os MDMs em cultura foram incubados com pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles™ (ThermoFisher) durante 2 horas e marcados intracelularmente para identificação dos filamentos de F-actina (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin; ThermoFisher). Em seguida, as células foram analisadas por imunofluorescência. Os resultados da avaliação morfológica evidenciaram a semelhança entre os MDMs derivados da biópsia hepática e aqueles do sangue periférico. A avaliação da capacidade fagocítica demonstrou ainda a funcionalidade dos MDMs *in vitro*, dada a abundante detecção de biopartículas presentes no interior das células mantidas em cultura, conforme representado na Figura 17A.

Por fim, questionamos se os MDMs obtidos da biópsia hepática de macacos Rhesus cronicamente infectados por SIV e virologicamente supressos com antirretrovirais durante 8 meses poderiam estar infectados e, a despeito da carga viral indetectável no sangue periférico, abrigar um possível foco de produção de novos vírus. Para investigar esta hipótese, os MDMs em cultura foram permeabilizados e incubados com anticorpos primários anti-HIV-1 p24 conjugados, capazes de interagir também com SIV p27, e avaliados por imunofluorescência. De modo interessante, nossos resultados evidenciaram a presença de SIV p27 no citoplasma de uma parcela significativa dos MDMs mantidos em cultura (Figura 17B). Em conjunto esses dados sugerem que também os MDMs presentes no fígado de macaco Rhesus submetidos à terapia antirretroviral contínua e com carga viral indetectável no sangue periférico podem ser cronicamente infectados por SIV e representar uma importante fonte de novos vírus nos tecidos ao longo do curso da infecção.

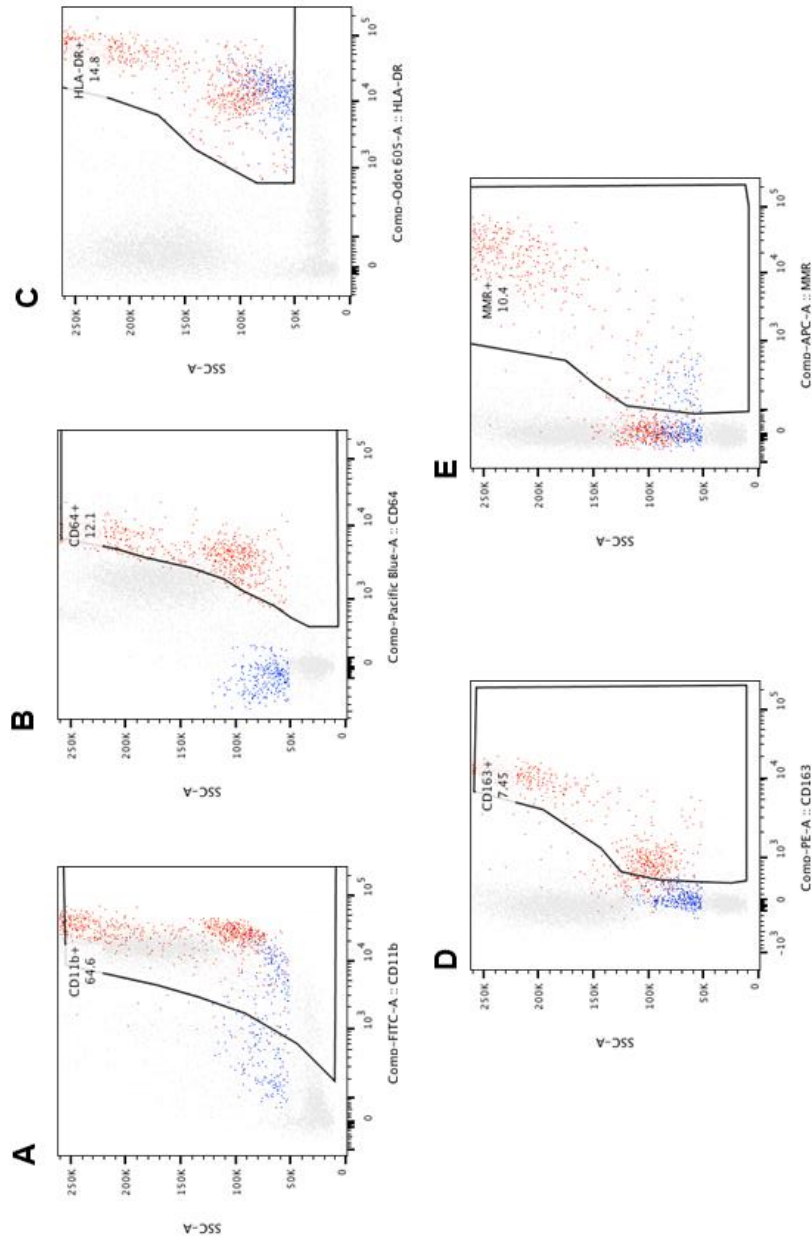


Figura 16. Expressão diferencial de marcadores na superfície celular em macrófagos presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV. Após a coleta de biópsia de fígado ($n=1$) proveniente de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV e tratado com antirretrovirais, as células presentes na amostra foram isoladas e, em seguida, incubadas com diferentes anticorpos para avaliação da expressão de proteínas presentes na superfície celular por citometria de fluxo. Representação dos resultados obtidos durante a citometria de fluxo relativos à expressão de (A) CD11b; (B) CD64; (C) HLA-DR; (D) CD163; e (E) MMR (CD209) nas células presentes na amostra. A *gate* inicial foi estabelecida na região compatível com a presença de células mononucleares. Os pontos representados nos *dotplots* em vermelho identificam as células com tamanho e complexidade semelhante aos macrófagos, enquanto os pontos azuis representam as demais células mononucleares presentes na análise inicial.

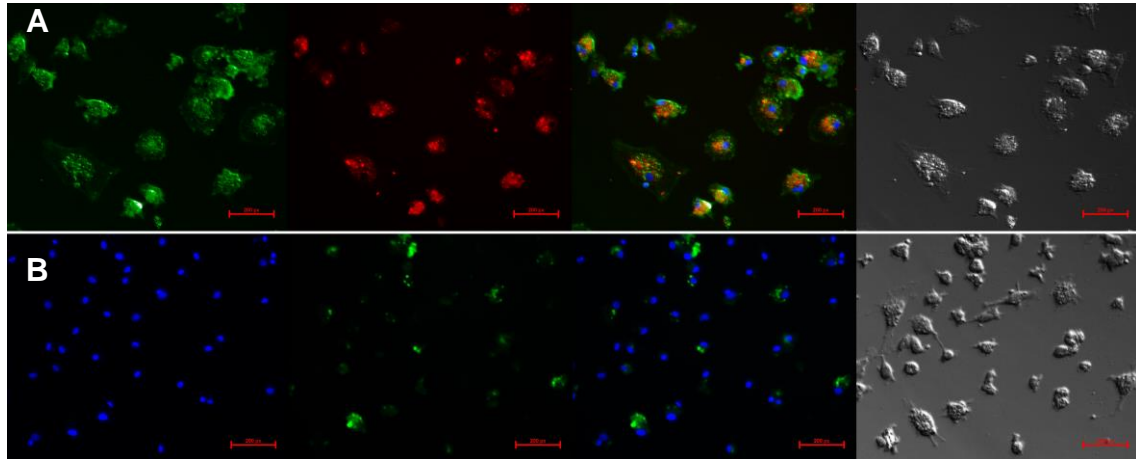


Figura 17. Avaliação da atividade fagocítica e expressão de SIV p27 por imunofluorescência em MDMs presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV e submetido à terapia antirretroviral. Após o isolamento dos MDMs presentes na biópsia de fígado coletada anteriormente ($n=1$), as células foram submetidas a ensaio para avaliação da fagocitose e expressão de proteínas virais no citoplasma. (A) Atividade fagocítica observada em MDMs após 2 horas de incubação com pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles™. A primeira imagem representa a fluorescência emitida pela identificação dos filamentos de F-actina; A segunda, a fluorescência pelas biopartículas de *E. coli* após a fagocitose pelos MDMs; A terceira, o *merge* das imagens adquiridas utilizando objetiva de 40x; e a quarta, a mesma imagem em campo claro ilustrando a morfologia geral das células analisadas. (B) Representação da expressão observada de SIV p27 em MDMs presentes no fígado de macaco Rhesus cronicamente infectado por SIV. A primeira imagem representa a fluorescência emitida pela coloração do núcleo com NucBlue® Live ReadyProbes®; A segunda, a fluorescência pela presença de SIV p27 no citoplasma de MDMs; A terceira, o *merge* das imagens adquiridas utilizando objetiva de 40x; e a quarta, a mesma imagem em campo claro ilustrando a morfologia geral das células analisadas.

6. *DISCUSSÃO*

6.1 Estratégias de evasão viral da resposta imune em macrófagos a partir da interação entre HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e proteínas celulares

Dentre os primeiros eventos que ocorrem após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs por células da imunidade inata, a liberação de citocinas e quimiocinas no microambiente tecidual desempenha um papel-chave na ativação de outras células e induz a migração de outros subtipos celulares. Nesse contexto, as diversas proteínas que compõem o complexo de ativação do inflamassoma atuam como um importante conjunto de sensores associados que são ativados após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs, sendo a liberação de IL-1 β e IL-18 uma das principais marcas de ativação deste sistema (Lamkanfi e Dixit, 2014).

Simultaneamente a estes eventos, o reconhecimento de citocinas no microambiente pode induzir a ativação de macrófagos em dois padrões distintos: o primeiro relacionado ao desenvolvimento e progressão da resposta inflamatória; e o segundo relacionado ao reparo tecidual. Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado a influência da infecção por HIV-1 na ativação do inflamassoma e desenvolvimento da resposta imune mediada por macrófagos e outras células da imunidade inata (Herbein e Varin, 2010; Doitsh *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2014). Nesse sentido, Pontillo e colaboradores descreveram que a infecção *in vitro* por HIV-1 é capaz de induzir apenas a expressão de NLRP3 em células dendríticas de indivíduos saudáveis, mas não em células obtidas de pacientes previamente infectados, enquanto Guo e colaboradores demonstraram que a produção de IL-1 β é dependente da sinalização de TLR8 e NLRP3 em monócitos humanos (Pontillo *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014).

No presente estudo, avaliamos inicialmente a liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de MDMs *resting* ou ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual após a infecção *in vitro* por HIV-1. A análise dos nossos dados indicou que os três padrões de ativação dos MDMs são capazes de reconhecer a infecção viral e liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (como IFN- α 2, TNF- α e CXCL10), mas apenas os MDMs *resting* induzem a ativação do inflamassoma, representado pela liberação de IL-1 β (Figura 3). Nesse sentido, a falha na ativação do inflamassoma de células

previamente ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual ganha destaque, sugerindo que a infecção por HIV-1 interfere na liberação de mediadores responsáveis pela ativação de outros subtipos celulares, podendo prejudicar a ativação da resposta imunológica dependente de macrófagos.

Nesse contexto, vale ressaltar que, apesar da existência de citocinas capazes de induzir a polarização celular na fonte de soro utilizada para suplementar o meio de cultura, a presença de MDMs *resting* só é possível em estudos *in vitro*, uma vez que durante a migração dos monócitos para os tecidos e sua posterior diferenciação em macrófagos ocorre o reconhecimento de citocinas (como IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10) no microambiente tecidual, as quais são capazes de ativar os MDMs nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual.

Esses achados foram corroborados pelas análises de correlação global de liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante, onde MDMs *resting* infectados apresentaram mais correlações positivas entre a liberação de citocinas pro-inflamatórias quando comparado ao respectivo controle não-infectado (Figura 4). Em contrapartida, a análise de correlação entre a liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de MDMs ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual indicou a alteração no perfil de liberação de citocinas, com a existência de um número menor de correlações positivas fortes/moderadas e alteração no padrão em relação aquelas observadas em MDMs não infectados.

Em conjunto, estes dados levaram à formulação de duas hipóteses distintas: 1) macrófagos ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual são mais resistentes ao processo de infecção inicial por HIV-1, resultando na menor internalização de partículas virais e consequentemente menor ativação de vias de sinalização celular – incluindo aquelas do complexo inflamassoma -, prejudicando o sucesso da infecção viral; ou 2) todos os MDMs conseguem ser igualmente infectados, independente do seu padrão de ativação. No entanto, em células previamente ativadas, o vírus consegue escapar do reconhecimento pelos sensores moleculares, impedindo a ativação do inflamassoma (evidenciado pela liberação de IL-1 β) e a ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B.

Nesse sentido, para testar estas hipóteses avaliamos a expressão de genes relacionados à ativação celular, ativação do inflamassoma e de fatores de restrição da replicação viral em macrófagos 18 horas após a infecção *in vitro* por HIV-1 (Figura 5).

A análise desses resultados indicou o aumento da expressão de genes pro-inflamatórios (como *CXCL10*) em MDMs *resting* ou ativadas no padrão inflamatório, corroborando os dados obtidos na quantificação de citocinas presentes no sobrenadante. Embora o aumento da expressão de *CXCL10* em MDMs ativadas no padrão relacionado ao reparo tecidual não tenha sido estatisticamente significativo, os dados obtidos neste estudo corroboram em parte os achados descritos por Chihara e colaboradores, no qual proteínas recombinantes de HIV-1 (como gp120 e Nef) seriam capazes de induzir a reprogramação celular *in vitro* e o aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias (como *CXCL10*) por MDMs ativadas no padrão relacionado ao reparo tecidual, tornando-os semelhantes aqueles ativadas no padrão inflamatório (Chihara et al., 2012). Nossos dados, no entanto, não apresentam indícios de mudanças no padrão de ativação de MDMs após a infecção, aqui representadas pela expressão de *ALOX15*.

A redução observada na expressão de *SPTBN1*, fundamental para o sucesso ainda nas fases iniciais da infecção viral, observada em MDMs ativadas no padrão inflamatório e infectados pode estar associada a ativação de mecanismos para evitar a superinfecção em macrófagos. Embora não tenhamos investigado os mecanismos relacionados à redução na expressão deste gene, outros trabalhos já demonstraram que a redução induzida por IL-27 na expressão deste gene foi anteriormente associada à inibição da infecção por HIV-1 em macrófagos (Dai et al., 2013; Swami, 2013). Por outro lado, não observamos diferenças na expressão de *CPSF6* entre os grupos analisados, descrito como um importante co-fator celular capaz de interagir com proteínas do capsídeo viral sem ativar os sensores da imunidade inata e contribuir para o sucesso da infecção por HIV-1 (Schaller et al., 2011; Price et al., 2012; Rasaiyaah et al., 2013).

