

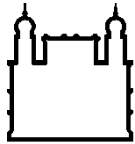
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular (BCM)

**EFEITO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
SOBRE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM MACRÓFAGOS**

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Rio de Janeiro
Outubro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Efeito das Redes Extracelulares de Neutrófilos sobre a infecção pela HIV-1 em macrófagos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2018

Le Quesne, Andrés Hernán Mojoli.

Efeito das Redes Extracelulares de neutrófilos sobre a infecção pelo HIV-1 em macrófagos / Andrés Hernán Mojoli Le Quesne. - Rio de Janeiro, 2018.

143 f.; il.

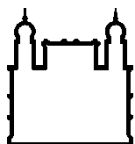
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Dumith Chequer Bou-Habib.

Bibliografia: f. 117-138

1. Macrófagos. 2. HIV-1. 3. Neutrophil extracellular traps. 4. imunidade inata . 5. Neutrófilos. I. Título.

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

EFEITO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS SOBRE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM MACRÓFAGOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 10/10/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Luciana Jesus da Costa (UFRJ)

Prof. Dr. Ulisses Gazos Lopes (UFRJ)

Prof. Dr. Flávia Lima Ribeiro-Gomes (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Luciana Barros de Arruda (UFRJ)

Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2018



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular de **Andres Hernan Mojoli Le Quesne**, sob orientação do Dr. Dumith Chequer Bou Habib. Ao décimo dia do mês de outubro de dois mil e dezoito, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Efeito das Redes Extracelulares de Neutrófilos sobre a infecção pelo Hiv-1 em macrófagos”** No programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Mecanismos imunológicos envolvidos na patologia de doenças autoimunes, infecciosas e parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Luciana Jesus da Costa - UFRJ/RJ, Dr. Ulisses Gazos Lopes - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Flávia Lima Ribeiro Gomes – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Luciana Barros de Arruda – UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2018.

Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani (Presidente da Banca):

Dr^a. Luciana Jesus da Costa (Membro da Banca):

Dr. Ulisses Gazos Lopes (Membro da Banca):

Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

AGRADECIMENTOS

A minha família. Meu amor e agradecimentos para vocês.

Ao meu orientador, Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, pessoa inspiradora e cientista admirável, meus mais especiais agradecimentos.

À Dra. Elvira Saraiva pelas dicas, análises, opiniões, avaliações e expertise compartilhadas comigo de forma gentil e esclarecedora.

À Rhaissa, minha amiga de grupo de pesquisa, laboratório, conversas filosóficas e apoio constante, muitíssimo obrigado.

Ao Jairo, Luis, Bruno e Raquel, muito obrigado pelo apoio e discussões enriquecedoras

À Barbara Simonsons, você chegou no final dessa tese, mas no momento certo, não teria melhor pessoa para continuar no futuro com esse estudo.

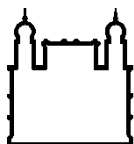
À Aline, Mariela e Rafa, obrigado pela amizade de vocês.

Às Dras. Antonieta Rojas de Arias, Miriam Rolón e Celeste Vega. Apesar da distância, o constante e estreito acompanhamento e apoio de vocês durante estes anos permitiram atingir meus objetivos.

A minha revisora de dissertação, a Dra. Flávia Ribeiro-Gomes, obrigado pelas valiosas correções e o perfeccionismo acompanhado sempre de uma grande gentileza.

Por último, meus maiores agradecimentos ao Laboratório de Pesquisas sobre o timo e pesquisadores, ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), ao Brasil e suas agencias de financiamento pela imensa e valiosa oportunidade dada para mim.

***“La science ne connaît pas de
frontière parce que la
connaissance appartient à
l’humanité et que c’est la flamme
qui illumine le monde”***



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DAS REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS SOBRE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM MACRÓFAGOS

RESUMO

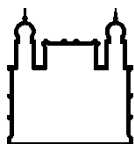
TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Os neutrófilos liberam Redes Extracelulares (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) após interação com microrganismos e produtos fisiológicos ou sintéticos, entre outros. As NETs são constituídas por cromatina descondensada complexada com proteínas citoplasmáticas e nucleares, algumas delas com propriedades microbicidas. Como as redes extracelulares, liberadas no microambiente tecidual, podem modular o funcionamento das células-alvo do HIV-1, nosso objetivo foi verificar se as NETs poderiam modificar a replicação do HIV-1 em macrófagos.

Neste estudo, nós vimos que a exposição de macrófagos infectados pelo HIV-1 às NETs resultou em significativa inibição da replicação viral. Observamos que tanto NETs individuais quanto *pools* destas estruturas apresentaram este efeito inibitório, que também ocorreu quando as NETs foram adicionadas aos macrófagos antes da infecção. O efeito anti-HIV-1 foi independente de outros fatores solúveis liberados pelos neutrófilos ativados, mas condicionado à integridade molecular das NETs, pois o tratamento destas estruturas com protease ou DNase anulou esse efeito. Vimos que a elastase neutrofílica (NE) é um componente crítico neste fenômeno, tendo em vista que a sua inibição (inibidor farmacológico) aboliu o efeito anti-HIV-1 das NETs, e que a NE purificada reproduziu este efeito antiviral. As NETs induziram a produção de RANTES e MIP-1 β por macrófagos, sugerindo que estas β -quimiocinas contribuem para o efeito anti-HIV-1 destas redes. Tanto as NETs quanto a NE diminuíram a síntese de transcritos *unspliced* do HIV-1, o que pode também explicar a queda da produção de vírions pelos macrófagos infectados. Ainda,

víriões remanescentes liberados pelos macrófagos infectados expostos às NETs apresentaram significativa queda da sua infectividade. Em estudos com amostras clínicas, observamos que neutrófilos de pacientes infectados pelo HIV-1 liberam NETs após estímulo com IL-8, e que moléculas componentes das NETs (DNA e elastase) estão presentes no plasma desses pacientes. Finalmente, nossos resultados mostram que as NETs exercem um potente efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, e sugerem que este mecanismo de imunidade inata é um importante fator endógeno de controle da infecção pelo HIV-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECTS OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS ON HIV-1 INFECTION IN MACROPHAGES

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Neutrophils release extracellular traps (NETs) after interaction with microorganisms and physiological or synthetic products, among others. NETs consist of decondensed chromatin complexed with cytoplasmic and nuclear proteins, some of them with microbicidal properties. Because NETs are released in the tissue microenvironment and they can modulate the functioning of HIV-1 target cells, we aimed to verify whether NETs could modify HIV-1 replication in macrophages.

In this study, we found that exposure of HIV-1-infected macrophages to NETs resulted in significant inhibition of viral replication. We observed that both, individual NETs or pools of these structures, present this inhibitory effect, which also occurred when NETs were added to macrophages before infection. The anti-HIV-1 effect was independent of others soluble factors released by the activated neutrophils, but otherwise dependent of the molecular integrity of NETs, since treatment of these structures with protease or DNase abolished this effect. We observed that neutrophil elastase (NE) is a critical component of this phenomenon, since its inhibition by a pharmacological inhibitor abolished the NETs anti-HIV-1 effect, and that purified NE reproduced this antiviral effect. NETs induced the production of RANTES and MIP-1 β by macrophages, suggesting that these β -chemokines contribute to the anti-HIV-1 effect of these traps. Both, NETs and NE, decreased the synthesis of HIV-1-unspliced transcripts, which also explain the decreased virus production by infected macrophages. Moreover, the residual virions released by infected macrophages treated with NETs showed a

significant loss in their infectivity. In studies using clinical samples, we observed that neutrophils from HIV-1 infected patients release NETs after stimulation with IL-8, and that component molecules of NETs (such as DNA and elastase) are present in the plasma of these individuals. Finally, our results show that NETs exert a potent inhibitory effect on HIV-1 replication in macrophages, and suggest that this innate immunity mechanism may control HIV-1 infection *in vivo*.

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	O Vírus da Imunodeficiência Humana e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	24
1.1.1	Origem e aspectos taxonômicos	24
1.1.2	Epidemiologia da infecção pelo HIV.....	26
1.1.3	Aspectos estruturais e genômicos do HIV-1	29
1.1.4	Transcrição do genoma proviral.....	34
1.1.5	Ciclo replicativo do HIV-1.....	37
1.1.5.1	A infecção pelo HIV-1 em macrófagos.....	42
1.1.6	Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1	44
1.1.7	Terapia antirretroviral.....	47
1.1.8	Resposta imune à infecção pelo HIV-1.....	49
1.2	O neutrófilo e as redes extracelulares (ou <i>Neutrophil extracellular Traps</i>)	54
1.2.1	Biologia do neutrófilo.....	54
1.2.1.1	Estratégias microbidas.....	56
1.2.2	Redes extracelulares de neutrófilos	59
1.2.2.1	Bases moleculares da Netose	62
1.2.2.2	Composição das NETs.....	64
1.2.2.3	Papel das NETs durante as infecções	66
2	OBJETIVOS	69
2.1	Objetivo Geral.....	69
2.2	Objetivos Específicos	69
3	MATERIAL E MÉTODOS	70

3.1	Declaração de ética	70
3.2	Macrófagos e neutrófilos humanos primários.....	70
3.3	Linhagens celulares	71
3.4	Obtenção de sobrenadantes ricos em NETs.....	71
3.5	Microscopia de fluorescência	72
3.6	Infecção pelo HIV-1	73
3.7	Análise do efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1... 73	
3.8	Ensaio de viabilidade celular.....	76
3.9	Quantificação de β -quimiocinas e IL-10 em sobrenadantes de macrófagos tratados com NETs	76
3.10	Avaliação de transcritos do HIV-1.....	76
3.11	Ensaio de infectividade.....	77
3.12	Análise de marcadores de NETs em plasma de pacientes infectados pelo HIV-1, e de liberação de NETs por neutrófilos destes pacientes	78
3.13	Análise estatística	79
4	RESULTADOS	80
4.1	Isolamento dos neutrófilos e obtenção de NETs.....	80
4.2	NETs inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos, sem comprometimento da viabilidade celular.....	83
4.3	O tratamento com NETs induz a produção de RANTES e MIP-1 β em macrófagos.....	89
4.4	Macrófagos de cultivos infectados pelo HIV-1 internalizam NETs.	91
4.5	Análise da participação de componentes das NETs na inibição do HIV-1.	96

4.6	NE e MPO presentes nas NETs participam na inibição do HIV-1.	98
4.7	Análise da participação de MyD88 ou do IFN I na inibição do HIV-1 induzida pelas NETs.....	100
4.8	As NETs, assim como com elastase, reduz a transcrição de RNAs não processados em macrófagos infectados pelo HIV-1.	101
4.9	NETs diminuem a infectividade do HIV-1	102
4.10	Neutrófilos de pacientes com o HIV-1 liberam NETs, e moléculas associadas a redes extracelulares (ETs) são achadas em plasmas desses indivíduos.....	103
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÃO	116
7	PERSPECTIVAS	117
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagem de microscopia eletrônica do artigo original de Barré-Sinoussi e colaboradores.	25
Figura 1.2. Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.	27
Figura 1.3 Distribuição mundial das infecções por subtipos do HIV-1 em 2014.	28
Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da partícula viral madura do HIV-1.	30
Figura 1.5. Representação da organização do genoma do provírus do HIV-1.	31
Figura 1.6. Transcrição do provírus.	36
Figura 1.7. Representação do ciclo replicativo do HIV-1.	39
Figura 1.8. Estrutura e funções do precursor poliproteico Gag.	40
Figura 1.9. Representação dos estágios finais do ciclo replicativo do HIV-1.	41
Figura 1.10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados com HIV-1.	43
Figura 1.11. Curso natural da infecção pelo HIV-1.	45
Figura 1.12. Detecção intracelular da infecção pelo HIV-1 e indução de fatores de restrição viral.	52
Figura 1.13. Conteúdo dos diferentes tipos de grânulos dos neutrófilos.	56
Figura 1.14. Estratégias microbidas dos neutrófilos.	57
Figura 1.15. Análise de microscopia eletrônica de neutrófilos em repouso e em NETose.	60
Figura 1.16. Micróbios capturados por NETs.	61
Figura 1.17. Imunomarcação de NETs.	64
Figura 1.18. NETs interagem com macrófagos.	67
Figura 4.1. Análise da pureza de neutrófilos obtidos por gradiente de Ficoll.	80
Figura 4.2. Produção de NETs por neutrófilos.	82
Figura 4.3. Quantificação de NETs.	83
Figura 4.4. NETs inibem a infecção pelo HIV-1 em macrófagos.	86
Figura 4.5. Efeitos das NETs em células THP-1 e PBMCs.	88

Figura 4.6. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos expostos às NETs.	89
Figura 4.7 NETs induzem a produção de RANTES e MIP-1 β em macrófagos.....	90
Figura 4.8. Macrófagos oriundos de cultivos infectados com HIV-1 interagem com NETs.....	92
Figura 4.9. As NETs são removidas do cultivo de macrófagos após lavagem.....	93
Figura 4.10. Macrófagos de cultivos infectados com HIV-1 internalizam NETs.	94
Figura 4.11. A inibição mediada pelas NETs é independente de fagocitose, mas requer internalização dependente de dinamina.....	95
Figura 4.12. A integridade da associação do DNA:proteína é essencial para a inibição viral mediada pelas NETs.	97
Figura 4.13. NE e MPO presentes nas NETs participam na inibição do HIV-1.	99
Figura 4.14. Análise da participação de MyD88 ou do IFN I na inibição do HIV-1 induzida pelas NETs.	100
Figura 4.15. NETs e elastase regulam os transcritos não processados do HIV-1 em células infectadas.....	101
Figura 4.16. As NETs diminuem a infectividade de vírions liberados por macrófagos.....	102
Figura 4.17. Neutrófilos de pacientes com HIV-1 liberam NETs quando estimulados com IL-8.	104
Figura 4.18. Análise de plasmas de diferentes coortes de pacientes positivos para HIV-1.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1. Resumo dos genes e proteínas do HIV-1 com suas respectivas funções.....	33
Tabela 1. 2. Mecanismos de ação das proteínas granulares dos neutrófilos.....	57
Tabela 1. 3. Diferenças entre necrose, apoptose e netose	61
Tabela 1. 4 Proteínas identificadas nas NETs.....	65
Tabela 3.1 Primers e sondas utilizados.....	71
Tabela 9.1 Dados clínicos dos pacientes infectados pelo HIV-1 participantes no estudo	134

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

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

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*)

BST-2 – Antígeno 2 de células do estroma de medula óssea (*bone marrow stromal cell antigen 2*)

CA - Capsídeo

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

cDNA - Ácido Desoxi-Ribonucléico complementar (*complementary Deoxyribonucleic Acid*)

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

CXCR – Receptor para quimiocina do tipo CXC

DAMP – Padrão Molecular Associado a Dano (*Damage-associated molecular pattern*)

DC – Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)

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

DIC - Contraste de interferência diferencial (do inglês, *Differential Interference Contrast*)

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

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

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

Env – Envelope

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

ETs – Redes extracelulares (do inglês, *Extracellular traps*)

g – Gravidade

gag – Antígeno específico de grupo (do inglês, *Group-specific antigen*)

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

gp – glicoproteína

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

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

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

HLA – Antígeno leucocitário humano (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*)

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

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

kDa – Kilo Dalton

LE – Endossoma tardio (do inglês, *Late Endosome*)

LPS – Lipopolissacarídeo

LTR – Repetição terminal longa (do inglês, *Long Terminal Repeat*)

M – Molar

MA - Matriz

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

MVBs- Corpos Multivesiculares (do inglês, *MultiVesicular Bodies*)

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

mg – miligrama

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

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

mL – mililitro

mM – milimolar

MPO - Mieloperoxidase

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, *messenger Ribonucleic Acid*)

NADPH oxidase – Oxidase de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*)

NC - Nucleocapsídeo

Nef – Fator efetor negativo (do inglês, *Negative effector factor*)

NE – Elastase Neutrófila (do inglês, *Neutrophil elastase*)

NETs – Redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*)

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*)

ng – nanograma

NK – Células assassinas naturais (do inglês, *Natural Killer*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAD4 - Peptidilarginina deiminase 4 (*Peptidylarginine deiminase 4*)

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno (*Pathogen-associated molecular pattern*)

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

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

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

PD-1 – Gene de morte programada 1 (*Programmed Death 1*)

PD-L1 – Ligante de morte programada 1 (*Programmed Death Ligand 1*)

pH – Potencial hidrogeniônico

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

PMA – Forbol 12-Miristato 13-Acetato (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*)

PMN - Polimorfonuclear

Pol - polimerase

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

RER – retículo endoplasmático rugoso

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

RPMI – Meio Instituto Parque Memorial Roswell (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

RNA – Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

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

SD – Desvio padrão (*Standard deviation*)

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

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

SP – Peptídeo espaçador (*spacer peptide*)

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

TAR – Resposta à Transativação (*Transactivation Response*)

Tat – Transativador de Transcrição (*Transcriptional transactivator*)

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

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

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

VCC – Compartimentos que contêm vírus (*Virus-containing compartments*)

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

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

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

7AAD – 7-aminoactinomicina D

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

1.1.1 *Origem e aspectos taxonômicos*

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pertence ao gênero Lentivirus da família Retroviridae (sub família Orthoretrovirinae) (1).

Os membros da família Retroviridae possuem um genoma diploide composto por duas cópias de RNA de fita simples. Esse grupo apresenta a propriedade única de transcrever de forma reversa seu RNA genômico em DNA de fita dupla e integrá-lo no genoma da célula hospedeira. De forma característica, todos os integrantes dessa família possuem uma organização genética semelhante composta pelos genes *gag*, *pol* e *env* (2,3).

Além da organização do genoma descrita acima, os lentivirus que infectam primatas possuem também outros genes adicionais chamados de regulatórios (*tat*, *rev*) e acessórios (*vif*, *vpr*, *nef* e *vpu*, este último gene presente apenas no HIV-1) (4). Diferente de outros retrovírus, os lentivírus podem replicar em células terminalmente diferenciadas que não sofrem divisão mitótica (4). Cabe indicar que os membros deste gênero estão geralmente associados a doenças crônicas tanto do sistema nervoso central quanto do sistema imunológico (5).

O HIV foi isolado em 1983 por Barré-Sinoussi e colaboradores (6) (Figura 1.1) dois anos depois da descrição de uma nova imunodeficiência humana adquirida em pacientes com pneumonia pneumocística e candidíase, entre outras infecções oportunistas (7).

O agente recebeu diversas denominações como vírus associado a linfadenopatia (LAV, *lymphadenopathyassociated virus*), vírus humano linfotrópico de células T tipo III (HTLV-III, *human T-cell lymphotropic virus type III*), vírus associado a imunodeficiência (IDAV, *immunodeficiency-associated virus*), retrovírus associado à AIDS (ARV, *AIDS-associated retrovirus*). Finalmente em 1986, um grupo de cientistas do comitê internacional de taxonomia de vírus humanos sugeriu a denominação de Vírus da

Imunodeficiência Humana (HIV, *human immunodeficiency vírus*) para todos os vírus causadores da AIDS (8).

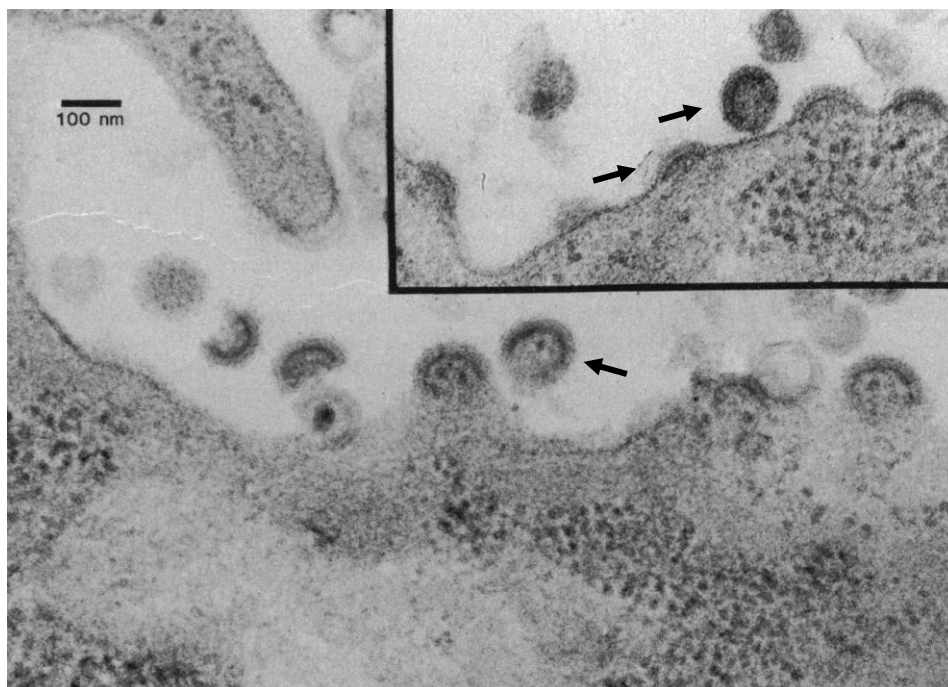


Figura 1.1. Imagem de microscopia eletrônica do artigo original de Barré-Sinoussi e colaboradores.

Na imagem pode ser observado o brotamento e liberação de partículas virais de um linfócito (setas). Tomado de (6).

As evidências mais antigas da infecção pelo HIV em humanos foram encontradas em amostras de soro e em uma biópsia de linfonodo de 1959 e 1960, respectivamente, em Kinshasa na República Democrática do Congo (9,10). Análises epidemiológicas e de filogenia indicam que o vírus teria sido introduzido na população humana na década de 1920 (11), produto de um salto interespecífico do vírus da imunodeficiência simia (SIV) aos seres humanos na África Ocidental e Central como consequência da caça de macacos para alimentação ou captura como animais de estimação (12).

Atualmente são reconhecidos dois tipos de HIV, o tipo 1 e o tipo 2 (HIV-1 e HIV-2, respectivamente). O primeiro descrito em 1983 por Barré-Sinoussi e o HIV-2 isolado em 1986 por Clavel e colaboradores (13). Ambos tipos são similares morfológicamente, mas com diferenças na organização gênica e na patogenicidade (1). Assim, o HIV-2 codifica para a proteína Vpx em vez da proteína Vpu (14), além de ser considerado menos patogênico que o HIV-1 (15,16). As análises de sequências gênicas sugerem que o HIV-1 e o HIV-2 são

o resultado de transmissões para os seres humanos de SIV_{cpz} do chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* e SIV_{smm} de *mangabeis* da espécie *Cercocebus atys*, respectivamente (17,18).

O curso natural da infecção pelo HIV-1 produz uma diminuição drástica das células CD4⁺ acompanhada de infecções múltiplas e do aumento da viremia, com o decorrer dos anos gera-se a condição clínica conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) (15), resultante da profunda imunossupressão causada pela infecção pelo HIV-1.

Desde o início da epidemia, mais de 70 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV-1, e estima-se que o número de óbitos por complicações relacionadas à AIDS seja de aproximadamente 50% dos infectados (cerca de 35 milhões). A terapia anti-retroviral combinada (cART) é altamente eficaz, sendo capaz de suprimir ou diminuir a replicação do HIV, melhorando a função imunológica e reduzindo consideravelmente o risco de desenvolver a AIDS [revisado em (16)].

1.1.2 ***Epidemiologia da infecção pelo HIV***

O informe da UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS) estima que 36.7 milhões de pessoas encontravam-se infectadas pelo HIV em 2017 (19), sendo a região da África subsaariana a mais afetada com uma prevalência aproximada de 4,2% (1 de cada 25 pessoas). A segunda região mais afetada são as Américas (0.5%), seguida pela Europa (0,4%) (Figura 1.2).

Os dados de UNAIDS 2017 indicam também que 1,8 milhões de novas infecções aconteceram ao longo deste ano, com aproximadamente 1 milhão de óbitos por doenças relacionadas à AIDS (19).

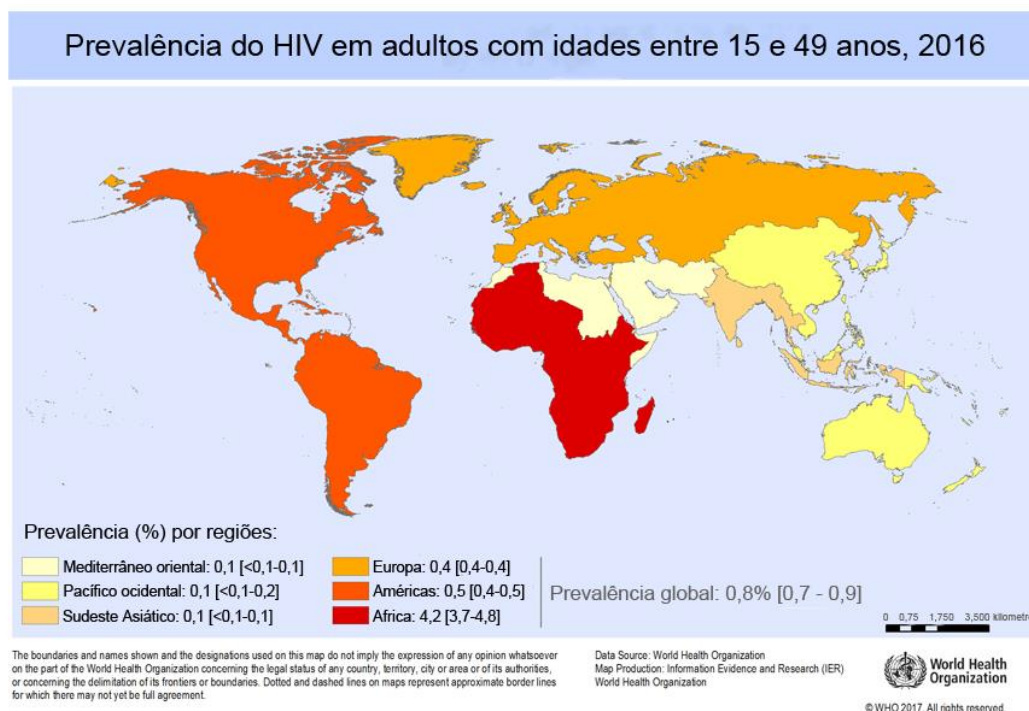


Figura 1.2. Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.

Estima-se que 0,8% [$0,6-0,9\%$] dos adultos com 15-49 anos em todo o mundo vivem com o HIV, embora o fardo da epidemia continua a variar consideravelmente entre países e regiões. O continente africano é a região mais gravemente afetada, com quase 1 em cada 25 adultos infectados com HIV e representando quase dois terços das pessoas que vivem com o HIV em todo o mundo. Modificado de <http://www.who.int/gho/hiv/en/>

A nível regional, 1,8 milhão de pessoas vivem com HIV-1 na América Latina, com 97 mil novas infecções reportadas em 2016. No Brasil, estima-se que 830 mil pessoas se encontram infectadas, com 48 mil novas infecções (uma incidência de 0,24 por cada 1000 habitantes) e aproximadamente 14 mil falecimentos relacionados à AIDS em 2016 (20).

Baseado em análises de filogenia, o HIV-1 é subdividido em grupos diferentes: M (*major*), O (*outlier*), N (não M, não O). Os isolados dos grupos O e N encontram-se concentrados no leste e na região centro ocidental da África, respectivamente. Enquanto esses dois grupos são raros, o grupo M se espalhou de forma irrestrita no mundo sendo causa de mais de 95% das infecções pelo HIV-1. O grupo M por sua vez pode ser dividido nos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K (21), sendo o subtipo B o de maior prevalência nas Américas e Europa Ocidental. Em 2007, Gilbert e colaboradores demonstraram que esse subtipo teria se originado de uma cepa única levada da África para o Haiti antes de se espalhar nos Estados Unidos (22). O subtipo C -predominante na África do Sul

e na Índia - apresenta a maior prevalência global com 56% das infecções no mundo (23) (Figura 1.3). Além dos subtipos, a recombinação entre estes tem gerado 60 formas recombinantes circulantes identificadas atualmente (21). Os subtipos A, D e G são responsáveis por 12%, 2% e 5% das infecções mundiais, respectivamente. Enquanto que os demais subtipos juntos (F, H, J, K) causam menos de 1% das infecções (24).

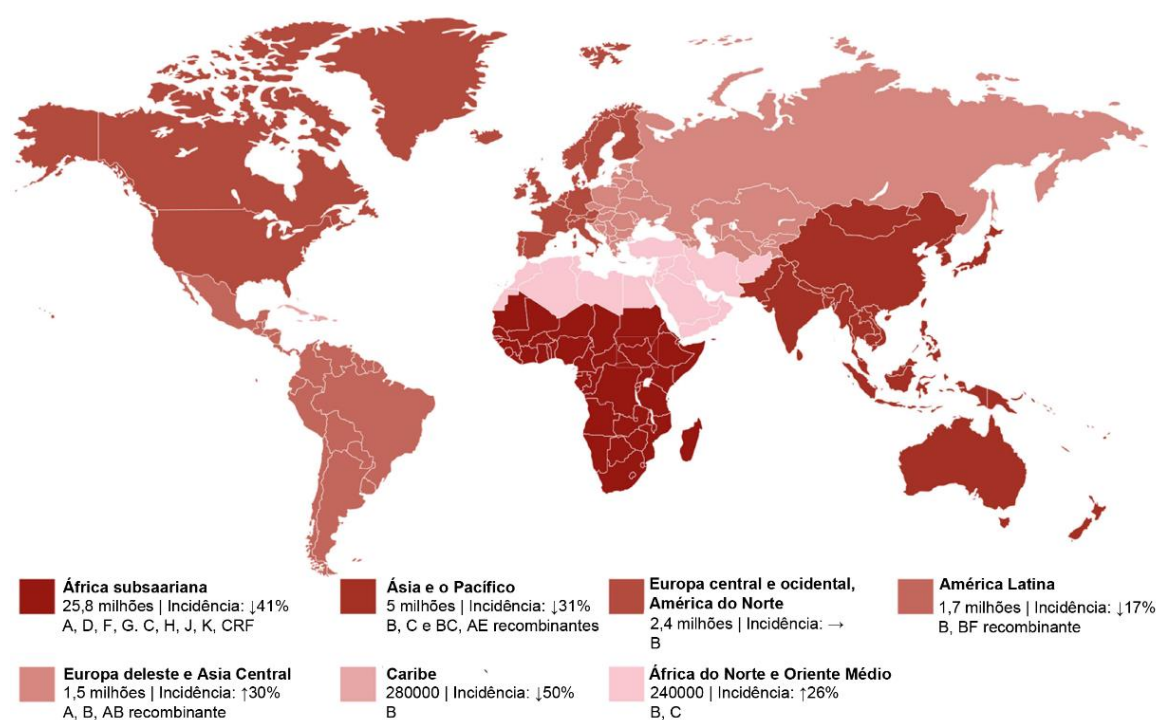


Figura 1.3 Distribuição mundial das infecções por subtipos do HIV-1 em 2014. Incidência de novas infecções de 2000 a 2014 e subtipos de HIV-1. Números e percentagens baseados na ficha técnica da UNAIDS 2015. Modificado de (21).

Em 1988, Li e colaboradores determinaram que a taxa de evolução do HIV-1 é aproximadamente um milhão de vezes mais rápida do que o genoma dos mamíferos (25). Dentre as causas dessa extensa e rápida variabilidade do genoma do HIV-1 podem ser consideradas: 1) A alta taxa de mutações durante a transcrição reversa. Estima-se que a cada ciclo de replicação viral ocorra uma mutação por genoma (25); 2) Eventos de recombinação que ocorrem quando a célula hospedeira está infectada com múltiplos subtipos de HIV-1 (26); 3) O grande número de pessoas infectadas junto com a melhora das redes de transporte e a intensa migração humana (21); 4) A elevada produção diária de

víriões *in vivo*, estimada em $10,3 \times 10^9$ partículas virais liberadas no meio extracelular (27).

1.1.3 Aspectos estruturais e genômicos do HIV-1

A partícula do HIV-1, ou vírion, é esférica com um diâmetro aproximado de 100 nm. Apresenta na superfície externa uma bicamada lipídica (ou envelope) proveniente da membrana plasmática, ou de compartimentos intracelulares, dependendo da célula hospedeira na qual foi produzido o vírion. Inseridas na membrana viral, encontram-se trímeros de glicoproteínas (gp). Cada trímero está composto por monômeros glicoproteicos, que por sua vez, estão constituídos por duas subunidades glicoproteicas, uma transmembranar de 41 KDa (gp41) e outra solúvel de 120 KDa (gp120). A subunidade gp120 encontra-se ancorada à gp41 e está em contato com o espaço extracelular (Figura 1.4). Ambas subunidades são originadas de um precursor glicoproteico comum de 160 KDa (gp160) (28).

Internamente, uma matriz de natureza proteica formada por monômeros da proteína p17 contorna um *core* cônico composto pela proteína p24, o capsídeo viral. A quantificação da proteína p24 presente em sobrenadantes de culturas celulares (ou mesmo no soro de pacientes) permite medir a produção do HIV-1. Estima-se que cada partícula viral contenha aproximadamente 2000 moléculas de p24 (1).

O Capsídeo, por sua vez, alberga a Protease viral (PR), o Nucleocapsídeo (NC, composto pelas proteínas p7) e as enzimas Integrase (IN) e Transcriptase reversa (RT), todas elas associadas com genoma viral (29). O genoma do HIV-1 é composto por duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e sentido positivo. Uma vez no citoplasma da célula hospedeira, a enzima viral transcriptase reversa sintetiza o Ácido Desoxi-Ribonucleico (DNA) viral que, posteriormente, será integrado ao genoma da célula hospedeira pela ação da enzima viral Integrase (30).

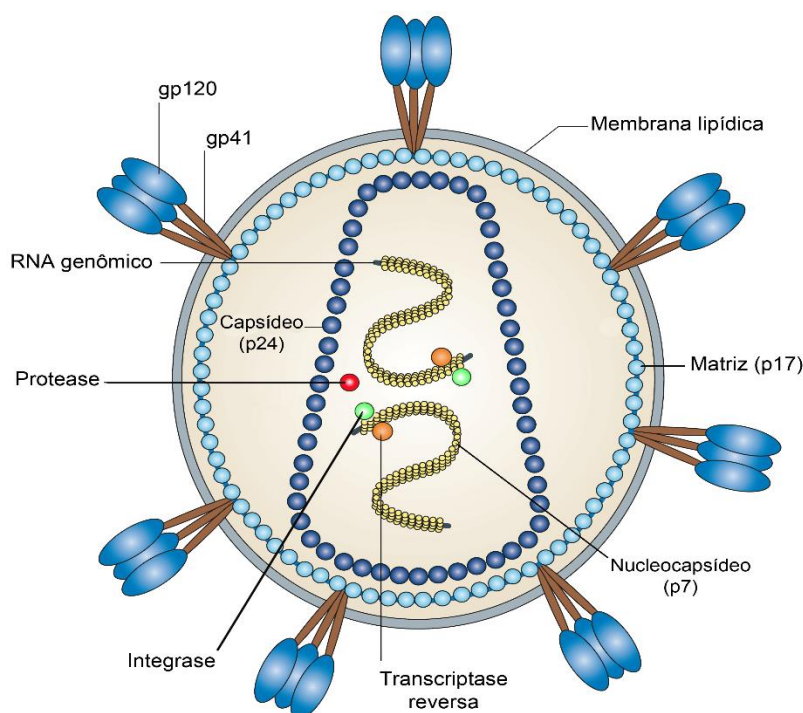


Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura da partícula viral madura do HIV-1.

A partícula viral apresenta uma bicamada de membrana lipídica oriunda de membranas celulares da célula-hospedeira. No envelope viral encontram-se inseridos complexos de gp120-gp41. No interior da partícula madura, a subunidade gp41 interage com a Matriz. Mais internamente, o capsídeo viral contém o material genético do vírus, composto por cópias de RNA associadas ao nucleocapsídeo e às enzimas transcriptase reversa e Integrase. Figura modificada de (31).