Paralelamente, observamos ainda a expressão em níveis semelhantes de *NLRP3*, *AIM2* e *RIG-I*, genes diretamente relacionados à ativação do

inflamassoma, assim como de *SAMHD1*, importante fator de restrição da replicação viral, nos três padrões de ativação dos MDMs infectados em relação aos seus respectivos controles.

Classicamente, a ativação do inflamassoma requer o reconhecimento de dois sinais (PAMPs ou DAMPs) para a ativação das caspases, liberação de IL-1 β e desencadeamento dos mecanismos efetores associados à esta via de sinalização: o primeiro sinal é mediado por sensores presentes na superfície celular e ativado a partir do reconhecimento de microrganismos e/ou moléculas endógenas, resultando na indução da expressão gênica de NLRP3 e pro-IL-1 β a partir da ativação do NF- κ B, por exemplo. O segundo sinal ativado na sequência pode ser desencadeado pelo reconhecimento de ATP no meio extracelular, formação de poros, e reconhecimento de PAMPs através de receptores intracelulares, por exemplo (He *et al.*, 2016).

Considerando estes dados, avaliamos a expressão proteica de NLRP3 e ativação de NF- κ B e Casp-1 após a infecção *in vitro* por HIV-1. Apesar das diferenças observadas nas citocinas liberadas no sobrenadante, não observamos diferenças significativas na expressão de NF- κ B fosforilado, NLRP3 e Caspase-1 em MDMs após 8 horas de incubação com a suspensão viral (Figura 6). Possivelmente, a alteração na atividade destas proteínas ocorre em etapas anteriores ao período observado no presente estudo, resultando na liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das células infectadas. Nesse contexto, Pontillo e colaboradores demonstraram que a infecção por HIV-1 induz a expressão de NLRP3 e liberação de IL-1 β em células dendríticas de indivíduos saudáveis, mas não de células obtidas de pacientes infectados por HIV-1, enquanto a ativação do inflamassoma em células da micróglia foi associada à ocorrência de lesões neurológicas em pacientes HIV-1+ (Pontillo *et al.*, 2012; Walsh *et al.*, 2014).

Dessa forma, os achados descritos no presente trabalho (especialmente aqueles relativos à liberação de citocinas no sobrenadante) corroboram com aqueles descritos por Hernandez e colaboradores, onde a infecção por HIV-1 atuaria como fonte do primeiro sinal de ativação do inflamassoma dependente de NLRP3 em MDMs *resting*, mas não naqueles ativados nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual (Hernandez *et al.*, 2014). Isoladamente, este

sinal não seria responsável por induzir a formação do complexo multiproteico e a liberação de IL-1 β , mas permitiria a ativação de NF- κ B, o qual atuaria induzindo a expressão gênica de citocinas e de NLRP3, por exemplo. Apesar de Hernandez e colaboradores não apresentarem dados relativos à expressão gênica de *NLRP3* e ativação de NF- κ B e Casp-1, esta aparente divergência entre os resultados pode ter sido ocasionada pelos períodos escolhidos para avaliação após a infecção *in vitro*. Para tentar esclarecer esta questão, novos experimentos deverão ser realizados avaliando a expressão gênica e atividade proteica em diferentes períodos após a infecção *in vitro*.

Com base nestes achados, avaliamos se a infecção por HIV-1 em MDMs poderia induzir a liberação de *specks* de ASC no sobrenadante, um importante DAMP associado à ativação de morte celular por piroptose (Figura 7). No entanto, de modo surpreendente, 48 horas após a infecção viral não foram observadas alterações significativas na liberação de *specks* no sobrenadante de MDMs infectados. Este resultado foi particularmente intrigante, uma vez que MDMs são cronicamente infectados por HIV-1 e a liberação desta proteína para o meio extracelular é um sinal importante da ativação do inflamassoma e atua como fonte de propagação do sinal pro-inflamatório (Franklin *et al.*, 2014). No entanto, a inibição da liberação dessa proteína após a infecção por HIV-1 corrobora a ideia de que macrófagos podem atuar como reservatórios virais durante a infecção por HIV-1, uma vez que são resistentes à morte celular induzida por apoptose/piroptose, ao contrário do que ocorre em linfócitos T CD4+ infectados (Doitsh *et al.*, 2014).

Nesse sentido, considerando a capacidade de macrófagos serem cronicamente infectados por HIV-1, induzirem a ativação dos estágios iniciais do inflamassoma, mas serem resistentes à morte celular, nossa hipótese de trabalho passou a considerar que proteínas virais presentes nos primeiros ciclos de replicação seriam capazes de interagir com sensores da imunidade inata presentes em macrófagos e impedir o adequado funcionamento da resposta imune. Para testar essa hipótese, elaboramos uma estratégia de análise de predição de interações *in silico* utilizando 4 plataformas distintas e adotamos uma política de consenso entre os resultados para identificação das interações proteicas mais prováveis de ocorrer na natureza.

Dentre os vários modelos preditos utilizando esta abordagem, destacaram-se as interações preditas entre HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e diversos alvos celulares. Após a validação desta estratégia de análise (Figura 8) e filtrando-se os dados obtidos com base na relevância de cada alvo para ativação da resposta imune, identificamos prováveis interações relacionadas a ISGs (como HIV-1 Gag e IFI16), atividade mitocondrial (HIV-1 Vpr e BCL2), síntese de mediadores lipídicos (HIV-1 Gag e PTGES) e indução de mecanismos apoptóticos (HIV-1 Gag / HIV-1 Vpr e PPIA) (Figuras 9 e 10). De fato, diversos trabalhos evidenciaram que a infecção por HIV-1 com cepas defeituosas está associada à redução do *fitness* e infectividade viral, além da ativação eficiente da resposta imune (Zennou *et al.*, 1998; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Poon e Chen, 2003; Goepfert *et al.*, 2008; Pollack *et al.*, 2017).

Considerando os resultados obtidos *in silico*, avaliamos se as interações preditas após infecção viral poderiam interferir na síntese de mediadores lipídicos e produção de espécies reativas de oxigênio. Recentemente, Zhong e colaboradores demonstraram que a produção de ROS e a oxidação do DNA mitocondrial causada durante o metabolismo celular pode ser reconhecido por NLRP3 e induzir a ativação do inflamassoma (Zhong *et al.*, 2018). Apesar dos moderados efeitos descritos na liberação de *trans*-LTB4 e de ROS em MDMs infectados (Figuras 11 e 12), a análise por imunofluorescência da estrutura mitocondrial e localização intracelular de Caspase-1 indicou a ocorrência alterações morfológicas e na dispersão citoplasmática de mitocôndrias, além de um discreto aumento no sinal detectado em MDMs 24 horas após a infecção (Figura 13). Esses achados serviram de base para o questionamento se o mecanismo relacionado à sobrevivência por longos períodos de MDMs infectados por HIV-1 poderia estar relacionado à inibição da morte celular por apoptose/piroptose, desencadeada por proteínas mitocondriais.

Nesse sentido, ao longo dos últimos anos diversos trabalhos têm demonstrado a importância de BIM na manutenção da viabilidade celular (Dewson e Kluck, 2009; Martinou e Youle, 2011; Westphal *et al.*, 2011). Recentemente, Castellano e colaboradores demonstraram que MDMs e micróglia infectados por HIV-1 sobrevivem durante os estágios iniciais da infecção através de um mecanismo dependente de BIM, impedindo a liberação do citocromo c

mitocondrial para o citoplasma e a consequente ativação de mecanismos de morte celular (Castellano *et al.*, 2017).

Nesse sentido, avaliamos a presença de BIM, uma proteína capaz de interagir com MCL-1/BCL-2 e impedir a liberação de sinais pro-apoptóticos (Figura 14). Nossos resultados indicaram a maior presença de BIM em MDMs infectados ativados nos três padrões distintos (*resting*, inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual) em relação aos respectivos controles. Em conjunto, estes dados sugerem que proteínas virais poderiam estar interagindo com alvos proteicos mitocondriais (como HIV-1 Vpr e MCL-1/BCL-2, conforme predito *in silico*) e interferindo na arquitetura mitocondrial. No entanto, apesar da ocorrência dessas lesões mitocondriais, a ativação deste mecanismo resultaria na manutenção da viabilidade das células infectadas. Paralelamente, a avaliação da localização de HIV-1 p24 e distribuição intracelular de NLRP3 em MDMs infectados revelou grande quantidade de proteínas virais dispersas no citoplasma e região perinuclear, comprovando a infecção induzida *in vitro*. Curiosamente, 24 horas após o contato com a suspensão viral, NLRP3 passou a ser detectado principalmente na região perinuclear e próximo a agregados de HIV-1 p24 (Figura 15).

Dessa forma, embora não seja possível comprovar a ocorrência da interação predita entre HIV-1 Gag e NLRP3 durante os ensaios *in silico*, o conjunto dos nossos dados sugerem que, além das alterações epigenéticas induzidas durante a infecção crônica por HIV-1 anteriormente demonstradas por nosso grupo e por outros (Desplats *et al.*, 2014; Espindola *et al.*, 2018), as deficiências funcionais e de ativação da resposta imune observadas em MDMs podem ser ocasionadas desde as etapas iniciais da infecção por HIV-1, a partir da inativação de sensores celulares fundamentais para ativação da resposta imune e sobrevivência celular do hospedeiro, contribuindo decisivamente para o estabelecimento da infecção viral e formação de reservatórios em diversos tecidos. No entanto, apesar dos novos indícios apresentados neste trabalho, alguns mecanismos relacionados à inativação do inflamassoma (especialmente da via dependente de NLRP3) durante a infecção por HIV-1 em MDMs precisam ser melhor explorados, de forma que estes achados possam resultar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

6.2 Caracterização inicial e avaliação da formação de reservatórios virais em populações de macrófagos presentes nos tecidos de acordo com a sua origem embrionária

Apesar de preliminares, os resultados obtidos a partir da biopsia de fígado de macaco Rhesus cronicamente infectados por SIV, tratado continuamente com antirretrovirais e carga viral indetectável no sangue periférico possibilitaram a identificação fenotípica inicial de MDMs (CD11b⁺ MMR^{neg} HLA-DR⁺ CD64⁺ CD163^{low/neg}) e YSDMs (CD11b⁺ MMR⁺ HLA-DR⁺ CD64⁺ CD163^{hi}). A análise por imunofluorescência de MDMs purificados de acordo com este perfil fenotípico apresentavam capacidade fagocítica compatível à observada em outros macrófagos, assim como também estavam infectadas por SIV. No entanto, considerando a impossibilidade de obter-se YSDMs em quantidade suficiente da amostra coletada, bem como a perda da viabilidade *in vitro* das células purificadas, é fundamental que novos experimentos sejam realizados de modo a confirmar a funcionalidade e a capacidade deste subtipo celular de tornarem-se infectados por SIV *in vivo*.

Embora tenha sido possível diferenciar as duas subpopulações de macrófagos presentes no fígado de macaco Rhesus infectados, o painel de caracterização fenotípica deve ser encarado como o uma análise preliminar do fenótipo desses macrófagos, de modo que, dada a importância dessas células durante a patogênese do SIV/HIV, sugerimos a ampla avaliação de outros marcadores celulares em amostras humanas e de outros primatas, incluindo a análise funcional e do transcriptoma, a fim de compreender melhor as estratégias virais para evasão da resposta imune e estabelecimento de reservatórios virais nos tecidos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o estudo dos mecanismos relacionados à ativação do inflamassoma e estratégias de evasão viral da resposta imune durante a infecção por HIV-1 em macrófagos, observamos que a infecção viral induz a liberação de IL-1 β e outras citocinas/quimiocinas em MDMs *resting*, mas não em MDMs ativadas nos padrões inflamatório ou relacionado ao reparo tecidual. Além de não induzirem diretamente a ativação do inflamassoma, MDMs previamente estimulados liberaram menores níveis de citocinas/quimiocinas (como IL-6 e MIP-1 α/β), assim como alterações no padrão global de liberação no sobrenadante desses mediadores após a infecção, sugerindo que estas células também podem reconhecer as partículas virais desde as etapas iniciais da infecção. Nossos resultados ainda não indicaram se, de fato, a infecção por HIV-1 é capaz de induzir o primeiro sinal de ativação do inflamassoma (evidenciado pela expressão de *NLRP3*, fosforilação de NF- κ B e atividade de *NLRP3* e *Casp-1*, sendo necessária a realização de novos experimentos em diferentes períodos de infecção para explorar melhor essa hipótese. No entanto, a deficiência na ativação desses mecanismos pode ser causada por falhas induzidas por proteínas virais, conforme predito durante os ensaios *in silico*. Estes dados são corroborados pelos resultados observados durante as imunofluorescências, onde alterações mitocondriais induzidas após a infecção viral poderiam estar relacionadas à ausência de produção de ROS e contribuir para manutenção da viabilidade celular. Em conjunto, a ação dessas proteínas virais em diferentes alvos celulares pode contribuir para evasão do HIV-1 da ação dos mecanismos efetores da resposta imune inata em macrófagos, possibilitando a sobrevivência de células infectadas por longos períodos e a formação de reservatórios teciduais.

Paralelamente, embora tenha sido realizada uma análise preliminar do perfil fenotípico de YSDMs e MDMs, o painel de marcadores utilizados para isolamento dessas duas subpopulações celulares deve ser melhor explorado, incluindo a análise de amostras humanas e de outros primatas, para diferenciação dessas células também com base em ensaios funcionais e do transcriptoma, tendo em vista relevância dessas células no estabelecimento de reservatórios virais nos tecidos.

8. *CONCLUSÃO*

Em conjunto, nossos dados sugerem que diversas proteínas virais (como HIV-1 Gag e Vpr) podem interagir com proteínas do hospedeiro desde as etapas iniciais da infecção viral em macrófagos, prejudicando a ativação do inflamassoma, o desenvolvimento da resposta imune e viabilizando o sucesso da infecção viral.