A forma integrada do HIV-1 é conhecida como provírus e possui aproximadamente 9,8 kilobases de comprimento (32). A figura 1.5 exibe uma representação do provírus. A sequência do DNA viral apresenta em suas extremidades segmentos gênicos conhecidos como Repetições Terminais Longas (LTR). A região LTR-5' codifica para o promotor da transcrição dos genes provirais. Seguindo a direção do extremo 5' para o extremo 3', encontra-se o gene *gag* (antígeno específico de grupo), que codifica para o precursor poliproteico Pr55Gag, que posteriormente será clivado pela protease viral originando as proteínas p17, p24, p7 e p6 (matriz, capsídeo, nucleocapsídeo e domínio tardio, respectivamente). A continuação, *gag* é seguido do gene *pol* (polimerase) que codifica também um precursor poliproteico, o Pr160GagPol, clivado também pela protease viral dando origem às enzimas PR (p12), IN (p32), RT (p51) e RNase H (p15). Contíguo ao gene *pol*, o gene *env* (envelope) gera precursor poliproteico do envelope gp160, que posteriormente é clivado por proteases celulares originando as proteínas gp120 e gp41 [revisado em (33)].

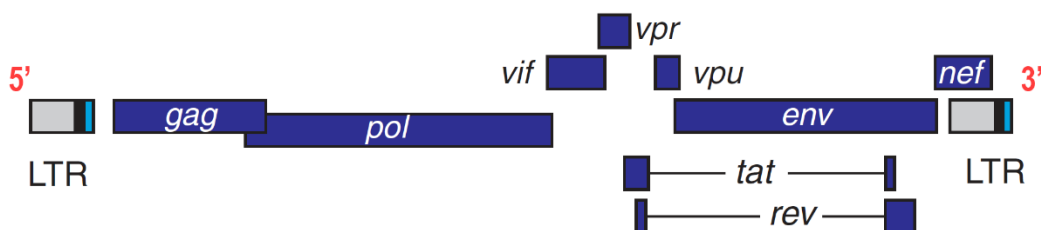


Figura 1.5. Representação da organização do genoma do provírus do HIV-1.

Retângulos em azul indicam os marcos de leitura aberta com seus respectivos nomes. Os LTRs são mostrados em cinza. Adaptado de (34).

Adicionalmente, o genoma do HIV codifica para outras duas proteínas chamadas de regulatórias: *tat* (Transativador de transcrição) e *rev* (regulador do vírion)

O gene *tat*, codifica um dos fatores regulatórios da expressão gênica do HIV-1, e seu produto, Tat, é uma proteína de 14 KDa essencial para a replicação do HIV-1. Diferentemente de outros fatores de transcrição que interagem com o DNA, Tat se associa ao RNA, promovendo a transcrição do provírus aproximadamente 100 vezes. Tat também é liberada no espaço extracelular por células infectadas, e sabe-se que a interação de Tat com células não infectadas pode promover a morte destas [revisado em (35)].

Normalmente RNAs sem processamento (*unspliced*) ou incompletamente processados são retidos no núcleo da célula e posteriormente degradados. A proteína codificada pelo gene *rev* participa da exportação de RNAs virais sem processamento ou incompletamente processados do núcleo ao citoplasma para sua posterior tradução [revisado em (35)].

O genoma do HIV-1 contém outros quatro genes que codificam proteínas chamadas de acessórias. Tal denominação foi estabelecida baseada em estudos iniciais que mostraram que a inativação desses genes produzia alterações mínimas na replicação viral em linhagens celulares (36–38). No entanto, investigações subsequentes em células primárias demonstraram que os produtos desses genes são capazes de mudar drasticamente o curso e a gravidade da infecção viral (39)

O gene *vif* (fator de infectividade viral) se superpõe de forma parcial com os genes *pol* e *vpr*. O produto é um polipeptídeo de 23 KDa (30) que é incorporado

ao vírion durante a montagem da partícula viral (40). Essa proteína acessória é essencial para a replicação viral eficiente em PBMCs, macrófagos e em algumas linhagens celulares (41). Mutações nesse gene têm como consequência a redução, inclusive a perda, da infectividade viral. A função melhor caracterizada desta proteína é a de neutralização de uma citidina deaminase endógena chamada APOBEC3G. Essa enzima do hospedeiro, dependente de Interferon de tipo 1, induz mutações pontuais do tipo guanina para adenina no genoma do HIV, representando, com esta atividade, um fator celular antiviral inato (42,43).

O gene *vpr* (proteína viral r) por sua vez codifica uma proteína com um papel fundamental na infecção de células que não estão em divisão. Após a infecção, essa proteína é rapidamente direcionada para o núcleo da célula hospedeira (44). Estudos indicaram que Vpr associa-se ao complexo de pré-integração (PIC), interage com microtúbulos do citoesqueleto e auxilia no endereçamento do DNA viral ao núcleo. Essa proteína também provoca a interrupção na fase G2 do ciclo celular (45).

Em 1988, Strebel e colaboradores identificaram um gene exclusivo do HIV-1, *vpu*, com superposição parcial com o extremo 5' de *env* (36). A proteína codificada por esse gene induz a degradação de moléculas CD4 no retículo endoplasmático através da via ubiquitina/proteasoma (46,47) e participa da liberação do vírion da superfície da célula hospedeira antagonizando a proteína endógena Teterina, também chamada BST-2 (*bone marrow stromal cell antigen 2*) ou CD317, a qual causa a retenção das partículas virais na superfície de células infectadas (48,49).

A proteína miristolada Nef inicialmente foi nomeada como fator de regulação negativa, pois pensava-se que esta atuava de forma inibitória na replicação viral (50). Estudos posteriores indicaram que essa proteína é um fator essencial para replicação viral eficiente, além de facilitar a replicação do vírus e aumentar a infectividade dos vírions *in vitro* (51). O gene é composto por um éxon e encontra-se superposto com o LTR 3'. A proteína interage com a cauda citoplasmática das moléculas CD4 na superfície da célula infectada. Essa interação aumenta a taxa de endocitose de CD4 com a sua posterior degradação nos lisossomos. Nef também induz a redução de MHC de classe I da superfície

celular, protegendo a célula hospedeira da ação de células T citotóxicas [revisado em (35)].

Um resumo dos genes do HIV-1, seus produtos proteicos e função pode ser apreciado na tabela 1.1.

Tabela 1. 1. Resumo dos genes e proteínas do HIV-1 com suas respectivas funções

Gene	Tamanho*	Proteína	Função
<i>Gag</i>		Pr55Gag	Precursor das proteínas estruturais internas do vírion
	p24	Capsídeo (CA)	Formação do capsídeo viral
	p17	Matriz (MA)	Proteína miristilada, compõe a camada interna do envelope viral
	p7	Nucleocapsídeo (NC)	Formação do complexo núcleo proteico associado ao RNA genômico do vírus
	p6		Participa na liberação de partículas virais
<i>Pol</i>		Pr160GagPol	Precursor das enzimas virais
	p10	Protease (PR)	Clivagem proteolítica dos precursores Pr55Gag e Pr160GagPol
	p51	Transcriptase reversa (RT)	Transcrição reversa do RNA viral em DNA proviral de dupla fita
	p15	RNase H	Degradação do RNA viral no complexo de RNA / DNA viral
	p32	Integrase (IN)	Integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro
<i>Env</i>		PrGp160	Precursor das proteínas do envelope
	gp120	Glicoproteína de superfície	Ligação do vírus ao receptor na célula alvo
	gp41	Glicoproteína de transmembrana	Fusão das membranas viral e celular
<i>Tat</i>	p14	Transativador de transcrição	Ativa a transcrição de genes virais
<i>Rev</i>	p19	Regulador do <i>splicing</i> do RNA	Regula a exportação de RNAs sem processamento ou incompletamente processados
<i>Vif</i>	p23	Proteína de infectividade viral	Incorporada no vírion, produção de vírus infecciosos, antagoniza APOBEC3G.

Continuação. Tabela 1.1. Resumo dos genes e proteínas do HIV-1 com suas respectivas funções.

Gene	Tamanho*	Proteína	Função
<i>Vpr</i>	p15	Proteína viral r	Incorporada no vírion, importação do PIC ao núcleo da célula hospedeira
<i>Vpu</i>	p16	Proteína viral u	Redução da expressão de CD4, liberação do vírion da superfície da célula hospedeira (antagoniza BST2)
<i>Nef</i>	p27	Factor regulador negativo	Redução da expressão de CD4 e MHC-I na membrana celular

* Os números correspondem ao tamanho das proteínas (p) ou glicoproteínas (gp) em 1.000 Da. Adaptado de (1)

1.1.4 *Transcrição do genoma proviral*

Após integrado, o DNA viral serve como molde para a síntese de RNAs mensageiros (mRNAs) virais pela ação da RNA polimerase II celular (52). O transcrito primário pode ser processado de forma alternativa, gerando mais de 30 tipos de mRNA (53) e nove proteínas, ou ser empacotado sem modificações nas partículas virais como RNA genômico (33).

A região LTR-5' contém sequências promotoras e *enhancers* com sítios de união para fatores celulares de início de transcrição. A sequência promotora contém três sítios de união para SP1 (54), um elemento TATA (55) e uma sequência iniciadora altamente ativa (56). Essas regiões do promotor auxiliam à RNA polimerase II se posicionar no sítio de início da transcrição. Por sua vez, a região *enhancer* possui dois motivos de união para o fator de transcrição NF-κB (57). Tanto os membros da família NF-κB quanto do fator de transcrição NFAT podem ligar nesses motivos (58,59), mas de forma mutuamente excludente, sendo a união de NF-κB é mais eficiente que a de NFAT (60).

Uma vez que esses fatores estejam presentes na região do LTR-5' a transcrição começa, mas na ausência da proteína Tat, a produção de transcritos virais termina de forma abrupta devido à baixa processividade da RNA polimerase II. A proteína Tat estabiliza o alongamento do RNA nascente, aumentando assim a taxa da transcrição em aproximadamente 1000 vezes (61).

Tat interage com uma estrutura em alça rica em uracila do RNA viral (62), chamada região de resposta de transativação (TAR). Depois da união à TAR, Tat associa-se com o Fator Positivo b de Alongamento da Transcrição (P-TEFb, formado pelas subunidades cinase dependente de ciclina 9, *Cdk9*, e ciclina T1, *CycT1*). O complexo Tat/P-TEFb induz a dissociação de fatores de alongamento negativos do TAR -como por exemplo DSIF e NELF (63)- e fosforila o domínio C terminal (CTD) da RNA polimerase II, promovendo assim o alongamento do RNA (64), com a consequente transcrição produtiva do provírus (Figura 1.6)

A transcrição do provírus do HIV-1 um único RNA que posteriormente pelo processo de splicing geram-se três classes de RNAs com comprimentos diferentes. Primeiramente, os transcritos completamente processados (*spliced*) possuem aproximadamente 2 kilobases (kb) de comprimento e codificam para Tat, Nef e Rev. Diferentemente de mRNAs celulares, o provírus gera também transcritos parcialmente processados (≈ 4 kb) que codificam para Env, Vif, Vpr e Vpu, assim como também transcritos sem processamento (≈ 9 kb, *unspliced*) que codificam para Gag e Pol e geram também o RNA genômico do vírus (65).

Imediatamente após a integração, apenas os transcritos de 2 kb atravessam os poros da membrana nuclear e são traduzidos no citoplasma, enquanto que os demais transcritos permanecem no núcleo. Posteriormente, durante a fase tardia da infecção, são observados altos níveis da proteína Rev que ingressa ao núcleo e participa da exportação dos transcritos parcialmente processados e não processados ao citoplasma para serem depois traduzidos. Assim, os genes do HIV-1 podem ser classificados em genes de expressão precoce e genes de expressão tardia, sendo os primeiros independentes da proteína Rev e os tardios dependentes desta proteína (34).

Tanto os RNA incompletamente processados, quanto os parcialmente processados, contêm uma estrutura secundária denominada Elemento de resposta a Rev (RRE). A interação Rev:RRE com a exportina celular 1 (CRM-1) e com a helicase DDX3 permite a exportação desses ácidos nucleicos ao citoplasma (66,67).

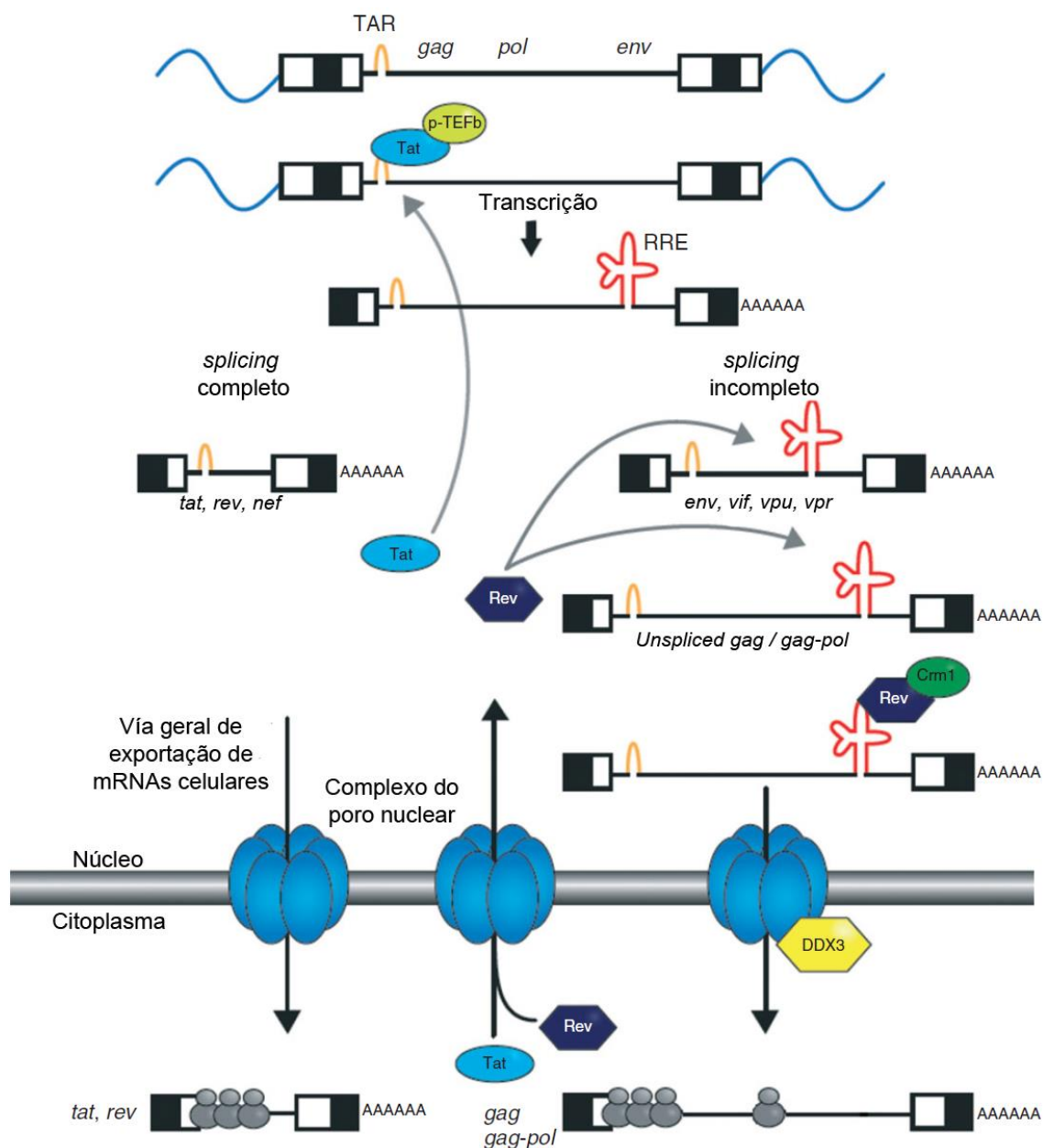


Figura 1.6. Transcrição do provírus.

O HIV-1 gera três tipos de mRNAs: *unspliced* (9kb), com *splicing* incompleto (4kb) e com *splicing* completo (2 kb). A expressão de genes precoces gera mRNAs com *splicing* completo, incluindo *tat*, *rev*, *nef* (margem esquerda). Após tradução no citoplasma, as proteínas Tat e Rev são importadas ao núcleo. Tat se liga à TAR para promover o alongamento da transcrição, enquanto que REV liga-se ao RRE de transcritos sem *splicing* completo (margem direita) para mediar na exportação ao citoplasma desses transcritos depois de recrutar ao fator CRM1. Essa exportação é facilitada pela helicase DDX3. Modificado de (65)

1.1.5 *Ciclo replicativo do HIV-1*

O ciclo do HIV-1 pode ser dividido em etapas, cada uma delas envolvendo moléculas do vírus e da célula hospedeira (Figura 1.7). A primeira, denominada de entrada, inicia-se com a interação do vírus com moléculas da superfície da célula hospedeira, e conclui-se com a fusão do envelope viral com a membrana celular e com a liberação do capsídeo viral no citoplasma.

Com maiores detalhes, a entrada envolve primeiramente a ligação da molécula viral gp120 ao receptor CD4 da célula hospedeira. A molécula gp120 contém domínios conservados (C1-C5) e loops variáveis (V1-V5). A interação de gp120 com o receptor CD4 produz uma mudança estrutural nos domínios variáveis, em especial em V3, que é exposto aumentando a afinidade da gp120 pelos co-receptores CCR5 ou CXCR4 [revisado em (68)]. Antes da descoberta desses co-receptores, foi descrito que as β -quimiocinas MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa), MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófagos-1 beta) e RANTES (Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) têm a capacidade de diminuir a infecção das células suscetíveis ao vírus (69). Essas moléculas ligam-se ao CCR5 e induzem a internalização deste co-receptor crítico do HIV-1, bloqueando, assim, a entrada do vírus (70–73). A importância do co-receptor CCR5 na infecção *in vivo* pode ser apreciada em indivíduos homozigotos para o alelo mutante CCR5 delta 32. Essa mutação compreende uma deleção de 32 pares de bases no gene *ccr5*, que codifica uma proteína truncada retida no retículo endoplasmático, e, como consequência, não é expressa na membrana plasmática (74). Indivíduos homozigotos para esse alelo mutante são altamente resistentes à infecção por isolados virais trópicos para CCR5 (75,76). Vários anos após o HIV ter sido identificado como o agente etiológico da AIDS, as cepas de HIV foram descritas como trópicas para macrófagos (M trópico) ou trópicas para células T (T trópicas). Investigações posteriores demonstraram que os isolados M e T trópicos usavam preferencialmente os co-receptores CCR5 (77,78) ou CXCR4 (79,80), respectivamente. Estabeleceu-se assim uma nova nomenclatura baseada no tropismo viral (81), denominando os isolados com tropismo para CCR5 como vírus R5 trópicos, os isolados com tropismo para CXCR4 como X4 trópicos, e aqueles com tropismo duplo como R5X4 trópicos.

Finalmente, a ligação da gp120 ao co-receptor expõe a gp41, hidrofóbica e até então oculta, que se insere na membrana da célula hospedeira promovendo a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, evento este fundamental na liberação do capsídeo viral no citoplasma (68).

Uma vez no citoplasma, ocorre o desnudamento do capsídeo viral e a transcrição reversa do RNA genômico do vírus para produzir uma dupla fita de DNA viral. A transcrição reversa é um processo complexo efetuado pela enzima RT, a qual é heterodimérica e contém duas subunidades, p51 e p15. A primeira subunidade (p51) apresenta as atividades de polimerase de DNA dependente de RNA e dependente de DNA. Assim, a atividade dependente de RNA da RT, usando como *primer* um tRNA, sintetiza uma fita de DNA complementar ao RNA genômico, estabelecendo um complexo de DNA/RNA. A seguir, a subunidade p15 (também chamada de RNase H) degrada a fita original de RNA desse duplex, permitindo a atividade de polimerase de DNA dependente de DNA da subunidade p51 para produzir a dupla fita de DNA viral [revisado em [revisado em (1,15)].

O DNA viral de dupla fita, associado com as proteínas MA, RT, IN e Vpr forma o complexo de pré-integração (PIC) que é transportado ao núcleo através do citoesqueleto (82).

Uma vez no interior do núcleo, a proteína IN participa do processo de inserção do DNA viral no genoma do hospedeiro estabelecendo assim o chamado provírus, que será replicado como parte de genoma da célula hospedeira durante a divisão celular, e também transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro em associação com fatores celulares e a proteína viral TAT, gerando produtos virais [revisado em (65)]. No interior do núcleo, existem também DNAs virais não integrados, chamados de formas epissomais, que circularizam-se antes de serem degradados por enzimas celulares (83). A integração viral ocorre com maior frequência em regiões consideradas exon de genes (84).

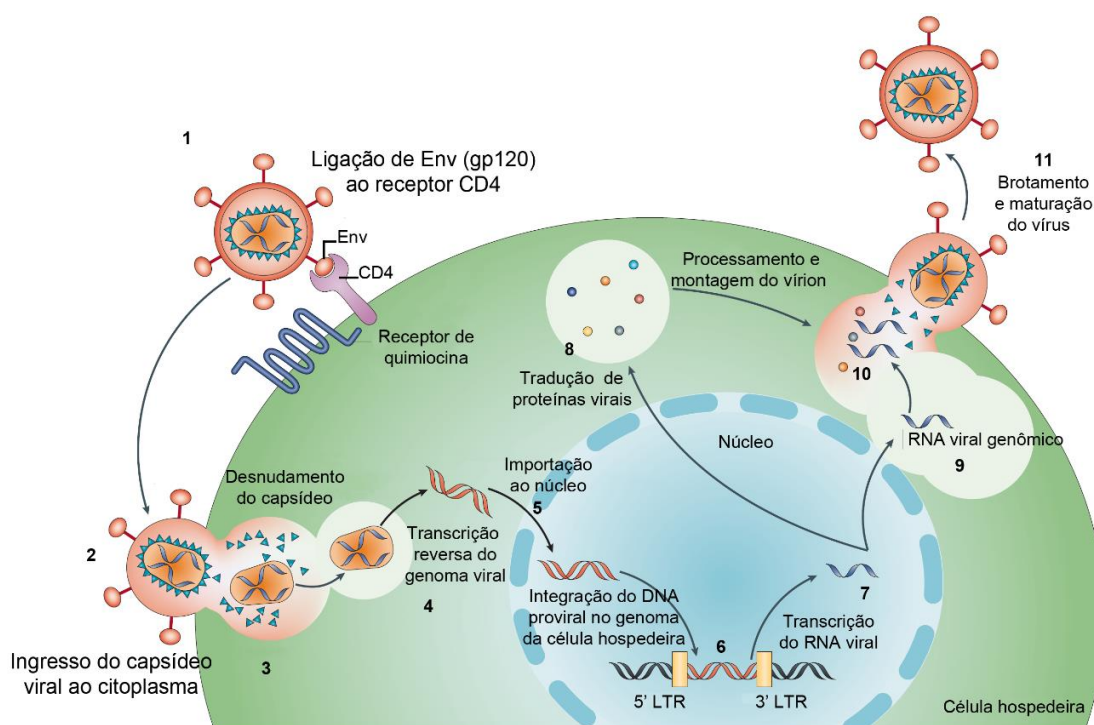


Figura 1.7. Representação do ciclo replicativo do HIV-1.

O ciclo de infecção começa com a ligação das proteínas do envelope viral com a molécula CD4, e posteriormente com o co-receptor, na superfície da membrana plasmática da célula alvo (passo 1). Uma mudança conformacional permite a exposição da gp41 que promove a fusão do envelope com a membrana plasmática (passo 2) permitindo o acesso do capsídeo ao citoplasma que logo após desnuda-se (passo 3) para o RNA genômico sofrer o processo de transcrição reversa e a formação de uma dupla fita de DNA (passo 4). A continuação, é formado o complexo de pré-integração (contendo DNA e proteínas virais) que migra através do núcleo (passo 5) para posteriormente o DNA viral ser integrado no genoma do hospedeiro pela ação da proteína IN (passo 6). O provírus então é transcrito (passo 7) originando transcritos virais que poderão ser traduzidos em proteínas no citoplasma (passo 8) ou constituírem o RNA viral genômico (passo 9). Proteínas virais e RNA genômico são direcionados para a membrana plasmática aonde acontece a montagem e o brotamento do vírion (passos 10, 11). Posteriormente, a partícula viral é liberada e acontece a maturação do vírion a partir da clivagem de Gag-Pol mediada pela PR (passo 11). Modificada de (85).

As glicoproteínas do envelope viral (Env) são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), modificadas no aparelho de Golgi e finalmente encaminhadas em vesículas até a membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 1.9). O precursor da poliproteína Gag (Pr55_{Gag}), por sua vez, é sintetizado por ribossomos no citoplasma a partir do mRNA viral (Figura 1.9), onde recebe a adição de um grupo miristilo de forma co-traducional no extremo N terminal, essa modificação permite a inserção de Pr55_{Gag} na monocamada interna da membrana plasmática. Estruturalmente, o precursor da poliproteína está composto de quatro domínios organizados do extremo N- ao C- terminal: matriz (MA), capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC) e p6, junto com os dois peptídeos espaçadores SP1 e SP2 (Figura 1.8) [revisado em (86)].

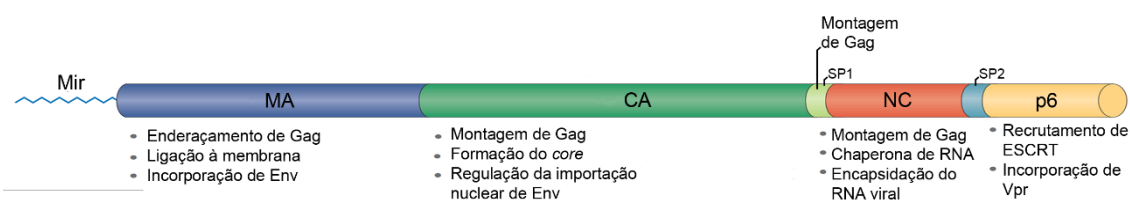


Figura 1.8. Estrutura e funções do precursor poliproteico Gag.

Os principais domínios de Gag - matriz (MA), capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC) e p6 - são apresentados junto com os peptídeos espaçadores – SP1 e SP2 - ao longo de uma representação linear da poliproteína precursora de Gag. As funções principais de cada domínio são também indicadas na Figura. Mir: grupo miristilo. Adaptado de (86).

Cada domínio do precursor possui funções específicas durante a montagem e liberação da partícula viral (Figura 1.8). Assim, o domínio MA direciona ao Pr55Gag para domínios enriquecidos em colesterol da membrana plasmática (*lipid rafts*) interagindo especificamente com o fosfolípido fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato; CA dirige a multimerização de Gag durante a montagem dos vírions; NC recruta o RNA genômico viral ao interior dos vírions em brotamento; o domínio p6 recruta o ESCRT-I que participa na catálise da fissão de membrana e liberação da partícula viral (Figura 1.9). Paralelamente, também no citoplasma, é sintetizado o precursor GagPol (Pr160_{GagPol}) que contém domínios para as enzimas PR, RT e IN. Finalmente, após da liberação das partículas virais acontecem modificações estruturais no vírion. Durante esse processo chamado de maturação, a protease viral (codificada pelo Pr160_{GagPol}) cliva os precursores Gag e GagPol originando as formas maduras das proteínas MA, CA, NC, p6 e as enzimas PR, RT e IN, respectivamente. Só após essas mudanças estruturais as partículas tornam-se infectivas (Figura 1.9) [revisado em (86)].

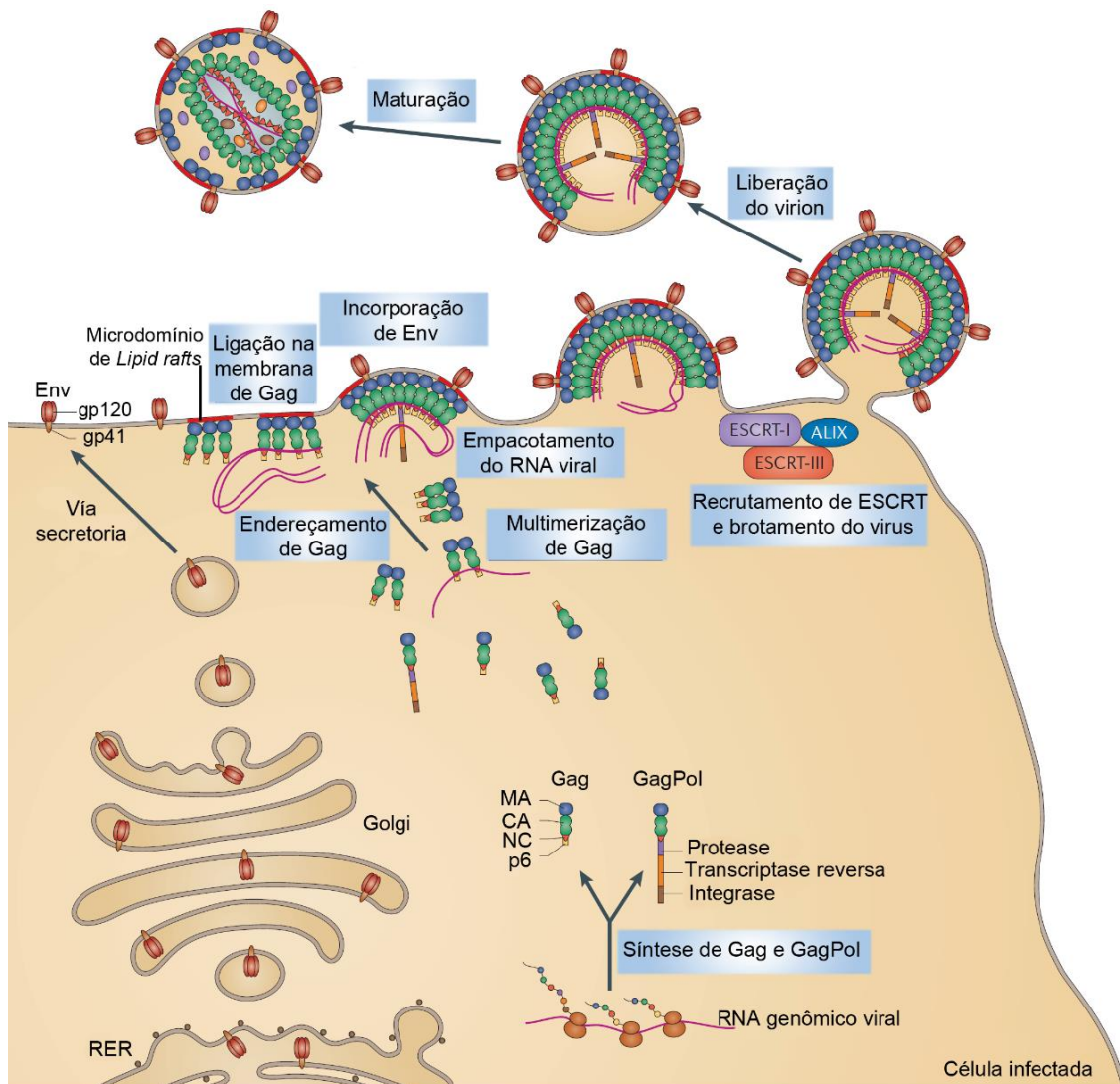


Figura 1.9. Representação dos estágios finais do ciclo replicativo do HIV-1.

As glicoproteínas do envelope viral (Env) transitam pela via secretória, do retículo endoplasmático rugoso (RER) para o Golgi e, em seguida, em vesículas até chegarem na membrana plasmática da célula infectada (margem esquerda da figura). Por outro lado, o precursor poliproteico Gag – contendo os domínios matriz (MA), capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC) e p6 - é sintetizada no citosol. Enquanto que o precursor poliproteico GagPol - que contém os domínios MA, CA, NC, protease, transcriptase reversa e integrase - é sintetizada como resultado de um evento programado de mudança de fase de leitura durante a tradução do RNA viral codificador de Gag (margem direita). Gag então multimeriza e recruta o RNA genômico viral, ao tempo que é endereçado para microdomínios de *lipid rafts* da membrana plasmática onde é ancorado por meio da inserção de seu grupo miristato amino-terminal. A partícula sendo montada incorpora Env e recruta o complexo ESCRT - I que participa processo de fissão da membrana com a consequente liberação da partícula viral. Posteriormente acontece a maturação, que leva à formação do núcleo cônico do capsídeo viral, gerando vírions infecciosos. Adaptado de (86)

1.1.5.1 A infecção pelo HIV-1 em macrófagos

Os macrófagos são células fagocíticas da linhagem mieloide descritas pela primeira vez por Elie Metchnikoff (1845-1916) em organismos invertebrados e posteriormente em organismos vertebrados. Infiltram virtualmente em todos tecidos durante a inflamação e formam populações polarizadas que desempenham funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Ademais, possuem um papel importante na resposta imune adaptativa, por atuar como células apresentadoras de antígeno [revisado em (87)].

Dependendo do microambiente celular, os macrófagos podem adquirir perfis inflamatórios polarizados. O perfil M1 é descrito como pró-inflamatório com liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas inflamatórias. Por outro lado, o perfil M2 é considerado anti-inflamatório e encontra-se associado a reparação de tecidos e resolução da inflamação [revisado em (88)]. Em 2009, Cassol e colaboradores demonstraram que a polarização de macrófagos humanos -tanto M1 quanto M2- está associada a uma produção viral reduzida em isolados R5 trópicos (89).

A infecção pelo HIV-1 em macrófagos apresenta diferenças para com a das células T CD4⁺. Ao contrário dos linfócitos T CD4⁺, os macrófagos são altamente resistentes aos efeitos citopáticos do vírus podendo servir de reservatório além de propagar a infecção devido a sua capacidade de infiltrar nos tecidos e de produzir vírions continuamente (90–93). Enquanto as células T CD4⁺ devem ser ativadas antes de serem infectadas de forma produtiva, processo que inclui divisão celular, a infecção produtiva em macrófagos pode ser estabelecida de forma independente da síntese de DNA (94). Os macrófagos acumulam vírus de replicação competente por períodos prolongados (95), mesmo em pacientes que recebem cART (96,97). A interrupção da terapia anti-retroviral, produz um rápido ressurgimento da carga viral, com a participação desse tipo celular (90,91,98).

As etapas do ciclo replicativo do vírus apresentam também diferenças nessas células alvo. A dupla fita de DNA viral, produto da transcrição reversa, é sintetizada em poucas horas nas células T, enquanto em macrófagos este processo toma aproximadamente 36-48 horas (99). O processo de transcrição

em macrófagos tem sido relacionado com diferentes isoformas do fator de transcrição C/EBP β . A isoforma 30-37 kDa é requerida para a replicação do HIV-1 em macrófagos mas não em linfócitos T CD4⁺ (100). A isoforma menor (16-23 kDa) é descrita como inibitória da transcrição em macrófagos (101).

A montagem de partículas virais em células T CD4⁺ acontece na membrana plasmática, de forma rápida e com efeitos citopáticos. No entanto, em macrófagos os vírions são acumulados em vesículas do citosol (Figura 1.10).

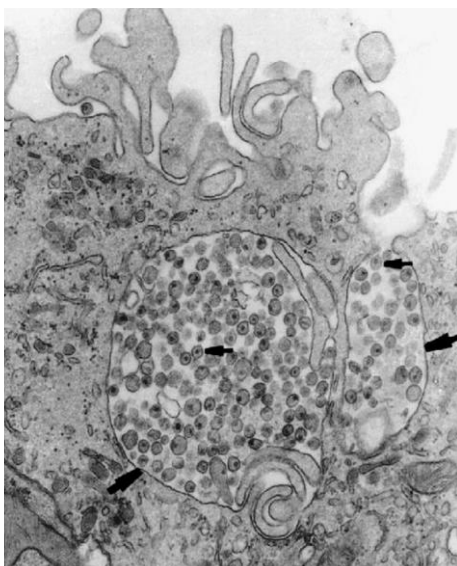


Figura 1.10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados com HIV-1.

As partículas virais podem ser observadas acumuladas dentro de estruturas vacuolares rodeadas por membrana (setas grandes); um vacúolo apresenta comunicação ao meio extracelular. As partículas virais apresentam o núcleo eletrodenso (pequenas setas). Aumento 30.000x. Adaptado de (102)

Inicialmente, os estudos de ultraestrutura indicaram a presença de partículas virais maduras e imaturas em compartimentos intracelulares de macrófagos infectados pelo HIV (103). Complementando essas observações, estudos de microscopia imunoeletrônica demonstraram que tais estruturas intracelulares continham marcadores de corpos multivesiculares (MVBs, do inglês *Multi Vesicular Bodies*), sugerindo que a montagem de vírions nestas células acontecia em estruturas intracelulares do tipo endossomo tardio ou MVBs (104)

Posteriormente, foram descritas diferenças entre os compartimentos citoplasmáticos contendo vírus e os MVBs. Essas estruturas foram então

chamadas de Compartimentos Contendo Vírus (VCCs do inglês *virus-containing compartments*) e são sugeridas como o sítio de montagem de partículas virais em macrófagos infectados (105,106).

O pH constitui uma outra diferença dos VCCs quando comparados com LEs. Enquanto os endossomos acidificam seu interior, os VCCs apresentam pH neutro (107). Diversos autores têm sugerido que essa diferença de pH entre as duas estruturas poderia se dever a uma outra diferença entre elas: os VCCs apresentam conexões com o meio extracelular (108,109). Importante mencionar, estudos ultraestruturais e imunoenaios mostram que essas estruturas estão também presentes em macrófagos não infectados e tornam-se mais proeminentes durante a infecção pelo HIV-1, sugerindo que o vírus aproveitaria essas estruturas já pré-existentes para a montagem das partículas virais (104,108).

1.1.6 ***Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1***

O curso natural da infecção pelo HIV-1 pode variar entre indivíduos, mas suas características gerais são virtualmente semelhantes em todas as pessoas infectadas sem tratamento (Figura 1.11).

O período compreendido entre as 1-2 semanas após da infecção é chamado de Fase Eclipse. Nessa etapa, o vírus replica em células permissivas do local inicial da infecção, a maioria das células T CD4⁺ do trato intestinal são depletadas como resultado da infecção viral, com a consequente destruição do tecido linfóide associado com o intestino (GALT) e disseminação generalizada através do sistema linfático. Porém, a viremia se mantém indetectável, e não são observados sintomas nem resposta imune do hospedeiro (110).

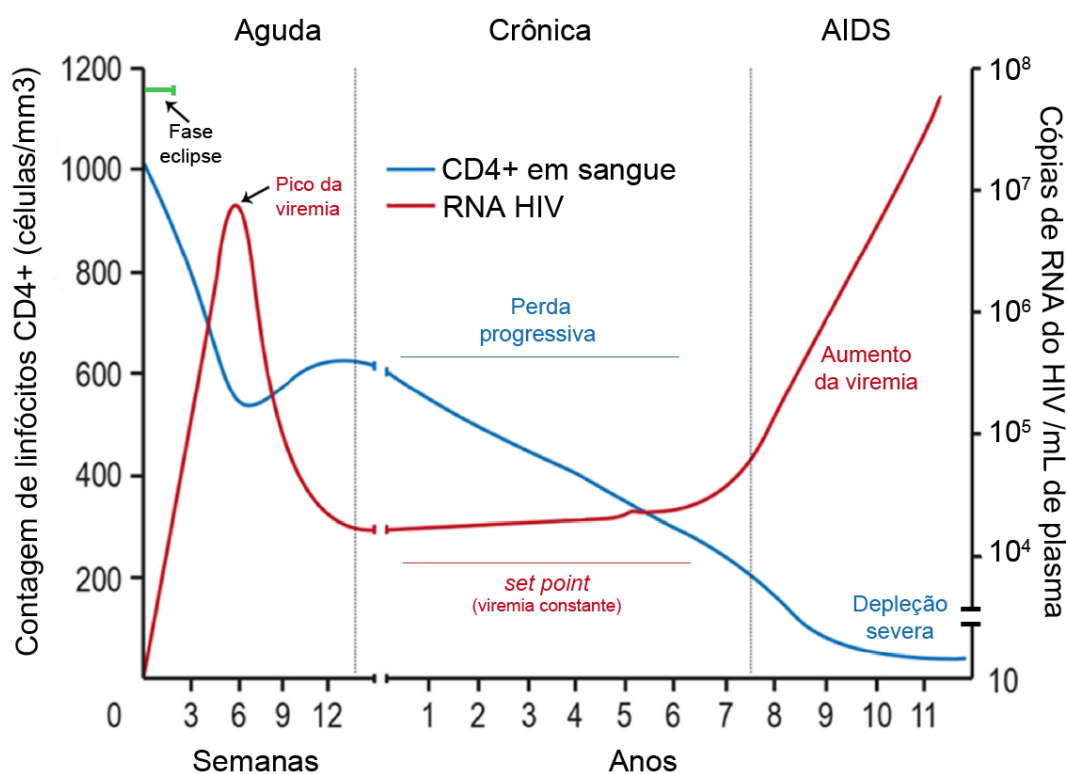


Figura 1.11. Curso natural da infecção pelo HIV-1.

Durante as duas primeiras semanas após a infecção se estabelece a fase eclipse, período durante o qual o vírus multiplica -porém se mantém em níveis indetectáveis- nas células permissivas do sítio inicial da infecção. Seguidamente, inicia-se o período agudo da infecção onde são observados um pico da viremia com queda simultânea na contagem dos linfócitos CD4⁺. Em seguida, a viremia diminui e os níveis de linfócitos de CD4⁺ aumentam, mas sem retornar aos níveis iniciais. A fase crônica da infecção tem duração variável (em média 10 anos) sendo caracterizada pela redução progressiva das células T CD4⁺ e a manutenção de níveis virais constantes (*set point* viral). Na fase de AIDS acontece um aumento dramático da carga viral com uma depleção severa da contagem de células T CD4⁺. Modificado de (21).

Em continuação, na fase aguda (também chamada de infecção primária), aparecem altos níveis plasmáticos do RNA viral, podendo atingir um pico de 10⁷-10⁹ cópias de RNA/mL. No entanto, essa elevada viremia não persiste, diminuindo paralelamente com o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro e com a apresentação dos primeiros sintomas, que são variáveis tanto em intensidade quanto em duração. Estes sinais e sintomas podem incluir febre, linfadenopatia, dor de cabeça e erupções cutâneas. Importante citar, o número de células T CD4⁺ circulantes experimenta mudanças, diminuindo de forma concomitante à elevação da carga viral e posteriormente aumentando, porém o número de células T CD4⁺ no GALT não retorna aos níveis normais prévios à infecção (111). Nessa fase observa-se também uma expansão clonal de células T CD8⁺ específicas para os antígenos do HIV-1 expressando altos

níveis de marcadores de ativação com CD38 e HLA DR. A resposta mediada por essas células correlaciona-se de forma direta com o controle da viremia, e de forma inversa com a rapidez da progressão clínica (15,112).

Posteriormente, inicia-se a fase crônica, caracterizada por apresentar uma viremia constante (*set point*, 10^3 - 10^5 cópias de RNA/mL) ou com aumento discreto sem atingir valores elevados (1). A duração desse período é variável (em média de 10 anos) e, geralmente, com ausência de sintomas. Essa etapa também é designada latência clínica, no entanto, a infecção encontra-se ativa com alta replicação viral e com perda progressiva de células T CD4⁺ (113).

No final desse período, o número de células T CD4⁺ é menor que 200/ μ L, observa-se um aumento drástico da viremia e podem surgir infecções oportunistas - e também neoplasias -iniciando-se assim a fase de AIDS, caracterizada pelo contínuo aumento da carga viral e declínio de células T CD4⁺ até o óbito do paciente (15).

A contagem de células T CD4⁺ circulantes constitui uma medida amplamente utilizada para avaliar a competência imunológica/imunossupressão do paciente, além de servir como indicador do risco imediato de doenças oportunistas (114). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) estabeleceu um sistema de classificação da infecção pelo HIV-1 baseado na contagem das células T CD4⁺ circulantes. As três categorias são definidas como indicadas a seguir: 1) Categoria I: a contagem de linfócitos T CD4⁺ situa-se acima de 500 células por microlitro (μ L); 2) Categoria 2: 200-499 células/ μ L; 3) categoria III: com contagem inferior a 200 células/ μ L (115).

A infecção pelo HIV-1 é caracterizada não apenas pelo desenvolvimento de uma imunodeficiência profunda, mas também por uma ativação imunológica crônica (116) que inclui a expansão policlonal de células B (117), o aumento do *turnover* de células T (118), aumento de células T com fenótipo de ativação (119) e o incremento nos níveis séricos de citocinas e quimiocinas inflamatórias (120). Ressalte-se que o grau de ativação do sistema imune tem sido considerado um melhor marcador da progressão da doença do que a carga viral sérica (121).

Durante a infecção, a integridade da mucosa do intestino é danificada permitindo a translocação de produtos microbianos da mucosa intestinal para a

circulação. Essa alteração da permeabilidade da mucosa contribui para a ativação crônica do sistema imune e desregulação sistêmica observada durante essa infecção (122). O GALT é considerado principal fonte de células alvo para o HIV durante a fase aguda. No entanto, durante a fase crônica o dano ao epitélio intestinal permanece, associado a uma contínua depleção das células de memória T CD4⁺CCR5⁺ que residem na lâmina própria (122).

Durante o curso natural da infecção, a atividade funcional das células T CD8⁺ é perdida de forma progressiva, caracterizada por diminuição da produção de citocinas, redução da capacidade proliferativa e da ação citotóxica. Vários fatores têm sido apontados para explicar esse fenômeno, conhecido como exaustão celular (123). Dentre eles, foi descrito o aumento da expressão da molécula PD-1 na superfície das células T CD8⁺ e CD4⁺. A expressão do receptor PD-1 correlaciona-se com os níveis de carga viral e a interação desse receptor com o seu ligante PD-L1 -expresso em células do sistema mieloide-regula de forma negativa a capacidade proliferativa e a produção de citocinas efetoras nas células T (124). Outras alterações observadas incluem a retenção de linfócitos nos tecidos linfóides (125) e o depósito de fibras de colágeno nos linfonodos, alterando a arquitetura destas estruturas (126).

1.1.7 *Terapia antirretroviral*

Como foi indicado anteriormente, a infecção pelo HIV-1 se torna crônica e leva ao estabelecimento da AIDS depois de longos períodos, que podem chegar a 10 anos, ou mais, na ausência de tratamento antirretroviral.

De acordo com UNAIDS (2017), estima-se que 20,9 milhões receberam tratamento antirretroviral nesse ano, indicando um aumento da cobertura quando comparado com anos anteriores (7,7 milhões em 2010 e 17,1 milhões de pessoas em 2015). Dados da mesma organização indicaram que o acesso ao tratamento em 2016 foi de 58% entre todas as pessoas infectadas com HIV na América Latina, e de 60% no Brasil (19).

Alguns dos impedimentos para aumentar a cobertura do tratamento são o desconhecimento da própria infecção -estima-se que 30-50% das pessoas

infectadas permanecem sem diagnóstico (127) -, o início tardio do tratamento (aproximadamente 30% dos pacientes não iniciam a terapia no tempo adequado) e a falta de adesão ao tratamento a longo prazo (15). Em 2013, UNAIDS estabeleceu como meta atingir novos objetivos de cobertura conhecidos como “90-90-90”. Esse projeto global pretende que até o início da próxima década, 90% das pessoas infectadas pelo HIV sejam diagnosticadas, que 90% das pessoas diagnosticadas estejam em tratamento e que 90% das pessoas em tratamento com drogas antirretrovirais tenham supressão viral (128).

Os fármacos antirretrovirais adotam basicamente cinco estratégias diferentes, cada uma delas envolvendo uma etapa do ciclo viral. Os inibidores de entrada, como o seu nome indica, impedem o ingresso do vírus na célula alvo. Os inibidores da transcriptase reversa podem ser de duas naturezas diferentes. Assim, os inibidores do tipo nucleosídicos são análogos de nucleosídeos e nucleotídeos naturais, e são incorporados de forma competitiva no DNA viral pela transcriptase reversa provocando a interrupção abrupta da síntese do DNA. Por outro lado, os inibidores do tipo não nucleosídicos atuam de forma diferente. Essas moléculas associam-se à transcriptase reversa em um domínio próximo ao sítio catalítico, gerando uma mudança conformacional que a torna inativa, consequentemente inibindo o processo de transcrição reversa. Os inibidores da Integrase viral impedem que o genoma do HIV seja integrado no genoma do hospedeiro. Como foi mencionado anteriormente, durante o brotamento e liberação do vírion, a protease viral cliva precursores poliproteicos no vírion ainda imaturo gerando uma partícula viral infecciosa. Os inibidores de protease viral bloqueiam esse processo do ciclo viral [revisado em (15)].

A terapia antirretroviral diminui a replicação do vírus e impede que novas células se infectem permitindo a restauração, ainda que incompleta, da quantidade de células T CD4⁺ (1). Reduz também o risco de transmissão, mas não consegue erradicar a infecção uma vez que o DNA viral é integrado no genoma das células alvo, inclusive naqueles pacientes com cargas virais indetectáveis (129,130).

Uma das maiores barreiras para atingir a cura esterilizante é o estabelecimento de reservatórios virais (131,132) que ocasionam o ressurgimento do vírus no plasma do paciente após de 2-3 semanas da

interrupção do tratamento (133,134). Os linfonodos que abrigam o vírus são considerados "santuários" para o HIV-1 em termos da penetração limitada dos medicamentos antirretrovirais (135), e estima-se que a eliminação desses reservatórios levaria várias décadas, assumindo que todos os novos eventos de infecção sejam inibidos com a terapia antirretroviral (136). Uma das estratégias que visam eliminar esses reservatórios é conhecida como "*shock and kill*", a qual preconiza a associação de agentes de reversão de latência com a cART (esta, para evitar novos ciclos de infecção), buscando-se ativar a transcrição viral em células latentes, junto com a expressão de proteínas, a produção de vírions e a consequente eliminação das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺ anti-HIV-1 (137).

Uma outra possível abordagem terapêutica consiste no transplante de células tronco hematopoiéticas com mutações para moléculas envolvidas na infecção pelo HIV-1. Recentemente, a descrição de uma possível cura usando essa estratégia foi alvo de interesse de grande parte da comunidade científica internacional (138,139). Este episódio, também conhecido como o "Paciente de Berlin" envolveu um paciente do sexo masculino infectado com HIV-1 afetado com uma leucemia mieloide aguda. O tratamento - desenvolvido em Berlim, daí o nome- consistiu em radioterapia com um posterior transplante de células tronco hematopoiéticas halogênicas de um doador homozigoto para a deleção CCR5-Δ32 (140). Após o transplante, a terapia antirretroviral foi interrompida e os níveis virais foram indetectáveis tanto em sangue como em amostras de linfonodos, sugerindo uma provável cura do paciente (141).

1.1.8 **Resposta imune à infecção pelo HIV-1**

Durante a infecção pelo HIV-1, os pacientes apresentam respostas adaptativas tanto celular quanto humoral, as quais podem ser detectadas associadas ao pico da viremia inicial, determinando a queda da carga viral e recuperação dos números de células T CD4⁺ (Figura 1.11). Esta resposta imunitária não é suficiente para erradicar o vírus, ou para deter a progressão da infecção [revisado em (142)]

A resposta celular é mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) que inibem a multiplicação viral de forma direta ao eliminar as células T CD4⁺ infectadas, mediante a interação do receptor de célula T (TCR) com epítomos virais apresentados nas moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC I) das células infectadas. Por outro lado, os CTLs também inibem a replicação viral de forma indireta, através da produção de fatores antivirais solúveis como as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β (69) que, como foi mencionado anteriormente, ligam-se ao CCR5 da célula alvo e induzem a internalização desse co-receptor do HIV-1, inibindo assim a entrada do vírion (70–73). Um dos mecanismos de escape da resposta mediada por CTLs são mutações de epítomos em sítios essenciais para o reconhecimento do MHC de classe I ou do receptor da célula T (TCR), ou mutações nas regiões que as flanqueiam, afetando o processamento antigênico (143,144).

No caso da resposta humoral, os primeiros anticorpos produzidos com capacidade neutralizante são específicos para a região hipervariável 3 da proteína do envelope gp120 (*loop V3*) (145). No entanto, a resposta humoral não consegue eliminar a infecção. Estudos apontam que, sob pressão seletiva exercida pela resposta imune, vírions com mutações nas proteínas do envelope viral são selecionados, facilitando o escape viral (146). Além disso, e os epítomos presentes nessas proteínas virais não são acessíveis aos anticorpos neutralizantes (147,148).

O crescimento viral é inibido quando as células infectadas pelo HIV-1 são expostas a ligantes de TLR2 (149), TLR3 (150), TLR4 (151,152) e TLR7 (153). Os receptores de tipo *Toll* (ou TLRs) compõem os chamados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PPRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) responsáveis pela detecção de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*,) e detecção de Padrões Moleculares Associados a Dano (DAMPs, do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*,). Os PPRs são receptores cruciais para a detecção precoce de patógenos invasores, para o início da resposta imune inata e para orquestrar a resposta imune adaptativa [revisado em (154)]. Esses receptores podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com a sua localização celular. Assim TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 encontram-se na

superfície da membrana plasmática. Por outro lado, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas intracelulares. Os TLRs presentes na superfície celular reconhecem componentes da membrana de patógenos diversos, enquanto que os TLRs localizados em compartimentos celulares reconhecem ácidos nucleicos (155).

A ativação dos TLRs por seus ligantes desencadeia uma cascata de sinalização celular com a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon de tipo I. Todos os TLRs, com exceção do TLR3, sinalizam através da molécula adaptadora MYD88, enquanto que na via de TLR3 ocorre o recrutamento da molécula adaptadora TRIF. Essa molécula, associada com TRAM, participa também na sinalização mediada por TLR4. A ativação de TLR3 e TLR4 também induz a produção de interferon (IFN) de tipo I, além das citocinas pró-inflamatórias [revisado em (156)]. O interferon de tipo I, induz um estado antiviral nas células através do aumento da expressão de centenas de genes denominados Genes Estimulados por Interferon (ISGs, do inglês *Interferon-stimulated genes*). O IFN α produz uma intensa inibição da replicação do HIV-1 *in vitro* através de fatores de restrição ao HIV-1 codificados por ISGs. Dentre eles podem ser destacados os seguintes: 1) APOBEC3G, trata-se de uma citidina deaminase, que, uma vez empacotada no vírion, catalisa a conversão das citosinas em uracilos, induzindo assim hipermutações do cDNA viral; 2) TRIM5 α induz degradação precoce do capsídeo viral impedindo a síntese do cDNA viral; 3) Teterina, proteína celular de transmembrana que previne a liberação dos vírions em brotamento retendo eles na superfície da célula infectada 4) SAMHD1, trifosfohidrolase que reduz os níveis de Desoxirribonucleotídeos Trifosfato (dNTPs) em células que não sofrem divisão mitótica, em consequência a transcriptase reversa é privada dos substratos necessários para a síntese do cDNA viral; 5) PKR, proteína quinase que fosforila o fator eIF2 inibindo assim a tradução de proteínas virais e celulares. Além disso, sabe-se também que a infecção pelo HIV-1 induz a síntese de IFN tipo I e, conseqüentemente a ativação de ISGs, pela via de CGas/STING (157) (Figura 1.12).

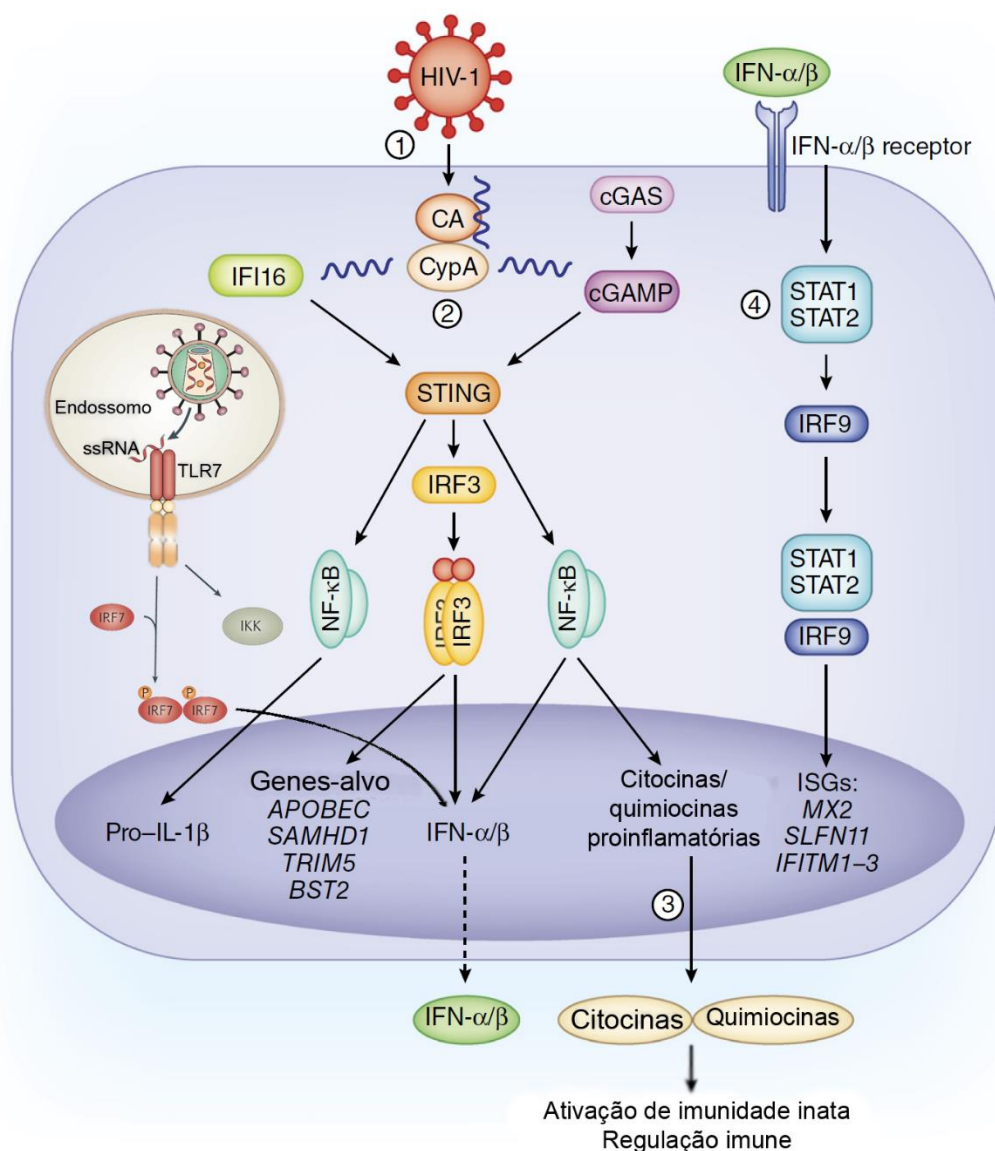


Figura 1.12. Detecção intracelular da infecção pelo HIV-1 e indução de fatores de restrição viral.

O capsídeo viral (CA), associado com a chaperona CypA protege os produtos da transcrição reversa do reconhecimento por PPRs. IFI16 e cGAS reconhecem e ligam-se ao DNA do HIV-1. cGAS produz cGAMP que interage com a proteína STING, entanto que a ativação de IFI16 medeia a interação direta com STING que participa da ativação de IRF3 e NF-κB com a posterior indução de fatores de restrição ao HIV-1, pro-IL-1β, IFN de tipo I e citocinas inflamatórias. O IFN de tipo I, por sua vez, sinaliza em células infectadas, ou não, através da via Jak-STAT ativando ISGs. Além disso, as células podem detectar RNA viral de fita simples (ssRNA) em endossomos via TLR7. A ativação deste receptor resulta na indução de IFN via IRF7 e NF-κB. Modificado de (158,159)

Durante a infecção pelo HIV-1, as células do sistema imune inato apresentam alterações diversas tanto em número quanto em funções efetoras [revisado em (160)]. No caso específico dos neutrófilos, embora estas células possuam um papel amplamente documentado na imunidade frente a patógenos bacterianos, sua contribuição para na resposta antiviral ainda não está

completamente esclarecida (161,162). No caso da infecção pelo HIV-1, a diminuição de neutrófilos circulantes em pacientes infectados com esse vírus correlaciona-se com a progressão da doença (163) e com infecções oportunistas recorrentes (164,165). A neutropenia também tem sido considerada como um fator de risco indiretamente correlacionado à transmissão perinatal, mostrando um aumento no risco de transmissão vertical em mulheres grávidas com baixo número de neutrófilos em circulação (166). Além disso, α -defensinas derivadas de neutrófilos, também chamadas de peptídeos de neutrófilos humanos (HNPs, do inglês *Human neutrophil peptides*), possuem efeitos anti-HIV-1 (167), seja por interação direta e inativação do vírus (168,169) ou por afetar às células-alvo da infecção (168–171).

Recentemente foi descrito que a exposição *in vitro* de neutrófilos ao HIV-1 induz a liberação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) as quais retêm e inativam o vírus impedindo assim a infecção de outras células (172). Ainda que este estudo tenha mostrado os efeitos inativadores das NETs sobre as partículas virais livres ainda não existem trabalhos que avaliem os efeitos das NETs sobre a replicação viral em células infectadas pelo HIV-1.

1.2 O neutrófilo e as redes extracelulares (ou *Neutrophil extracellular Traps*)

1.2.1 *Biologia do neutrófilo*

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs), ou neutrófilos, são células mieloides fagocíticas da família dos granulócitos. O nome de neutrófilo foi dado por Paul Ehrlich (1854-1915) devido à tendência deste tipo celular para reter corantes neutros. Posteriormente, Elie Metchnikoff baseado no núcleo multilobulado característico renomeou esses leucócitos como polimorfonucleares (173).

Os neutrófilos são células terminais diferenciadas e com atividade transcricional. No entanto, a maior parte de seu DNA encontra-se inativo e condensado na forma de heterocromatina dentro do núcleo (174). Esse tipo celular constitui 50-70% dos leucócitos circulantes, sendo assim as células imunitárias mais abundantes no sangue dos seres humanos. Estima-se que a medula óssea destina 55-60% da hematopoiese na produção dessas células, gerando diariamente uma taxa aproximada de 10^{11} neutrófilos, número que aumenta para 10^{12} durante infecções bacterianas [revisado em (175)].

Acompanhando essa grande produção diária, essas células apresentam um rápido declínio quantitativo em relação aos outros tipos celulares. Estudos iniciais indicaram que o período de vida dos neutrófilos é de apenas 8-12 h na circulação e de 1-2 dias nos tecidos (176). Novas abordagens sugeriram que em condições de homeostase, o período de vida destas células seria de aproximadamente 5 dias (177). No entanto, ainda não existe consenso sobre esta questão, tornando-se motivo de controvérsia e debates (178,179).

Como foi mencionado anteriormente, os neutrófilos -juntamente com eosinófilos e basófilos- integram o grupo dos granulócitos, isto é, leucócitos caracterizados pela presença de grânulos. Essas estruturas, presentes no citoplasma, são organelas que contêm moléculas altamente reativas, mas com escassa especificidade. Como consequência, o conteúdo desses compartimentos celulares possui um potencial duplo, ou seja, se por um lado, os grânulos conferem aos neutrófilos potentes propriedades antimicrobianas, por

outro, em razão da inespecificidade, as moléculas dos grânulos têm o potencial tóxico de causar danos ao hospedeiro(173).

Os neutrófilos apresentam quatro tipos de grânulos, e basicamente podem ser classificados pelo conteúdo específico e pelo momento de formação durante a maturação dessas células (Figura 1.13). Assim, os grânulos primários (também chamados de azurofílicos) são os maiores dentre os três diferentes tipos (0,3 μm de diâmetro). No interior se incluem moléculas como Defensinas, Lisozima, diversas serino proteases: Elastase neutrofílica (NE), Catepsina G e Proteinase 3, além de Proteína de aumento da permeabilidade/bactericida (BPI), entre outras. Encontra-se também a mieloperoxidase (MPO), enzima fundamental na explosão respiratória. Esses peptídeos presentes nos grânulos primários conferem ao neutrófilo uma importante atividade antimicrobiana pelas vias oxidativa e não oxidativa. O nome de primários, deve-se que eles são os primeiros formados durante a maturação dos neutrófilos. Esses grânulos podem ser corados com componentes azuis da coloração de Romanowski usada de rotina em hematologia, propriedade que lhe outorga o outro nome pelo qual são conhecidos – azurofílicos.

A classe seguinte de grânulos são os chamados secundários, ou específicos. Apresentam um tamanho menor quando comparados aos primários (0,1 μm de diâmetro). Esses grânulos são negativos para MPO e formam-se posteriormente aos grânulos primários.

Os grânulos terciários, também chamados de grânulos de gelatinase, contêm metaloproteinases como gelatinase e leucolisina. Esses grânulos são os últimos a serem formados durante a maturação do neutrófilo.

O último tipo de grânulo, chamado de vesículas secretórias, diferem na sua biogênese dos grânulos anteriormente mencionados, originam-se a partir do aparelho de Golgi. As vesículas secretórias são formadas por endocitose nos últimos estágios do processo de maturação do neutrófilo. Como consequência o seu conteúdo inclui, de forma predominante, proteínas derivadas do plasma [revisado em (173,180)].

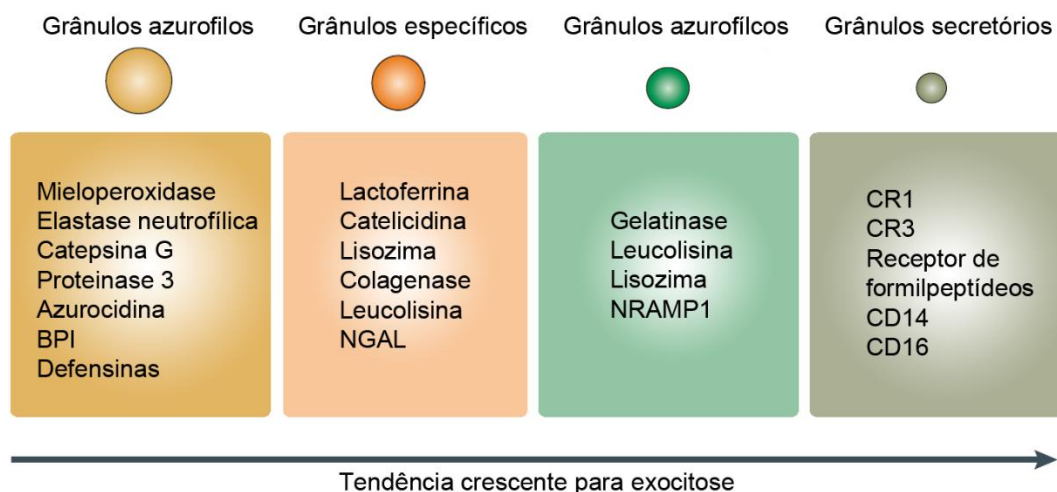


Figura 1.13. Conteúdo dos diferentes tipos de grânulos dos neutrófilos.

Os constituintes proteicos dos diferentes grânulos são definidos pelo tempo de sua biossíntese durante a diferenciação de neutrófilos. O conteúdo dos grânulos é liberado de forma sequencial. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL); Proteína 1 do macrófago associada à resistência natural (NRAMP1); receptor de complemento 1 (CR1); Receptor de complemento 1 (CR3) composto pelas proteínas CD11b e CD18. Adaptado de (181)

1.2.1.1 Estratégias microbidas

Os neutrófilos são um componente essencial da imunidade inata dirigida a um amplo número de patógenos que incluem bactérias, fungos e protozoários [revisado em (182)]. Como foi mencionado, os PMNs são células fagocíticas e podem internalizar micróbios e degradá-los de forma altamente eficaz. A fagocitose induz a ativação do sistema enzimático NADPH oxidase, enzima que é montada em neutrófilos ativados, principalmente na membrana dos fagolisossomos. Uma vez montada, NADPH oxidase transfere elétrons do NADPH ao oxigênio molecular para formar superóxido que, posteriormente, será convertido enzimaticamente a peróxido de hidrogênio (explosão respiratória). A fagocitose de microrganismos promove também a fusão dos grânulos presentes no citoplasma com o fagolisossomo, o que permite a liberação das enzimas granulares no fagolisossomo (Figura 1.14). Dessa forma, uma vez dentro dos fagolisossomos, os microrganismos são expostos a altas concentrações tanto de ROS quanto de substâncias altamente tóxicas [revisado em (173)].

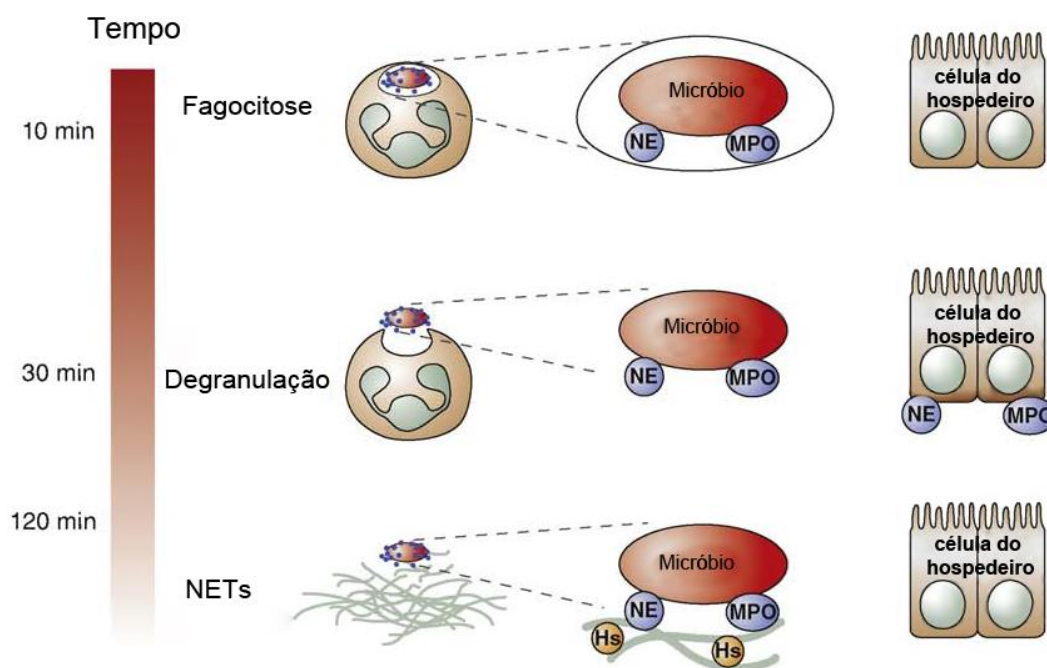


Figura 1.14. Estratégias microbicidas dos neutrófilos.

Os neutrófilos exercem a sua atividade antimicrobiana mediante três mecanismos efetores principais: fagocitose, degranulação e formação de NETs. Cada um destes processos acontece em tempos e com efeitos diferentes no patógeno. NE, elastase neutrofílica; MPO, mieloperoxidase; Hs, histonas. Figura adaptada de (183)

Durante o processo de degranulação os diferentes tipos de grânulos se fundem com a membrana plasmática liberando o seu conteúdo no espaço extracelular e estabelecendo um ambiente inflamatório prejudicial para os microrganismos invasores. Três classes de moléculas microbicidas são liberadas ao espaço extracelular: 1) proteínas e peptídeos catiônicos que se ligam em membranas de micróbios; 2) enzimas; 3) proteínas que reduzem nutrientes essenciais para os microrganismos [revisado em (173)]. As atividades microbicidas desses diferentes tipos de moléculas são apresentadas na tabela 1.2.