Adicionalmente, sugerimos que a população de MDMs obtida de NHPs seja caracterizada pela expressão de CD11b⁺ MMR^{neg} HLA-DR⁺ CD64⁺ CD163^{low/neg}, enquanto a população de YSDMs seja caracterizada pela expressão de CD11b⁺ MMR⁺ HLA-DR⁺ CD64⁺ CD163^{hi}, de modo a diferenciar fenotipicamente as duas subpopulações.

REFERÊNCIAS

ABDERRAZAK, A. et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, v. 4, p. 296-307, 2015. ISSN 2213-2317 (Electronic)

2213-2317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625584> >.

ALEXAKI, A.; LIU, Y.; WIGDAHL, B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res*, v. 6, n. 5, p. 388-400, Sep 2008. ISSN 1873-4251 (Electronic)

1570-162X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855649> >.

ALEXANDER, L. et al. Induction of AIDS in rhesus monkeys by a recombinant simian immunodeficiency virus expressing nef of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, v. 73, n. 7, p. 5814-25, Jul 1999. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364333> >.

ANDRADE, M. F. et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. *Int Immunopharmacol*, v. 15, n. 2, p. 387-94, Feb 2013. ISSN 1878-1705 (Electronic)

1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333455> >.

ANSARI, A. W.; KAMARULZAMAN, A.; SCHMIDT, R. E. Multifaceted Impact of Host C-C Chemokine CCL2 in the Immuno-Pathogenesis of HIV-1/ Co-Infection. *Front Immunol*, v. 4, p. 312, 2013. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24109479> >.

ANTIRETROVIRAL THERAPY COHORT, C. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*, v. 372, n. 9635, p. 293-9, Jul 26 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657708> >.

AVALOS, C. R. et al. Quantitation of Productively Infected Monocytes and Macrophages of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *J Virol*, v. 90, n. 12, p. 5643-56, Jun 15 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27030272> >.

AVERT. Antiretroviral Drugs. <http://www.avert.org/antiretroviral-drugs.htm>, 2015. Acesso em: 16 March 2015.

BARASA, S. S. True story about HIV: theory of viral sequestration and reserve infection. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, v. 3, p. 125 -133, 2011.

BARRE-SINOUSI, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183> >.

BEKKERING, S. et al. In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes. *Clin Vaccine Immunol*, v. 23, n. 12, p. 926-933, Dec 2016. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733422> >.

BENAROCH, P. et al. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology*, v. 7, p. 29, 2010. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374631> >.

BOSURGI, L. et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, v. 356, n. 6342, p. 1072-1076, Jun 9 2017. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28495875> >.

BRASIL, M. D. S. Boletim Epidemiológico - AIDS e IST. SAÚDE, S. D. V. E. S. M. D. 2017.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, v. 16, n. 7, p. 407-20, Jul 2016. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291964> >.

BUONAGURO, L. et al. Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example. *Retrovirology*, v. 4, p. 34, May 21 2007. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517125> >.

CASSETTA, L. et al. Isolation of Mouse and Human Tumor-Associated Macrophages. *Adv Exp Med Biol*, v. 899, p. 211-29, 2016. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27325269> >.

CASTELLANO, P.; PREVEDEL, L.; EUGENIN, E. A. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 12866, Oct 9 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28993666> >.

CDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, v. 30, n. 21, p. 250-2, Jun 5 1981. ISSN 0149-2195 (Print)

0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6265753> >.

CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, v. 31, n. 23, p. 305-7, Jun 18 1982. ISSN 0149-2195 (Print)

0149-2195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6811844> >.

CEN, S. et al. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. J Biol Chem, v. 279, n. 32, p. 33177-84, Aug 6 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159405> >.

CHATTERGOON, M. A. et al. HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. PLoS Pathog, v. 10, n. 5, p. e1004082, May 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788318> >.

CHEN, I. Y.; ICHINOHE, T. Response of host inflammasomes to viral infection. Trends Microbiol, v. 23, n. 1, p. 55-63, Jan 2015. ISSN 1878-4380 (Electronic)

0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456015> >.

CHIHARA, T. et al. HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages. J Immunol, v. 188, n. 8, p. 3620-7, Apr 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407921> >.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? Trends Cell Biol, v. 18, n. 4, p. 157-64, Apr 2008. ISSN 1879-3088 (Electronic)

0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314333> >.

CHUN, T. W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature, v. 387, n. 6629, p. 183-8, May 8 1997. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144289> >.

CHUN, T. W. et al. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. Nat Med, v. 1, n. 12, p. 1284-90, Dec 1995. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489410> >.

CHUN, T. W. et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 24, p. 13193-7, Nov 25 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371822> >.

CLAPHAM, P. R.; MCKNIGHT, A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol*, v. 83, n. Pt 8, p. 1809-29, Aug 2002. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124446> >.

CLAYTON, K. L. et al. HIV Infection of Macrophages: Implications for Pathogenesis and Cure. *Pathog Immun*, v. 2, n. 2, p. 179-192, 2017. ISSN 2469-2964 (Print)

2469-2964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752134> >.

CLEMENTS, J. E. et al. The central nervous system as a reservoir for simian immunodeficiency virus (SIV): steady-state levels of SIV DNA in brain from acute through asymptomatic infection. *J Infect Dis*, v. 186, n. 7, p. 905-13, Oct 1 2002. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12232830> >.

COBOS JIMENEZ, V. et al. Differential expression of HIV-1 interfering factors in monocyte-derived macrophages stimulated with polarizing cytokines or interferons. *Sci Rep*, v. 2, p. 763, 2012. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094138> >.

COHEN, J. Monkeys reveal new clues toward elusive HIV vaccine and cure. *Science*, 2018. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/news/2018/03/monkeys-reveal-new-clues-toward-elusive-hiv-vaccine-and-cure> >.

COLLINI, P. et al. Monocyte and macrophage dysfunction as a cause of HIV-1 induced dysfunction of innate immunity. *Curr Mol Med*, v. 10, n. 8, p. 727-40, Nov 2010. ISSN 1875-5666 (Electronic)

1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937022> >.

CORBOY, J. R.; GARL, P. J. HIV-1 LTR DNA sequence variation in brain-derived isolates. *Journal of neurovirology*, v. 3, n. 5, p. 331-341, 1997. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372454> >.

CROWE, S. M.; SONZA, S. HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: a further obstacle

to eradication. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 68, n. 3, p. 345-50, Sep 2000. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985250> >.

CUNNINGHAM, A. L. et al. Manipulation of dendritic cell function by viruses. *Curr Opin Microbiol*, v. 13, n. 4, p. 524-9, Aug 2010. ISSN 1879-0364 (Electronic)

1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598938> >.

DAI, L. et al. IL-27 inhibits HIV-1 infection in human macrophages by down-regulating host factor SPTBN1 during monocyte to macrophage differentiation. *J Exp Med*, v. 210, n. 3, p. 517-34, Mar 11 2013. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460728> >.

DATTA, P. K. et al. Glutamate metabolism in HIV-1 infected macrophages: Role of HIV-1 Vpr. *Cell Cycle*, v. 15, n. 17, p. 2288-98, Sep 2016. ISSN 1551-4005 (Electronic)

1551-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245560> >.

DAVIS, B. K.; TING, J. P. NLRP3 has a sweet tooth. *Nat Immunol*, v. 11, n. 2, p. 105-6, Feb 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084064> >.

DESPLATS, P. et al. Epigenetic alterations in the brain associated with HIV-1 infection and methamphetamine dependence. *PLoS One*, v. 9, n. 7, p. e102555, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054922> >.

DEWSON, G.; KLUCK, R. M. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci*, v. 122, n. Pt 16, p. 2801-8, Aug 15 2009. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795525> >.

DIGET, E. A. et al. Characterization of HIV-1 infection and innate sensing in different types of primary human monocyte-derived macrophages. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 208412, 2013. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431237> >.

DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, v. 505, n. 7484, p. 509-14, Jan 23 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356306> >.

DRAGIN, L. et al. Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply. *Retrovirology*, v. 10, p. 30, 2013. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23497353> >.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, v. 8, n. 3, p. 396-7, Jul 1959. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13669362> >.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, v. 130, n. 3373, p. 432-7, Aug 21 1959. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13675766> >.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, v. 10, n. 4, p. 279-90, Apr 2012. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421880> >.

ERMLER, M. E. et al. Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome. *Virology*, v. 449, p. 174-80, Jan 20 2014. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418550> >.

ESPINDOLA, M. S. et al. Dysregulated Immune Activation in Second-Line HAART HIV+ Patients Is Similar to That of Untreated Patients. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0145261, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26684789> >.

ESPINDOLA, M. S. et al. Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. *Scientific Reports*, 2018.

ESTES, J. D.; WONG, S. W.; BRENCHLEY, J. M. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat Rev Immunol*, Mar 19 2018. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29556017> >.

EVANS, D. T.; SILVESTRI, G. Nonhuman primate models in AIDS research. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 8, n. 4, p. 255-61, Jul 2013. ISSN 1746-6318 (Electronic)

1746-630X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615116> >.

FEDERICO, M. et al. HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors. *Blood*, v. 98, n. 9, p. 2752-61, Nov 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675348> >.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 509-13, Mar 26 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158676> >.

FRANKLIN, B. S. et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*, v. 15, n. 8, p. 727-37, Aug 2014. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952505> >.

FREEDMAN, B. D. et al. HIV-1 gp120 chemokine receptor-mediated signaling in human macrophages. *Immunologic Research*, v. 27, n. 2-3, p. 261-76, 2003. ISSN 0257-277X.

FRIEW, Y. N. et al. Intracellular interactions between APOBEC3G, RNA, and HIV-1 Gag: APOBEC3G multimerization is dependent on its association with RNA. *Retrovirology*, v. 6, p. 56, Jun 4 2009. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497112> >.

GALDIERO, M. R. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol*, v. 228, n. 7, p. 1404-12, Jul 2013. ISSN 1097-4652 (Electronic)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065796> >.

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 865-7, May 20 1983. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601823> >.

GALVAO-CASTRO, B. et al. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 4, p. 453-6, Oct-Dec 1987. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507914> >.

GALVAO-LIMA, L. J. et al. Classical and alternative macrophages have impaired function during acute and chronic HIV-1 infection. *Braz J Infect Dis*, v. 21, n. 1, p. 42-50, Jan - Feb 2017. ISSN 1678-4391 (Electronic)

1413-8670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912071> >.

GALVAO, A. F. et al. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. *Anal Bioanal Chem*, v. 408, n. 13, p. 3613-23, May 2016. ISSN 1618-2650 (Electronic)

1618-2642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968567> >.

GAMA, L. et al. SIV Latency in Macrophages in the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol*, May 17 2018. ISSN 0070-217X (Print)

0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29770863> >.

GAMA, L. et al. Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS*, v. 31, n. 1, p. 5-14, Jan 2 2017. ISSN 1473-5571 (Electronic)

0269-9370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27898590> >.

GAMA, L. et al. Expansion of a subset of CD14^{high}CD16^{neg}CCR2^{low}/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection. *J Leukoc Biol*, v. 91, n. 5, p. 803-16, May 2012. ISSN 1938-3673 (Electronic)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368280> >.

GARDNER, M. B.; LUCIW, P. A. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J*, v. 49, n. 2, p. 220-55, 2008. ISSN 1084-2020 (Print)

1084-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323583> >.

GAUTIER, E. L. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology*, v. 13, n. 11, p. 1118-1128, 2012. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2419> >.

GEIJTENBEEK, T. B. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, v. 100, n. 5, p. 587-97, Mar 3 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721995> >.

GETAHUN, H. et al. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin Infect Dis*, v. 50 Suppl 3, p. S201-7, May 15 2010. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397949> >.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 439-449, Mar 15 2016. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982352> >.

GINHOUX, F. et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*, v. 17, n. 1, p. 34-40, Jan 2016. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681460> >.

GOEPFERT, P. A. et al. Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients. *J Exp Med*, v. 205, n. 5, p. 1009-17, May 12 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18426987> >.

GOUGEON, M. L. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol*, v. 3, n. 5, p. 392-404, May 2003. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766761> >.

GREENE, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol*, v. 37 Suppl 1, p. S94-102, Nov 2007. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972351> >.

GROSS, O. et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*, v. 36, n. 3, p. 388-400, Mar 23 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444631> >.

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, v. 65, n. 5, p. 791-3, Oct 2013. ISSN 0920-9069 (Print)

0920-9069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975256> >.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, v. 21, n. 7, p. 677-87, Jul 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197> >.

GUO, H. et al. HIV-1 infection induces interleukin-1beta production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes. *J Biol Chem*, v. 289, n. 31, p. 21716-26, Aug 1 2014. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939850> >.

HAUSMANN, S. et al. RIG-I and dsRNA-induced IFN β activation. *PLoS One*, v. 3, n. 12, p. e3965, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19115016> >.

HE, Y.; HARA, H.; NUNEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, Dec 2016. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669650> >.

HEID, M. E. et al. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol*, v. 191, n. 10, p. 5230-8, Nov 15 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089192> >.

HENDRICKSON, A. W.; MENG, X. W.; KAUFMANN, S. H. Anticancer therapy: boosting the bang of Bim. *J Clin Invest*, v. 118, n. 11, p. 3582-4, Nov 2008. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949061> >.

HENNING, T. et al. Development of a pigtail macaque model of sexually transmitted infection/HIV coinfection using *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, and SHIV(SF162P3). *J Med Primatol*, v. 40, n. 4, p. 214-23, Aug 2011. ISSN 1600-0684 (Electronic)

0047-2565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781129> >.

HERBEIN, G. et al. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology*, v. 7, p. 34, Apr 9 2010. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380698> >.

HERBEIN, G.; VARIN, A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology*, v. 7, p. 33, Apr 9 2010. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380696> >.

HERNANDEZ, J. C.; LATZ, E.; URCUQUI-INCHIMA, S. HIV-1 induces the first signal to activate the NLRP3 inflammasome in monocyte-derived macrophages. *Intervirolgy*, v. 57, n. 1, p. 36-42, 2014. ISSN 1423-0100 (Electronic)

0300-5526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008203> >.

HU, S. L. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Curr Drug Targets Infect Disord*, v. 5, n. 2, p. 193-201, Jun 2005. ISSN 1568-0053 (Print)

1568-0053 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975024> >.

HUFERT, F. T. et al. Human Kupffer cells infected with HIV-1 in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 6, n. 7, p. 772-7, Jul 1993. ISSN 0894-9255 (Print)

0894-9255 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099611> >.

Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*, v. 43, n. 3, p. 203-22, May 2016. ISSN 1660-3796 (Print)

1660-3796 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403093> >.

HWANG, S. Y. et al. 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Res*, v. 40, n. 6, p. 2724-33, Mar 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127865> >.

ISHII, M. et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood*, v. 114, n. 15, p. 3244-54, Oct 8 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567879> >.

IVANOV, A. V. et al. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2016, p. 8910396, 2016. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829986> >.

JACKSON, W. D.; WOOLLARD, K. J. Targeting monocyte and macrophage subpopulations for immunotherapy: a patent review (2009 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*, v. 24, n. 7, p. 779-90, Jul 2014. ISSN 1744-7674 (Electronic)

1354-3776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24773534> >.

JACOBS, S. R.; DAMANIA, B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 3, p. 469-77, Sep 2012. ISSN 1938-3673 (Electronic)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581934> >.

JAMBO, K. C. et al. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol*, Jan 29 2014. ISSN 1935-3456 (Electronic)

1933-0219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472847> >.

KAMAT, A. et al. A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e30881, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363505> >.

KITTAN, N. A. et al. Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e78045, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205083> >.

KOGAN, M.; RAPPAPORT, J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*, v. 8, p. 25, 2011. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489275> >.

KOOTSTRA, N. A.; SCHUITEMAKER, H. Proliferation-dependent replication in primary macrophages of macrophage-tropic HIV type 1 variants. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 14, n. 4, p. 339-45, Mar 1 1998. ISSN 0889-2229 (Print)

0889-2229 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519895> >.

KOPPENSTEINER, H.; BRACK-WERNER, R.; SCHINDLER, M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*, v. 9, p. 82, 2012. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035819> >.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses*, v. 6, n. 4, p. 1837-60, Apr 2014. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759213> >.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 28, p. 137-61, 2012. ISSN 1530-8995 (Electronic)

1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974247> >.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855941> >.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702978> >.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 11, p. 750-61, Nov 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025054> >.

LE CAO, K. A.; BOITARD, S.; BESSE, P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*, v. 12, p. 253, Jun 22 2011. ISSN 1471-2105 (Electronic)

1471-2105 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693065> >.

LIMA, R. G. et al. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J Infect Dis*, v. 185, n. 11, p. 1561-6, Jun 1 2002. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023761> >.

LINDSAY, J.; ESPOSTI, M. D.; GILMORE, A. P. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta*, v. 1813, n. 4, p. 532-9, Apr 2011. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056595> >.

LUPFER, C. et al. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol*, v. 14, n. 5, p. 480-8, May 2013. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525089> >.

LYNCH, R. M.; YAMAMOTO, T.; MCDERMOTT, A. B. HIV vaccine research and discovery in the nonhuman primates model: a unified theory in acquisition prevention and control of SIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 8, n. 4, p. 288-94, Jul 2013. ISSN 1746-6318 (Electronic)

1746-630X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666390> >.

MA, Y.; MOUTON, A. J.; LINDSEY, M. L. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res*, v. 191, p. 15-28, Jan 2018. ISSN 1878-1810 (Electronic)

1878-1810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29106912> >.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 2, n. 5, p. a006940, May 2012. ISSN 2157-1422 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553496> >.

MANCHES, O.; FRLETA, D.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol*, v. 35, n. 3, p. 114-22, Mar 2014. ISSN 1471-4981 (Electronic)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24246474> >.

MANKOWSKI, J. L.; CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Searching for clues: tracking the pathogenesis of human immunodeficiency virus central nervous system disease by use of an accelerated, consistent simian immunodeficiency virus macaque model. *J Infect Dis*, v. 186 Suppl 2, p. S199-208, Dec 1 2002. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424698> >.

MARCHETTI, G.; TINCATI, C.; SILVESTRI, G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*, v. 26, n. 1, p. 2-18, Jan 2013. ISSN 1098-6618 (Electronic)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297256> >.

MARECHAL, V. et al. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, v. 72, n. 3, p. 2208-12, Mar 1998. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9499078> >.

MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol*, v. 40, n. 3, p. 616-9, Mar 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201014> >.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002. ISSN 1097-2765 (Print)

1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486> >.

MARTINO, J. C.; YOULE, R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, v. 21, n. 1, p. 92-101, Jul 19 2011. ISSN 1878-1551 (Electronic)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763611> >.

MASHIBA, M.; COLLINS, K. L. Molecular mechanisms of HIV immune evasion of the innate immune response in myeloid cells. *Viruses*, v. 5, n. 1, p. 1-14, Jan 2013. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344558> >.

MC, C. T.; MAXWELL, M.; KRUSE, P. F., JR. The amino acid requirements of the Jensen sarcoma in vitro. *Cancer Res*, v. 19, n. 6, Part 1, p. 591-5, Jul 1959. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13671417> >.

MCDONALD, D. Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection. *Viruses*, v. 2, n. 8, p. 1704-17, Aug 2010. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994702> >.

MICCI, L. et al. CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells. *PLoS Pathog*, v. 10, n. 10, p. e1004467, Oct 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356757> >.

MINTON, K. Immunometabolism: Stress-induced macrophage polarization. *Nat Rev Immunol*, v. 17, n. 5, p. 277, May 2017. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393924> >.

MOIR, S. et al. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, v. 192, n. 5, p. 637-46, Sep 4 2000. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974030> >.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science*, v. 343, n. 6169, p. 428-32, Jan 24 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356113> >.

MOORE, G. E.; GERNER, R. E.; FRANKLIN, H. A. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, v. 199, n. 8, p. 519-24, Feb 20 1967. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4960081> >.

MOORE, G. E. et al. Culture of human leukemia cells. *Cancer*, v. 19, n. 5, p. 713-23, May 1966. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5218782> >.

MURRAY, A. J. et al. The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *J Immunol*, v. 197, n. 2, p. 407-17, Jul 15 2016. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27382129> >.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*, v. 79, p. 541-566, Feb 10 2017. ISSN 1545-1585 (Electronic)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27813830> >.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950> >.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 93, n. 6, p. 875-81, Jun 2013. ISSN 1938-3673 (Electronic)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23505314> >.

OLIVETTA, E. et al. HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J Immunol*, v. 170, n. 4, p. 1716-27, Feb 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574335> >.

OLIVETTA, E. et al. HIV-1 Nef impairs key functional activities in human macrophages through CD36 downregulation. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. e93699, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705461> >.

PACE, M. J. et al. HIV reservoirs and latency models. *Virology*, v. 411, n. 2, p. 344-54, Mar 15 2011. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284992> >.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Fcgamma and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2015, p. 429878, 2015. ISSN 1741-427X (Print)

1741-427X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26346244> >.

PAULS, E. et al. Restriction of HIV-1 replication in primary macrophages by IL-12 and IL-18 through the upregulation of SAMHD1. *J Immunol*, v. 190, n. 9, p. 4736-41, May 1 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526823>

<http://www.jimmunol.org/content/190/9/4736.full.pdf> >.

PLANTIER, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, v. 15, n. 8, p. 871-2, Aug 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648927> >.

POECK, H. et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*, v. 11, n. 1, p. 63-9, Jan 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915568> >.

POLLACK, R. A. et al. Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape. *Cell Host Microbe*, v. 21, n. 4, p. 494-506 e4, Apr 12 2017. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407485> >.

PONTILLO, A. et al. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1beta secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS*, v. 26, n. 1, p. 11-8, Jan 2 2012. ISSN 1473-5571 (Electronic)

0269-9370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971358> >.

POON, B.; CHEN, I. S. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J Virol*, v. 77, n. 7, p. 3962-72, Apr 2003. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634356> >.

PRICE, A. J. et al. CPSF6 defines a conserved capsid interface that modulates HIV-1 replication. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 8, p. e1002896, 2012. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431306/pdf/ppat.1002896.pdf> >.

QUEEN, S. E. et al. Replication-competent simian immunodeficiency virus (SIV) Gag escape mutations archived in latent reservoirs during antiretroviral treatment of SIV-infected macaques. *J Virol*, v. 85, n. 17, p. 9167-75, Sep 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715484> >.

RAJAN, J. V. et al. The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection. *J Virol*, v. 85, n. 9, p. 4167-72, May 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289120> >.

RASAIYAAH, J. et al. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature*, v. 503, n. 7476, p. 402-405, 11/21/print 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature12769> >.

<http://www.nature.com/nature/journal/v503/n7476/pdf/nature12769.pdf> >.

RATHINAM, V. A. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol*, v. 11, n. 5, p. 395-402, May 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351692> >.

RATNER, L. et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, v. 313, n. 6000, p. 277-84, Jan 24-30 1985. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578615> >.

RAUCH, C. et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*, v. 28, n. 4, p. 305-16, 2011. ISSN 1868-596X (Print)

1868-596X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130485> >.

REHWINKEL, J. et al. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell*, v. 140, n. 3, p. 397-408, Feb 5 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144762> >.

RICH, E. A. et al. Increased susceptibility of differentiated mononuclear phagocytes to productive infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). *J Clin Invest*, v. 89, n. 1, p. 176-83, Jan 1992. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370293> >.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr 7 2000. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766634> >.

SANTIAGO, M. L. et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol*, v. 79, n. 19, p. 12515-27, Oct 2005. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160179> >.

SATO, K.; SASAKI, E. Genetic engineering in nonhuman primates for human disease modeling. *J Hum Genet*, v. 63, n. 2, p. 125-131, Feb 2018. ISSN 1435-232X (Electronic)

1434-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203824> >.

SCHALLER, T. et al. HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLoS Pathog*, v. 7, n. 12, p. e1002439, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002439> >.

SCHULZ, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 336, n. 6077, p. 86-90, 2012. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1219179> >.

SHANDILYA, S. M. et al. Crystal structure of the APOBEC3G catalytic domain reveals potential oligomerization interfaces. *Structure*, v. 18, n. 1, p. 28-38, Jan 13 2010. ISSN 1878-4186 (Electronic)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152150> >.

SHEHU-XHILAGA, M.; CROWE, S. M.; MAK, J. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol*, v. 75, n. 4, p. 1834-41, Feb 2001. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160682> >.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, v. 122, n. 3, p. 787-95, Mar 1 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378047> >.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13. HIV-1 infection. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, v. 111, n. 2 Suppl, p. S582-92, Feb 2003. ISSN 0091-6749.

SMITH, P. D. et al. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, n. 5, p. 642-9, Nov 2003. ISSN 0741-5400.

SONZA, S. et al. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol*, v. 70, n. 6, p. 3863-9, Jun 1996. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648722> >.

SOUZA, T. M. et al. The nerve growth factor reduces APOBEC3G synthesis and enhances HIV-1 transcription and replication in human primary macrophages. *Blood*, v. 117, n. 10, p. 2944-52, Mar 10 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217078> >.

SPERBER, K. et al. Progressive impairment of monocytic function in HIV-1-infected human macrophage hybridomas. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 9, n. 7, p. 657-67, Jul 1993. ISSN 0889-2229 (Print)

0889-2229 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8369170> >.

STEEVES, J. D. Bench to bedside: challenges of clinical translation. *Prog Brain Res*, v. 218, p. 227-39, 2015. ISSN 1875-7855 (Electronic)

0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890140> >.

STEPHENSON, C. B. et al. Immune activation and oxidative damage in HIV-positive and HIV-negative adolescents. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 38, n. 2, p. 180-90, Feb 1 2005. ISSN 1525-4135 (Print)

1525-4135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671803> >.

SWAMI, M. HIV infections: Restricting HIV from macrophages. *Nat Med*, v. 19, n. 4, p. 416-416, 04//print 2013. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3166> >.

TAM, J. C.; JACQUES, D. A. Intracellular immunity: finding the enemy within-how cells recognize and respond to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol*, v. 96, n. 2, p. 233-244, Aug 2014. ISSN 1938-3673 (Electronic)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899588> >.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 3, p. 210-5, Mar 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168318> >.

TSUNETSUGU-YOKOTA, Y.; MUHSEN, M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Front Microbiol*, v. 4, p. 178, 2013. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847602> >.

VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol*, v. 85, n. 3, p. 1403-7, Feb 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084486> >.

VARIN, A. et al. Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *J Biol Chem*, v. 278, n. 4, p. 2219-27, Jan 24 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419805> >.

WALSH, J. G. et al. Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology*, v. 11, n. 1, p. 35, 2014. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886384> >.

WESTPHAL, D. et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, v. 1813, n. 4, p. 521-31, Apr 2011. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195116> >.

WHO. Global Health Observatory (GHO) data - HIV/AIDS. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/gho/hiv/en/> >. Acesso em: 03/21.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, v. 6, n. 11, p. 859-68, Nov 2006. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063186> >.

WU, X. et al. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology*, v. 59, n. 2, p. 103-11, Mar 2009. ISSN 0920-9069 (Print)

0920-9069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496017> >.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450-462, Mar 15 2016. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982353> >.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*, v. 16, n. 2, p. 99-117, Apr 2017. ISSN 1445-5781 (Print)

1445-5781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259457> >.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, v. 5, n. 7, p. 730-7, Jul 2004. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208624> >.

YU, W. et al. Induction of the HIV-1 Tat co-factor cyclin T1 during monocyte differentiation is required for the regulated expression of a large portion of cellular mRNAs. *Retrovirology*, v. 3, p. 32, 2006. ISSN 1742-4690 (Electronic)

1742-4690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16764723> >.

ZENNOU, V. et al. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. *J Virol*, v. 72, n. 4, p. 3300-6, Apr 1998. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525657> >.

ZHONG, Z. et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, v. 560, n. 7717, p. 198-203, Aug 2018. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30046112> >.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun*, v. 7, p. 10760, Feb 23 2016. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907476> >.

ANEXOS

**ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do
HC/FMRP/USP para realização do presente estudo**



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 25 de março de 2015.