Tabela 1. 2. Mecanismos de ação das proteínas granulares dos neutrófilos.

Molécula antimicrobiana	Mecanismo de ação microbicida
Peptídeos catiônicos	
α -Defensinas	<ul style="list-style-type: none"> Permeabilização membranas que contêm fosfolipídios com carga negativa Inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas
LL-37	<ul style="list-style-type: none"> Formação de poros na membrana
BPI	<ul style="list-style-type: none"> Ligação a LPS promovendo o incremento da permeabilidade da parede e hidrólise de fosfolipídios bacterianos
Histonas*	<ul style="list-style-type: none"> Mecanismo desconhecido

Continuação. Tabela 1.2. Mecanismos de ação das proteínas granulares dos neutrófilos.

Molécula antimicrobiana	Mecanismo de ação microbicida
Enzimas	
Lisozima	<ul style="list-style-type: none"> Degradação da parede bacteriana
Elastase	<ul style="list-style-type: none"> Clivagem de fatores de virulência e de proteínas da membrana
Mieloperoxidase	<ul style="list-style-type: none"> Produção de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio e ânions cloreto durante a explosão respiratória
Catepsina G	<ul style="list-style-type: none"> Interrupção da síntese de proteoglicanos
Proteinase 3	<ul style="list-style-type: none"> Contribuição proteolítica para a geração de peptídeos antimicrobianos
Azurocidina	<ul style="list-style-type: none"> Interação com LPS. Mecanismo microbicida desconhecido
Proteínas quelantes de metais	
Lactoferrina	<ul style="list-style-type: none"> Altera o crescimento bacteriano ligando-se ao ferro, um nutriente bacteriano essencial Liga-se ao lipídio da parte A do LPS, causando a sua liberação da parede celular e aumentando a permeabilidade da membrana
Calprotectina	<ul style="list-style-type: none"> Altera o crescimento bacteriano sequestrando manganésio e zinco
NGAL	<ul style="list-style-type: none"> Limita o crescimento bacteriano sequestrando ferro

*As histonas não são liberadas durante o processo de degranulação. Essas proteínas são apresentadas nessa tabela apenas por possuírem propriedades antimicrobianas. Modificado de (173)

As duas estratégias microbicidas mencionadas anteriormente foram descritas já no século XIX por Metchnikoff (173). Mais recentemente, em 2004, uma nova estratégia microbicida foi descrita em neutrófilos ativados (184) designada Netose, a qual se trata de um processo de morte celular seguida da liberação de cromatina para o espaço celular.

1.2.2 Redes extracelulares de neutrófilos

Em 2004, Brinkmann e colaboradores descreveram um novo mecanismo antimicrobiano dos neutrófilos. Durante um processo de morte celular programada denominada Netose (185) os neutrófilos liberam o conteúdo nuclear para o espaço extracelular (184) na forma de fibras de cromatina altamente descondensada associadas a proteínas nucleares, citoplasmáticas e dos grânulos tais como elastase, mieloperoxidase, entre outros (ver secção *Composição das NETs*). Estas estruturas foram chamadas de *Neutrophil Extracellular Traps* ou NETs (Figura 1.15).

Durante esse processo, a célula sofre modificações diversas, entre elas: perda da morfologia multilobulada do núcleo (adquirindo uma forma arredondada), descompactação do DNA, desorganização das membranas dos grânulos e do núcleo com a consequente liberação e interação dos seus respectivos conteúdos no citoplasma (186). Posteriormente, a cromatina associada com as proteínas granulares e citoplasmáticas é liberada no espaço extracelular aonde atua como uma barreira física que impede a disseminação de microrganismos (Figura 1.16), e incrementa também a concentração de produtos microbicidas no local, contribuindo na neutralização e eliminação de diversos micróbios (184,187–190).

A exteriorização de cromatina associada com proteínas antimicrobianas não é um fenômeno limitado aos neutrófilos. Após a descoberta de Brinkmann e colaboradores, a liberação destas estruturas foi descrita em macrófagos e em granulócitos humanos como eosinófilos e mastócitos e, assim como em células de outros mamíferos (191–195), além de células de amebas (196), peixes (197), insetos (198), aves (199), plantas (200–202), entre outros. Considerando que esse processo parece ser uma característica compartilhada ao longo de diferentes grupos de seres vivos, vários autores renomearam essas estruturas apenas de *Extracellular Traps* (ETs), e o processo de morte como Etose (203,204). O presente trabalho se limita a ETs obtidas de neutrófilos, motivo pelo qual escolhemos continuar usando a denominação de NETs e Netose ao longo do manuscrito.

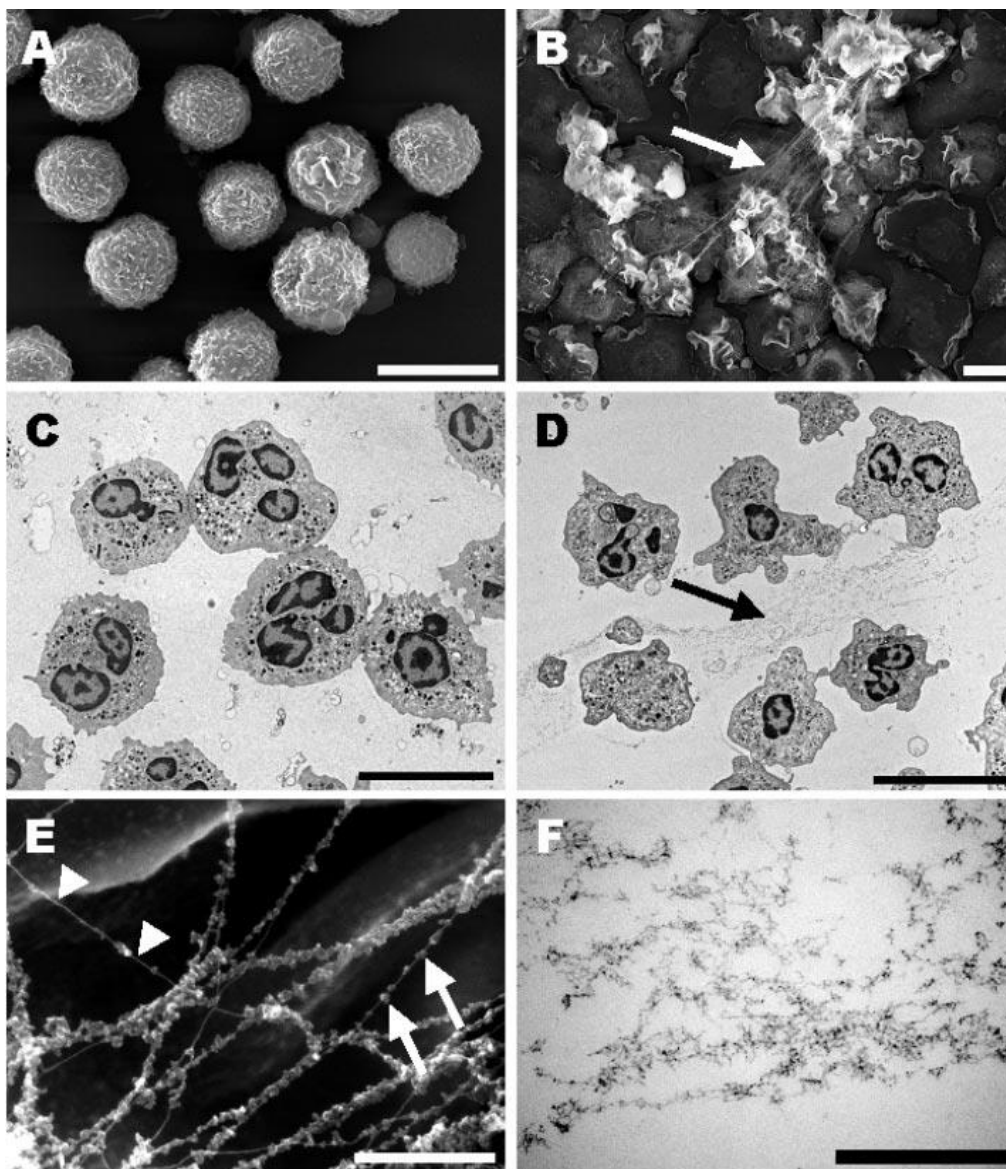


Figura 1.15. Análise de microscopia eletrônica de neutrófilos em repouso e em NETose. (A, C) Os neutrófilos em repouso apresentam morfologia arredondada, núcleos multilobulados e abundantes grânulos no citoplasma. (B, D) Após estímulo com agentes indutores de NETose, as células apresentam-se achatadas e com vários pseudópodes. A configuração multilobulada do núcleo é modificada adquirindo um formato arredondado e fibras de cromatina podem ser observadas no espaço extracelular (indicadas com setas em B e D). (E) Análises de alta resolução mostrando NETs que consistem em finas fibras com diâmetros entre 15-17 nm (cabeças de setas) e domínios globulares maiores com diâmetros de 25 nm aproximadamente e que podem formar agregados (setas). (F) As NETs liberadas não apresentam associação com membranas. (A, B, E) Microscopia eletrônica de varredura; (C, D, F) Microscopia eletrônica de transmissão. As barras indicam 10 μm em (A-D) e 50 μm em (E, F). (B) As células foram tratadas com 25 nM de PMA durante 30 min; em (D, F) com 10 ng de IL-8 durante 45 min. Figura adaptada de (184).

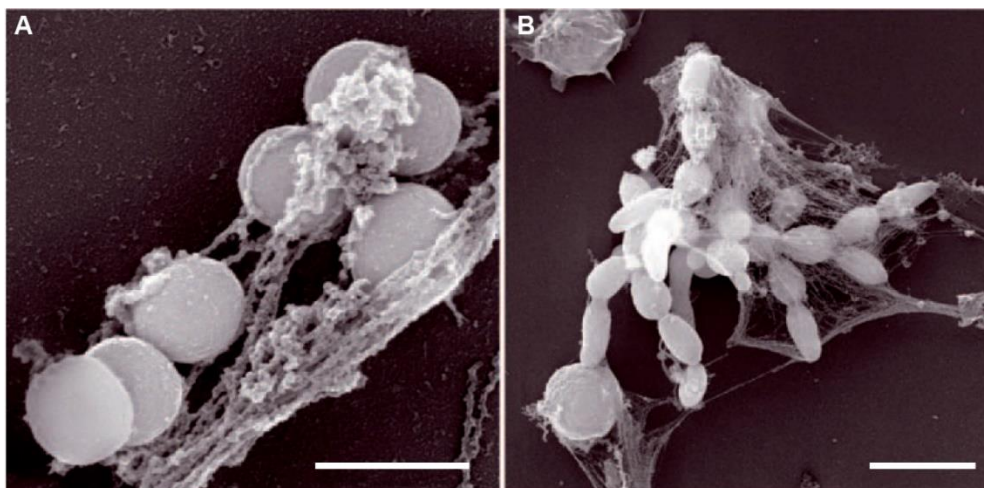


Figura 1.16. Micróbios capturados por NETs.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando micróbios diversos retidos por NETs. (A) *Staphylococcus aureus*; (B) *Candida albicans*. As barras indicam 1 μm em (A) e 10 μm (B). Figura adaptada de (205)

A Netose possui características distintas dos mecanismos de morte celular como a apoptose ou a necrose. A tabela 1.3 apresenta um quadro comparativo com as principais diferenças entre esses três tipos de morte celular.

Tabela 1. 3. Diferenças entre necrose, apoptose e netose

Necrose	Apoptose	Netose
Exposição de fosfatidilserina (PS) nos inícios da morte	Exposição de PS na superfície celular	Sem exposição de PS
Membrana nuclear conservada	Membrana nuclear conservada	Desorganização da membrana nuclear e dos grânulos
Descompactação da cromatina	Compactação da cromatina	Descompactação rápida da cromatina
Fragmentação do DNA	Fragmentação do DNA	DNA sem fragmentação

(183,204,206)

Durante o processo de indução a Netose foi reportado que aproximadamente um terço dos neutrófilos ativados produzem NETs (184,186,205). Também, Yipp e colaboradores descreveram que neutrófilos podem permanecer viáveis, mesmo após a liberação do DNA nuclear, e continuar migrando dentro do tecido. Considerando que os neutrófilos sobrevivem, pelo menos algum tempo após da liberação do DNA ao exterior, esse processo foi chamado de NETose vital (207).

A formação de NETs tem sido descrita também *in vivo*. No artigo original, Brinkman e colaboradores observaram a formação destas estruturas em tecidos de animais infectados experimentalmente com *Shigella* e também em amostras de apendicite humana (184) assim como em infecções por *Streptococcus*, *Aspergillus nidulans*, *Eimeria bovis*, lesões cutâneas de leishmaniose, periodontite, entre outros [revisado em (204)]. Marcadores dessas estruturas podem também estar presentes em amostras sorológicas de pacientes com diferentes afecções (208–210).

1.2.2.1 Bases moleculares da Netose

A produção de NETs pode ser induzida por diversos estímulos, estejam eles presentes no contexto da inflamação ou de uma infecção. Assim, citocinas como IL-8, produtos sintéticos como PMA, diferentes microrganismos, sejam estes fungos, bactérias, parasitas e vírus, ou moléculas oriundas desses agentes (e.g., LPS) são capazes de induzir a liberação destas estruturas [revisado em (183,206,211)].

Os mecanismos moleculares envolvidos na Netose ainda não estão completamente compreendidos, mas diversas moléculas têm sido descritas como centrais nesse processo. Entre elas, as enzimas como NADPH oxidase e peptidilarginase deiminase (PAD4) e as proteases granulares NE e MPO.

Em 2007 Fuchs e colaboradores descreveram pela primeira vez um dos mecanismos envolvidos na netose. Nesse estudo, eles observaram que o tratamento de neutrófilos com agentes que ativam NADPH oxidase promovia a liberação de NETs, enquanto que a incubação prévia de neutrófilos com inibidores dessa enzima impedia a formação de NETs. Adicionalmente, no mesmo estudo, eles descreveram também que neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica (CGD) não conseguem produzir NETs quando estimulados com PMA (185). A CGD é causada por mutações que inibem a geração de superóxido pela NADPH oxidase, em consequência os pacientes são propensos a infecções recorrentes e graves, como pneumonias causadas por diferentes espécies do fungo *Aspergillus* spp. (212–214). Em 2009, um novo

estudo acrescentou a importância dessa enzima na geração de NETs quando Bianchi e colaboradores restauraram a função da NADPH oxidase em um paciente com CGD através de terapia genética. Como resultado, o paciente controlou a infecção por *A. nidulans* e, resalte-se, seus neutrófilos liberaram NETs com propriedades microbicidas quando estimulados *in vitro* (215). Esse conjunto de dados indica a geração de ROS pela enzima NADPH oxidase como um evento essencial na indução de NETs.

Como mencionado anteriormente, os neutrófilos possuem grandes quantidades de heterocromatina, porém durante processo netótico apresentam uma rápida descompactação do DNA no interior do núcleo junto com a perda da estrutura multilobulada deste. Essas modificações celulares se acompanham com ativação da enzima PAD4 que, durante as etapas iniciais da netose, induz a conversão de resíduos de arginina de carga positiva em citrulina (aminoácido polar de carga neutra) numa reação conhecida como citrulinização. O uso de inibidores específicos de PAD4 impede a formação de NETs (216). Igualmente, neutrófilos de camundongos PAD4^{-/-} são incapazes de formar NETs *in vitro*, e tais animais apresentam infecções mais severas (217). O aminoácido arginina faz parte da cauda das histonas que interage com o DNA, e a mudança de carga no aminoácido durante a citrulinização reduz a interação das histonas com o DNA, provocando um relaxamento da compactação desse ácido nucleico concomitante com a perda dos lóbulos do núcleo (216).

Continuando com os estudos sobre a descompactação do DNA como requisito desse processo de morte celular e liberação de NETs, em 2010 Papayannopoulos e colaboradores descreveram que durante os primeiros 30 min depois da indução da netose, a NE -contida nos grânulos primários ainda íntegros- migra ao interior do núcleo do neutrófilo, associa-se à cromatina e induz a degradação das histonas (principalmente H4). Em seguida, a MPO é também direcionada ao núcleo onde promove a descompactação do DNA de forma sinérgica com a NE. No entanto, esse efeito mediado pela MPO é independente da sua atividade enzimática sendo seu mecanismo de ação ainda desconhecido (218). A importância dessas proteases no processo da netose também é ilustrada em estudos de pacientes deficientes em MPO, cujos neutrófilos são incapazes de liberar NETs quando estimulados com indutores diversos (219), e

pelo uso de inibidores específicos da NE, os quais inibem a formação de NET em neutrófilos humanos. Ainda, neutrófilos de camundongos $NE^{-/-}$ falham na produção de NETs durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae* (185).

Recentemente, Sollberger e colaboradores (2016) demonstraram que os neutrófilos maduros contêm todos os fatores necessários para a produção de NETs de forma independente da transcrição e tradução gênica *de novo* (220).

1.2.2.2 Composição das NETs

Em 2004, Brinkmann e colaboradores, mediante o uso de imunomarcações identificaram histonas e proteínas granulares associadas ao DNA extracelular das NETs (184) (Figura 1.17).

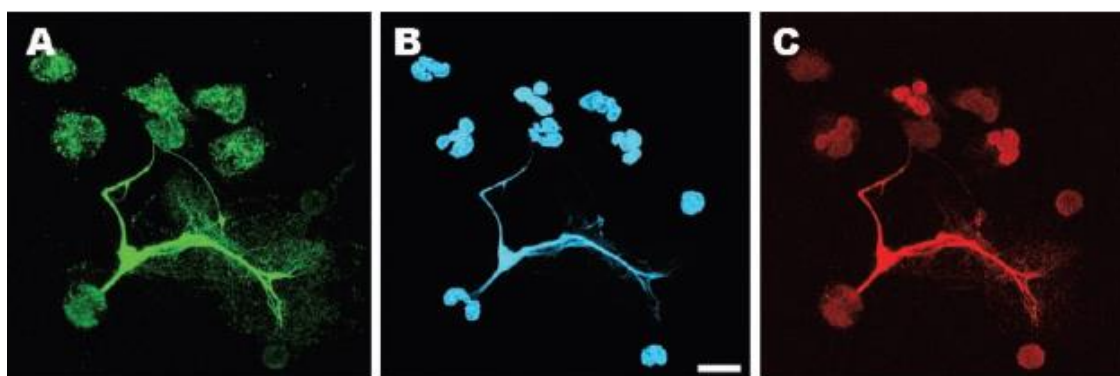


Figura 1.17. Imunomarcação de NETs.

Os neutrófilos foram ativados com IL-8 e marcados para NE (A), DNA (B), e o complexo formado pelas histonas H2A-H2B-DNA (C). Modificado de (184).

Posteriormente, com o uso de ferramentas de proteômica, Urban e colaboradores (2009) identificaram proteínas associadas às NETs que normalmente encontram-se localizadas no núcleo, nos grânulos e inclusive no citoplasma de neutrófilos em repouso (190). As proteínas identificadas nesse estudo são apresentadas na tabela 1.4. Porém, outros estudos sugerem que a composição das NETs pode variar de acordo com o tipo de estímulo usado durante a indução (221–223).

Tabela 1. 4 Proteínas identificadas nas NETs.

Localização na célula em repouso	Nome da proteína
Grânulos	Elastase de neutrófilo. Lactotransferrina. Azurocidina. Catepsina G. Mieloperoxidase. Proteinase 3. Lisozima C. Defensinas 1 e 3.
Núcleo	Histonas H2A, H2B, H3, H4. Antígeno de diferenciação nuclear de célula mieloide (MNDNA).
Citoplasma	Proteínas S100 de união a cálcio A8, A9, A12. Actina (beta e/ou gamma). Miosina-9. Alfa actinina (1 e/ou 4). Plastina-2. Citoqueratina-10.
Peroxissoma	Catalase.
Enzimas glicolíticas	Alfa enolase. Transquetolase.

Retirada de (190)

Logo após as histonas, a NE é descrita como a proteína associada às NETs mais abundante nessas estruturas (190). Trata-se de uma serino protease [família de enzimas de 30 a 35 kDa que contém um resíduo de serina no sítio ativo (181)]. A principal função microbicida dessa proteína granular é a clivagem de fatores de virulência de bactérias (180). No entanto, diversos autores descreveram efeitos diversos da NE sobre as células do hospedeiro. Assim, NE induz a liberação de IL-8 via TLR4 em células (HEK)293 (224), além de mediar a eliminação do parasita *Leishmania major* em macrófagos (225). No entanto, a forma de sinalização da NE via esse receptor ainda não está completamente esclarecida [revisado em (181,226)]. Outros alvos da NE incluem clivagem de receptores celulares como CD4 e CD8 (227), CD14 (228), CR1 (229) e inativação de citocinas como TNF (230), IL-6 (231) e IL-18 (232).

1.2.2.3 Papel das NETs durante as infecções

Os neutrófilos interagem com células do sistema imune tanto inato quanto o adaptativo [revisado em (233)]. No caso específico dos macrófagos, ambas as células têm receptores comuns para várias quimiocinas entre eles CXCR1, CXCR2, CCR2 etc, resultando no recrutamento concomitante dessas duas células no local tecidual [revisado em (234)]. Além disso, diferentes autores descreveram a capacidade moduladora de diversas proteínas derivadas de neutrófilos sobre macrófagos por exemplo a nível de tradução proteica onde α -defensinas podem inibir esse processo em macrófagos (235) ou também induzir um fenótipo pró-inflamatório em macrófagos pela ação de LL37 derivada de neutrófilos (236).

Assim como os neutrófilos e as suas moléculas derivadas, também as NETs podem modular funções e fenótipos de outras células do sistema imunitário - incluindo as células alvo da infecção pelo HIV-1 - mesmo na ausência de infecções. Deste modo, a incubação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com NETs reduzem o limite mínimo de ativação dessas células aumentando as suas respostas e sugerindo umnexo entre as respostas da imunidade inata e a adquirida (237). Farrera e colaboradores (2013) demonstraram que macrófagos humanos (derivados de monócitos periféricos) internalizam NETs *in vitro* (Figura 1.18) como um processo de remoção destas estruturas (238), ao mesmo tempo em que o funcionamento dessas células é modificado, passando a produzir citocinas pró e anti-inflamatórias (239,240).

Logo após uma infecção, os neutrófilos estão entre as primeiras células a serem recrutadas no local da injúria. Embora a contribuição dessas células seja bem conhecida nas infecções bacterianas, o seu papel nas infecções virais continua pouco explorado (161,162).

Estudos em camundongos infectados com influenza A indicam o importante papel dessas células na proteção do hospedeiro diante esse patógeno. Durante a primeira fase da infecção, observa-se um infiltrado massivo de neutrófilos nos pulmões, e a depleção desse tipo celular antes da infecção leva um incremento da mortalidade desses animais (241).

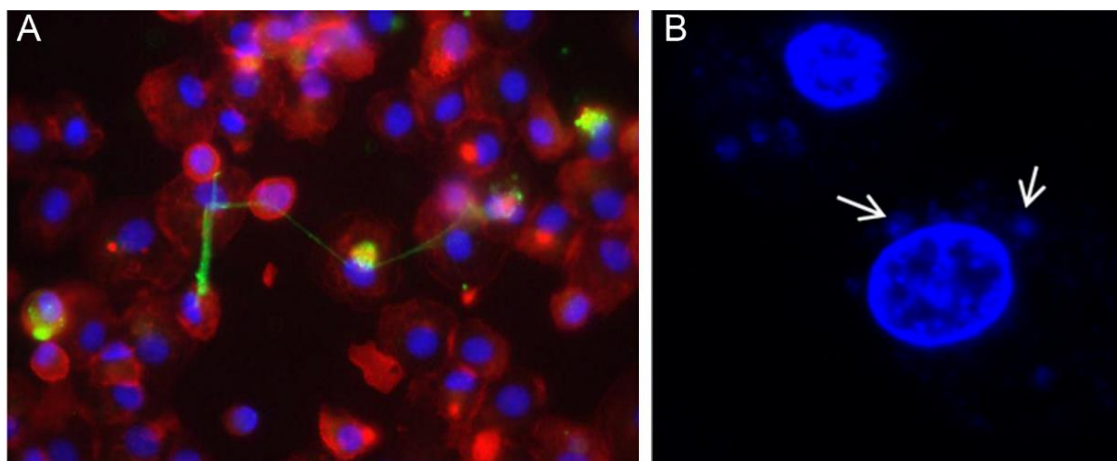


Figura 1.18. NETs interagem com macrófagos.

(A) Imagem de fluorescência mostrando NETs interagindo com macrófagos humanos primários derivados de monócitos. Marcação com elastase (verde), DAPI (azul) e faloidina (vermelho). Aumento original 400x. (B) Imagem de microscopia confocal mostrando internalização de NETs (setas) por macrófagos. As células foram tratadas com cloroquina e incubadas com NETs. Marcação com DAPI. Aumento original 600X. Tomado de (238)

Em 2013, Jenne e colaboradores demonstraram que tanto o uso de análogos virais quanto a infecção experimental com Myxoma vírus induzem um intenso infiltrado de neutrófilos na microvasculatura do fígado de camundongos, e, observaram também que os neutrófilos presentes nos capilares liberam NETs que conferem proteção às células diante da infecção viral (242).

A liberação de NETs tem sido descrita também em outras infecções virais como influenza (243–245), Hanta vírus (172), vírus respiratório sincicial (246) e vírus de imunodeficiência felina (247). No caso específico do HIV-1, Saitoh e colaboradores (2012) descreveram que o HIV-1 induz a liberação de NETs quando incubado com neutrófilos. Os vírus são capturados e inativados, inibindo a infecção e impedindo assim, a sua propagação para outras células (172). Recentemente também foi visto que neutrófilos da mucosa vaginal humana liberam NETs quando expostos ao HIV-1. Os vírus são capturados e inativados inibindo a infecção de células T CD4⁺ (248).

Nestes estudos, os autores exploraram os efeitos das NETs sobre as partículas virais no espaço extracelular. Curiosamente, ainda são poucos os trabalhos que reportam os efeitos das NETs, ou das moléculas associadas a elas, sobre células infectadas por patógenos intracelulares, sobretudo e incluem infecções bacterianas intracelulares. Assim, sabe-se que macrófagos infectados

com *Mycobacterium* internalizam grânulos de neutrófilos e os direcionam aos compartimentos que contêm essas bactérias (249), e mais recentemente Stephan e colaboradores demonstraram que complexos de DNA e LL37 são internalizados por macrófagos, sendo posteriormente direcionados aos mesmos compartimentos onde participam da eliminação do patógeno (250).

Como já mencionado ao longo desta introdução, as NETs modificam o funcionamento dos macrófagos, que as internalizam e, em seguida, secretam citocinas pró e anti-inflamatória. Além disso, inúmeros trabalhos mostram um importante papel das NETs em doenças infecciosas. Com relação ao HIV-1 sabe-se que várias moléculas que foram posteriormente associadas às NETs são capazes de modular a replicação do HIV-1. Porém, ainda não há trabalhos que relatem possíveis efeitos das NETs sobre a infecção pelo HIV-1. Tendo em conta esta carência, e também o papel das NETs, como relevante mecanismo de imunidade inata, no controle de infecções diversas, estudamos a atividade das NETs sobre a infecção pelo HIV-1 em macrófagos primários. Nossa investigação também se apoia nas evidências de que pacientes infectados com HIV-1 apresentam na sua circulação moléculas indutoras de NETs, como PAMPs oriundos da translocação microbiana, e o próprio HIV-1 e seus antígenos, que, como mostrado por Saitoh e colaboradores (2012) também são capazes de induzir NETs. Como vamos mostrar a seguir, nós encontramos que as NETs são potentes agentes inibidores da replicação do HIV-1 em macrófagos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito das NETs sobre a infecção pelo HIV-1 em macrófagos primários humanos infectados *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar se a replicação do HIV-1 em macrófagos é modulada pela exposição das células infectadas às NETs.
- 2) Investigar se NETs induzem a liberação de mediadores inflamatórios conhecidos por sua atividade anti-HIV-1, como IL-10 e β -quimiocinas.
- 3) Estudar o papel das moléculas presentes nas NETs na modulação da replicação do HIV-1 por estas estruturas.
- 4) Analisar a participação das vias de sinalização de TLRs na modulação do HIV-1 em macrófagos expostos às NETs.
- 5) Examinar a modulação de transcritos do HIV-1 em macrófagos incubados com NETs, ou com a molécula NE.
- 6) Avaliar a infectividade das partículas de HIV-1 liberadas por macrófagos previamente expostos às NETs.
- 7) Verificar a liberação de NETs por neutrófilos procedentes de pacientes infectados pelo HIV-1.
- 8) Avaliar a presença de marcadores de NETs em plasma destes indivíduos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Todos os procedimentos experimentais envolvendo células humanas de indivíduos saudáveis foram realizados com amostras obtidas após consentimento informado por escrito, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob o número 397-07, em nome do orientador desta tese.

3.2 Macrófagos e neutrófilos humanos primários

Para a obtenção de macrófagos derivados de monócitos, os PBMCs de doadores soronegativos para HIV-1 foram isolados a partir de “*buffy coats*” e diferenciados através da aderência em placas de plástico. De forma resumida, os PBMCs foram obtidos através de centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque ($d=1,077$ g/mL, Sigma Chemical Co), a 400xg durante 30 minutos. Em seguida, essas células foram lavadas com PBS (LGC, Brasil), contadas em hemocítômetro com 0,1% de Azul de Tripán (Sigma Chemical Co.), distribuídas em placas de cultura (Costar, EUA) e cultivadas em meio DMEM com baixa glicose (LGC Bio) contendo 10% de soro humano previamente inativado (30 min. a 56°C; Sigma, EUA) e penicilina-estreptomicina (10ng/mL; Sigma, EUA). As células foram mantidas em cultura durante 7-10 dias (37°C, 5% CO₂) para diferenciação de monócitos em macrófagos. A seguir, as células não-aderentes foram removidas através da lavagem com PBS, e a monocamada remanescente foi mantida em cultura (DMEM contendo 5% de soro humano). A pureza destas culturas (superior a 95%) foi avaliada por citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD68 (BD Bioscience, #347523 e 562111, respectivamente) e o citômetro BD Canto II equipado com o *software* BD FACSDiva (BD Bioscience, EUA). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo v10, Tree Star Inc

Os neutrófilos foram obtidos também a partir de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque. Resumidamente, após a centrifugação essas células foram aspiradas da monocamada intimamente associada com as

hemácias. A seguir, os eritrócitos residuais associados aos neutrófilos foram removidos utilizando solução de Dextran (3%; Sigma) durante 45 minutos e, em seguida, com solução de lise hipotônica (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após, as células foram lavadas com PBS e imediatamente ativadas para obtenção de NETs (como descrito abaixo). A viabilidade dos neutrófilos foi superior a 95%, como avaliado por azul de trypan, e a pureza superior a 95%, determinada por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD16 (BD Bioscience, #347523, clone NKP15), e coloração com Giemsa (Merck). Os *buffy coats* nos foram cedidos pelos serviços de hemoterapia dos Hospitais Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ) e Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro.

3.3 Linhagens celulares

A linhagem celular de leucemia monocítica humana THP-1 (ATCC: TIB202TM) foi mantida em meio DMEM com baixa glicose (LGC Bio, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Brasil) e penicilina-estreptomicina (10ng/mL). Tais células foram diferenciadas em macrófagos tratando-as com 40 ng/mL de PMA (SIGMA) durante 3 dias. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio fresco por mais 3 dias. As células TZM-bl (obtidas através do *NIH AIDS Reagent Program*, Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu e Tranzyme Inc) foram mantidas com DMEM com baixa glicose com 10% de soro fetal bovino inativado, e penicilina-estreptomicina (10ng/mL).

3.4 Obtenção de sobrenadantes ricos em NETs

Imediatamente após a obtenção dos neutrófilos, estas células foram distribuídas em placas de 48 poços (2.10⁶ /poço), e incubadas em RPMI sem soro com IL-8 (50 ng/mL; Biolegend) durante 3 horas (37°C, 5% CO₂). Em seguida, os sobrenadantes ricos em NETs foram colhidos e centrifugados a 400xg durante 10 minutos, para eliminar células e *debris*, e estas amostras foram mantidas a -80°C até o momento do uso.

A quantificação das NETs foi determinada baseada na concentração do DNA pelo método de Quant-it™ Picogreen dsDNA (Invitrogen). Para tal, foram interpolados valores de uma curva-padrão realizada com concentrações conhecidas de DNA de salmão (Sigma, EUA), e a leitura foi realizada com o kit mencionado acima, de acordo com as instruções do fabricante.

Para eliminar produtos liberados pelos neutrófilos que não compõem as NETs, algumas amostras de NETs foram submetidas a filtração em tubos Centricon 100 (Millipore) durante 5 minutos a 2000xg. Em seguida, as NETs retidas na membrana filtrante foram recuperadas por eluição, ressuspensas no mesmo volume original, quantificadas por Picogreen e estocadas para posterior uso a -80°C.

3.5 Microscopia de fluorescência

Os neutrófilos ($5 \cdot 10^5$ /mL) foram cultivados em placas (Labteks, Brand Products) e estimulados com IL-8, como descrito anteriormente. Em seguida, as amostras foram fixadas com solução de paraformaldeído (PFA, 4%; Merck) durante 30 minutos, e lavadas cuidadosamente com PBS. As amostras foram, então, incubadas com soro humano puro durante 1 hora (etapa do bloqueio), e, posteriormente, marcadas durante 2h com anticorpo policlonal anti-elastase obtido em coelho (Calbiochem, # 481001). Em seguida, as amostras foram lavadas com solução de bloqueio (PBS, 10% de soro bovino, 5% de BSA) durante 5 minutos, e incubadas com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho Alexa546 obtidos em cabra (Life Technologies, #A11010) durante 30 minutos. Após a lavagem com PBS, as amostras foram montadas em *ProLong® Diamond antifade* contendo DAPI (*life technologies*). Todo o processo foi conduzido a temperatura ambiente.

Nos ensaios de interação de NETs com macrófagos, estas células foram expostas às NETs (500 ng/mL) durante 30 ou 60 minutos, fixadas com PFA (4%) durante 30 minutos, as amostras foram lavadas com cuidado para não danificar as NETs, incubadas com soro humano puro durante 1 hora. O material foi então marcado com os anticorpos anti-elastase e anti-coelho-Alexa546, e Faloidina-

488 (invitrogen) durante 30 minutos. As amostras foram montadas em meio contendo DAPI, como descrito acima.

Para as análises de internalização de NETs, os macrófagos foram expostos a estas estruturas (500 ng/mL) durante 90 minutos, lavados rigorosamente para remoção das NETs residuais e fixados com descrito acima. As amostras foram permeabilizadas com saponina (0,01%, Sigma) durante 5 minutos, e incubadas com anticorpos anti-elastase e o secundário Alexa546, e montadas em meio contendo DAPI, como descrito acima. As amostras foram examinadas usando os microscópios confocal (Leica DMI8) e de fluorescência (Zeiss Ax10), e os programas LasX e AxioVision, respectivamente. Brilho, contraste e cor das imagens digitais foram ajustados com o programa Adobe Photoshop CS5 v12.0, Adobe Systems Inc.