Ofício nº 1119/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 18492/2014

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado "**ANÁLISE DA INFECÇÃO IN VITRO POR HIV-1 NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA E EVASÃO VIRAL DA RESPOSTA IMUNE DEPENDENTE DE MACRÓFAGOS**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 404ª Reunião Ordinária realizada em 23/03/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão II de 27/02/2015.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
LEONARDO JUDSON GALVÃO DE LIMA
DRª FABIANA GAI FRANTZ (Orientadora)
Depto. de Imunologia e Bioquímica – FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil / CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B – Termo de anuência do Hemocentro de Ribeirão Preto para recrutamento de doadores de sangue voluntários



Hemocentro RP

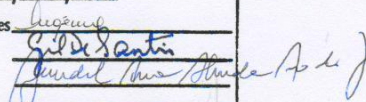
Centro Regional de Hemoterapia
HCFMRP - USP

Rua Tenente Catão Roxo, 2501 - Monte Alegre
Fone: (16) 2101-9300 - Fax (16) 2101-9309
CEP: 14051-140 - Ribeirão Preto - SP

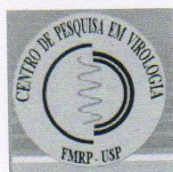
DECLARAÇÃO

Declaramos, a pedido do pesquisador Leonardo J. Galvão de Lima, que o Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP, mediante consentimento informado dos participantes, autoriza a abordagem e eventual coleta de 06 ml de sangue venoso provenientes de doadores voluntários de sangue para uso no projeto de pesquisa "Análise da infecção *in vitro* por HIV-1 na ativação do inflamassoma e evasão viral da resposta imune dependente de macrófagos", desenvolvido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Fabiane Gai Frantz.

Ribeirão Preto, 19 de novembro de 2014.

Comissão Deliberativa em Viabilização para Cessão de Amostras Biológicas e/ou Hemocomponentes para fins de Pesquisa Científica	
Data	19 / 11 / 2014
Participantes	

ANEXO C – Termo de anuência do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP/USP para realização dos ensaios de infecção *in vitro* por HIV-1



**Centro de Pesquisa em Virologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo**



Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2014.

DECLARAÇÃO

Declaro que **Leonardo Judson Galvão de Lima**, inscrito sob CPF número 076.619.654-29, biomédico, estudante de doutorado matriculado no programa de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, realizou treinamento técnico necessário e está apto para executar o seu projeto de doutorado utilizando a estrutura física do laboratório de biossegurança nível 3 – BSL 3 – do Centro de Pesquisa em Virologia desta faculdade, sob orientação da Dra. Fabiani Gai Frantz e sub-orientação do Dr. Mario Luis Garcia de Figueiredo. Afirmo, ainda, que o laboratório conta com toda infraestrutura e segurança necessárias para manipulação de HIV-1 e realização de infecções *in vitro* em cultura de células primárias.

Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Professor titular de doenças infecciosas e tropicais – FMRP/USP

Coordenador do Centro de Pesquisa em Virologia – FMRP/USP

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para anuência dos doadores de sangue atendidos no Hemocentro de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: **“ANÁLISE DA INFECÇÃO *IN VITRO* POR HIV-1 NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA E EVASÃO VIRAL DA RESPOSTA IMUNE DEPENDENTE DE MACRÓFAGOS”**.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

MSc. Leonardo Judson Galvão de Lima

Dra. Fabiani Gai Frantz

Prezado Doador(a),

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Análise da infecção *in vitro* por HIV-1 na ativação do inflamassoma e evasão viral da resposta imune dependente de macrófagos”**, cuja condução será responsabilidade do estudante de doutorado Leonardo Judson Galvão de Lima, sob orientação da Dra. Fabiani Gai Frantz. Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa sobre HIV e Epigenética, desenvolvida no Laboratório de Imunologia e Epigenética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, e conta com a colaboração de pesquisadores do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/USP, do Hemocentro de Ribeirão Preto e do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ.

O objetivo deste estudo é entender como a infecção por HIV-1 interfere na ativação e quais os mecanismos utilizados pelo vírus para escapar da

resposta imune em macrófagos, uma das principais células do nosso sistema de defesa e que auxilia no combate às diversas infecções. Dessa forma, a sua colaboração é fundamental para que possamos realizar este estudo. Gostaríamos de lembrar que a sua participação será **totalmente voluntária** e da importância de ler atentamente este documento até o final. A qualquer momento, as suas dúvidas sobre esta pesquisa poderão ser esclarecidas, seja durante esta abordagem inicial ou durante o desenvolvimento do estudo. Caso tenha interesse em participar, solicitaremos que assine este documento e o rubrique em todas as páginas, em duas vias – uma que será disponibilizada para você e outra que será armazenada junto aos resultados obtidos deste estudo. Caso não queira participar, deixamos claro que não haverá nenhum tipo de prejuízo à sua doação.

O que é macrófago?

Os macrófagos são células do sistema de defesa do nosso corpo, importantes para combater diversos germes (como vírus e bactérias) capazes de causar doenças.

O que é inflamassoma?

O inflamassoma é um sistema de reconhecimento e sinalização presente nos macrófagos, capaz de avisar a célula a existência de alguma situação de perigo (como a presença de infecções), e que ajuda na ativação do sistema de defesa do nosso corpo.

Porque esta pesquisa está sendo feita? Como eu posso participar?

Esta pesquisa ajudará a entender como a infecção por HIV-1 interfere na ativação e desenvolvimento da resposta imunológica de macrófagos, uma das principais células do nosso sistema de defesa e que auxilia no combate às diversas infecções. Desta forma, é necessário a coleta de amostras ricas em monócitos/macrófagos de indivíduos saudáveis. Caso concorde em participar

desta pesquisa, sua participação será voluntária e você deverá autorizar a utilização das células presentes na câmara LRS de isolamento de leucócitos utilizada durante a sua doação de plaquetas por aférese. Em seguida, a sua amostra será encaminhada para o Laboratório de Imunologia e Epigenética, vinculado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, onde serão realizadas todas as análises necessárias para realização do estudo.

Eu corro algum risco em participar deste estudo?

Para participar do estudo não será necessária uma nova coleta, além daquela normalmente realizada durante o procedimento normal de doação de plaquetas por aférese, realizada no Hemocentro de Ribeirão Preto. Todo o procedimento será realizado utilizando materiais estéreis e descartáveis por um profissional capacitado em ambiente adequado para esta finalidade. Não há riscos adicionais decorrentes da sua participação nesta pesquisa, além daqueles inerentes à coleta de sangue. Caso concorde em participar, a câmara LRS de isolamento de leucócitos utilizada no kit durante a sua doação de plaquetas por aférese será encaminhada para o Laboratório de Imunologia e Epigenética, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, onde serão realizadas todas as análises. A sua participação neste estudo não trará qualquer prejuízo para você ou para o paciente que irá receber a sua doação no futuro. O contato das células com o vírus durante a realização deste projeto ocorrerá somente no laboratório, contando com toda a infraestrutura necessária para realização deste tipo de procedimento, de modo que os participantes da pesquisa não sofrerão qualquer risco de contaminação.

Ao longo deste estudo não haverá despesa ou qualquer tipo de remuneração aos participantes. Todos os dados obtidos durante a execução deste estudo serão guardados de maneira sigilosa e os nomes dos envolvidos não serão divulgados em nenhum momento. Ao final da pesquisa, cada participante poderá solicitar a divulgação de seus resultados, de forma individual e sigilosa. Este estudo não trará benefício direto ao sujeito envolvido, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo à sua doação de sangue. A qualquer momento, você poderá entrar em

contato com os pesquisadores ou diretamente como o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto através do telefone (16) 3315-2228 para obter esclarecimentos sobre os aspectos éticos deste estudo.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

ANEXO E

RESULTADOS ADICIONAIS

Durante o desenvolvimento do estágio sanduíche nos EUA, foram realizados alguns experimentos sob orientação do Dr Lúcio Gama, paralelamente ao desenvolvimento do objetivo principal do estágio.

Macrófagos humanos apresentam alterações fenotípicas e morfológicas de acordo com o meio de cultura e fonte de soro utilizada in vitro.

Leonardo J. Galvão-Lima^{*,†}; Sarah L. Price^{*}; Celina M. Abreu^{*}; Shelby Graham^{*}; Dionna W. Williams^{*}; Ellen R. Forsyth^{*}; Erin N. Shirk^{*}; Janice E. Clements^{*,‡,§}; Lúcio Gama^{*,¶#}

Author details: ^{*}Department of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. [†]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [‡]Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. [§]Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. [¶]Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA

I. **Macrófagos cultivados em DMEM apresentam alterações fenotípicas e morfológicas quando comparados aos cultivados em RPMI**

Durante várias décadas, a pesquisa em macrófagos e outras células fagocíticas foi pouco explorada em detrimento dos crescentes avanços na pesquisa relacionada ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa. No entanto, recentemente o ressurgimento de novas pesquisas nesse campo trouxe também diversas questões importantes relacionadas à fisiologia dos macrófagos (Galdiero *et al.*, 2013; Jackson e Woollard, 2014; Bekkering *et al.*, 2016).

Diante deste contexto, além da variação biológica normal do background genético entre os indivíduos, atualmente não existe uma metodologia que seja consenso para obtenção e ativação *in vitro* dos macrófagos, considerando o meio de cultura, a fonte de soro e as citocinas utilizadas para induzir a polarização celular (Murray *et al.*, 2014; Minton, 2017; Murray, 2017). Em conjunto, estas discrepâncias resultam em diferentes status de ativação basal dos macrófagos, antes mesmo da adição de qualquer estímulo adicional, prejudicando diretamente a reprodutibilidade dos achados entre diferentes grupos de pesquisa e a pesquisa translacional entre a ciência básica e a clínica (Steeves, 2015). Com objetivo de explorar esta questão e evitar a decisão empírica entre os meios de cultura utilizados, nós avaliamos a influência dos meios RPMI 1640 e DMEM na cultura de macrófagos humanos quanto ao fenótipo induzido na presença de cada um dos meios de cultura, bem como alterações transcricionais e por fim, na liberação de citocinas. Avaliamos ainda, as diferenças fenotípicas induzidas nos diferentes protocolos, quando os macrófagos foram infectados *in vitro* por HIV-1.

Como observado na Figura 18, quando macrófagos foram cultivados em RPMI houve maior expressão de MMR (CD206) se comparados àqueles cultivados em DMEM e, embora não significativa, uma tendência de maior expressão de CD14 e CD163 na superfície celular (Fig. 18). Estes achados foram corroborados pela análise morfológica das células em cultura, a qual indicou que, após 7 dias em cultura e sem adição de estímulos adicionais, todos os macrófagos cultivados em meio contendo RPMI eram morfológicamente maiores do que aqueles cultivados em DMEM e suplementados com diferentes fontes de soro (Fig. 19), sugerindo que o RPMI promove o aumento do status basal de

ativação celular, considerando-se a expressão de marcadores de superfície e a morfologia de macrófagos humanos primários.

II. Macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI apresentam diferenças no perfil de liberação de citocinas

O nível basal de citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI, ambos suplementados com 10% de FBS. Os MDMs cultivados em RPMI liberam níveis menores de IL-10 e apresentam tendência a liberar níveis maiores de IFN- γ , IL-6, IL-12 (p40), IL-18, TNF- α , CCL5, CXCL9 and IP-10 (Fig. 20). As alterações observadas no perfil de citocinas liberadas por MDMs sugerem que o meio de cultura utilizado pode influenciar no status basal de ativação celular e, certamente, refletir no desenvolvimento da resposta imune inata observada *in vitro* após adição de diferentes estímulos (como PAMPs e outras citocinas).

III. Análise do transcriptoma sugere que macrófagos cultivados em RPMI e suplementados com FBS apresentam-se mais ativados

Amostras cultivadas em DMEM ou RPMI, ambas suplementadas com 10% de FBS, demonstraram diferenças importantes na expressão de diversos genes (Fig. 21A). Dentre estes, podemos destacar o aumento da expressão de *Interferon-Stimulated Genes (ISGs)* e outros relacionados à ativação da resposta imune (como *CTLA4*, *CD209*, *TIGIT*, *MARCO*, *FOXP3*, *STAT3*, *CCL13* e *IRF4*) em MDMs cultivados em RPMI, contrastando com o perfil transcricional observado em MDMs cultivados em DMEM. As diferenças no perfil transcricional entre esses dois grupos é ainda mais evidente quando analisadas por *Sparse Partial Least Squares – Discriminant Analysis (sPLS-DA)* (Fig. 21B). Esta ferramenta de análise possibilita a classificação de multivariáveis biológicas complexas em grupos similares, possibilitando a discriminação de ‘clusters’ dentro das amostras observadas (Le Cao *et al.*, 2011).