3.6 Infecção pelo HIV-1

Os ensaios de infecção foram realizados com o isolado de HIV-1 Ba-L, monocitotrópico e dependente de CCR5, doado pelo *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program* (Divisão de AIDS, NIAID, NIH, MD, EUA). De forma resumida, os macrófagos foram expostos ao isolado viral (10ng/mL da proteína viral p24) durante 16h, a 37°C e 5% CO₂ e, em seguida, lavados e realimentados com meio de cultura (DMEM contendo 5% de soro humano). A replicação viral foi medida 12-14 dias após da infecção pela detecção do antígeno p24 do HIV-1 nos sobrenadantes das culturas, pelo método de ELISA (SinoBiological). Todos os experimentos envolvendo material infectado com HIV-1 foram conduzidos no laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) do Pavilhão Leônidas Deane, Fiocruz Rio de Janeiro, Brasil.

3.7 Análise do efeito das NETs sobre a replicação do HIV-1

Os macrófagos, previamente infectados com HIV-1, foram expostos a diferentes concentrações de NETs obtidas de neutrófilos de doadores individuais, em DMEM sem soro, durante 3 h. Em seguida, as células foram lavadas e mantidas em cultura (DMEM com 5% soro humano) durante 12-14 dias, quando a produção viral foi avaliada, como descrito acima. Após os

primeiros ensaios de análise da replicação viral usando-se NETs de doadores individuais, os ensaios seguintes foram realizados com *pools* destas mesmas NETs (5-6 NETs/*pool*), procedendo-se em seguida como descrito acima. Em alguns experimentos, os macrófagos foram expostos às NETs (40ng/mL) antes da infecção pelo HIV-1, lavados e, então, infectados por este vírus, e a replicação viral foi avaliada como descrito. Da mesma forma, macrófagos infectados foram também tratados com as NETs recuperadas (40ng/mL) após filtração com tubos Centricon, e a replicação viral avaliada como já descrito.

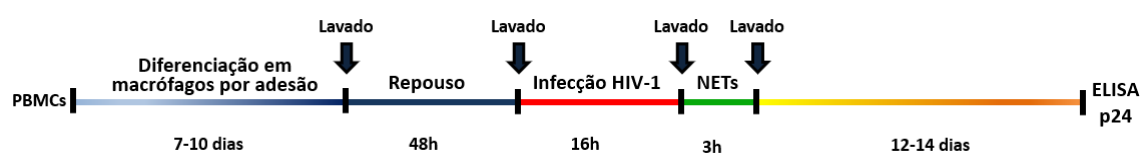


Figura 3.1. Resumo da metodologia utilizada na diferenciação dos macrófagos, infecção com o HIV-1, tratamento e avaliação por ELISA.

Em um grupo de experimentos, macrófagos diferenciados da linhagem THP-1, e infectados pelo HIV-1 da mesma maneira que os macrófagos primários, foram incubados com NETs, e a replicação viral foi avaliada seguindo o mesmo protocolo usado em macrófagos primários. De forma adicional, verificamos se as NETs exerceriam algum efeito sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs de indivíduos saudáveis. Para tal, os PBMCs foram ativados com fitohemaglutinina (2 μ g/L; Sigma, EUA) durante 48-72 horas, lavados e infectados com 10ng/mL do isolado viral Ba-L durante 2 horas. A seguir, as células foram incubadas com NETs (100ng/mL durante 2 horas), lavadas e mantidas em cultivo. A replicação viral foi avaliada 7 dias após infecção por ELISA.

Para avaliar a contribuição do DNA e/ou das proteínas contidas nas NETs para o seu efeito anti-HIV-1, as NETs foram tratadas com DNase I (10U/mL; Promega) a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, a atividade enzimática da DNase foi interrompida pela adição de EDTA 2,4 mM e a digestão enzimática do DNA presente nas NETs foi avaliada por Picogreen. Em seguida, as NETs assim tratadas foram adicionadas aos macrófagos infectados, de acordo com o protocolo já descrito. De forma adicional, os macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados com DNA de salmão (40ng/mL) e a replicação viral foi avaliada

como já descrito. Em outro grupo de experimentos, as NETs originais foram tratadas com diferentes concentrações de proteinase K (Invitrogen) a 56°C durante 30 ou 120 minutos e a degradação das proteínas foi avaliada através de eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS/PAGE). Resumidamente, para realizar o SDS/PAGE, as amostras e o marcador de peso molecular (SeeBlue® Plus2; *life technologies*) foram expostos a 70°C durante 10 minutos em tampão LDS (*life technologies*), aplicados em géis de poliacrilamida (10%; invitrogen) e submetidos a eletroforese em tampão TBS a 140 volts durante aproximadamente 45 min. Então, os géis foram marcados com o protocolo de marcação rápida com prata do kit SilverQuest™ (*life technologies*), e, em seguida, documentados com o transiluminador E-gel imager (Life Technologies). Cabe mencionar que, para avaliar a preservação da integridade do DNA após incubação com proteinase K, estas amostras foram analisadas com Picogreen.

Também avaliamos a contribuição da NE no efeito anti-HIV-1 das NETs. Para tal, as NETs foram tratadas durante 30 minutos com um inibidor irreversível da atividade catalítica da NE (MeOSuc-AAPV-cmk, 10 µg/mL; Calbiochem). Após esse tratamento, as NETs foram adicionados aos macrófagos infectados pelo HIV-1 e a replicação viral avaliada como já descrito. Em conjunto com estas análises, macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados com diferentes concentrações de NE purificada de origem comercial (Calbiochem), durante 3 horas, em DMEM sem soro. Logo em seguida, as células foram lavadas e mantidas em cultura (DMEM com 5% soro humano) durante 12-14 dias, quando a produção viral foi avaliada.

Em outro grupo de experimentos, macrófagos infectados foram incubados durante 30 minutos com anticorpos neutralizantes para os receptores de IFN1 α/β (1µg/mL; PBL assay science), tratados com NETs (como já descrito) e, logo em seguida, lavados e expostos novamente aos anticorpos neutralizantes mencionados. Macrófagos infectados foram também tratados com inibidores farmacológicos da molécula adaptadora MyD88 (40µM; Invivogen), com citocalasina D ou Dynasore (5 ug/mL e 80nM, respectivamente; Sigma, EUA) 45 minutos antes da exposição às NETs.

3.8 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade das células tratadas com NETs foi determinada usando-se o método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, Sigma), como descrito(148). Resumidamente, os macrófagos foram expostos às NETs durante 24 ou 48 horas, quando foram adicionados 1mg/mL de XTT e 15 ng/mL de PMS (N-metil dibenzopyrazina metil sulfato) dissolvidos em DMEM sem soro. Após 3 horas a 37°C, a densidade ótica foi medida a 450nm. A viabilidade celular também foi avaliada por citometria de fluxo, após tratamento semelhante ao descrito acima, usando-se anexina V (R&D) e 7AAD (BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9 Quantificação de β -quimiocinas e IL-10 em sobrenadantes de macrófagos tratados com NETs

Macrófagos foram incubados com NETs durante 3 horas e lavados, amostras do sobrenadante foram colhidas após 12, 24, 48, 72 e 96 horas, e a concentração de β -quimiocinas e IL-10 foi quantificada pelo método de ELISA com kits específicos para cada molécula (RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β : R&D Systems; IL-10: BioLegend), de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.10 Avaliação de transcritos do HIV-1

Para analisar se as NETs podem modular os transcritos do HIV-1 em macrófagos infectados, estas células foram tratadas com NETs - ou com NE - durante 3 horas, lavadas e mantidas em cultura durante 72 horas. A seguir, as células foram lisadas com tampão de lise (Qiagen), e o RNA total foi isolado com o kit *mirVana*TM e quantificado usando Nanodrop. Para remover possíveis moléculas de DNA contaminante presentes no RNA total, as amostras foram tratadas com DNase I (TURBO DNA-freeTM Kit; *Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante.

Durante a síntese do DNA complementar (cDNA), foram utilizados 2 μ g de RNA total e o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied BiosystemsTM), em um volume total de 20 μ L. Este kit contém todos os reagentes

para a reação da transcrição reversa, ou seja, *primers* randômicos, transcriptase reversa, dNTPs, inibidor de RNases e *buffer* de reação.

A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços no aparelho ABI 7500 equipado com o programa 7500 v2.3 (ABI 7500, Applied Biosystems) utilizando-se o *Taqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems), com 200ng de cDNA por reação. A configuração da RT-PCR foi a seguinte: 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Os oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*) e as sondas utilizados na reação são apresentados na tabela 3.1

Região genômica	Primer	Sentido (<i>Foward primer</i>)*	Antisentido (<i>Reverse primer</i>)*
Gag	GAG1	TCAGCCCAGAAGTAATACCCATGT	CACTGTGTTTAGCATGGTGT
GAPDH	GAPDH	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
TAT/REV	MF84 F/ MF83 R	ACAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAA GCA	GGATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCAC C

* Todos os primers estão no sentido 5'→3'

Sondas	Sequencias
TAT/REV (KS2-TQ)	5'-FAM-TTCCTTCGGGCCTGTCTGGGTCCC-ZEN/Iowa Black FQ
GAG (GAG3)	5'-FAM-ATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGA-ZEN/Iowa Black FQ
GAPDH	5'-/56-FAM/AAGGTCGGA/ZEN/GTCAACGGATTGGTC/3IAB kFQ/

As análises dos resultados foram feitas pelo método de ΔCT , utilizando-se o gene GAPDH como controle endógeno. Esses estudos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal de Rio de Janeiro, sob a supervisão do Dr. Renato Aguiar Santana.

3.11 Ensaios de infectividade

Para verificar se as NETs alteram o *fitness* viral, macrófagos infectados foram tratados com as NETs durante 3 horas em placas de 6 poços e, após 12 dias, os sobrenadantes da cultura (ricos em HIV-1) foram coletados, centrifugados a 3.000xg e filtrados em membranas com poros de 0.45 μ m. Os sobrenadantes foram, então, centrifugados em dispositivos de filtro Centricon com membranas YM-100 (Millipore, EUA) para concentrar e quantificar as partículas virais. Em seguida, células TZM-bl (10^5 células/poço/placa de 96 poços) foram expostas a esta suspensão viral (10 ng/ml de p24) e na presença

de DEAE-Dextran (15 ug/mL; Sigma EUA). Após 48 horas de infecção, o conteúdo de luciferase foi analisado com o reagente Bright-Glo, seguindo as instruções do fabricante (Promega, EUA).

3.12 Análise de marcadores de NETs em plasma de pacientes infectados pelo HIV-1, e de liberação de NETs por neutrófilos destes pacientes

Para realizar estas análises, nós obtivemos plasma de 71 pacientes infectados pelo HIV-1 oriundos do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), sob a supervisão do Dr. José Henrique Pilotto (Lab. AIDS e Imunologia Molecular/IOC; estudos autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Geral de Nova Iguaçu, parecer #008/2010; Dr. Henrique Pilotto). As amostras plasmáticas foram obtidas de 10-15 pacientes para cada nível de carga viral plasmática, a saber: A) indetectável (<40 cópias/mL); B) baixa (até $10 \cdot 10^3$ cópias/mL); C) intermediária (entre $10 \cdot 10^3$ e $100 \cdot 10^3$ cópias/mL); D) elevada (acima de $100 \cdot 10^3$ cópias/mL). De forma paralela, e de acordo com a contagem de células T CD4⁺ circulantes, estes pacientes também foram classificados em três categorias (115), como indicadas a seguir: a) Categoria I: >500 células/ μ L; b) Categoria II: 200-499 células/ μ L; c) Categoria III: <200 células/ μ L.

Para quantificação de elastase neutrofílica, amostras de plasma dos pacientes (e também de indivíduos saudáveis) foram diluídas 1:4 em tampão (50 mM HEPES, 100 mM NaCl and 0.01% Triton X-100) e a atividade da elastase foi quantificada usando o substrato fluorogênico N- Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-methyl-coumarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em paralelo, também foi avaliada a presença de DNA extracelular nestes mesmos plasmas. Para tal, estas amostras foram diluídas 1:2 em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e o DNA quantificado com Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay. Os valores obtidos nestas quantificações (assim como os dados clínicos destes pacientes) são apresentados na tabela 9.1 (Anexo 1). Além disso, neutrófilos de pacientes infectados pelo HIV-1 foram estimulados com IL-8, e a sua capacidade de liberar NETs foi analisada por microscopia de fluorescência, como descrito acima.

3.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram inicialmente avaliados com testes de normalidade (251) e, a partir dos quais, as análises estatísticas foram realizadas de acordo com métodos indicados nas legendas de cada figura. Os resultados considerados paramétricos estão representados como a média associada ao desvio padrão, enquanto que os dados não paramétricos estão representados como mediana associada a amplitude de variação (*range*) (251–253).

As figuras e testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software Prism 6 (GraphPad Software, EUA), e a significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento dos neutrófilos e obtenção de NETs

Inicialmente, foi avaliada a pureza e viabilidade dos neutrófilos obtidos após o gradiente de Ficoll-Hypaque e a lise das hemácias. Para tal, foi realizado um esfregaço das amostras, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Na Figura 4.1A se observam majoritariamente células com núcleos multilobulados e também uma célula de menor tamanho apresentando um núcleo arredondado e escasso citoplasma.

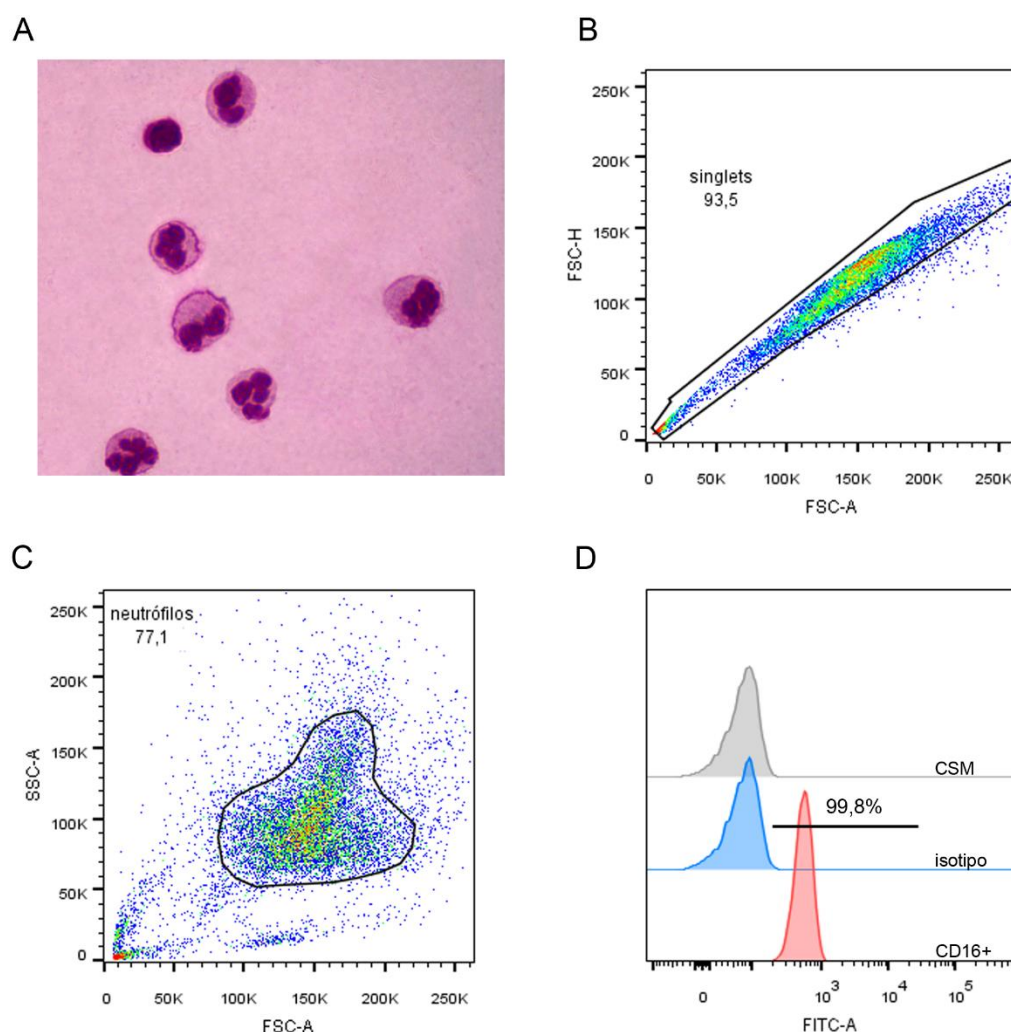


Figura 4.1. Análise da pureza de neutrófilos obtidos por gradiente de Ficoll.

A) Amostras contendo neutrófilos obtidos por gradiente de centrifugação foram coradas com Giemsa e analisados por microscopia ótica. B-D) Análise das células por citometria de fluxo usando marcação para CD16. B) Exclusão de agregados celulares. C) Seleção da população de estudo. D) Histograma de fluorescência para CD16. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. CSM: células sem marcação.

As amostras foram também analisadas por citometria de fluxo com o uso do marcador CD16. Nas figuras 4.1B e C é apresentada a estratégia de *gating*, primeiramente com a exclusão de agregados celulares e a análise da população

específica, respectivamente. As análises indicam que mais de 95% das células isoladas apresentam marcação positiva para CD16 (Figura 4.1D), semelhante à quantificação por microscopia ótica, indicando uma elevada pureza dos neutrófilos obtidos com o nosso protocolo. Cabe mencionar que a viabilidade celular se manteve inalterada durante o processo de isolamento, sendo esta superior a 95%, como avaliada por azul de trypan.

Uma vez determinados esses parâmetros, fomos avaliar a produção de NETs por imunofluorescência. Assim, os neutrófilos foram incubados em RPMI sem soro na presença de IL-8, durante 3 horas. Logo em seguida, as amostras foram cuidadosamente fixadas e analisadas através de microscopia de fluorescência, usando-se dois marcadores de NETs descritos como clássicos, o DNA extracelular e a NE. Na figura 4.2A, podem ser observados neutrófilos com núcleos multilobulados (cabeças de seta) ou arredondados (asterisco). O sucesso da indução de NETs, pode ser apreciada pela presença de estruturas filamentosas e reticulares no espaço extracelular positivas para a marcação com DAPI (Figura 4.2A, setas) e para proteína granular elastase (Figura 4.2B). A colocalização de ambos os marcadores (Figura 4.2D) sugere a associação da elastase com o DNA extracelular, coincidindo com descrições realizadas por diversos outros autores (184,186,188,190,221,254), e indica a liberação de redes extracelulares em nossas condições experimentais.

Diferentes autores descreveram variações quantitativas na liberação de NETs entre indivíduos diferentes, usando diversos indutores (190,221,255). Com o objetivo de mensurar a produção de NETs nas nossas condições experimentais, quantificamos a concentração destas estruturas no sobrenadante de neutrófilos em repouso ou estimulados com IL-8. Como pode ser observado na figura 4.3, os sobrenadantes de neutrófilos não estimulados apresentaram uma concentração aproximada de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de DNA enquanto que a produção de NETs em 20 doadores diferentes foi variada, apresentando uma concentração de DNA com mediana de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e faixa aproximada entre 1 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$, portanto, com uma relação aproximada de 20 a 30 vezes mais.

Dessa forma, nossos resultados – em conformidade com a literatura- indicam que neutrófilos de doadores saudáveis liberam NETs quando estimulados com IL-8, podendo apresentar diferenças quantitativas individuais.

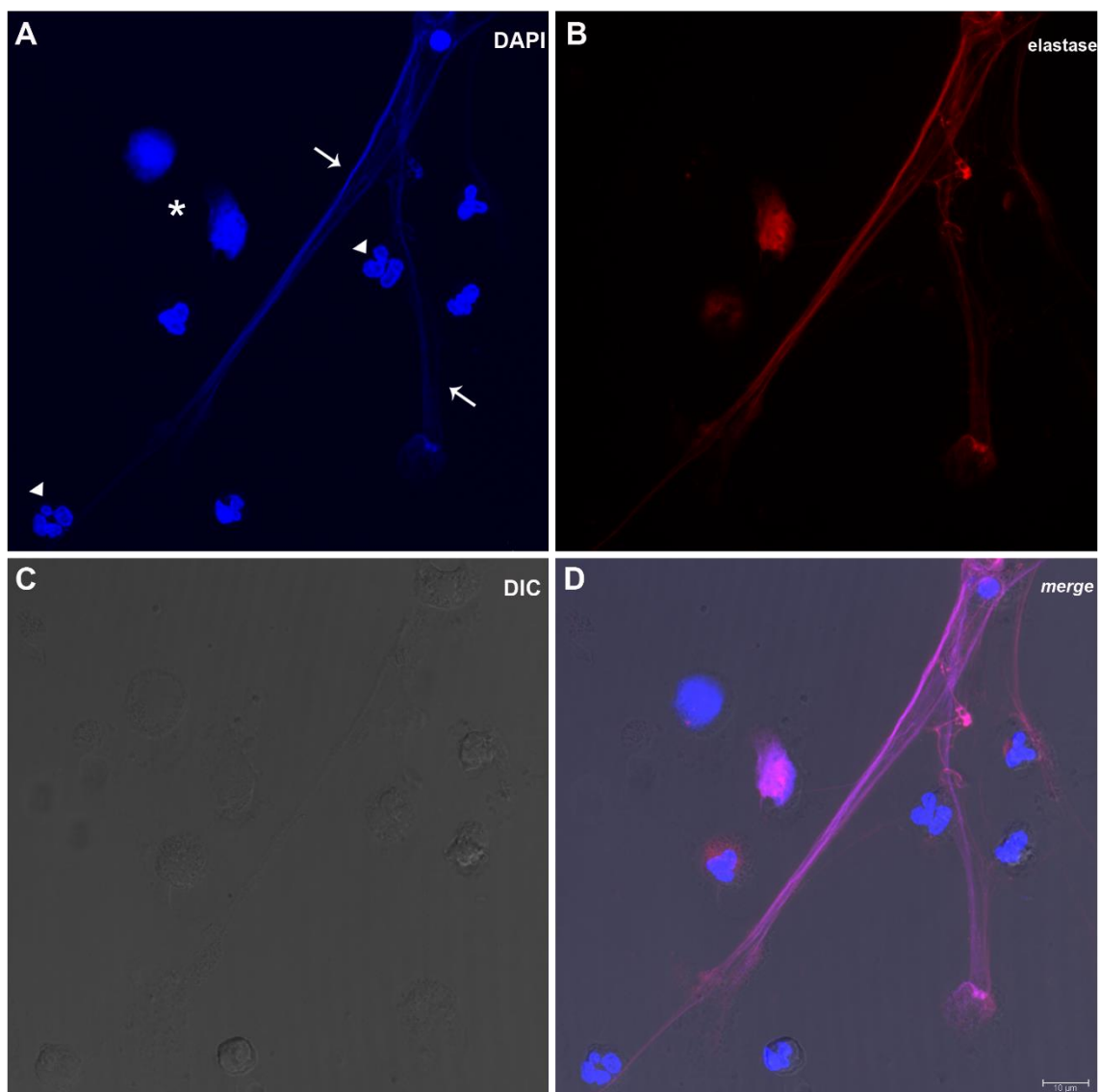


Figura 4.2. Produção de NETs por neutrófilos.

Neutrófilos foram incubados com 50 ng de IL-8 durante 3 h a 37°C. As NETs foram marcadas com DAPI (A) e anticorpos anti-NE (B), contraste de interferência diferencial (DIC; C). As imagens ilustram a morfologia de tipo rede característica dessas estruturas com superposição com a proteína elastase (D). Aumento original 630X. Barra de escala: 10 μm. Imagens representativas de pelo menos 4 marcações semelhantes.

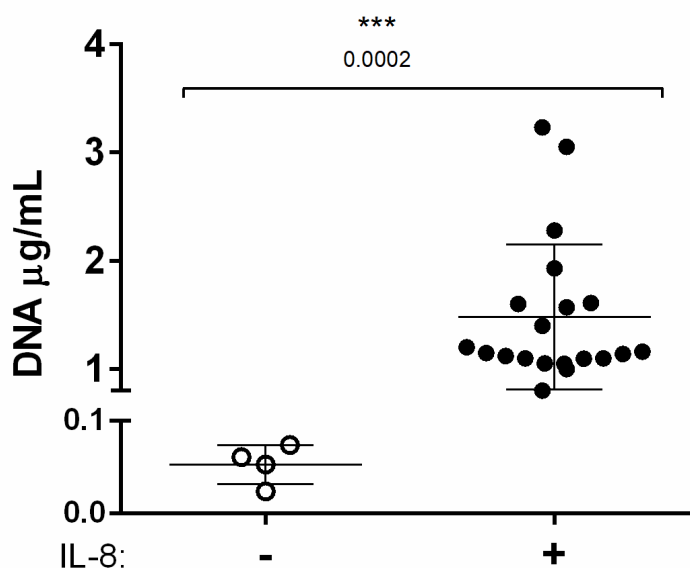


Figura 4.3. Quantificação de NETs.

Neutrófilos ($2 \cdot 10^6$ células) foram estimulados, ou não, com 50ng/mL de IL-8 e, posteriormente, as NETs foram quantificadas no sobrenadante pelo método *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA*, reagente específico para DNA de dupla fita. Cada ponto representa um doador. Os dados foram analisados com o teste de Mann-Whitney.

4.2 NETs inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos, sem comprometimento da viabilidade celular.

Diferentes estudos têm evidenciado que moléculas ou sobrenadantes derivados de neutrófilos ativados podem aumentar a capacidade microbicida de macrófagos infectados com patógenos intracelulares (225,249,256–259). Mais recentemente, foi descrito que a molécula LL-37 associada ao DNA de dupla fita também apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias intracelulares em macrófagos (250). De forma adicional, diversas proteínas presentes nas NETs têm sido descritas com atividade anti-HIV-1(168,172,260,261).

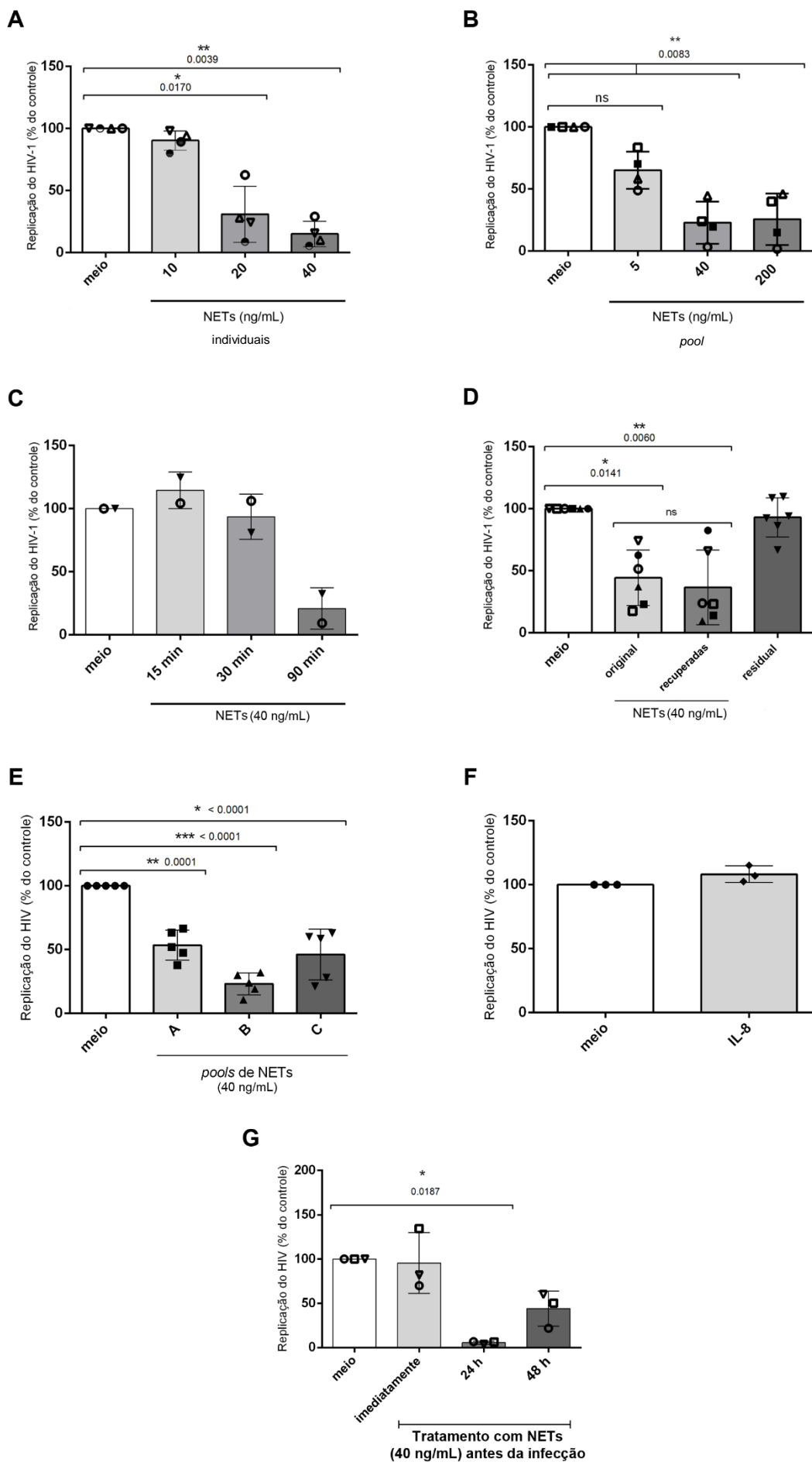
Com base nesses dados, e considerando que as NETs poderiam modular a capacidade microbicida dos macrófagos em nosso modelo, fomos verificar se a interação macrófagos-NETs produziria efeitos sobre a replicação do HIV-1. Assim, macrófagos infectados com HIV-1 foram tratados com diferentes concentrações de NETs logo após a infecção, durante 3 h, e a produção de vírions foi avaliada 12-14 dias após da infecção.

Como pode ser observado na Figura 4.4A, o tratamento das células com NETs, derivadas de diferentes doadores, assim como os macrófagos, resultou em uma forte diminuição dos títulos virais. A concentração de 40ng/mL induziu a maior redução na produção de vírus, com um percentual de inibição viral de $85\pm 10,2\%$. Observamos também que concentrações inferiores apresentaram uma efetividade menor ($70\pm 22,5\%$ e $10\pm 7,8\%$ para 20 e 10 ng/mL de NETs, respectivamente), sugerindo que o efeito antiviral das NETs é dependente da dose de tratamento.

Como foi indicado anteriormente, diferentes autores já reportaram variações não apenas quantitativas na produção de NETs, mas também na composição delas. Essas diferenças derivam tanto do estímulo usado quanto da heterogeneidade dos indivíduos (190,221,255). Com o objetivo de reduzir potenciais efeitos distintos sobre a replicação viral de NETs obtidas de vários doadores que possuam, por exemplo, diferentes concentrações de proteínas associadas ao DNA, e tendo em vista que a capacidade inibitória sobre o HIV-1 foi alta e semelhante entre as amostras individuais testadas (Figura 4.4A), passamos a avaliar a replicação viral em células tratadas com *pools* de NETs, compostos de 5 diferentes doadores. O tratamento dos macrófagos infectados com diferentes concentrações de *pools* de NETs inibiu a produção do vírus de forma semelhante ao tratamento com NETs derivadas de doadores individuais, apresentando percentuais próximos de 80% nas concentrações de 40 e 200 ng/mL (Figura 4.4B).

Ressalte-se que também foram avaliados os possíveis efeitos de sobrenadantes de neutrófilos não ativados sobre a replicação do vírus em macrófagos. Para tal, os macrófagos foram tratados com volumes de sobrenadante de neutrófilos mantidos em repouso equivalentes a aqueles contendo 40 ng/mL de NETs. O sobrenadante obtido das células em repouso não apresentou efeitos modulatórios na replicação do HIV-1 ($95,24 \pm 15,27\%$ da replicação controle; n=3).

Considerando-se que os efeitos inibitórios na produção viral foram idênticos entre o *pool* e as NETs individuais, os experimentos seguintes foram conduzidos apenas utilizando *pools* destas estruturas.



Legenda da figura da página anterior.

Figura 4.4. NETs inibem a infecção pelo HIV-1 em macrófagos.

A) Macrófagos de diferentes doadores foram infectados *in vitro* e tratados com NETs obtidas de diferentes indivíduos durante 3 horas, lavados e mantidos em cultura (n=4). B) Diferentes concentrações de *pool* de NETs foram adicionadas a macrófagos infectados durante 3 horas, lavados e mantidos em cultura (n=4). C) *Pool* de NETs incubado com macrófagos durante 3 intervalos de tempos diferentes (n=2). D) *Pool* de NETs submetidos a centrifugação com tubos centricon 100 e as células infectadas foram expostas às diferentes frações de NETs durante 3 horas (n=6). E) Comparação do efeito inibitório de 3 *pools* de NETs (n=5). F) Macrófagos infectados foram tratados com concentrações de IL-8 equivalentes aos sobrenadantes ricos em NETs (n=3). G) Macrófagos foram tratados com NETs previamente à infecção pelo HIV-1 (n=3). A-G) A replicação viral foi avaliada 12-14 dias após a infecção. Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (A-B; G), *One Way Anova* com pós teste de Turkey (D, E) e teste *t-student* (F). Cada símbolo nas colunas representa um doador de macrófagos.

Avaliamos também uma cinética de tratamento com diferentes tempos de exposição dos macrófagos infectados às NETs. Como pode ser observado na Figura 4.4C, o tratamento com NETs durante 90 minutos induziu efeitos anti-HIV-1 nos macrófagos.

Durante o processo de ativação, os neutrófilos podem sofrer o processo de degranulação e liberar diversas moléculas ao meio extracelular. Para afastar possíveis efeitos inibitórios oriundos de outros fatores presentes nos sobrenadantes ricos em NETs, porém não associados com elas, decidimos purificar as amostras ricas em NETs usando tubos Centricon 100, os quais permitem a passagem de moléculas de peso molecular inferior a 100 kDa. As NETs retidas na membrana dos tubos foram recuperadas por eluição (*NETs recuperadas*) e ressuspensas no volume original. Posteriormente, a concentração de DNA, tanto os sobrenadantes recuperados da membrana, quanto aqueles que atravessaram o filtro dos tubos (*NETs residuais*) foram quantificados por Picogreen e comparados com as NETs originais (Tabela 4.1)

Tabela 4.1. Concentrações de NETs em sobrenadantes centrifugados com tubos Centricon 100 (n=2)

Condição	Concentração de DNA de dupla fita ($\mu\text{g/mL}$)
NETs originais	2,45 \pm 0,14
NETs recuperadas	1,4 \pm 0,44
NETs residuais	0,05 \pm 0,16

Verificamos que a concentração de NETs após o processo de recuperação das membranas dos tubos foi de aproximadamente 60% do valor original, com apenas 2% de DNA no sobrenadante que atravessou as membranas.

Uma vez estabelecidos esses parâmetros, as diferentes frações de NETs foram adicionadas aos cultivos infectados. Interessantemente, o *pool* recuperado de NETs apresentou a mesma capacidade de inibição da replicação do HIV-1 que o *pool* original (Figura 4.4D). No entanto, o sobrenadante resultante da passagem através do filtro não teve efeitos significativos na produção de vírus. Estes resultados mostram que a inibição viral é mediada pelas NETs, independentemente de outros possíveis fatores presentes no sobrenadante. Como verificamos que os efeitos sobre a replicação viral foram idênticos entre o *pool* original e o purificado, realizamos os experimentos seguintes apenas com o *pool* original.

Comparamos também o efeito de três pools aleatórios, obtidos em momentos e de doadores diferentes, e observamos uma capacidade inibitória semelhante entre todos eles (Figura 4.4E).

A modo de controle, e para assegurar que a inibição viral se deve às NETs presentes no sobrenadante sem interferência do indutor, os macrófagos infectados foram tratados com IL-8 em concentrações equivalentes a aquelas presentes nos sobrenadantes de neutrófilos estimulados e a replicação viral foi avaliada como descrito anteriormente. Não foi observada alteração significativa da produção de HIV-1 pelos macrófagos tratados com esta citocina (Figura 4.4F).