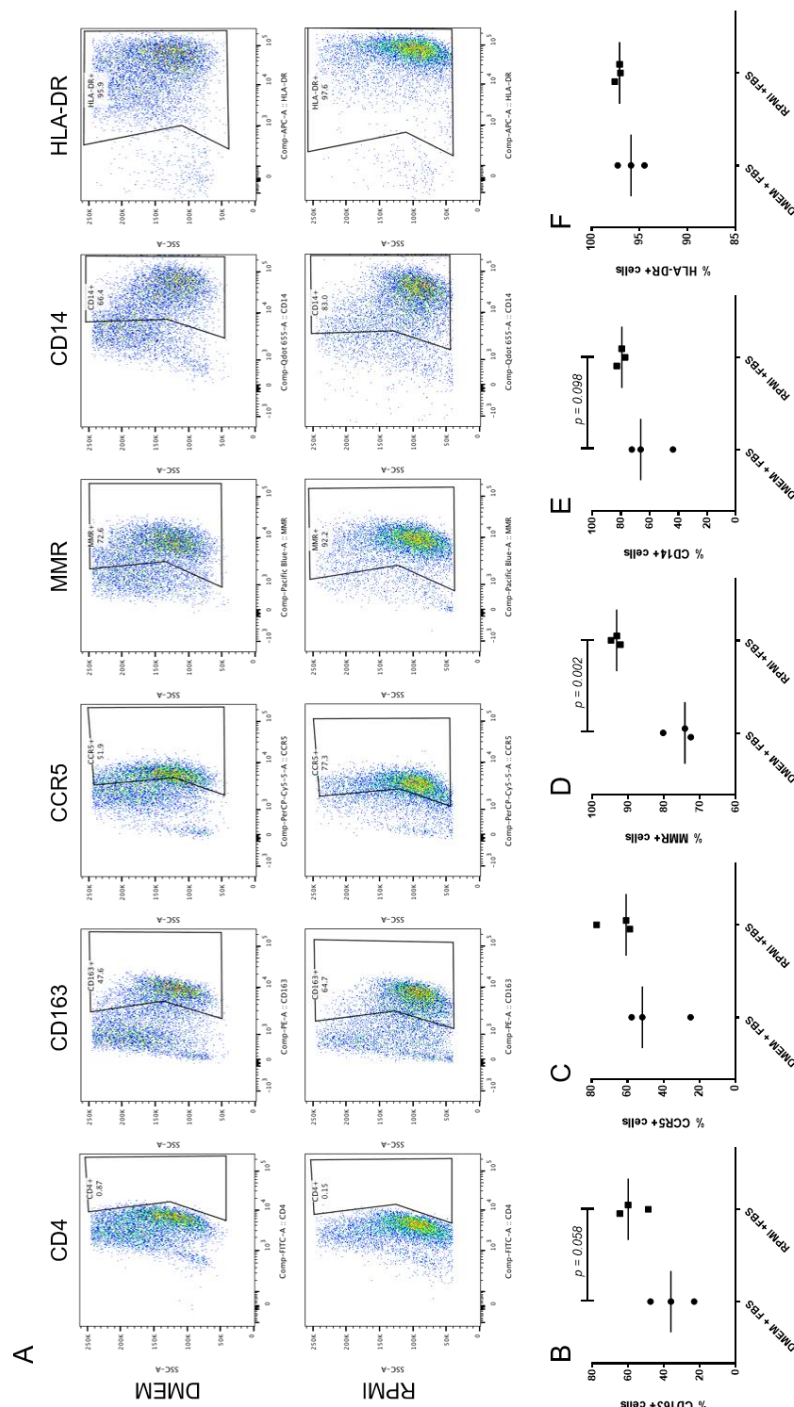


Figura 18. Expressão de CD4, CD163, CCR5, MMR (CD206), CD14 e HLA-DR na superfície celular de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640. PBMCs de doadores saudáveis ($n=3$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI, suplementados com 10% de FBS. Após 7 dias em cultura, todas as células foram removidas das placas para quantificação de moléculas na superfície celular por citometria de fluxo. A, representação dos *dot plots* obtidos relativos à expressão de CD4, CD163, CCR5, MMR (CD206), CD14 e HLA-DR. B-E, representação gráfica das porcentagens de células positivas para cada uma das moléculas avaliadas. Cada ponto representa os resultados obtidos de cada doador e a barra horizontal a mediana do conjunto de dados analisados utilizando teste *t* pareado.

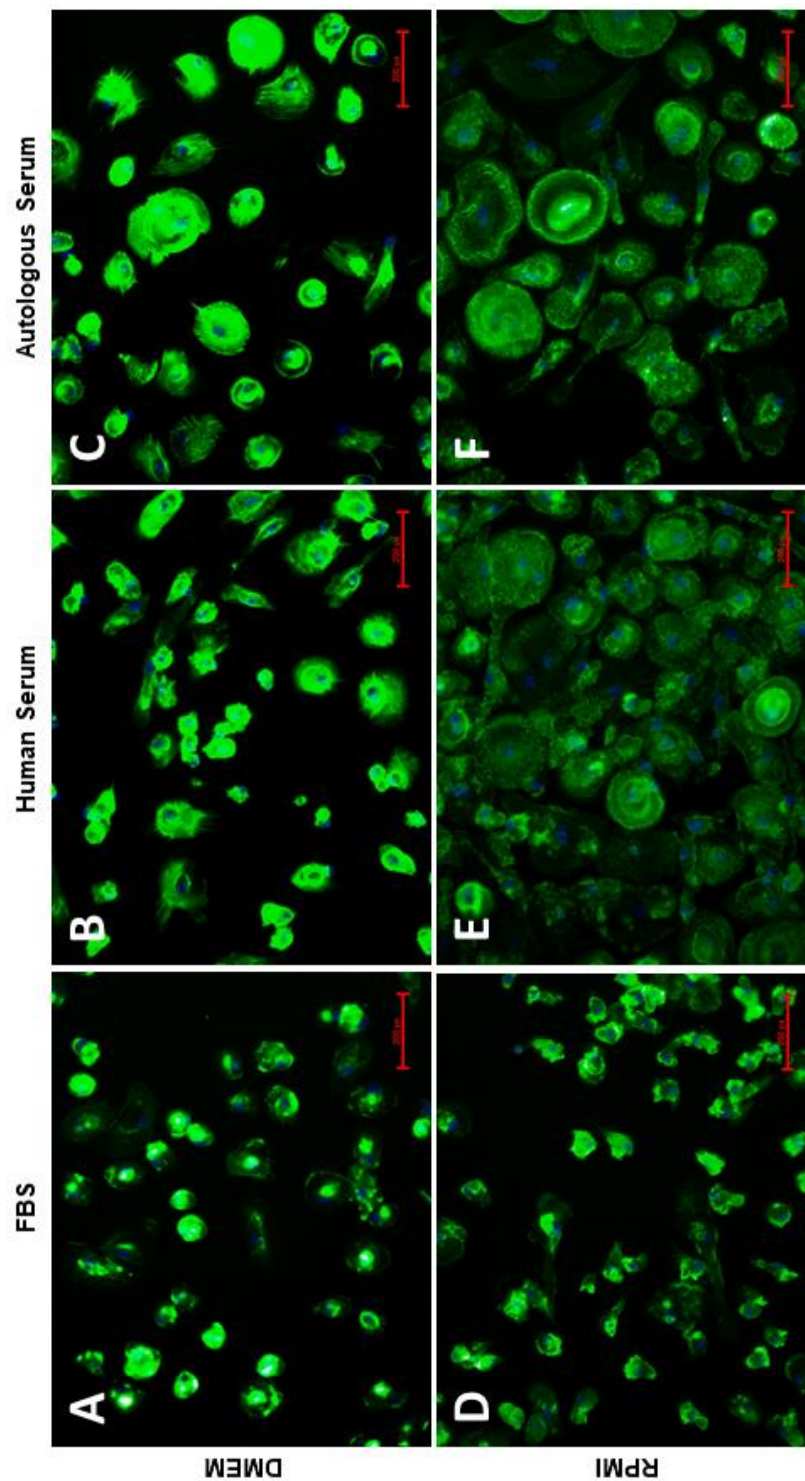


Figura 19. Alterações morfológicas em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 e suplementados com diferentes fontes de soro. PBMCs de doadores saudáveis ($n=4$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI, suplementados com diferentes fontes de soro - 10% de FBS ou soro humano inativado ou autólogo. Após 7 dias em cultura, todas as células foram permeabilizadas e incubadas com Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (Invitrogen) para marcação de F-actina (em verde), enquanto o núcleo (em azul) foi corado com Nucblue (ThermoFischer). As células foram analisadas em microscópio de fluorescência (20x) e fotografadas.

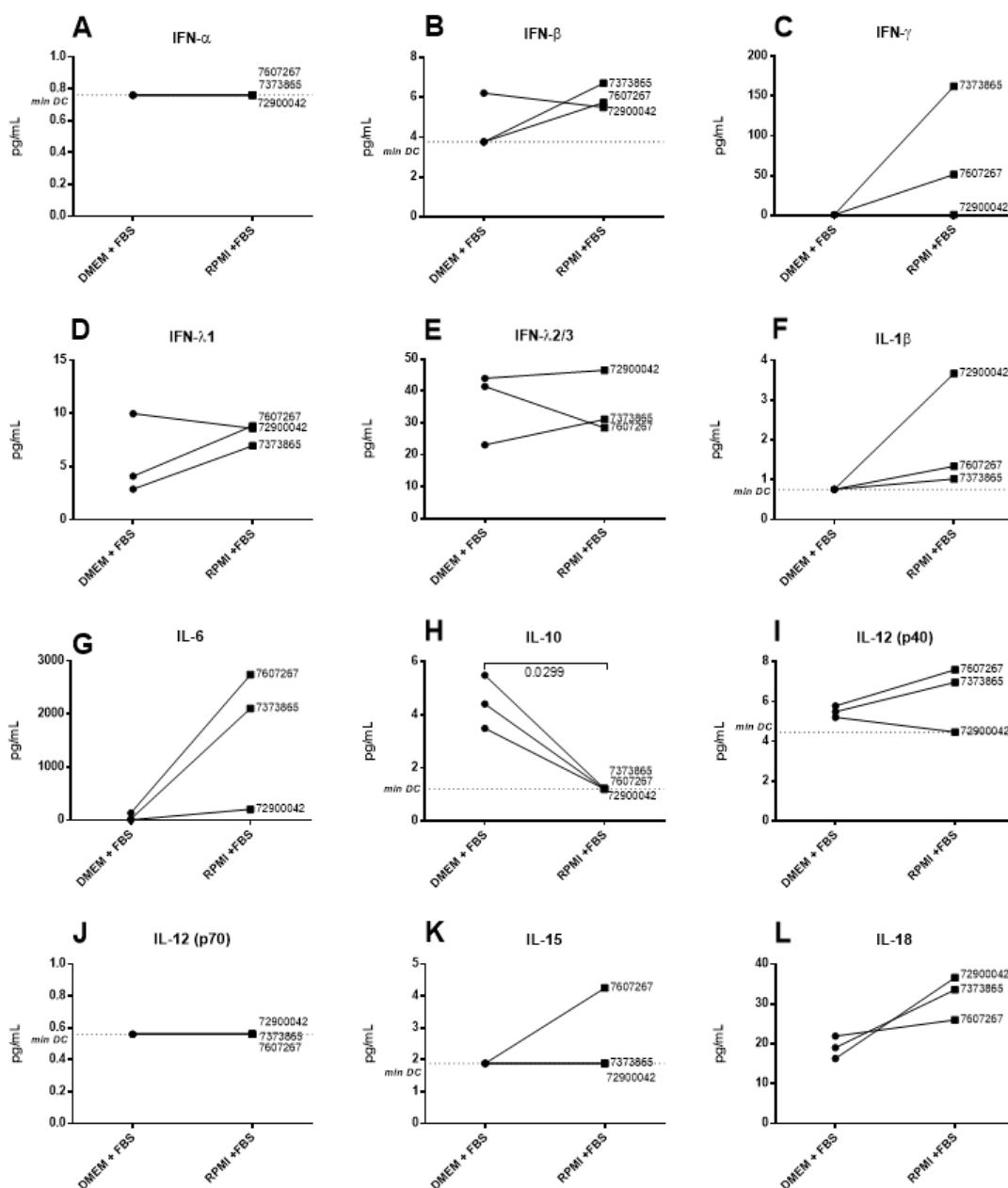
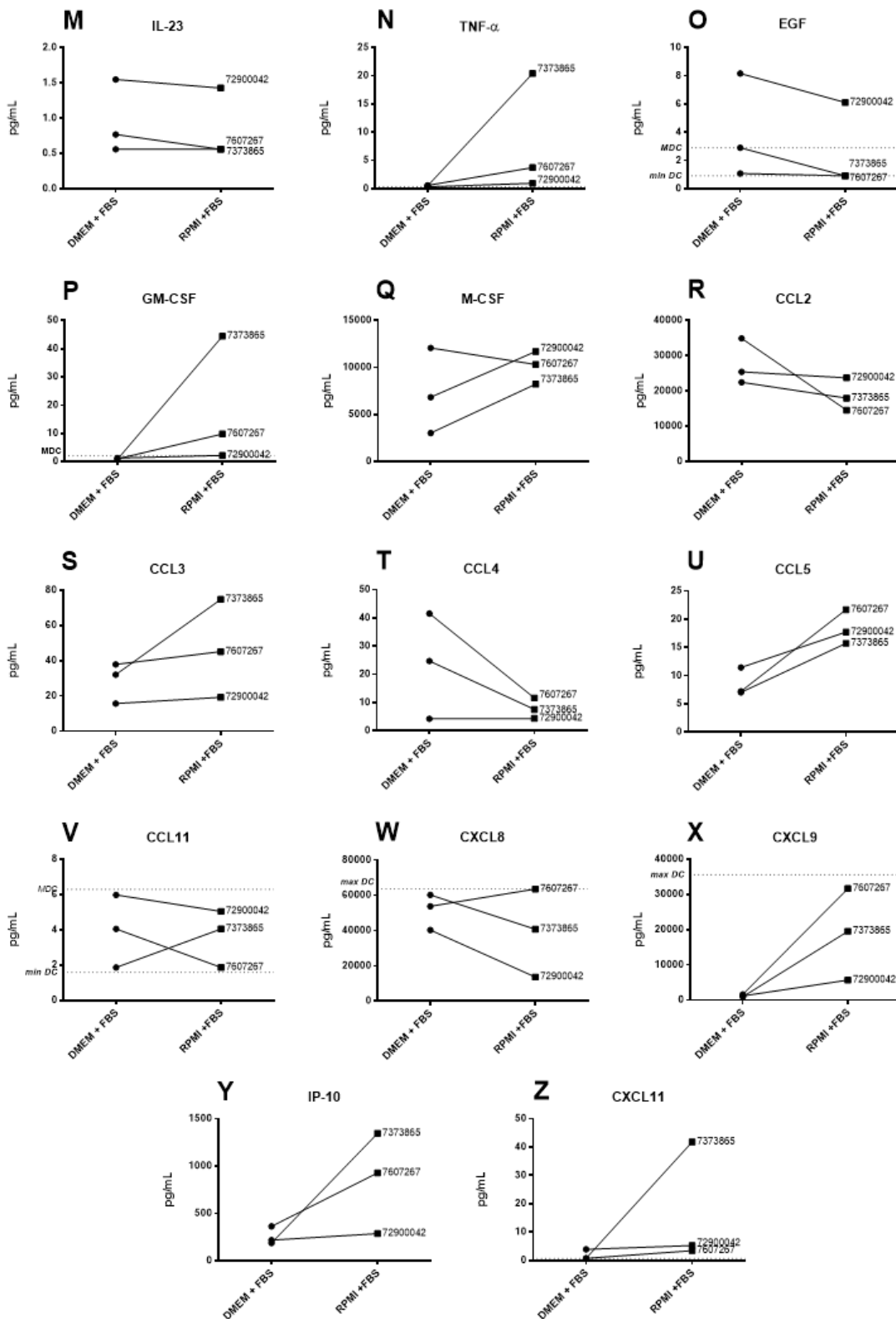


Figura 20. Citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com FBS. PBMCs de doadores saudáveis ($n=3$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI, suplementados com 10% de FBS. Após 7 dias em cultura, o sobrenadante das células em cultura foi coletado e incubado com o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) e as citocinas/quimiocinas presentes na amostra foram quantificadas por citometria de fluxo. Cada ponto representa os resultados obtidos, expressos em pg/mL, de cada doador. Os resultados foram analisados utilizando o teste t pareado.



cont. Figura 20. Citocinas e quimiocinas liberadas no sobrenadante de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com FBS.