Esse conjunto de resultados indica que as NETs exercem potente efeito sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos primários, e que este efeito é dependente da concentração de NETs e independente de outras moléculas presentes no sobrenadante, porém não associadas à cromatina.

Uma vez estabelecidas as condições efetivas de tratamento, investigamos se a adição das NETs aos macrófagos antes da infecção também resultaria em queda da replicação viral. Observamos que o tratamento com NETs 24h antes da infecção resultou em uma forte inibição da produção de HIV-1, não obstante

tratamentos 48 h e imediatamente antes da infecção não apresentam efeitos significativos na replicação viral (Figura 4.4G)

Observando a inibição do HIV-1 induzida nos macrófagos, perguntamos se as NETs seriam capazes de exercer efeitos anti-HIV-1 em outros tipos celulares. Assim, o tratamento com *pools* de NETs também inibiu o crescimento viral em macrófagos diferenciados da linhagem celular THP-1 (Figura 4.5A), mas não foram observadas mudanças na produção viral em PBMCs, como mostram os resultados preliminares apresentados na Figura 4.5 B.

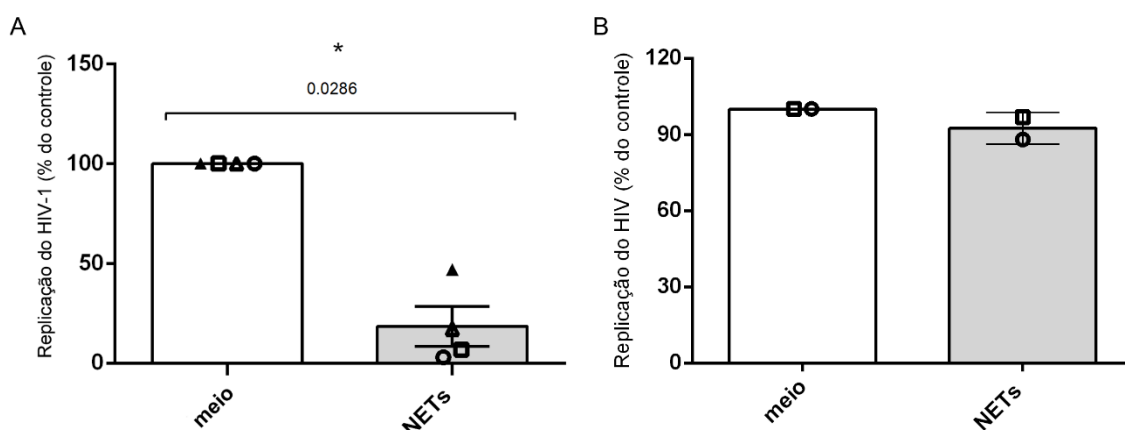


Figura 4.5. Efeitos das NETs em células THP-1 e PBMCs.

A) Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos, infectados com HIV-1 como descrito nos métodos e posteriormente incubados com 40ng/mL de NETs. A replicação viral foi determinada 14 dias após a infecção (n=4). Os dados foram analisados com o teste de Mann-Wihtney. B) PBMCs foram infectados com HIV-1 e tratados com NETs (100ng/mL). A replicação viral foi quantificada 7 dias após a adição do inoculo viral (n=2).

Em virtude dos resultados de inibição viral e para verificar se as NETs poderiam alterar a viabilidade celular, os macrófagos não infectados foram expostos a duas concentrações diferentes de NETs durante 3 horas, lavados e posteriormente mantidos em cultura durante 24 ou 48 h. Em seguida, a viabilidade celular foi examinada através de citometria de fluxo e o método XTT (Figuras 4.6A e B, respectivamente). Nossos resultados indicam que a viabilidade celular se manteve inalterada nestas condições, sugerindo que os tratamentos utilizados não apresentam efeitos citotóxicos que poderiam afetar a replicação viral nas células usadas em nosso modelo.

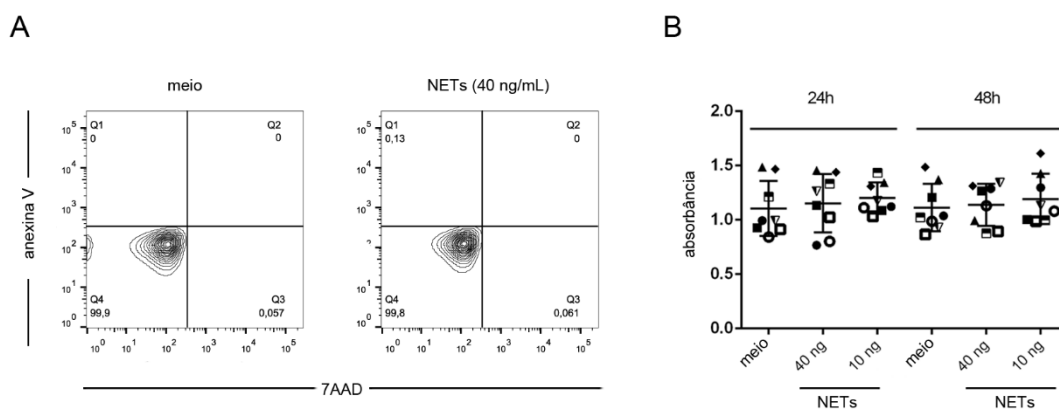


Figura 4.6. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos expostos às NETs.

Macrófagos foram incubados durante 3h com NETs, como descrito na Metodologia. A) Avaliação da viabilidade celular 24 horas após o tratamento com NETs por citometria de fluxo. Figura representativa de 2 experimentos independentes; B) A viabilidade celular foi avaliada 24 h ou 48 h após usando o método XTT (n= 8).

4.3 O tratamento com NETs induz a produção de RANTES e MIP-1 β em macrófagos.

Para investigar possíveis mecanismos envolvidos na inibição da replicação do HIV-1 nas células expostas às NETs, nós avaliamos se o tratamento dos macrófagos com essas estruturas poderia induzir a produção de fatores solúveis com propriedades anti-HIV-1, como por exemplo, β -quimiocinas ou IL-10. Assim, os macrófagos não infectados foram tratados com NETs, e a produção dessas moléculas foi avaliada por ELISA em tempos diferentes. NETs estimularam a produção de RANTES e MIP-1 β de forma significativa 12 e 96 h após o tratamento (Figura 4.7A e B, respectivamente).

No entanto, não foram observadas mudanças significativas na concentração de MIP-1 α e IL-10 nos sobrenadantes de macrófagos tratados com NETs (Figura 4.7C e D, respectivamente)

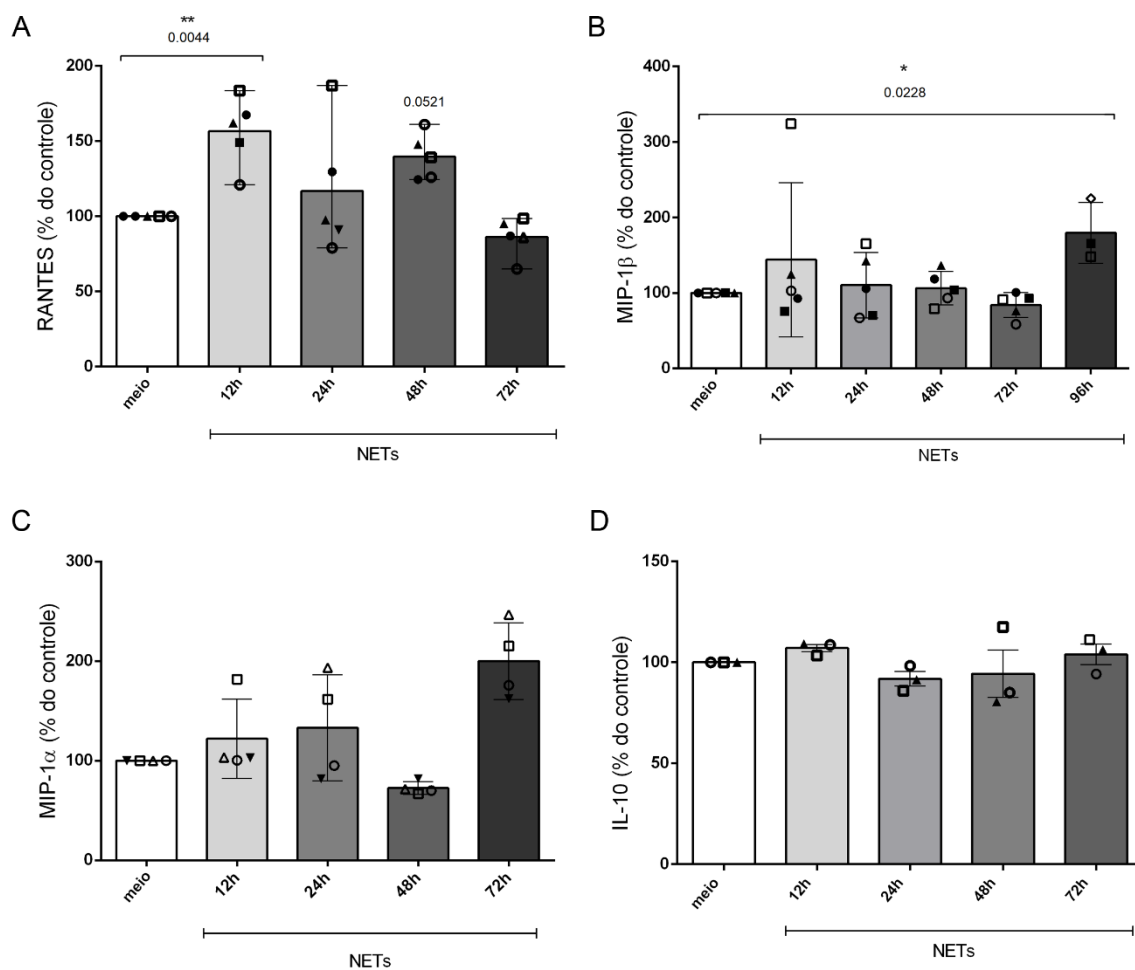


Figura 4.7 NETs induzem a produção de RANTES e MIP-1 β em macrófagos.

Macrófagos foram tratados com 40ng/mL de NETs durante 3 horas, lavados e mantidos em cultura com meio fresco. A concentração de RANTES (A, n=5), MIP-1 β (B, n=5), MIP-1 α (C, n=4) e IL-10 (D, n=3) foi quantificada nos sobrenadantes por ELISA nos tempos acima indicados. Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

4.4 Macrófagos de cultivos infectados pelo HIV-1 internalizam NETs.

Uma vez caracterizados os efeitos das NETs na produção viral em macrófagos, fomos estudar a interação dessas estruturas com as células do nosso modelo. Assim, cultivos infectados pelo HIV-1 foram expostos às NETs durante 30 min, e as amostras foram imediatamente fixadas e analisadas por imunofluorescência. Na figura 4.8A podem ser observados macrófagos marcados com DAPI e faloidina, além de fibras de DNA extracelular (marcadas com DAPI) colocalizadas com a proteína NE. A interação das células com as NETs pode ser apreciada com maiores detalhes no campo escolhido indicado pelas linhas pontilhadas. A estrutura reticular da cromatina extracelular (Figura 4.8B) colocalizada com a proteína elastase (Figura 4.8C) sugere que as NETs adicionadas aos macrófagos mantiveram as suas características morfológicas preservadas no momento da execução do experimento.

Considerando que as NETs têm a capacidade de inativar o HIV-1 no espaço extracelular (172,248), e para evitar uma possível interferência em nossas avaliações devido a essa causa, avaliamos se o nosso processo de lavagem das células após a incubação com as NETs removeria essas estruturas do meio extracelular. Assim, as células foram lavadas como descrito nos métodos, e os cultivos foram analisados por imunofluorescência para marcadores de NETs. Como apresentado na Figura 4.9, o lavado das células com PBS após da incubação com NETs removeu eficientemente essas estruturas dos cultivos.

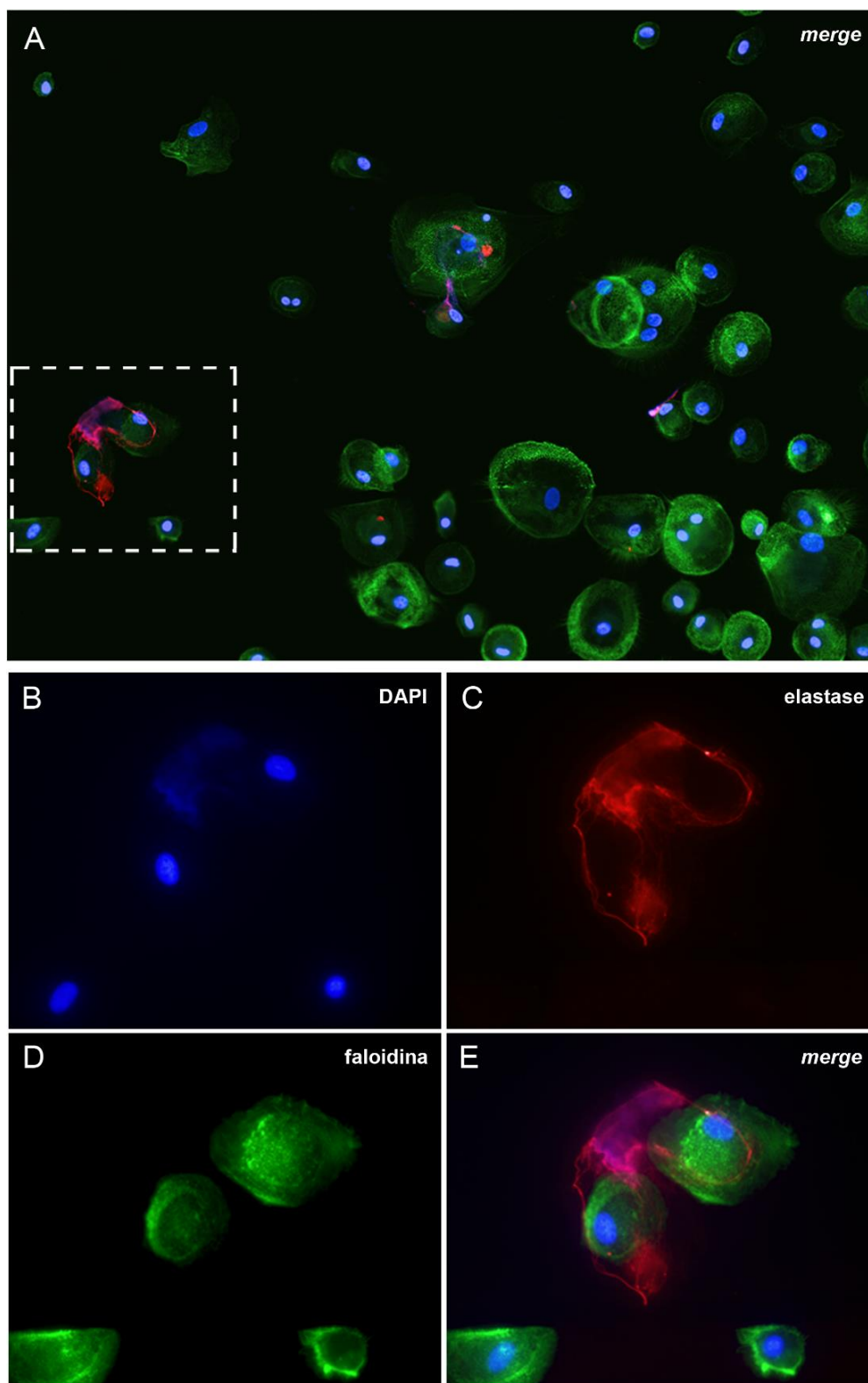


Figura 4.8. Macrófagos oriundos de cultivos infectados com HIV-1 interagem com NETs. A) Imunofluorescência mostrando interação de NETs com macrófagos. Macrófagos de cultivos infectados com HIV-1 foram expostos as NETs durante 30 min e, após a fixação, as NETs foram marcadas com DAPI e anticorpos anti-NE, enquanto que as células foram visualizadas através da marcação com faloidina e DAPI. Aumento original: 200X. B-E) Ampliação digital da área delimitada pelas linhas pontilhadas em A. Observar a estrutura reticular das NETs conservada (B, C) e em volta das células (E). Imagens representativas de 4 experimentos diferentes.

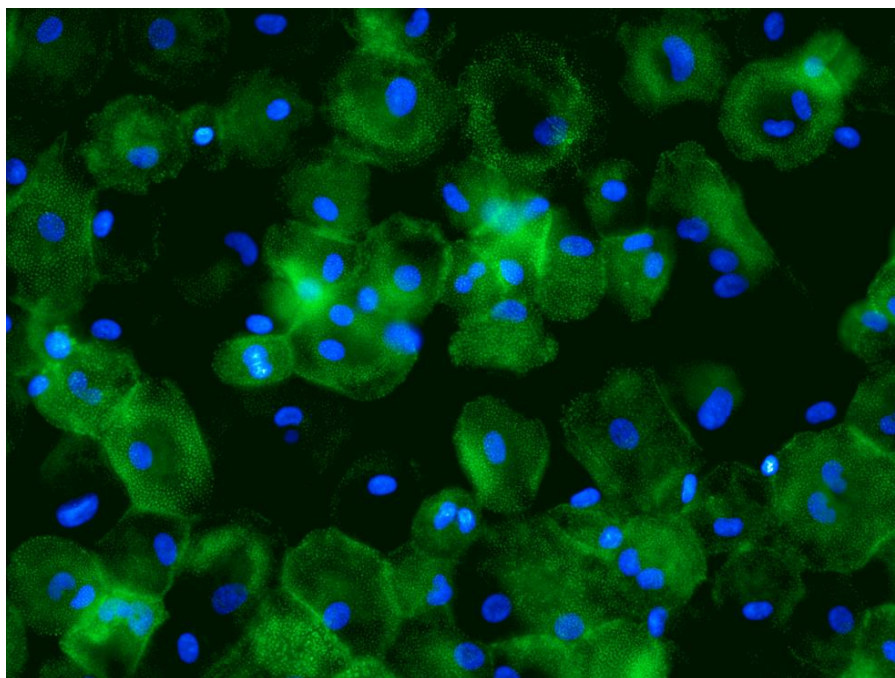


Figura 4.9. As NETs são removidas do cultivo de macrófagos após lavagem. Macrófagos foram incubados com NETs e lavados com PBS antes da fixação e marcação para os componentes das NETs e faloidina. Aumento original 400X. Imagem representativa de 3 experimentos distintos, obtida após observação completa do campo microscópico.

Considerando a natureza fagocítica dessas células e os achados de Farrera e colaboradores (238), avaliamos a internalização de NETs por macrófagos de cultivos infectados pelo HIV-1. As células foram primeiramente incubadas com NETs durante 1 h, imediatamente fixadas e marcadas com anticorpos anti-elastase e com DAPI. Durante as análises de fluorescência confocal foi identificada a presença de DNA no ambiente extracelular (Figura 4.10A) e, de forma importante, também no citoplasma do macrófago (Figura 4.10A1, setas). Também foram analisados macrófagos de cultivos incubados com NETs e lavados previamente à análise com microscopia confocal. Como pode ser observado na figura 4.10E, mesmo quando as células foram lavadas, foi observada a presença de DNA no citoplasma, nessa ocasião colocalizado com elastase (Figura 4.10F). Esses resultados de microscopia confocal, mostrando a associação do DNA com a proteína elastase no citoplasma, sugerem a que macrófagos de cultivos infectados são capazes de internalizar as NETs.

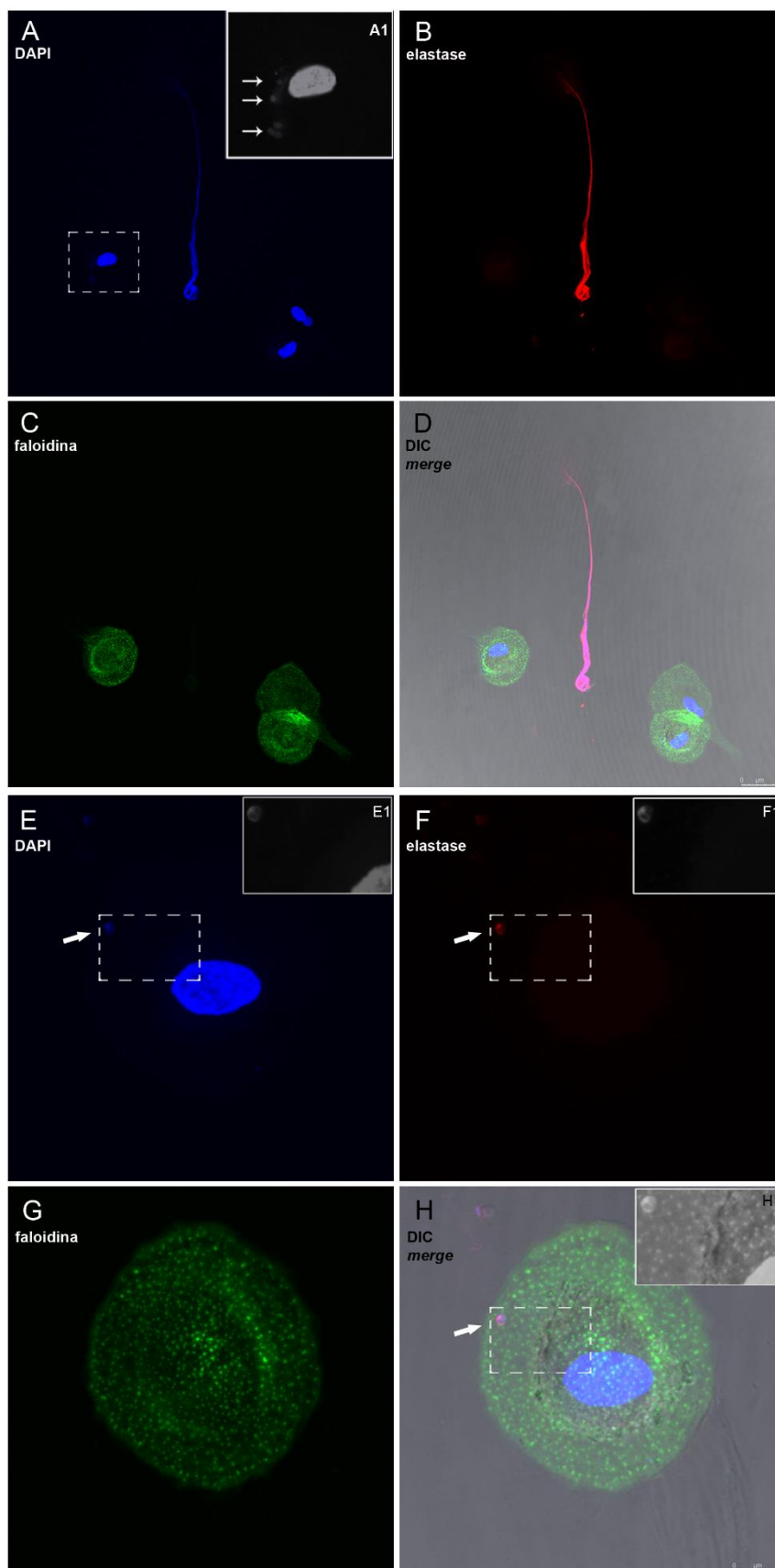


Figura 4.10. Macrófagos de cultivos infectados com HIV-1 internalizam NETs.

A-D) Macrófagos infectados foram incubados com NETs durante 1h, imediatamente fixados e analisados para marcadores de NETs por microscopia confocal. Aumento original 200x. (Continua na página seguinte)

Considerando nossos resultados sobre a internalização de NETs e tentando compreender os mecanismos envolvidos na inibição viral mediada pelas NETs, perguntamo-nos se a fagocitose dessas estruturas seria necessária para o efeito antiviral observado. Para responder essa pergunta, macrófagos de cultivos infectados foram tratados com citocalasina D durante 30 min, e posteriormente expostos às NETs. O bloqueio da fagocitose não reverteu a redução da replicação mediada por NETs (Figura 4.11A).

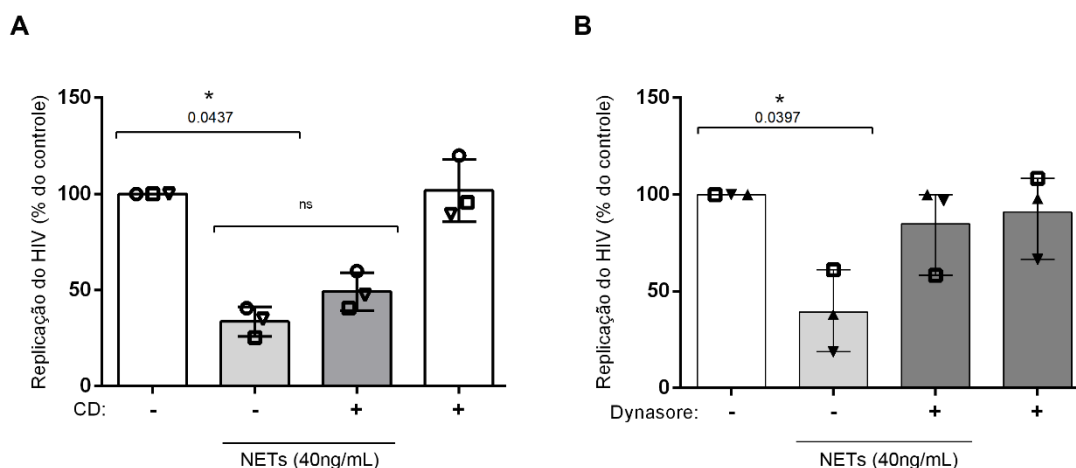


Figura 4.11. A inibição mediada pelas NETs é independente de fagocitose, mas requer internalização dependente de dinamina.

A) Macrófagos de cultivos infectados foram tratados com citocalasina D (5µg/mL) durante 30 min., e posteriormente foram incubados com NETs (n=3). B) As células foram tratadas com *Dynasore* durante 30 min, e posteriormente expostas às NETs (n=3). Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

O processo de internalização de substâncias extracelulares pode acontecer por outras vias diferentes da fagocitose, como por exemplo, a endocitose mediada por clatrina, sendo a proteína dinamina fundamental em este tipo processo (262). Estudos recentes indicam que as NETs podem ser internalizadas por vias dependentes de dinamina (263,264). Para analisar a contribuição dessa via de endocitose, células infectadas foram tratadas com *Dynasore*, inibidor da atividade da proteína dinamina (265), e posteriormente expostas às NETs. O efeito anti-HIV-1 das NETs foi bloqueado na presença de *Dynasore* (Figura 4.11B), sugerindo o envolvimento de dinamina no efeito antiviral.

Continuação. Figura 4.10. Macrófagos de cultivos infectados com HIV-1 internalizam NETs. A.1) ampliação digital da área delimitada pela linha pontilhada mostrando presença de DNA citoplasmático apontado pelas setas. E-H) Macrófagos infectados foram incubados com NETs durante 1,5 h, lavados, fixados e posteriormente analisados por microscopia confocal. Aumento original 1000x. E1-H1) Ampliações digitais da área delimitada pela linha pontilhada mostrando a internalização de NETs apontada pela seta. Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

4.5 Análise da participação de componentes das NETs na inibição do HIV-1.

Diversos estudos têm demonstrado as propriedades microbidas dos diferentes componentes das NETs (172,188,190,244,250) e, atendendo aos nossos resultados que sugerem que NETs mantêm suas características morfológicas durante a interação com os macrófagos (Figura 4.8), questionamos quais seriam os elementos constituintes dessas redes envolvidos na inibição do HIV-1. Buscando compreender melhor esse aspecto, examinamos então a contribuição de dois componentes majoritários das NETs.

Primeiramente, tendo em vista que o DNA é um dos constituintes essenciais das NETs que interagem diretamente com as células a elas expostas, analisamos se a estrutura preservada deste componente é importante no efeito anti-HIV-1 das NETs. Assim, as NETs foram tratadas com DNase e, então, adicionadas aos macrófagos infectados. Como pode ser apreciado na figura 4.12A (esquina superior direita) o tratamento das NETs com essa enzima degradou o DNA de forma significativa e, a sua posterior adição às células infectadas não produziu mudanças no crescimento do HIV-1 em relação ao controle, indicando uma supressão do efeito antiviral nessas condições (Figura 4.12A). Ante esse achado, passamos a avaliar então o efeito do DNA desprovido do componente proteico sobre a replicação do HIV-1. Curiosamente, o tratamento das células com 40ng/mL de DNA de salmão não modificou a produção de vírions nos macrófagos infectados (Figura 4.12B). Esses resultados sugerem que o DNA é um componente essencial, porém não suficiente, para exercer a inibição viral observada durante nosso estudo.

Em seguida, fazendo uso de uma abordagem física, fomos inspecionar a sensibilidade ao calor do potencial elemento inibitório. Assim, as NETs foram submetidas a 95°C durante 5 minutos e, posteriormente, adicionadas aos macrófagos infectados. De maneira semelhante com o tratamento enzimático, a exposição ao calor (Q) foi capaz de abolir o efeito antiviral das NETs (Figura 4.12C)

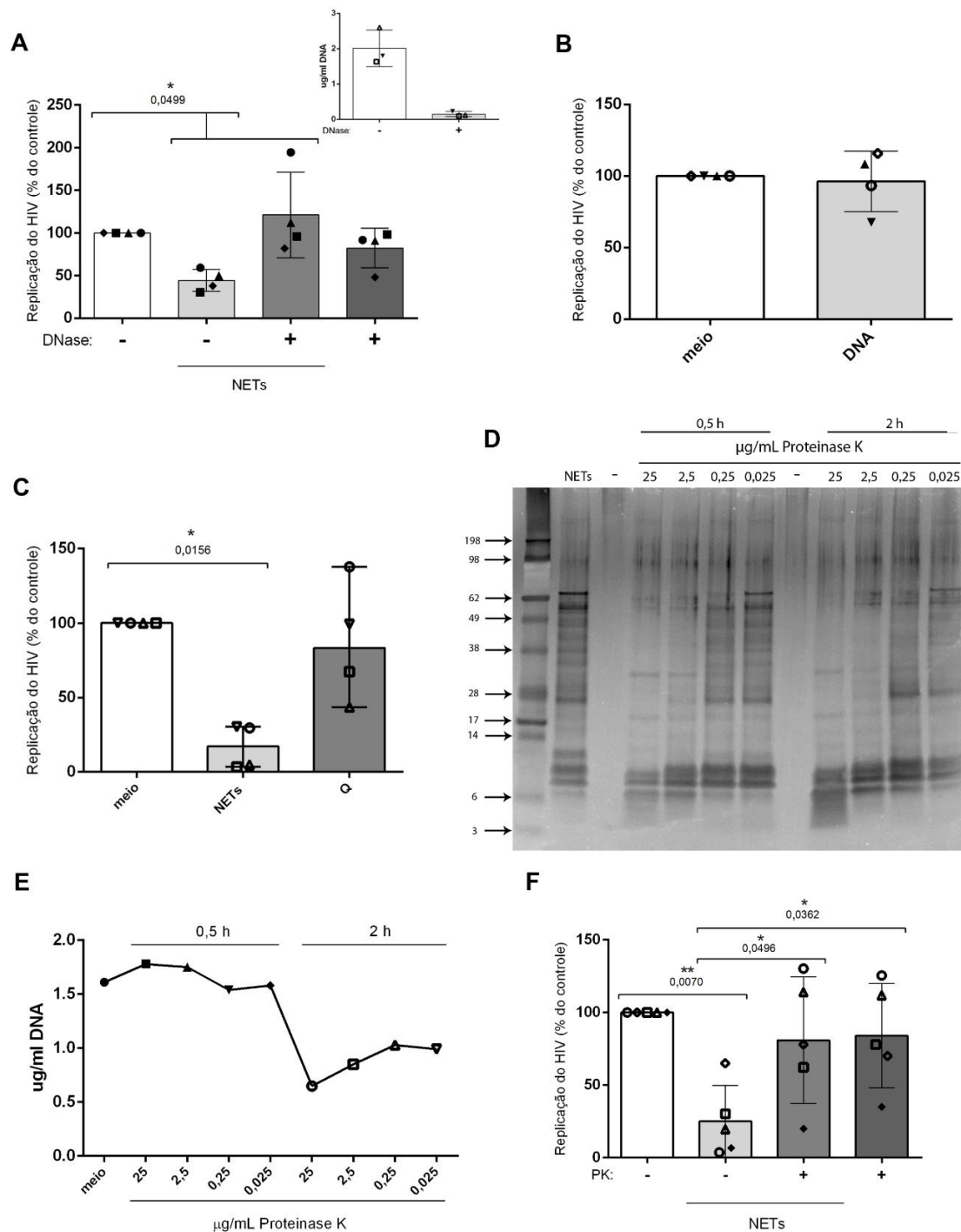


Figura 4.12. A integridade da associação do DNA:proteína é essencial para a inibição viral mediada pelas NETs.

A) NETs foram tratadas com DNase (10U/mL) durante 30 minutos e posteriormente incubadas com macrófagos infectados (n=4). A digestão enzimática foi quantificada por Picogreen (esquina superior direita). B) Macrófagos infectados foram incubados com 40ng/mL de DNA de salmão durante 3 horas e a replicação viral foi quantificada 14 dias depois por ELISA (n=4). C) NETs foram incubadas a 95°C (Q) durante 5 minutos e adicionadas aos macrófagos infectados (n=4). D) NETs foram tratadas com diferentes concentrações de proteinase K e posteriormente submetidas a eletroforese em acrilamida e marcação com prata - Imagem representativa de 3 experimentos independentes. E) Quantificação do DNA de NETs tratadas com proteinase K como em D. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. (Continua na página seguinte)

Os resultados anteriores sugeriram que a inibição viral mediada pelas NETs depende tanto do aspecto estrutural fornecido pelo DNA quanto de fatores termolábeis associados a ele. Tendo em conta que as proteínas sofrem perda de função irreversível quando são expostas a temperaturas elevadas, como consequência de um processo de desnaturação (266), consideramos a hipótese que essas macromoléculas, em associação ao DNA, poderiam ser responsáveis pela queda da replicação viral nos macrófagos infectados. Para avaliar essa possibilidade, primeiramente foi padronizada a digestão proteolítica das NETs em conjunto com a quantificação do DNA, a fim de garantir a manutenção da integridade do ácido nucleico durante o processo de proteólise. Observamos que o tratamento durante 30 minutos com 2,5 µg/mL de Proteinase K foi suficiente para digerir as proteínas (Figura 4.12D), sem alterar as concentrações de DNA (Figura 4.12E).

Uma vez estabelecidas essas variáveis, as NETs foram tratadas com proteinase K nas condições consideradas ótimas e, posteriormente, adicionadas aos macrófagos infectados. A digestão enzimática das proteínas associadas às NETs eliminou o efeito antiviral dessas estruturas (Figura 4.12F), constatando que tanto o suporte estrutural fornecido pelo DNA, quanto as proteínas associadas a este são críticos para o observado efeito inibitório das NETs sobre o HIV-1.

4.6 NE e MPO presentes nas NETs participam na inibição do HIV-1.

Depois das histonas, a elastase (NE) constitui a proteína mais abundante das NETs (190). Tendo em consideração nossos resultados que indicaram o papel fundamental do componente proteico no efeito anti HIV-1 das NETs (Figura 4.13), e tentando identificar com maior detalhe o elemento responsável pela inibição viral, fomos avaliar a participação dessa proteína específica. Para tal, as NETs foram tratadas com MeOSuc-AAPA-CMK, um inibidor irreversível da atividade catalítica da NE, e posteriormente adicionadas aos macrófagos

Continuação. Figura 4.12. A integridade da associação do DNA:proteína é essencial para a inibição viral mediada pelas NETs. F) NETs foram tratadas com 2,5 µg/mL de proteinase K durante 30 minutos e adicionadas a macrófagos infectados (n=5). Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn (A,C), teste de *t-student* (B) e *One Way ANOVA* com pós teste de Tukey (F).

infectados. Como pode ser observado na figura 4.13A, o tratamento com o inibidor de NE resultou na perda de efeito antiviral das NETs. A inibição da proteína MPO também resultou na perda do efeito inibitório das NETs.

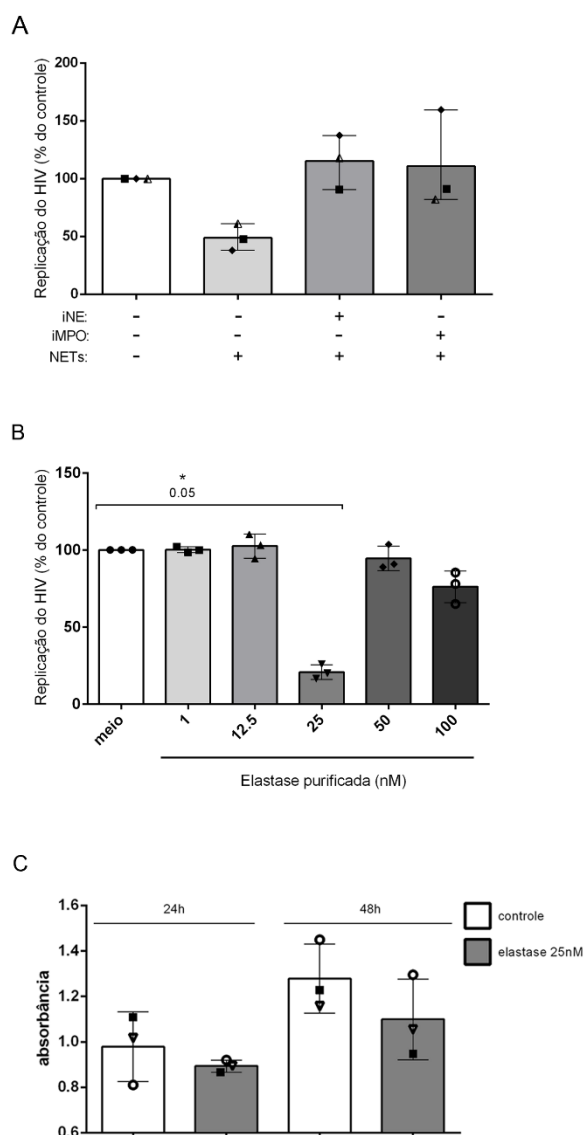


Figura 4.13. NE e MPO presentes nas NETs participam na inibição do HIV-1.

A) NETs foram tratadas com o inibidor da NE MeOSuc-AAPA-CMK (10 μ g/mL) durante 30 minutos e posteriormente incubadas com macrófagos infectados (n=3). B) Macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações de NE durante 3 horas (n=3). C) Análise da viabilidade celular em macrófagos tratados NE (25nM; n=3). Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Seguidamente, nos também incubamos os macrófagos infectados com diferentes concentrações de NE purificada imediatamente após a infecção, observando que o tratamento das células com essa molécula inibiu o vírus na

concentração de 25 nM (Figura 4.14B), sem alterar a viabilidade das células (Figura 4.14C).

4.7 Análise da participação de MyD88 ou do IFN I na inibição do HIV-1 induzida pelas NETs.

Considerando que algumas das moléculas que constituem as NETs são capazes de estimular receptores do tipo *Toll* (TLRs) e que estudos do nosso grupo, e de outros autores, demonstraram que a ativação de TLRs resulta em queda da replicação do HIV-1 (149–153), analisamos se a inibição da via da molécula adaptadora MyD88, comum à sinalização desencadeada após a ativação de vários TLRs, reverteria a atividade anti-HIV-1 das NETs. Assim, os macrófagos infectados foram previamente tratados com inibidores farmacológicos de MyD88 e, em seguida, incubados com NETs, como descrito anteriormente. Encontramos que a inibição da molécula MyD88 não conseguiu modificar os efeitos das NETs sobre replicação viral (Figura 4.14A), indicando que essa via de sinalização não teria participação na queda da replicação viral mediada pelas NETs.

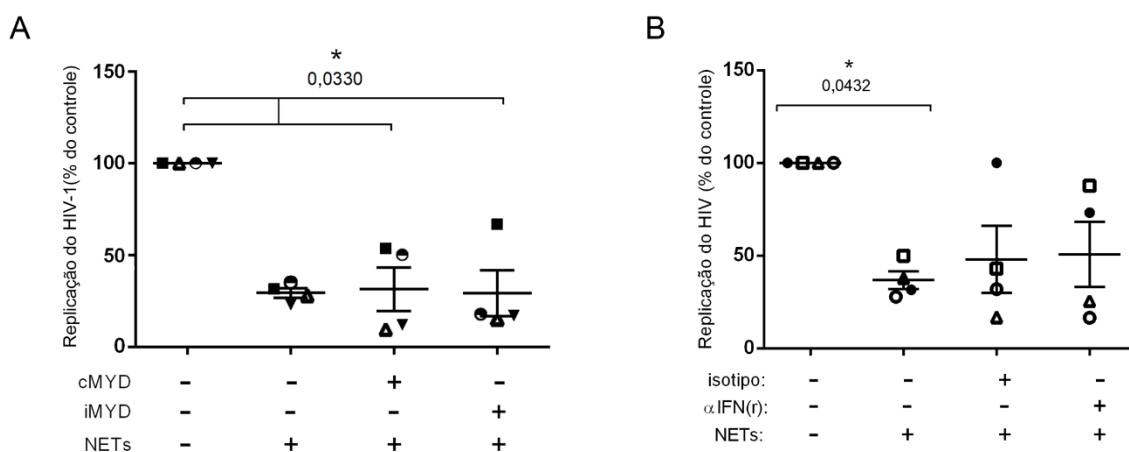


Figura 4.14. Análise da participação de MyD88 ou do IFN I na inibição do HIV-1 induzida pelas NETs.

(A) Macrófagos foram tratados com peptídeo inibidor de MyD88 (iMYD) ou o peptídeo controle (cMYD) ou anticorpos neutralizantes para os receptores do IFN alfa e beta (B) e posteriormente incubados com NETs como estabelecido. A replicação viral foi quantificada 14 dias após a infecção. (A, B n=4). Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Uma outra via envolvida na inibição da replicação do HIV-1 é a sinalização por interferon do tipo I (alfa e beta) (267–269), e como foi descrito acima, as NETs contêm moléculas que podem induzir a produção de IFN nas células

atingidas por estas estruturas. Para analisar a contribuição dessas citocinas nos efeitos anti-HIV-1 das NETs, nós tratamos os macrófagos infectados com anticorpos neutralizantes para os receptores de IFN alfa e beta e posteriormente as células foram expostas as NETs como descrito anteriormente. O bloqueio dos receptores dessas citocinas não alterou os efeitos anti-HIV-1 das NETs, sugerindo que essa via não se encontra envolvida na inibição da replicação viral (Figura 4.14B).

4.8 As NETs, assim como com elastase, reduz a transcrição de RNAs não processados em macrófagos infectados pelo HIV-1.

Recentemente foi descrito que defensas provenientes de neutrófilos são capazes de modular processos da síntese proteica em macrófagos humanos (235) e também que histonas extracelulares diminuem a transcrição do HIV-1 em células infectadas (270). Considerando que essas proteínas se encontram associadas com as NETs, perguntamo-nos se a inibição da transcrição de genes virais poderia explicar a queda da replicação viral observada no nosso modelo.

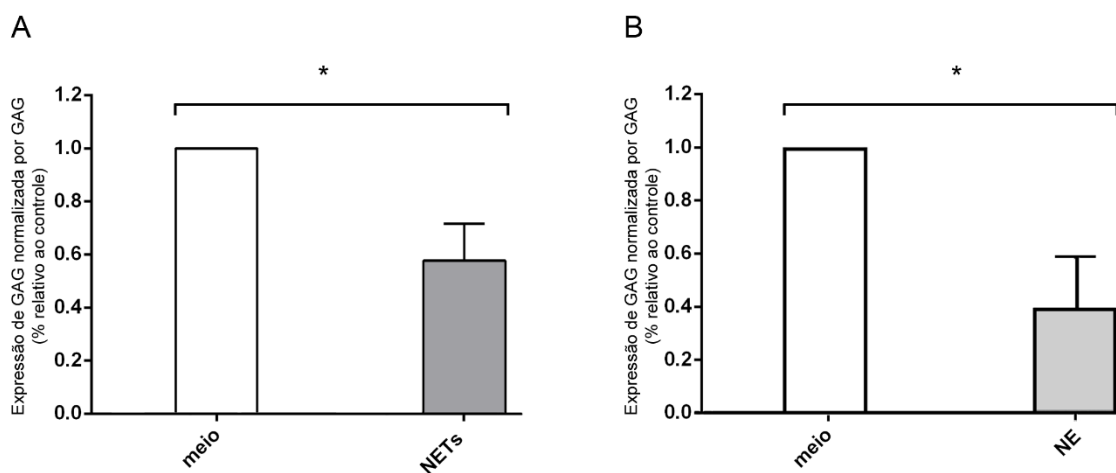


Figura 4.15. NETs e elastase regulam os transcritos não processados do HIV-1 em células infectadas.

Macrófagos infectados foram tratados com 40ng/mL de NETs (A) ou com 25 nM de elastase (B) durante 3 horas e os níveis de transcrição viral foram avaliados por PCR em tempo real. A, B) n= 4. Os dados foram analisados com o teste de Mann-Wihtney.

As células infectadas foram tratadas com NETs e os transcritos virais foram analisados 72h após a infecção. Observamos uma diminuição significativa dos RNAs virais não processados nos macrófagos tratados com NETs (Figura 4.15A). Tendo em conta que nossos resultados com elastase mediando a

inibição viral (Figura 4.13), fomos avaliar também a transcrição viral em macrófagos tratados com essa molécula. Como pode ser observado na Figura 4.15B, as células infectadas expostas à elastase apresentaram uma redução dos transcritos virais não processados de maneira semelhante ao observado no tratamento dos macrófagos com NETs. Esses resultados sugerem que a inibição da produção viral induzida pelas NETs, e pela elastase presente nelas, poderia ser causada pela regulação negativa da transcrição de produtos virais não processados.

4.9 NETs diminuem a infectividade do HIV-1

Nossos resultados indicam que as NETs diminuem de forma significativa a produção de partículas virais em macrófagos infectados (Figura 4.2). Avaliamos então, se os vírions residuais liberados por macrófagos expostos às NETs conservam inalterada a sua capacidade infectiva. Para responder essa pergunta, os sobrenadantes de células tratadas com NETs foram coletados 12 dias após a infecção, e os vírions foram concentrados e quantificados por ELISA. Posteriormente, quantidades normalizadas de partículas virais foram adicionadas a células TZM-bl para avaliação da infectividade viral. Observamos que os vírions que emergiram dos macrófagos expostos às NETs apresentaram significativa perda da sua capacidade infectiva (Figura 4.16A, B).

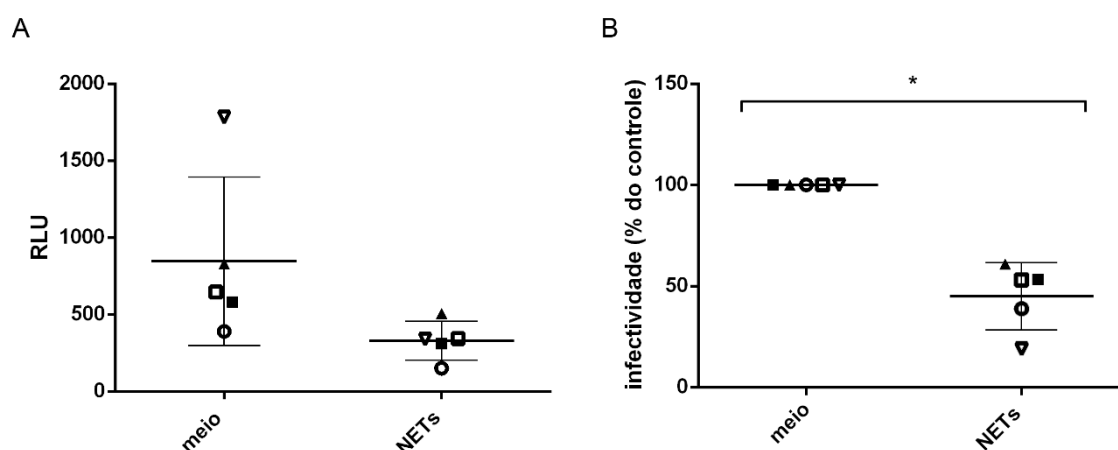


Figura 4.16. As NETs diminuem a infectividade de vírions liberados por macrófagos.

As células TZM-bl foram expostas a concentrações normalizadas de partículas virais obtidas a partir de macrófagos infectados por 12 dias tratados com NETs (40ng/mL) como descrito nos métodos. Após 48 horas, as células TZM-bl foram lisadas e a atividade da luciferase foi medida. (A) Unidades de luminescência relativa, as barras representam a mediana de cada tratamento;

(B) Representação dos dados normalizados de (A) (n = 5). Os dados foram analisados com o teste *t-student*.

As causas da alteração da infectividade das partículas virais não estão esclarecidas, mas poderiam se dever a mutações no genoma do provírus ou a alterações na estrutura dos vírions liberados por macrófagos tratados com NETs. Assim, nossos resultados sugerem que o tratamento com NETs, além de diminuir a produção viral, poderia também interferir na propagação do HIV-1 em cultura.

4.10 Neutrófilos de pacientes com o HIV-1 liberam NETs, e moléculas associadas a redes extracelulares (ETs) são achadas em plasmas desses indivíduos.

Considerando-se que neutrófilos de indivíduos saudáveis liberam NETs, e que estas inibem a replicação do HIV-1, consideramos como fundamental verificar se neutrófilos de pacientes infectados pelo HIV-1 são também capazes de liberar NETs. Assim, neutrófilos destes pacientes foram isolados por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque e estimulados *in vitro* com IL-8 durante 3 horas. Na figura 4.17A, além dos núcleos celulares, podem ser observadas fibras de DNA extracelular positivas para DAPI e para NE (Figura 4.17B). A colocalização desses dois marcadores (Figura 4.17C) indica a liberação de NETs por neutrófilos desses pacientes.

A alteração da permeabilidade do epitélio intestinal em pacientes com HIV-1, com a conseqüente translocação para a circulação de produtos bacterianos, leva a uma ativação crônica do sistema imunitário (122). Presumindo que a presença sistêmica de agentes de origem bacteriana poderia induzir a ativação dos neutrófilos desses pacientes, perguntamo-nos se diferentes coortes poderiam apresentar marcadores sistêmicos da presença de NETs. Assim, avaliamos a presença DNA e da NE, esta última de forma indireta através da atividade enzimática dela. Independente da classificação das coortes, seja por quantidade de células T CD4⁺ (Figura 4.19A) ou por carga viral (Figura 4.19B), todos os grupos de pacientes avaliados neste trabalho apresentam DNA extracelular em níveis semelhantes aos indivíduos do grupo controle. Cabe mencionar que aproximadamente 50% dos indivíduos com carga viral elevada apresentaram níveis indetectáveis de DNA extracelular nas amostras de plasma

avaliadas. Enquanto a NE presente no plasma, todos os grupos avaliados apresentaram também essa serino protease em níveis semelhantes aos indivíduos do grupo controle (Figura 4.19C, D).

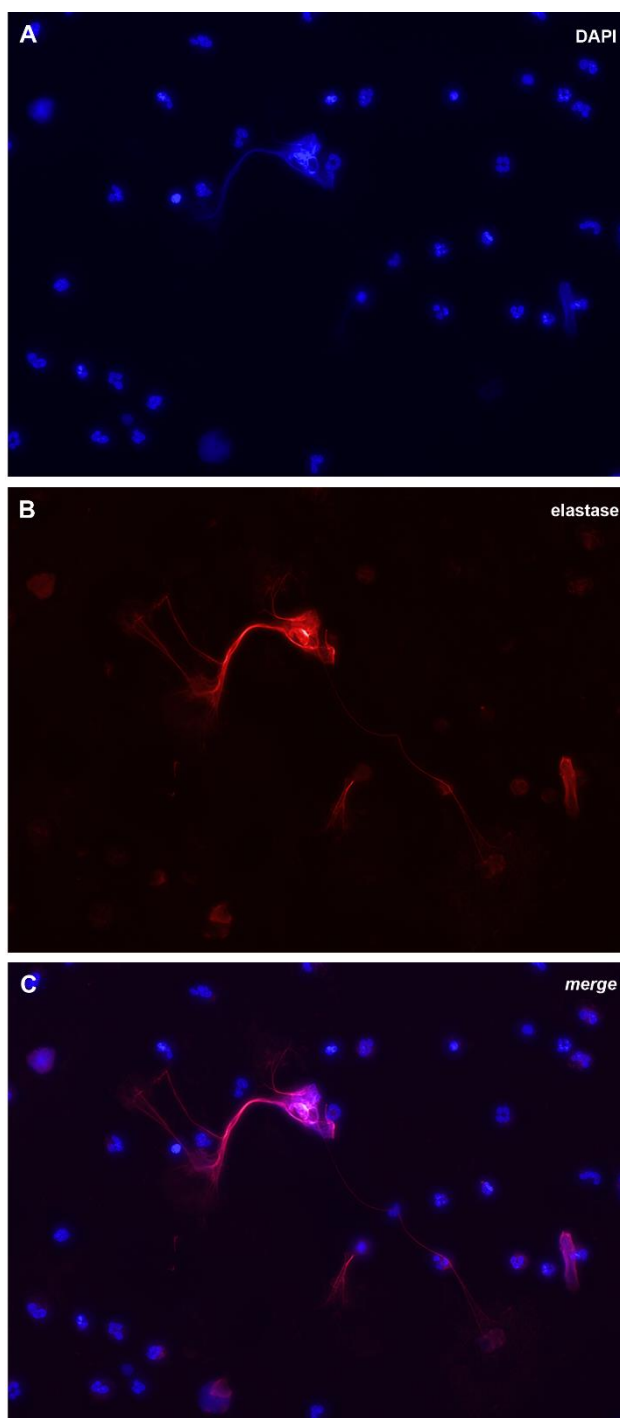


Figura 4.17. Neutrófilos de pacientes com HIV-1 liberam NETs quando estimulados com IL-8.

Neutrófilos de pacientes positivos para HIV-1 foram incubados *in vitro* com IL-8 (50ng/mL) durante 3 horas, fixados e marcados com DAPI e anticorpos anti-NE. As imagens são representativas de análises com neutrófilos de quatro pacientes distintos.

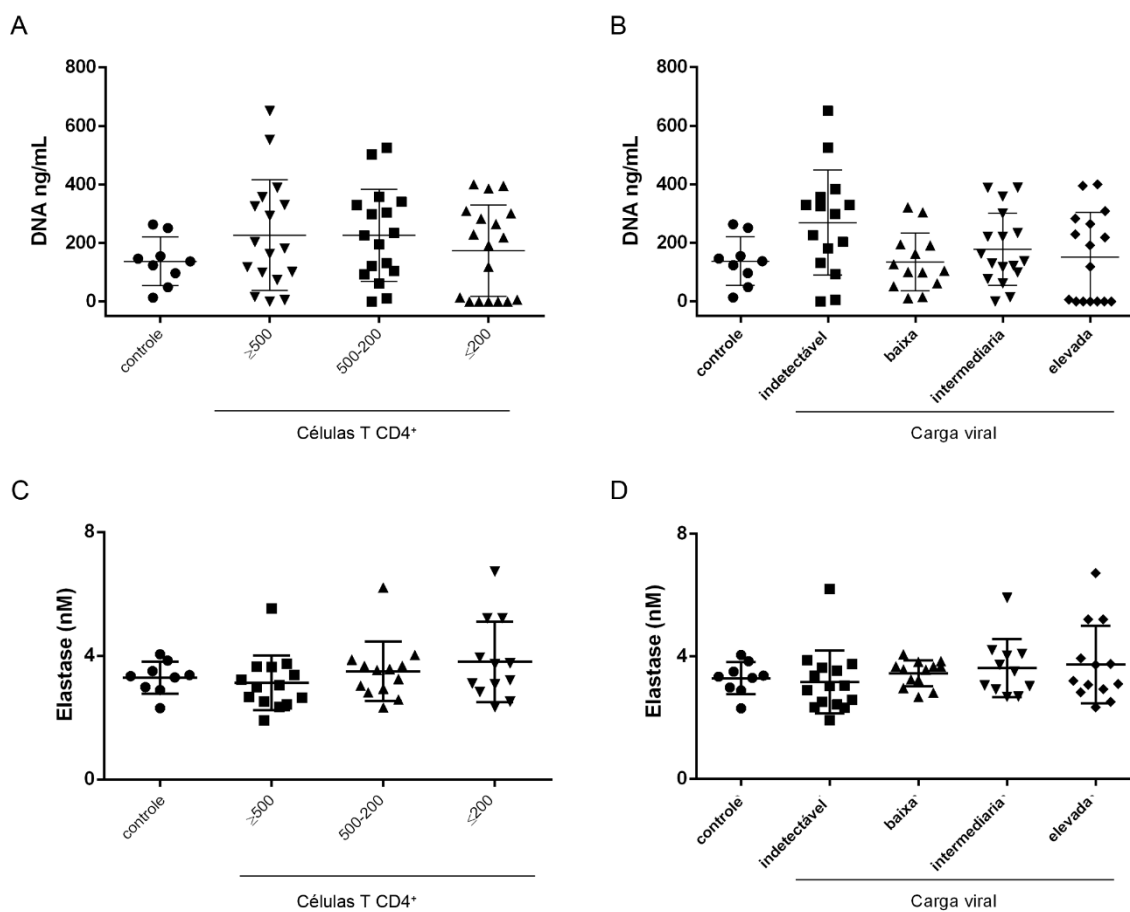


Figura 4.18. Análise de plasmas de diferentes coortes de pacientes positivos para HIV-1. Plasmas de pacientes de diferentes coortes foram analisados para DNA extracelular (A, B), atividade de NE (C, D).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, exploramos os efeitos das NETs sobre a replicação viral em macrófagos infectados pelo HIV-1. Tanto as NETs derivadas de doadores individuais, quanto um *pool* dessas mesmas NETs, inibiram o crescimento do vírus, efeito que foi reproduzido pela NE, um dos principais componentes quantitativos destas estruturas. Tanto a estrutura fornecida pelo DNA quanto o componente proteico foram críticos neste fenômeno. Os mecanismos que explicam os nossos achados são a inibição da transcrição do provírus (efeito também induzido pela NE), a síntese de β -quimiocinas e a perda da infectividade viral.

Saitoh e colaboradores (2012) descreveram que o HIV-1 induz a liberação de NETs por neutrófilos de indivíduos saudáveis, e que estas estruturas inviabilizam o vírion, tornando-o não infectivo (172). Tendo em vista as diferentes abordagens entre os estudos de Saitoh e o nosso trabalho, consideramos então, que este estudo é o primeiro a descrever os efeitos das NETs sobre a infecção pelo HIV-1 em uma das suas células-alvo, o macrófago.

Os neutrófilos participam da imunidade inata basicamente através de três estratégias microbidas: fagocitose, degranulação e, mais recentemente descrita, a liberação de NETs [revisado em (180)]. Com relação às NETs, uma vez no espaço extracelular, estas estruturas atuam como uma barreira física que evita a disseminação de microrganismos, aumentam a concentração de produtos microbidas nos sítios da infecção, desta forma contribuindo para a eliminação de diversos microrganismos [revisado em (184)].

Tanto os macrófagos como os neutrófilos apresentam receptores comuns para várias quimiocinas como CXCR1, CXCR2, CCR2, entre outros, resultando no recrutamento concomitante dessas duas células no local tecidual [revisado em (234)]. Ao mesmo tempo, diversos trabalhos têm sugerido que os macrófagos adquirem atividade microbida contra patógenos intracelulares através da captação de grânulos (249,271) ou de moléculas presentes nestes compartimentos (256–259). De forma importante, Farrera e colaboradores mostraram a internalização das NETs por macrófagos humanos. Ainda são relativamente escassos os trabalhos explorando o papel das NETs sobre

patógenos intracelulares. Recentemente, Stephan e colaboradores (2016) reportaram a participação de complexos de DNA associado à proteína LL37 na eliminação de bactérias intracelulares em macrófagos humanos infectados com *Mycobacterium bovis* (250). Anteriormente, outros autores descreveram a participação de grânulos, ou de produtos derivados da degranulação de neutrófilos, na inibição do crescimento bacteriano em macrófagos infectados com diferentes cepas de *Mycobacterium* (249,271). Assim, uma das nossas interrogações iniciais se referia à possibilidade de que produtos liberados pelos neutrófilos, presentes nos sobrenadantes ricos em NETs, porém não associadas à estas estruturas, contribuiriam para o efeito anti-HIV-1 observado. Para responder a esta questão, macrófagos infectados foram expostos a NETs previamente purificadas em filtros de 100 KDa, e verificamos que a capacidade de inibir a replicação viral estava preservada nas NETs livres de outros produtos liberados pelos neutrófilos no sobrenadante durante o processo da netose (Figura 4.4D). Entendemos, assim, que o efeito modulador da infecção viral resulta apenas da interação das NETs com os macrófagos infectados.

De acordo com Saitoh e colaboradores (2012), as NETs podem reter as partículas virais do HIV-1 e inativá-las através de defensinas e mieloperoxidase presentes nessas redes (172). Para evitar uma potencial interferência dessa natureza em nosso processo de quantificação dos vírions liberados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados, durante os nossos ensaios as células foram lavadas com PBS após 3 horas de incubação com NETs. As análises de fluorescência indicaram que essas estruturas foram retiradas dos cultivos seguindo esse procedimento (Figura 4.9), permitindo-nos sugerir que o efeito inibitório das NETs não é devido a uma possível inativação dos vírions liberados nos sobrenadantes por resíduos remanescentes de NETs. Indiretamente, o cuidado de remoção da NETs após não mais que três horas de incubação com os macrófagos nos permitiu também concluir que os mecanismos que levam à queda da replicação viral são desencadeados após este curto período de exposição das células infectadas a estas estruturas. As NETs são descritas como estruturas delicadas e frágeis, demandando manipulação cuidadosa durante os procedimentos de isolamento, visualização e ensaios funcionais (272,273). Levando em consideração essas características,

avaliamos a interação de NETs com macrófagos de cultivos infectados. Com base em dois marcadores (NE e DNA), nossas análises de microscopia de fluorescência indicaram que as NETs mantêm preservada a sua estrutura reticular e composição durante a interação com os macrófagos (Figura 4.8).

Em 2013, Farrera e colaboradores descreveram que as NETs são resistentes à digestão enzimática por DNase I em concentrações fisiológicas além de serem degradadas apenas parcialmente quando incubadas com soro humano. Ainda no mesmo estudo, eles reportaram que os macrófagos internalizam as NETs e sugeriram um processo de remoção destas estruturas por essas células (238). A resistência das NETs à digestão enzimática por DNases foi atribuída a modificações oxidativas na molécula de DNA durante a explosão respiratória (274) ou à associação do DNA com proteínas como LL37 (275). Durante as nossas incubações de NETs com macrófagos, observamos a internalização dessas estruturas em culturas infectadas pelo HIV-1 (Figura 4.10), sugerindo que em presença da infecção pelo HIV-1 *in vitro* os macrófagos internalizam NETs. Em nossas imagens de microscopia de confocal, os macrófagos apresentam no citoplasma marcação positiva para NETs em forma isolada e escassa (Figuras 4.10 A e H). Farrera e colaboradores, sugerindo que essas estruturas podem ser degradadas no interior dos lisossomos, utilizaram inibidores da acidificação desses compartimentos intracelulares, resultando na detecção de um maior número de estruturas positivas para marcadores de NETs no citosol do macrófago (238). O mesmo autor sugere que a remoção das NETs por macrófagos é um processo “silencioso”, no qual não é observada a modulação de agentes pró ou anti-inflamatórios nessas células. No entanto, outros estudos em macrófagos contradizem essa observação, pois viram que macrófagos expostos a NETs produzem inúmeros fatores inflamatórios (240,264,274,276). Farrera acredita que os macrófagos permanecem “silenciosos” devido à ausência da proteína HGMB1 nas NETs obtidas após a ativação dos neutrófilos por PMA em seus ensaios (238). Em nossos estudos, vimos que os macrófagos são estimulados a produzir β -quimiocinas (Figura 4.7) quando expostos às NETs, achado que está de acordo com os dos autores que observaram que os macrófagos ficam ativados quando interagem com estas estruturas.

Nossos resultados sugerem que o efeito anti-HIV-1 mediado pelas NETs é dependente de endocitose mediada por clatrina. Outros autores descreveram resultados semelhantes em macrófagos humanos, indicando que a internalização das NETs seria através da via endocítica mediada por clatrina e independente de filamentos de actina (250,264,277). Por sua parte, Chamilos e colaboradores descreveram que complexos de DNA associado com LL37 são mais eficientemente internalizados por monócitos quando comparados com DNA puro, sugerindo a importância da associação das proteínas ao DNA durante o processo de internalização (278). Estudos conduzidos em células fagocíticas de aves também mostram a importância da LL37 durante a internalização de DNA extracelular (279).

Os nossos resultados de inibição viral mediada por NETs também foram reproduzidos em macrófagos derivados da linhagem celular monocítica THP-1 (Figura 4.5A). Este achado se reveste de uma importância peculiar, pois nos permitirá utilizar estas células em futuros ensaios mecanísticos que requeiram modificações genéticas, que são costumeiramente de mais simples realização em linhagens celulares do que em células primárias. Por outro lado, em resultados preliminares, não observamos inibição viral em PBMCs infectados e tratados com NETs (Figura 4.5B). A interação dessas células com NETs foi descrita por Tillack e colaboradores (2012), indicando que as NETs, além de induzir proliferação nesse tipo celular, levam a produção de IFN- γ sem níveis detectáveis de IL-10 ou IL-4 (237). A falta de efeitos antivirais mediada pelas NETs nestas células não foi esclarecida no nosso estudo.

Observamos que o tratamento dos macrófagos com NETs 24 h antes da infecção pelo HIV-1 induz uma inibição do crescimento viral superior a 95%, sugerindo que essas estruturas poderiam estabelecer um fenótipo de proteção, ou resistência, na célula-alvo frente ao vírus (Figura 4.4G). De crítica importância para a nossa investigação, observamos também que macrófagos (não infectados) tratados com NETs produzem as β -quimiocinas RANTES e MIP-1 β em 12 e 96 h respectivamente. Este achado não só mostra que as NETs (em nosso caso, induzidas por IL-8) ativam os macrófagos, como também revela um dos mecanismos que provavelmente contribuem para a queda da produção de HIV-1 nos macrófagos expostos à estas estruturas. De acordo com os nossos

resultados, outros autores descreveram que macrófagos derivados a linhagem THP-1 tratados com NETs produzem as quimiocinas MIP-1 α/β , RANTES e IL-8 (240). Enquanto que Guo e colaboradores viram que α -defensinas (moléculas também presentes nas NETs) inibem a infecção pelo HIV-1 em macrófagos através da indução de β -quimiocinas nestas células (171) ao mesmo tempo em que essas moléculas induzem quimiotaxia e degranulação de neutrófilos (280). Considerando esses achados, poderíamos hipotetizar que um dos mecanismos possíveis da inibição viral mediada pelas NETs no nosso modelo poderia ser a indução de β -quimiocinas por moléculas presentes nesta estrutura, as quais impediriam a infecção das células previamente tratadas com NETs, ou novos rounds de infecção em cultivos infectados e tratados com NETs. Por outro lado, tem sido sugerido também que as NETs podem degradar quimiocinas através das serino-proteases presentes nelas (281) e que neutrófilos de pacientes com HIV-1 apresentam defeitos na quimiotaxia induzida por IL-8 e fMLP, defeito este corrigido pelo tratamento com GM-CSF (282). Assim, a liberação de quimiocinas poderia então induzir a chegada de neutrófilos por quimiotaxia e posterior liberação de grânulos com efeitos sobre os macrófagos, processo que, no entanto, poderia se ver dificultado em pacientes com HIV-1.

No presente estudo, os nossos resultados de co-incubação de macrófagos com NETs previamente tratadas com DNase sugerem que o DNA presente nas NETs é uma molécula necessária para exercer os efeitos antivirais observados no nosso modelo (Figura 4.12A). No entanto, essa molécula seria importante, mas não suficiente para induzir o efeito inibitório da replicação do HIV-1. Assim, a incubação dos macrófagos infectados com apenas DNA de salmão, ou com NETs tratadas com proteases, não foi capaz de desencadear respostas contra o HIV-1 nos macrófagos infectados (Figuras 4.12B e F, respectivamente). Esses achados sugerem, a princípio, que tanto o suporte estrutural fornecido pelo DNA, quanto as proteínas associadas a este são fundamentais no efeito anti-HIV-1 das NETs. Essas observações coincidem com os achados de Stephan e colaboradores, que indicam que o DNA exerce efeitos antimicrobianos apenas quando complexado com LL37 (250). Deve-se ressaltar, como já mencionado, que Chamilos e colaboradores descreveram que o DNA associado com LL37 é internalizado de forma mais eficiente em monócitos

humanos (278). Observou-se, ainda, em estudos usando macrófagos de galinha, que estas células internalizam o DNA extracelular de forma mais eficiente quando ele está associado com LL37 (279). De forma importante, o mesmo estudo indicou a importância da presença desta proteína para o ingresso do DNA na célula, porém a ativação posterior da célula pela molécula de DNA acontece apenas se a LL37 é degradada no interior celular, permitindo assim a interação do DNA com TLR21 [homólogo ao TLR9 de mamíferos (283)], levando à produção de IFN- γ e citocinas pro/anti-inflamatórias e óxido nítrico (279). Baseados nessas observações, podemos ponderar que o DNA, ou as NETs, desprovidos de proteínas poderiam não ter acesso ao interior dos macrófagos, o qual se traduziria em uma ausência de efeitos antivirais nos macrófagos infectados pelo HIV-1. Assim, em nosso modelo, não podem ser descartadas possíveis respostas microbicidas induzidas pela molécula de DNA. Por último, fazendo menção aos TLRs, nossos resultados usando o inibidor farmacológico de MYD88 sugerem que essa via de sinalização não estaria envolvida na inibição viral observada (Figura 4.14A). No entanto, não podem ser descartadas outras vias de sinalização ativadas por sensores citoplasmáticos de DNA.

Depois das histonas, a NE constitui a proteína mais abundante presente nas NETs (190), cuja atividade proteolítica deve-se majoritariamente (70%) à presença da elastase em sua estrutura. Outras enzimas como catepsina G e Proteinase 3 contribuem de forma menos acentuada nessa atividade (25 e 5%, respectivamente). Considerando essas observações, junto com os nossos resultados de inibição do HIV-1 que sugerem o envolvimento de fatores proteicos presentes nas NETs, avaliamos o papel da NE no nosso modelo. Observamos que a inibição da atividade catalítica dessa enzima nas próprias NETs eliminou o efeito antiviral dessas estruturas (Figura 4.13A), ao mesmo tempo em que o tratamento das células infectadas com esta proteína purificada resultou na inibição da replicação do HIV-1, reproduzindo, portanto, o efeito anti-HIV-1 das NETs. As serino-proteases, característica química da NE, são importantes efetores da imunidade mediada por neutrófilos, e essas proteínas podem atuar através da degradação de fatores de virulência de patógenos ou via ativação proteolítica ou desativação de citocinas, quimiocinas e receptores [revisado em (181)]. Assim, viu-se em pacientes com fibrose cística que a NE cliva a molécula

CD4 de linfócitos (227). Ribeiro-Gomes e colaboradores descreveram que a NE, através de sinalização via TLR4, participa na eliminação do patógeno intracelular *Leishmania major* em macrófagos murinos (225). No entanto, se a NE sinaliza diretamente através de TLR4 ou cliva um receptor ainda não identificado que, por sua vez, ativa o TLR4 permanece por esclarecer (226,284,285).