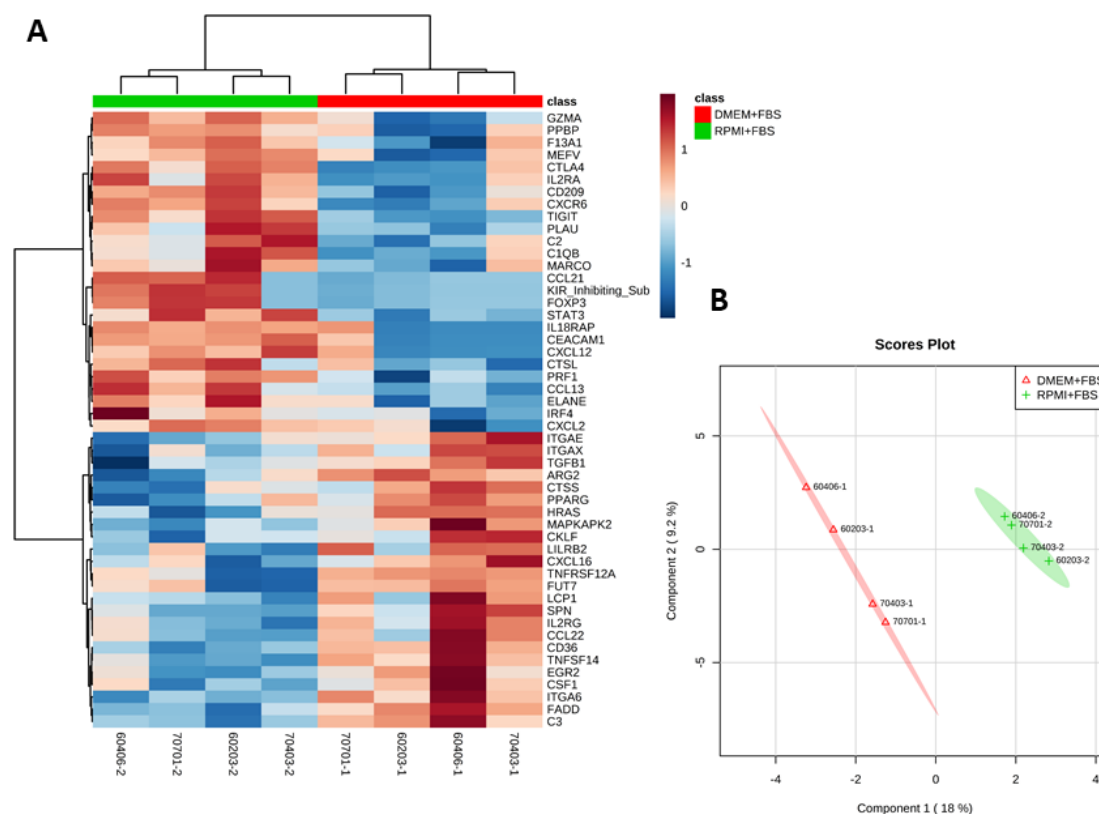


Figura 21. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640 suplementados com FBS. PBMCs de doadores saudáveis ($n=4$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI, suplementados com 10% de FBS. Após 7 dias em cultura, o RNA total das células em cultura foi extraído e purificado com auxílio do RNeasy Mini Kit (Qiagen). Os ensaios de análise do transcriptoma foram realizados a partir da hibridização do RNA celular com as sondas presentes no painel nCounter® PanCancer Immune Profiling (NanoString™). Todos os dados obtidos foram normalizados e analisados utilizando o *software* MetaboAnalyst 3.6 e os resultados expressos em (A) *heatmaps* ou (B) gráficos de sPLS-DA com 2 dimensões.

IV. Diferentes fontes de soro podem interferir no perfil transcricional dos macrófagos

Além do FBS, outras fontes de soro, como o comercial humano e os autólogos, também são rotineiramente utilizadas para suplementação dos meios de cultura de macrófagos *in vitro*. Nesse sentido, avaliamos se estas fontes alternativas de suplementação de DMEM e RPMI 1640 poderiam interferir no perfil transcricional dos macrófagos cultivados *in vitro*. A análise dos nossos resultados indicou que macrófagos cultivados em DMEM e suplementados com 10% de soro comercial humano ou soro autólogo, ambos previamente inativados, apresentam maiores níveis de expressão de genes pró-inflamatórios (como NF- κ B2, TRAF6, CD53 e LAMP1) quando comparados aqueles cultivados em DMEM suplementado com 10% de FBS (Figura 22A). Considerando os resultados da expressão de todos os genes presentes no painel é possível observar mais claramente a semelhança no perfil de expressão gênica entre macrófagos cultivados com DMEM suplementado com 10% de soro comercial humano ou soro autólogo inativado e como estes dois divergem do perfil de expressão observado em macrófagos cultivados com DMEM suplementado com 10% de FBS (Figura 22B). De modo semelhante, os resultados obtidos a partir da expressão gênica de macrófagos cultivados em RPMI1640 e suplementados com diferentes fontes de soro indicaram que o uso de soro comercial humano ou soro autólogo inativado induzem a maior expressão de genes pro-inflamatórios - como LAMP1, C3, MAPK1, CD53 e TNFSF14 (Figura 23A), os quais também podem ser agrupados em *clusters* que guardam maior semelhança entre si quando comparados aos resultados obtidos utilizando macrófagos cultivados em RPMI e suplementados com 10% de FBS (Figura 23B). Em conjunto, estes dados sugerem que além do meio de cultura, a fonte de soro utilizada para suplementação também pode interferir no perfil transcricional dos macrófagos cultivados *in vitro* e induzir um maior *status* de ativação basal, o qual pode influenciar na resposta a estímulos posteriores.

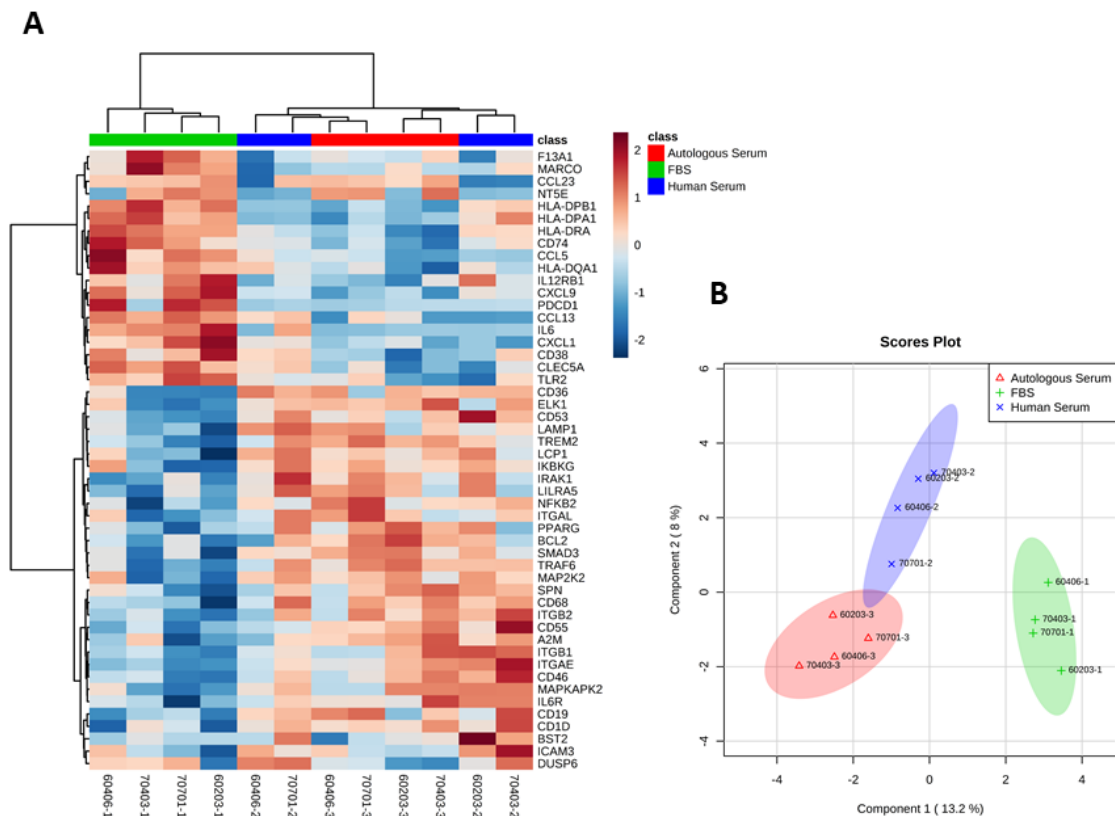


Figura 22. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em DMEM suplementados com diferentes fontes de soro. PBMCs de doadores saudáveis ($n=4$) foram isolados, plaqueados em meio DMEM e suplementados com 10% de FBS, soro humano inativado ou soro autólogo inativado. Após 7 dias em cultura, o RNA total das células em cultura foi extraído e purificado com auxílio do RNeasy Mini Kit (Qiagen). Os ensaios de análise do transcriptoma foram realizados a partir da hibridização do RNA celular com as sondas presentes no painel nCounter® PanCancer Immune Profiling (NanoString™). Todos os dados obtidos foram normalizados e analisados utilizando o *software* MetaboAnalyst 3.6 e os resultados expressos em (A) *heatmaps* ou (B) gráficos de sPLS-DA com 2 dimensões.

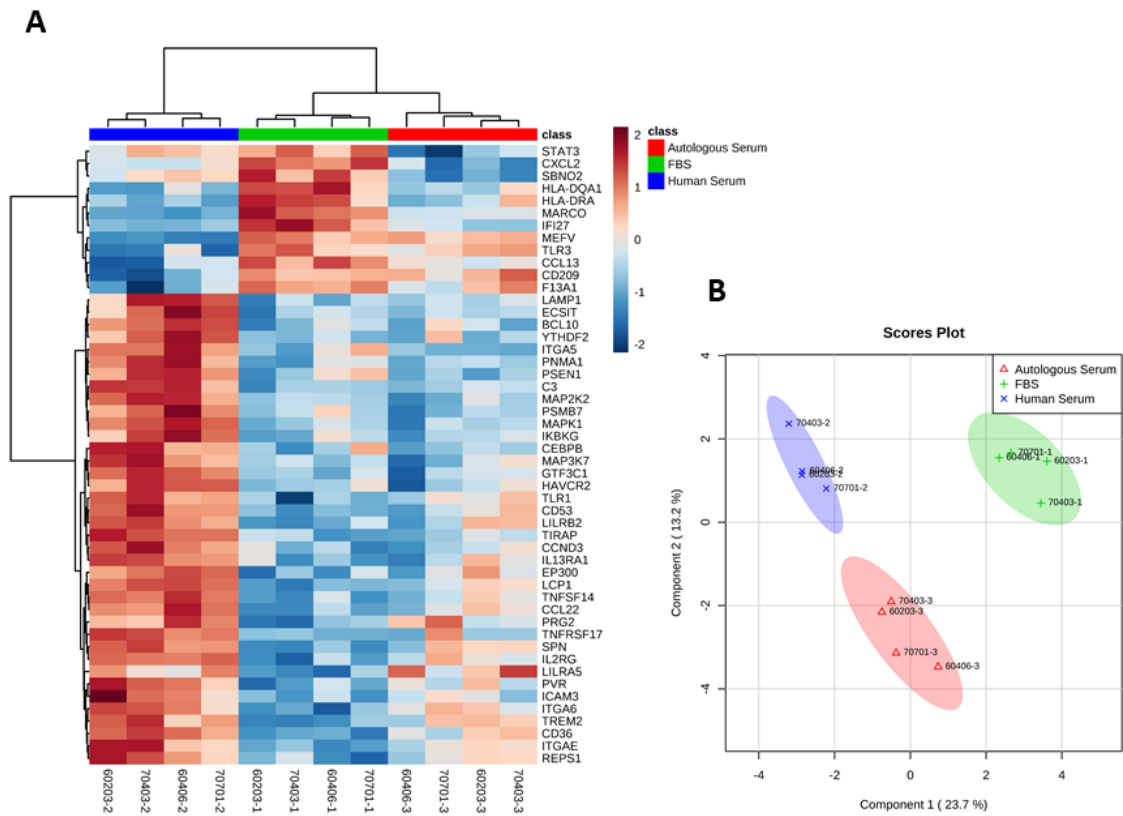


Figura 23. Análise do transcriptoma de macrófagos cultivados em RPMI 1640 suplementados com diferentes fontes de soro. PBMCs de doadores saudáveis ($n=4$) foram isolados, plaqueados em meio RPMI e suplementados com 10% de FBS, soro humano inativado ou soro autólogo inativado. Após 7 dias em cultura, o RNA total das células em cultura foi extraído e purificado com auxílio do RNeasy Mini Kit (Qiagen). Os ensaios de análise do transcriptoma foram realizados a partir da hibridização do RNA celular com as sondas presentes no painel nCounter® PanCancer Immune Profiling (NanoString™). Todos os dados obtidos foram normalizados e analisados utilizando o *software* MetaboAnalyst 3.6 e os resultados expressos em (A) *heatmaps* ou (B) gráficos de sPLS-DA com 2 dimensões.

V. Maior ativação basal de macrófagos cultivados em RPMI reduz a replicação de HIV-1

Para avaliar se a alteração basal no grau de ativação induzido pelo meio de cultura utilizado pode interferir na função celular, macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI e suplementados com 10% de FBS ou 10% de soro humano comercial ou 10% de soro autólogo foram infectados com HIV-1 89.6 (MOI 0.001).

O sobrenadante da cultura celular foi coletado a cada 2 dias para avaliação da replicação viral. Níveis semelhantes de RNA nos dias 2 e 4 após a infecção foram detectados no sobrenadante de MDMs cultivados em DMEM+FBS ou RPMI+FBS (Fig. 24A). No entanto, a partir do dia 6, a quantidade de HIV-1 RNA presente no sobrenadante de MDMs cultivados em DMEM+FBS foi maior do que aquele observado em MDMs cultivados em RPMI+FBS. MDMs cultivados em DMEM ou RPMI e suplementados com soro humano comercial ou soro autólogo não apresentaram diferenças no nível de partículas virais liberadas no sobrenadante (Fig. 24B e C), permanecendo estáveis durante todo período observado.

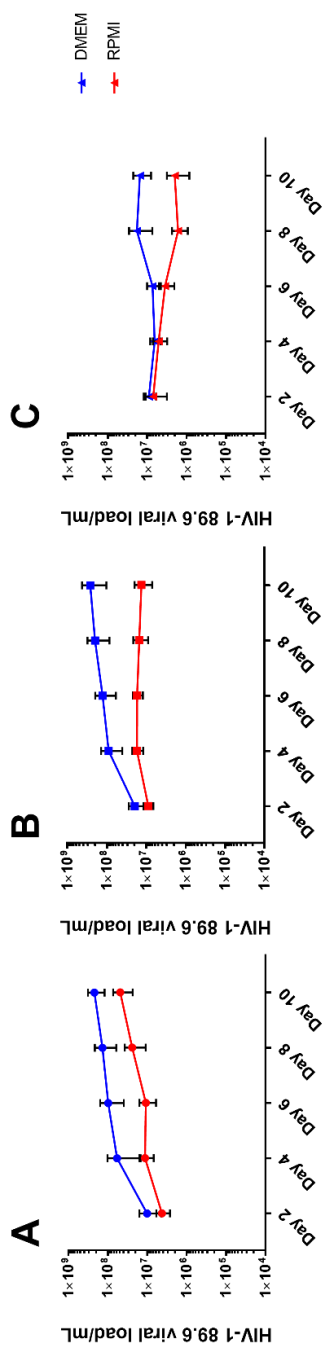


Figura 24. Quantificação da replicação de HIV-1 em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640. PBMCs de doadores saudáveis ($n=8$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI e suplementados com diferentes fontes de soro. Após 7 dias em cultura, as células foram espinoculadas para otimizar a infecção por HIV-1 89.6 (MOI 0.001). Após este período, meio fresco foi adicionado às respectivas condições de cultura e o sobrenadante foi coletado a cada 2 dias para avaliação da replicação viral por qRT-PCR. (A) MDMs cultivados com DMEM (azul) ou RPMI (vermelho) e suplementados com 10% de FBS. (B) MDMs cultivados com DMEM (azul) ou RPMI (vermelho) e suplementados com 10% de soro humano inativado. (C) MDMs cultivados com DMEM (azul) ou RPMI (vermelho) e suplementados com 10% de soro autógeno inativado. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão dos resultados obtidos de cada grupo de doadores.

VI. Macrófagos cultivados em RPMI liberam níveis maiores de IFN-tipo I e ISGs

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs induz a ativação da via de sinalização dependente de IFN-tipo I e expressão de ISGs em macrófagos, desencadeando a resposta imune inata após o reconhecimento do estímulo. Nesse sentido, nós avaliamos o impacto do DMEM e RPMI na expressão dos genes induzidos por IFN-tipo I (*MxA*, *Tyk2* e *IFN- α*) e na capacidade destas células desencadearem a resposta imune inata quando estimuladas.

Após 7 dias em cultura, MDMs cultivados em RPMI expressam maiores níveis de mRNA para *MxA*, *Tyk2* e *IFN- α* , quando comparado aos MDMs cultivados em DMEM (Fig. 25A). Em seguida, nós consideramos que este aumento basal também poderia impactar a ativação de MDMs durante o reconhecimento de um estímulo secundário. Para testar esta hipótese, MDMs foram cultivados em DMEM ou RPMI com poly I:C (agonista de TLR3) e observamos que os MDMs cultivados com DMEM expressam maiores níveis de *IFN- α* após o estímulo com poly I:C, enquanto o mesmo efeito não foi observado em MDMs cultivados em RPMI (Fig. 25B). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a ativação sustentada de macrófagos, induzida de acordo com o meio de cultura e fonte de soro utilizada, pode interferir nos resultados observados *in vitro*, uma vez que o *status* basal de ativação celular será fundamental para indução da expressão gênica e o desenvolvimento da resposta imune inata.

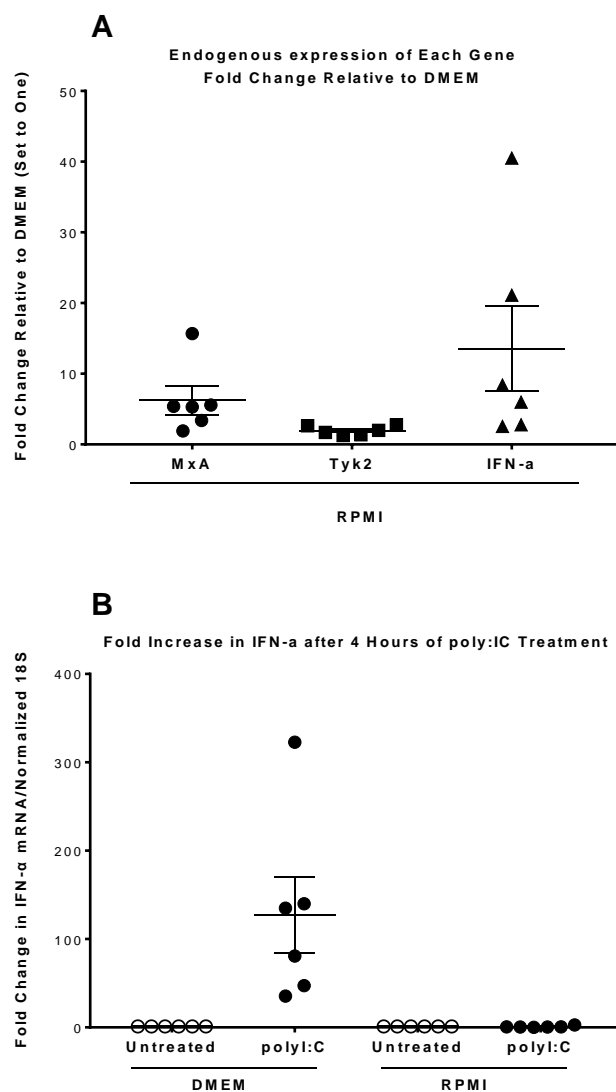


Figura 25. Expressão de *MxA*, *Tyk2* e *IFN-α* em macrófagos cultivados em DMEM ou RPMI 1640. PBMCs de doadores saudáveis ($n=6$) foram isolados e plaqueados em meio DMEM ou RPMI, suplementados com 10% de FBS. Após 7 dias em cultura, as células foram lisadas e o mRNA foi extraído para realização de qPCR para (A) quantificação da expressão basal de ISGs (*MxA*, *Tyk2* e *IFN-α*) em células cultivadas em DMEM ou RPMI. Resultado expresso em *fold-change* relativo ao DMEM. (B) Expressão de *IFN-α* após estímulo com poly:IC durante 4 horas. *Fold change* ajustado em função à expressão basal de *IFN-α* por células não estimuladas. Cada ponto representa os resultados obtidos de cada doador e a barra horizontal a mediana do conjunto de dados analisados.

VII. DISCUSSÃO

A escolha do meio de cultura utilizado em estudos *in vitro* de células mielóides parece ser baseada apenas em decisões empíricas ou disponibilidade em cada laboratório. No entanto, a falha na padronização dos reagentes e técnicas utilizadas entre os diferentes grupos de pesquisa pode ser uma das principais causas da divergência observada nos resultados de modelos experimentais semelhantes, impactando a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados experimentais de estudos *in vitro* comparados aos modelos *in vivo*.

A variação normal no *background* genético de doadores humanos em estudos *in vitro* é uma característica importante a ser considerada durante a análise dos resultados, no entanto, o uso de diversos meios de cultura e fontes de soro nos modelos experimentais adiciona uma nova variável à essa complexa equação. DMEM e RPMI 1640 são meios de cultura celular clássicos para células primárias e utilizados na maioria dos estudos *in vitro* para simular as condições fisiológicas encontradas *in vivo*. Recentemente, o trabalho de Yao e Asayama construíram uma importante linha do tempo sobre o desenvolvimento de diversos meios de cultura celular e evidenciaram algumas diferenças nas características de DMEM e RPMI 1640 (Yao e Asayama, 2017). A tabela 1 apresenta os principais constituintes de cada meio de cultura, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.

Resumidamente, o DMEM é considerado um meio básico e sua fórmula foi proposta em 1959 por Renato Dulbecco and Marguerite Vogt (Dulbecco e Freeman, 1959) após modificações na fórmula original do Meio Essencial Mínimo (MEM) (Eagle, 1959), enquanto a composição do meio desenvolvido pelo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 é considerada complexa e sua receita surgiu a partir de uma modificação na fórmula original do meio 5A, originalmente proposto por McCoy (Mc *et al.*, 1959). A primeira evidência da diferença entre esses dois meios no cultivo de células primárias foi reportada na década de 1960 durante o estabelecimento de uma cultura de leucócitos humano, levando ao RPMI1640 ser escolhido como meio de cultivo preferencial nos anos seguintes (Moore *et al.*, 1966; Moore *et al.*, 1967). Até os dias atuais existe um paradigma sugerindo que o DMEM é melhor para o cultivo de células aderentes, enquanto o RPMI 1640 deve ser o meio de cultura de escolha para cultura de células em

suspensão, como os linfócitos (Yao e Asayama, 2017). Nesse sentido, dada a falta de padronização e a escolha do meio de cultura baseada em evidências robustas, a pesquisa envolvendo a resposta imune de macrófagos é diretamente afetada conforme observado pelos resultados divergentes obtidos de MDMs primários cultivados em DMEM ou RPMI e apresentados neste trabalho.

No presente estudo, nós evidenciamos as alterações morfológicas e transcricionais observadas em MDMs primários cultivados em meios DMEM ou RPMI. Nossos resultados demonstraram a maior expressão de marcadores de superfície (como MMR) em MDMs cultivados em RPMI e estas células também apresentaram alterações morfológicas significantes em relação aquelas cultivadas em DMEM, independente da fonte de soro utilizada, sugerindo que o meio RPMI 1640 induz o aumento da ativação basal de MDMs humanos. Estas evidências são corroboradas pela quantificação das citocinas liberadas no sobrenadante de células em condições basais, na qual MDMs cultivados em RPMI apresentam níveis menores de IL-10 e uma tendência a liberar mais citocinas pro-inflamatórias (como IFN- γ , IL-6, IL-12 (p40), IL-18, TNF- α , CCL5, CXCL9 and IP-10).

Para confirmar a influência destes meios no perfil transcricional dos MDMs, nós avaliamos a expressão de 730 genes e demonstramos que as células cultivadas em DMEM ou RPMI apresentam uma profunda discrepância no perfil transcricional, também observada utilizando diferentes fontes de soro (como comercial humano ou autólogo) para suplementar o meio. Além das diferenças observadas na composição do DMEM e RPMI (tabela 1), estes resultados também indicam a influência da fonte de soro utilizada nos experimentos *in vitro* na ativação celular. Apesar das considerações éticas relacionadas ao uso de soro animal, alguns subtipos celulares necessitam de uma fonte extra de proteínas e citocinas para o seu desenvolvimento adequado *in vitro* (Rauch *et al.*, 2011; Gstraunthaler *et al.*, 2013). No entanto, a variação na composição dos diferentes soros, ou mesmo entre diferentes lotes, pode induzir níveis basais distintos de ativação celular, gerando uma variável adicional à reprodutibilidade dos resultados observados entre diferentes grupos de pesquisa. De modo semelhante aos dados apresentados neste trabalho, Wu e colaboradores apresentaram evidências da alteração do funcionamento de

periosteos cultivados em DMEM ou RPMI, demonstrando que células cultivadas em DMEM apresentam maiores níveis de diferenciação osteogênica e, portanto, deveriam ser utilizadas durante os estudos *in vitro* (Wu *et al.*, 2009).

Estas diferenças podem ser causadas pelo aumento da ativação basal observada em MDMs cultivados em RPMI, a qual reflete no perfil transcricional destas células. O aumento da expressão de diversos genes, incluindo ISGs (como *MxA*, *Tyk2* e *IFN-α*), pode afetar a produção de novas partículas virais durante a infecção *in vitro* por HIV-1. Em conjunto, nossos resultados demonstrados aqui evidenciam que o meio de cultura utilizado durante os experimentos *in vitro* afeta o status basal de ativação de MDMs, induzindo alterações morfológicas e fenotípicas, além de interferir nos resultados observados.

ANEXO F

Tabela 1. Composição dos meios de cultura celular RPMI 1640 e DMEM de acordo com as informações apresentadas pelos fabricantes.

Componentes (mg/L)	RPMI 1640	DMEM
Glycine	10	30
L-Arginine	200	84
L-Asparagine	50	-
L-Aspartic acid	20	-
L-Cystine 2HC	65	63
L-Glutamic Acid	20	-
L-Glutamine	300	584
L-Histidine	15	42
L-Hydroxyproline	20	-
L-Isoleucine	50	105
L-Leucine	50	105
L-Lysine hydrochloride	40	146
L-Methionine	15	30
L-Phenylalanine	15	66
L-Proline	20	-
L-Serine	30	42
L-Threonine	20	95
L-Tryptophan	5	16
L-Tyrosine	29	104
L-Valine	20	94
Biotin	0.2	-
Choline chloride	3	4
D-Calcium pantothenate	0.25	4
Folic Acid	1	4
Niacinamide	1	4
Para-Aminobenzoic Acid	1	-
Pyridoxine hydrochloride	1	4
Riboflavin	0.2	0.4
Thiamine hydrochloride	1	4
Vitamin B12	0.005	-
i-Inositol	35	7.2
Calcium Chloride	-	200
Calcium Nitrate	100	-
Ferric Nitrate	-	0.1
Magnesium Sulfate	48.84	97.67
Potassium Chloride	400	400
Sodium Bicarbonate	2000	3700
Sodium Chloride	6000	6400
Sodium Phosphate monobasic	-	125
Sodium Phosphate dibasic	800	-
D-Glucose (Dextrose)	2000	4500
Glutathione (reduced)	1	-
Phenol Red	5	15

*negrito: pelo menos 2x mais do que o meio correlato