Observamos também que tanto as NETs como a NE diminuíram significativamente os níveis de transcritos *unspliced* do HIV-1 (Figura 4.15), o que certamente contribui de forma decisiva para a acentuada queda da produção de vírions pelos macrófagos infectados expostos àquelas estruturas. Curiosamente, outros autores descreveram um papel favorecedor da elastase neutrofílica durante a infecção pelo HIV-1 (286). As serino-proteases, apresentam baixa especificidade, podendo causar danos aos tecidos circundantes. Nossas avaliações indicam que a concentração de NE capaz de exercer efeitos anti-HIV-1 não induziu alterações na viabilidade celular (Figura 4.13C). Para regular a atividade das serino-proteases, o hospedeiro utiliza as proteínas, como antitripsina α -1 e o inibidor de protease leucocitária secretada (SLPI), que inibem diretamente a atividade da NE [revisado em (226)]. É importante mencionar que as serpinas possuem efeitos anti-HIV-1, via a inibição da transcrição do LTR do provírus (287) e que macrófagos são capazes de produzir essas proteínas reguladoras da NE. Podemos conjecturar, então, que possivelmente o efeito inibitório da elastase seja de tipo indireto, ou seja, na presença de elastase extracelular o macrófago poderia responder produzindo serpinas, que seriam responsáveis pela queda da replicação observada. Esta é uma hipótese que não foi avaliada no presente trabalho, mas certamente pretendemos explorá-la como uma perspectiva interessante na continuação deste estudo. Outras moléculas também presentes nas NETs foram descritas como inibitórias da transcrição do HIV-1. Assim, histonas extracelulares presentes no sangue de crocodilos da espécie *Crocodylus porosus*, assim como histonas recombinantes humanas, são também capazes de inibir a transcrição do LTR em células infectadas pelo HIV-1 (270).

A diminuição de transcritos *unspliced* poderia explicar não só a redução da produção total de partículas virais, como também a queda da infectividade dos vírions oriundos de macrófagos tratados com NETs, como detectamos

(Figura 4.16). Os produtos dos transcritos virais *unspliced* geram o genoma viral que será empacotado no vírion em brotamento, além de participarem no processo de maturação do mesmo, pela atividade da protease viral. Uma diminuição deste tipo de transcritos virais poderia, portanto, gerar vírions imaturos e/ou sem genoma viral, com a consequente diminuição da infectividade das partículas virais liberadas pela célula.

O nosso protocolo de obtenção de neutrófilos indicou uma pureza superior a 95%, como avaliado por coloração com Giemsa e citometria de fluxo com marcação para CD16 (Figura 4.1). O padrão ouro na identificação de neutrófilos é a microscopia ótica, podendo ser usados também marcadores como CD15 e CD16. A molécula CD15 não é suficiente para discriminar neutrófilos, dado que ela é expressa em níveis semelhantes também em eosinófilos. Por outro lado, a molécula CD16 encontra-se presente em células NK, monócitos e neutrófilos, e ausente em eosinófilos, tornando esse marcador mais confiável na identificação de neutrófilos após o gradiente de Ficoll-Hypaque [revisado em (288)]. No que se refere à liberação de NETs por neutrófilos de indivíduos saudáveis, a coexistência de marcadores de NETs considerados clássicos indica a presença dessas estruturas em nossas avaliações por imunofluorescência de neutrófilos incubados com IL-8 (Figura 4.2). As variações quantitativas individuais (Figura 4.3) concordam com os achados de outros autores. Especificamente, Barrientos e colaboradores concluíram que o parâmetro com menor variação nas NETs é a dupla fita de DNA, sendo esse marcador o mais estável como indicador de quantificação (221).

Durante o curso da infecção pelo HIV-1, virtualmente todos os tipos celulares do sistema imune sofrem alterações diversas. De forma semelhante, os neutrófilos também podem apresentar alterações funcionais, como a diminuição da quimiotaxia, fagocitose e capacidade oxidativa, além de regulação negativa de receptores de IL-8 na membrana plasmática (282). Consideramos, então, de fundamental importância explorar a liberação de NETs por pacientes infectados com o HIV-1. As nossas análises de microscopia de imunofluorescência indicam que também os neutrófilos destes indivíduos liberam NETs quando são estimulados com IL-8 (Figura 4.17), o que nos faz presumir que NETs liberadas em pacientes infectados podem realmente contribuir para

reduzir a produção de HIV-1 por macrófagos. Para confirmar esta hipótese, nós iniciamos há poucas semanas estudos da capacidade de neutrófilos de pacientes, apresentado distintos níveis de carga viral, de liberar NETs, assim como se estas NETs são dotadas de atividade anti-HIV-1 (dissertação de Mestrado de Barbara Simonson, do nosso grupo).

Observamos também que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam DNA extracelular no plasma, em níveis semelhantes aos dos indivíduos saudáveis (Figura 4.18). No entanto, aproximadamente 50% dos plasmas dos indivíduos com carga viral acima de 100000 cópias/mL continham níveis indetectáveis desse marcador. As origens do DNA extracelular nos plasmas que nós analisamos devem ser definidas com cautela. As fontes e causas de ácidos nucleicos em circulação são extremamente variadas, incluindo diferentes tipos de morte celular (necrose, apoptose, piroptose, entre outros), falhas na divisão mitótica, envelhecimento, presença de patógenos diversos e, inclusive, DNA de origem mitocondrial, entre outros [revisado em (289)]. Recentemente, Arshad e colaboradores (2018) descreveram aumentos nos níveis de DNA mitocondrial e nuclear em plasma de pacientes com HIV-1 (290). A quantificação do DNA livre no plasma, isto é, não complexados com outros marcadores de NETs constitui uma limitação no nosso estudo, que poderá ser eliminada durante o projeto de mestrado da aluna Barbara Simonson - mencionado anteriormente – através da detecção de complexos de DNA:elastase com o uso de ELISA. A causa da presença simultânea de elevada carga viral e níveis indetectáveis de DNA no plasma de um grupo de pacientes não está clara. Podemos hipotetizar várias possíveis situações para tentar explicar esse achado, como, por exemplo, um aumento de DNases no plasma, como descrito em pacientes com leishmaniose visceral (291), uma maior susceptibilidade do DNA extracelular à degradação nesses pacientes, ou, considerando a netose como fonte dessa molécula, alterações funcionais (diminuição de produção de ROS) ou fenotípicas (déficit de expressão de receptores de IL-8) dos neutrófilos que podem levar à sua incapacidade de liberar NETs (282).

Em resumo, nós descrevemos neste estudo que as NETs apresentam potente atividade anti-HIV-1 em macrófagos primários humanos. Este efeito pode ser explicado pela capacidade das NETs de induzir a produção de β -

quimiocinas e de diminuir a geração mRNAs virais *unspliced* em estas células, e de reduzir a infectividade da progênie viral. O efeito anti-HIV-1 das NETs é reproduzido pela NE, um dos principais componentes proteicos destas estruturas. Nossos achados sobre a liberação de NETs por neutrófilos de pacientes infectados pelo HIV-1, ao lado dos marcadores de NETs presentes nos plasmas desses mesmos pacientes, sugerem que a atividade inibidora das NETs sobre a replicação do HIV-1 possa ocorrer *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Observamos em nosso trabalho que as NETs são potentes agentes inibidores da infecção pelo HIV-1 em macrófagos primários humanos. Esta conclusão se fundamenta nos resultados sumarizados abaixo:

- As NETs inibem a replicação do HIV-1;
- As NETs induzem a liberação de β -quimiocinas;
- mRNAs virais *unspliced* são reduzidos por NETs
- A NE reproduz os efeitos anti-HIV-1 das NETs
- O tratamento com NETs diminui a infectividade das partículas virais;
- Além disso, neutrófilos de pacientes infectados pelo HIV-1 liberam NETs. Enquanto que marcadores associados às NETs são encontrados em plasma de pacientes infectados com HIV-1

7 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste trabalho consideramos dar continuação ao estudo através das seguintes abordagens:

- Avaliar participação de sensores de DNA citosólicos na inibição do HIV-1 mediada pelas NETs,
- Estudar o envolvimento das serpinas no efeito anti-HIV-1 das NETs,
- Investigar a modulação de fatores de restrição em macrófagos expostos às NETs,
- Explorar a liberação e a capacidade microbicida de NETs derivadas de diferentes coortes de pacientes*,
- Avaliar a presença de complexos DNA:elastase como marcadores de NETs em plasmas de diferentes coortes de pacientes*.

*(Projeto de Mestrado de Barbara Simonson, também do nosso grupo)

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seitz R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*. 2016 May;43(3):203–22.
2. Johnson WE. Endogenous Retroviruses in the Genomics Era. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):135–59.
3. Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix J-L, Ohlmann T. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Feb;5(2):128–40.
4. Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet*. 1999;33:133–70.
5. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol*. 1989 Jul;70 (Pt 7)(7):1617–39.
6. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868–71.
7. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425–31.
8. Coffin J, Haase A, Levy J, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science (80-)*. 1986 May 9;232(4751):697–697.
9. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the of the epidemic. *Nature*. 1998;391(6667):594–7.
10. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*. 2008;455(7213):661–4.
11. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 2014;346(6205):56–61.
12. Hahn BH, Shaw GM, Cock KM De, Sharp PM. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science (80-)*. 2000;287(5453):607–14.
13. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*. 1986;324(6098):691–5.
14. Kappes JC, Morrow CD, Lee SW, Jameson BA, Kent SB, Hood LE, et al. Identification of a novel retroviral gene unique to human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVMAC. *J Virol*. 1988 Sep;62(9):3501–5.
15. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(October):15035.
16. Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. Past, present and future: 30

- years of HIV research. *Nat Rev Micro*. 2013;11(12):877–83.
17. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):436–41.
 18. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme A-M. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6588–92.
 19. Unaid. UNAIDS Data 2017. Program HIV/AIDS. 2017;1–248.
 20. UNAIDS. Fact sheet - Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. Unaid. 2017.
 21. Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell*. 2016;3(9):450–74.
 22. Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18566–70.
 23. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardländer B, Esparza J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Feb 1;29(2):184–90.
 24. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev*. 2014;16(1):23–34.
 25. Li WH, Tanimura M, Sharp PM. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol Biol Evol*. 1988 Jul;5(4):313–30.
 26. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012 Mar;18(3):182–92.
 27. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996 Mar 15;271(5255):1582–6.
 28. Turner BG, Summers MF. *Structural Biology of HIV*. 1999;
 29. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: The multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):471–83.
 30. Rabson AB, Martin MA. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell*. 1985 Mar;40(3):477–80.
 31. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RAM, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):143–55.
 32. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton C V, Lasky LA, Capon DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. 1985;313(6002):450–8.
 33. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67(1):1–25.
 34. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of

- HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a006916.
35. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 2004 Sep 1;9:2388–413.
 36. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science.* 1988 Sep 2;241(4870):1221–3.
 37. Laurence J. Update: HIV-1 gene nomenclature. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1988 Dec;4(6):vii–viii.
 38. Fan L, Pede K. Cell-free transmission of vif mutants of HIV-1. *Virology.* 1992;190(1):19–29.
 39. Steffens CM, Hope TJ. Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *AIDS.* 2001;15 Suppl 5:S21-6.
 40. Liu H, Wu X, Newman M, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. The Vif Protein of Human and Simian Immunodeficiency Viruses Is Packaged into Virions and Associates with Viral Core Structures. *J Virol.* 1995;69(12):7630–8.
 41. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV “A” (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature.* 1987;328(6132):728–30.
 42. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 2002;418(6898):646–650.
 43. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.* 2003;424(6944):99–103.
 44. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 19;91(15):7311–5.
 45. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol.* 1995;69(10):6304–13.
 46. Willey R, Maldarelli F, Martin M, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol.* 1992;66(12):7193–200.
 47. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol.* 1992;66(1):226–34.
 48. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 2008;451(7177):425–30.
 49. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host Microbe.* 2008;3(4):245–52.

50. Cheng-Mayer C, Iannello P, Shaw K, Luciw PA, Levy JA. Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science*. 1989 Dec 22;246(4937):1629–32.
51. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med*. 1994 Jan 1;179(1):101–13.
52. Wu Y. HIV-1 gene expression: Lessons from provirus and non-integrated DNA. Vol. 1, *Retrovirology*. 2004. p. 1–10.
53. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyö EM, Pavlakis GN. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):2519–29.
54. Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA, Tjian R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*. 1986 May 9;232(4751):755–9.
55. Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. 1989;8(3):765–78.
56. Zenzie-Gregory B, Sheridan P, Jones KA, Smale ST. HIV-1 core promoter lacks a simple initiator element but contains a bipartite activator at the transcription start site. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15823–32.
57. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*. 1987;326(6114):711–3.
58. Liu J, Perkins ND, Schmid RM, Nabel GJ. Specific NF-kappa B subunits act in concert with Tat to stimulate human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol*. 1992;66(6):3883–7.
59. Kinoshita S, Chen BK, Kaneshima H, Nolan GP. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell*. 1998;95(5):595–604.
60. Chen-Park FE, Huang D-B, Noro B, Thanos D, Ghosh G. The kappa B DNA sequence from the HIV long terminal repeat functions as an allosteric regulator of HIV transcription. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24701–8.
61. Laspia MF, Rice AP, Mathews MB. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*. 1989;59(2):283–92.
62. Rosen CA, Sodroski JG, Goh WC, Dayton AI, Lippke J, Haseltine WA. Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature*. 1986;319(6054):555–9.
63. Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, et al. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*. 1999;97(1):41–51.
64. Kim YK, Bourgeois CF, Isel C, Churcher MJ, Karn J. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated

- transcriptional elongation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(13):4622–37.
65. Leblanc J, Weil J, Beemon K. Posttranscriptional regulation of retroviral gene expression: Primary RNA transcripts play three roles as pre-mRNA, mRNA, and genomic RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;4(5):567–80.
 66. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell.* 1997;90(6):1051–60.
 67. Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi YH, Kleiman L, Jeang KT. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell.* 2004;119(3):381–92.
 68. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW, Walker B, Mcmichael A, Wilen CB, et al. HIV : Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8):1–14.
 69. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995 Dec 15;270(5243):1811–5.
 70. Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, et al. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med.* 1998 Apr 20;187(8):1215–24.
 71. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood.* 1999 Sep 15;94(6):1899–905.
 72. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. HIV-1 Coreceptor Activity of CCR5 and Its Inhibition by Chemokines: Independence from G Protein Signaling and Importance of Coreceptor Downmodulation. *Virology.* 1997 Aug;234(2):340–8.
 73. Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AE, Marsh M. Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5. *J Cell Biol.* 2000 Dec 11;151(6):1281–94.
 74. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley G a, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE . *Science.* 1996 Sep 27;273(5283):1856–62.
 75. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):722–5.
 76. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):367–77.
 77. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al.

- Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661–6.
78. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* (80-). 1996 Jun 28;272(5270):1955–8.
 79. Oberlin E, Amara A, Bachelierie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Vol. 382, *Nature*. 1996. p. 833–5.
 80. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Vol. 382, *Nature*. 1996. p. 829–33.
 81. Berger EA, Doms RW, Fenyö E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;391(6664):240–240.
 82. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*. 2002;159(3):441–52.
 83. Sharkey M, Triques K, Kuritzkes DR, Stevenson M. In Vivo Evidence for Instability of Episomal Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNA In Vivo Evidence for Instability of Episomal Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNA. *J Virol*. 2005;79(8):5203–10.
 84. Ciuffi A. Mechanisms Governing Lentivirus Integration Site Selection. *Curr Gene Ther*. 2008;8(6):419–29.
 85. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*. 2004 Jan;5(1):52–61.
 86. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Aug;13(8):484–96.
 87. Mowat AM, Scott CL, Bain CC. Barrier-tissue macrophages : functional adaptation to environmental challenges. 2017;(November):1258–70.
 88. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986–95.
 89. Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a Polarization of Human Monocyte-Derived Macrophages Inhibits HIV-1 Replication by Distinct Mechanisms. *J Immunol*. 2009;182(10):6237–46.
 90. Carter C a, Ehrlich LS. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:425–43.
 91. Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*. 2012 Jan;9:82.
 92. Swingler S, Mann AM, Zhou J, Swingler C, Stevenson M. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathog*. 2007;3(9):1281–90.

93. Brown A, Zhang H, Lopez P, Pardo CA, Gartner S. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):1127–35.
94. Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(6):1477–82.
95. Sharova N, Swingler C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* 2005;24(13):2481–9.
96. Zalar A, Figueroa MI, Ruibal-Ares B, Baré P, Cahn P, de Bracco MM de E, et al. Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Res.* 2010;87(2):269–71.
97. S.M. H, G. W, D.K. M, S.A. R, J.W. M, J.T. B, et al. Recovery of replication-competent HIV type 1-infected circulating monocytes from individuals receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002;18(6):427–34.
98. Honeycutt JB, Thayer WO, Baker CE, Ribeiro RM, Lada SM, Cao Y, et al. HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat Med.* 2017;23(5):638–43.
99. O'Brien W a, Namazi A, Kalhor H, Mao SH, Zack J a, Chen IS. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in blood mononuclear phagocytes are slowed by limitations of nucleotide precursors. *J Virol.* 1994 Feb;68(2):1258–63.
100. Henderson a J, Calame KL. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8714–9.
101. Honda Y, Rogers L, Nakata K, Zhao BY, Pine R, Nakai Y, et al. Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP)beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med.* 1998 Oct 5;188(7):1255–65.
102. Barreto-de-Souza V, Xavier Medeiros T, Machado Motta MC, Bou-Habib DC, Saraiva EM. HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes Infect.* 2008 May;10(6):642–9.
103. Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol.* 1988 Aug;62(8):2578–86.
104. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol.* 2007 Apr 23;177(2):329–41.
105. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology.* 2010 Apr 7;7(1):29.
106. Tan J, Sattentau QJ. The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche? *Trends Microbiol.* 2013 Aug;21(8):405–12.

107. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S, Schwartz O, Benaroch P. HIV-1 Buds and Accumulates in “Nonacidic” Endosomes of Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2007;2(2):85–95.
108. Welsch S, Groot F, Krausslich H-G, Keppler OT, Sattentau QJ. Architecture and Regulation of the HIV-1 Assembly and Holding Compartment in Macrophages. *J Virol*. 2011 Aug 1;85(15):7922–7.
109. Koppensteiner H, Banning C, Schneider C, Hohenberg H, Schindler M. Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies. *J Virol*. 2012 Mar 1;86(5):2826–36.
110. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Manuelli V, Jean-Pierre P, Lopez P, et al. Mechanisms of Gastrointestinal CD4+ T-Cell Depletion during Acute and Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 2007;81(2):599–612.
111. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006;3(12):2335–48.
112. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4650–5.
113. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):123–6.
114. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, Shelhamer JH, Baird BF, Travis W, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med*. 1989 Aug 1;111(3):223–31.
115. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention C. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports*. 1992 Dec 18;41(RR-17):1–19.
116. Naif HM. Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep*. 2013 Jun 6;5(Suppl 1):e6.
117. Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1983 Aug 25;309(8):453–8.
118. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med*. 1999;5(1):83–9.
119. Hazenberg MD, Stuart JWTC, Otto SA, Borleffs JCC, Boucher CAB, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: A longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART).

- Blood. 2000;95(1):249–55.
120. Valdez H, Lederman MM. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev.* :187–228.
 121. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter Survival in Advanced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is More Closely Associated with T Lymphocyte Activation than with Plasma Virus Burden or Virus Chemokine Coreceptor Usage. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):859–70.
 122. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1365–71.
 123. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682–7.
 124. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):350–4.
 125. Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, et al. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest.* 1999 May 15;103(10):1391–8.
 126. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2002 Oct;110(8):1133–9.
 127. HIV/AIDS. UJP on. The Gap Report [Internet]. 2016 [cited 2018 Jun 27]. Available from: <http://www.refworld.org/docid/53f1e1604.html>
 128. Programa Conjunto de las Naciones unidas sobre VIH/SIDA. Estrategia 90-90-90. Onusida. 2013;39.
 129. Chun T-W, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(24):13193–7.
 130. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir D V., Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science (80-).* 1997;278(5341):1291–5.
 131. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999 May;5(5):512–7.
 132. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8869–73.
 133. Chun TW, Davey RT, Engel D, Lane HC, Fauci AS. Re-emergence of HIV

- after stopping therapy. *Nature*. 1999 Oct 28;401(6756):874–5.
134. Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15109–14.
 135. Fletcher C V, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11;111(6):2307–12.
 136. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):727–8.
 137. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):14–26.
 138. Deeks SG, McCune JM. Can HIV be cured with stem cell therapy? *Nat Biotechnol*. 2010 Aug;28(8):807–10.
 139. Zou S, Glynn S, Kuritzkes D, Shah M, Cook N, Berliner N, et al. Hematopoietic cell transplantation and HIV cure: where we are and what next? *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3111–5.
 140. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009 Feb 12;360(7):692–8.
 141. Yukl SA, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun T-W, Douek D, et al. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003347.
 142. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*. 2011 Jan;6:223–48.
 143. Lee JK, Stewart-Jones G, Dong T, Harlos K, Di Gleria K, Dorrell L, et al. T Cell Cross-Reactivity and Conformational Changes during TCR Engagement. *J Exp Med*. 2004;200(11):1455–66.
 144. Brackenridge S, Evans EJ, Toebes M, Goonetilleke N, Liu MKP, di Gleria K, et al. An Early HIV Mutation within an HLA-B*57-Restricted T Cell Epitope Abrogates Binding to the Killer Inhibitory Receptor 3DL1. *J Virol*. 2011;85(11):5415–22.
 145. Javaherian K, Langloist AJ, Mcdanalt C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Med Sci*. 1989;86(September):6768–72.
 146. Park EJ, Vujcic LK, Anand R, Theodore TS, Quinnan G V. Mutations in both gp120 and gp41 are responsible for the broad neutralization resistance of variant human immunodeficiency virus type 1 MN to antibodies directed at V3 and non-V3 epitopes. *J Virol*. 1998;72(9):7099–107.
 147. Schønning K, Jansson B, Olofsson S, Nielsen JO, Hansen JS. Resistance

- to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology*. 1996 Apr 1;218(1):134–40.
148. Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocyctotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol*. 1994;68(9):6006–13.
 149. Victoria S, Temerozo JR, Gobbo L, Pimenta-Inada HK, Bou-Habib DC. Activation of Toll-like receptor 2 increases macrophage resistance to HIV-1 infection. *Immunobiology*. 2013 Dec;218(12):1529–36.
 150. Zhou Y, Wang X, Liu M, Hu Q, Song L, Ye L, et al. A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology*. 2010;131(1):40–9.
 151. Franchin G, Zybarth G, Dai WW, Dubrovsky L, Reiling N, Schmidtayerova H, et al. Lipopolysaccharide Inhibits HIV-1 Infection of Monocyte-Derived Macrophages Through Direct and Sustained Down-Regulation of CC Chemokine Receptor 5. *J Immunol*. 2000;164(5):2592–601.
 152. Verani A, Scarlatti G, Comar M, Tresoldi E, Polo S, Giacca M, et al. C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med*. 1997;185(5):805–16.
 153. Buitendijk M, Eszterhas SK, Howell AL. Gardiquimod: A Toll-Like Receptor-7 Agonist That Inhibits HIV Type 1 Infection of Human Macrophages and Activated T Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29(6):907–18.
 154. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637–50.
 155. McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):20–7.
 156. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):367.
 157. Gao D, Wu J, Wu Y-T, Du F, Aroh C, Yan N, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013 Aug 23;341(6148):903–6.
 158. Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: Who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(7):403–13.
 159. Altfeld M, Gale Jr M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2015;16(6):554–62.
 160. Espíndola MS, Soares LS, Galvão-Lima LJ, Zambuzi FA, Cacemiro MC, Brauer VS, et al. HIV infection: focus on the innate immune cells. *Immunol Res*. 2016;64(5–6):1118–32.
 161. Naumenko V, Turk M, Jenne CN, Kim SJ. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res*. 2018;371(3):505–16.
 162. Gabriel C, Her Z, Ng LFP. Neutrophils: neglected players in viral diseases.

- DNA Cell Biol. 2013 Dec;32(12):665–75.
163. Levine AM, Karim R, Mack W, Gravink DJ, Anastos K, Young M, et al. Neutropenia in human immunodeficiency virus infection: data from the women's interagency HIV study. *Arch Intern Med.* 2006 Feb 27;166(4):405–10.
 164. Keiser P, Higgs E, Smith J. Neutropenia is associated with bacteremia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Med Sci.* 1996;312(3):118–22.
 165. Kuritzkes DR. Neutropenia , Neutrophil Dysfunction , and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease : The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. 2000;(September):256–60.
 166. Kourtis AP, Hudgens MG, Kayira D. Neutrophil Count in African Mothers and Newborns and HIV Transmission Risk. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2260–2.
 167. Wu Z, Cocchi F, Gentles D, Ericksen B, Lubkowski J, DeVico A, et al. Human neutrophil α -defensin 4 inhibits HIV-1 infection in vitro. *FEBS Lett.* 2005;579(1):162–6.
 168. Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J Clin Invest.* 2005 Mar 1;115(3):765–73.
 169. Mackewicz CE, Yuan J, Tran P, Diaz L, Mack E, Selsted ME, et al. α -Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *Aids.* 2003;17(14).
 170. Wang W, Owen SM, Rudolph DL, Cole AM, Hong T, Waring AJ, et al. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):515–20.
 171. Guo C-J, Tan N, Song L, Douglas SD, Ho W-Z. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS.* 2004 May 21;18(8):1217–8.
 172. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012 Jul 19;12(1):109–16.
 173. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol.* 2012 Apr 23;30(1):459–89.
 174. Zhu Y, Gong K, Denholtz M, Chandra V, Kamps MP, Alber F, et al. Comprehensive characterization of neutrophil genome topology. *Genes Dev.* 2017;31(2):141–53.
 175. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010 Nov 24;33(5):657–70.
 176. Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976 Sep;58(3):705–15.
 177. Pillay J, den Braber I, Vrsekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM,

- et al. In vivo labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):625–7.
178. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. Vol. 117, *Blood*. 2011. p. 6050–2.
 179. Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JAM, et al. The in vivo half-life of human neutrophils. Vol. 117, *Blood*. 2011. p. 6053–4.
 180. Mayadas TN, Cullere X, Lowell C a. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181–218.
 181. Pham CTN. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):541–50.
 182. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013;210(7):1283–99.
 183. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009 Nov;30(11):513–21.
 184. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
 185. Fuchs T a, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
 186. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;
 187. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014 Sep 14;(September):1–11.
 188. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Apr 21;106(16):6748–53.
 189. Rocha JDB, Nascimento MTC, Decote-Ricardo D, Côrte-Real S, Morrot A, Heise N, et al. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci Rep*. 2015;5:8008.
 190. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. Levitz SM, editor. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000639.
 191. Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;113(1–2):248–55.

192. Silva LMR, Muñoz Caro T, Gerstberger R, Vila-Viçosa MJM, Cortes HCE, Hermosilla C, et al. The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol Res.* 2014;113(8):2797–807.
193. Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 2009;1(3):181–93.
194. Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Nadaes NR, Danelli MGM, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol.* 2010;91(1):259–64.
195. Jeffery U, Gray RD, LeVine DN. A Simple Fluorescence Assay for Quantification of Canine Neutrophil Extracellular Trap Release. *J Vis Exp.* 2016;(117):1–4.
196. Zhang X, Zhuchenko O, Kuspa A, Soldati T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat Commun.* 2016;7:1–9.
197. Palić D, Ostojić J, Andreasen CB, Roth JA. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(8):805–16.
198. Nascimento MTC, Silva KP, Garcia MCF, Medeiros MN, Machado EA, Nascimento SB, et al. DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. *Dev Comp Immunol.* 2018 Jul;84:62–70.
199. Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;129(1–2):126–31.
200. Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.* 2009 Oct;151(2):820–9.
201. Tran TM, MacIntyre A, Hawes M, Allen C. Escaping Underground Nets: Extracellular DNases Degrade Plant Extracellular Traps and Contribute to Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 2016;12(6):1–26.
202. Wen F, Curlango-Rivera G, Huskey DA, Xiong Z, Hawes MC. Visualization of extracellular DNA released during border cell separation from the root cap. *Am J Bot.* 2017;104(7):970–8.
203. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal.* 2008;1(21):pe25.
204. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012 Jan;2012(Table 1):929743.
205. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug;5(8):577–82.

206. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011 Apr;18(4):581–8.
207. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386–93.
208. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis.* 2018;(January).
209. Schechter MC, Buac K, Adekambi T, Cagle S, Celli J, Ray SM, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. *PLoS One.* 2017;12(8):6–13.
210. van der Meer AJ, Zeerleder S, Blok DC, Kager LM, Lede IO, Rahman W, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with pulmonary tuberculosis. *Respir Res.* 2017;18(1):1–4.
211. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal.* 2008 May 27;1(21):pe25.
212. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: Defective activity in chronic granulomatous disease. *Science (80-).* 1967 Feb 17;155(3764):835–6.
213. Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest.* 1967 Sep;46(9):1422–32.
214. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. In Vitro Bactericidal Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes: Diminished Activity in Chronic Granulomatous Disease of Childhood *. *J Clin Invest.* 1967;46(4):668–79.
215. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2619–22.
216. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009 Jan 26;184(2):205–13.
217. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010 Aug 30;207(9):1853–62.
218. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010 Nov 1;191(3):677–91.
219. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):953–9.
220. Sollberger G, Amulic B, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular trap formation is independent of de novo gene expression. *PLoS One.* 2016;11(6):1–10.
221. Barrientos L, Marin-Esteban V, de Chaisemartin L, Le-Moal VL, Sandré C,

- Bianchini E, et al. An Improved Strategy to Recover Large Fragments of Functional Human Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2013 Jun 24;4:166.
222. Lappann M, Danhof S, Guenther F, Olivares-Florez S, Mordhorst IL, Vogel U. In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Mol Microbiol.* 2013 Aug;89(3):433–49.
223. Dwyer M, Shan Q, D’Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun.* 2014;6(6):765–79.
224. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O’Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 2003 Jun 5;544(1–3):129–32.
225. Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MCA, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3988–94.
226. Heutinck KM, ten Berge IJM, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol.* 2010;47(11–12):1943–55.
227. Döring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol.* 1995;154(9):4842–50.
228. Henriksen PA, Devitt A, Kotelevtsev Y, Sallenave JM. Gene delivery of the elastase inhibitor elafin protects macrophages from neutrophil elastase-mediated impairment of apoptotic cell recognition. *FEBS Lett.* 2004;574(1–3):80–4.
229. Sadallah S, Hess C, Miot S, Spertini O, Lutz H, Schifferli JA. Elastase and metalloproteinase activities regulate soluble complement receptor 1 release. *Eur J Immunol.* 1999;29(11):3754–61.
230. Scuderi P, Nez PA, Duerr ML, Wong BJ, Valdez CM. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol.* 1991;135(2):299–313.
231. Bank U, Kupper B, Ansorge S. Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:431–7.
232. Robertson SE, Young JD, Kitson S, Pitt A, Evans J, Roes J, et al. Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2006;36(3):722–31.
233. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood.* 2014 Jul 31;124(5):710–9.
234. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):93–106.

235. Brook M, Tomlinson GH, Miles K, Smith RWP, Rossi AG, Hiemstra PS, et al. Neutrophil-derived alpha defensins control inflammation by inhibiting macrophage mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Apr 19;113(16):4350–5.
236. van der Does AM, Beekhuizen H, Ravensbergen B, Vos T, Ottenhoff THM, van Dissel JT, et al. LL-37 Directs Macrophage Differentiation toward Macrophages with a Proinflammatory Signature. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1442–9.
237. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3150–9.
238. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol*. 2013 Sep 1;191(5):2647–56.
239. Braian C, Hogeia V, Stendahl O. Mycobacterium tuberculosis- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J Innate Immun*. 2013 Jan;5(6):591–602.
240. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. 2016;67:19–28.
241. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Pantin-Jackwood MJ, et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*. 2005;79(23):14933–44.
242. Jenne CN, Wong CHY, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013 Feb 13;13(2):169–80.
243. Hemmers S, Teijaro JR, Arandjelovic S, Mowen KA. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS One*. 2011;6(7):e22043.
244. Hoeksema M, Tripathi S, White M, Qi L, Taubenberger J, van Eijk M, et al. Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immun*. 2015 Oct 2;21(7):736–45.
245. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011;179(1):199–210.
246. Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Promotes TLR-4 – Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation by Human Neutrophils. 2015;1–14.
247. Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Nadaes NR, Danelli MGM, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol*. 2010 Jan;91(Pt 1):259–64.
248. Barr FD, Ochsenbauer C, Wira CR, Rodriguez-Garcia M. Neutrophil

- extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunol.* 2018 Jun 6;(January):1–9.
249. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol.* 2006 Aug 1;177(3):1864–71.
250. Stephan A, Batinica M, Steiger J, Hartmann P, Zaucke F, Bloch W, et al. LL37:DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages. *Immunology.* 2016;148(4):420–32.
251. Habibzadeh F. Common statistical mistakes in manuscripts submitted to biomedical journals. *Eur Sci Ed.* 2014;40(2):43.
252. Barde MP, Barde PJ. What to use to express the variability of data: Standard deviation or standard error of mean? *Perspect Clin Res.* 2012 Jul;3(3):113–6.
253. Jaykaran. “Mean \pm SEM” or “Mean (SD)”? *Indian J Pharmacol.* 2010 Oct;42(5):329.
254. Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 2012;3(JAN):413.
255. Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 2012 Jan;3(January):413.
256. Lincoln JA, Lefkowitz DL, Cain T, Castro A, Mills KC, Lefkowitz SS, et al. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun.* 1995 Aug;63(8):3042–7.
257. Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K, et al. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest.* 2008 Oct;118(10):3491–502.
258. Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):139–45.
259. Wan M, van der Does AM, Tang X, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2014;95(June):1–11.
260. Münk C, Wei G, Yang OO, Waring AJ, Wang W, Hong T, et al. The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003 Oct;19(10):875–81.
261. Wong JH, Legowska A, Rolka K, Ng TB, Hui M, Cho CH, et al. Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides.* 2011 Jun;32(6):1117–22.
262. Sever S, Damke H, Schmid SL. Dynamin: GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 2000;150(5):1137–47.
263. Chen L, Zhao Y, Lai D, Zhang P, Yang Y, Li Y, et al. Neutrophil extracellular

- traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. *Cell Death Dis.* 2018 May 22;9(6):597.
264. Carmona-Rivera C, Carlucci PM, Moore E, Lingampalli N, Uchtenhagen H, James E, et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci Immunol.* 2017;2(10):eaag3358.
265. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Dev Cell.* 2006;10(6):839–50.
266. Bull HB, Breese K. Thermal transitions of proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1973 Jun;156(2):604–12.
267. Gessani S, Puddu P, Varano B, Borghi P, Conti L, Fantuzzi L, et al. Role of interferons in the restriction of HIV replication in human monocytes/macrophages. *Res Immunol.* 1994 Jan;145(8–9):659-62; discussion 662-3.
268. Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol.* 1992 Mar;66(3):1321–8.
269. Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res.* 1994 Jul;24(2–3):221–33.
270. Kozlowski HN, Lai ETL, Havugimana PC, White C, Emili A, Sakac D, et al. Extracellular histones identified in crocodile blood inhibit in-vitro HIV-1 infection. *AIDS.* 2016 Aug 24;30(13):2043–52.
271. Jena P, Mohanty S, Mohanty T, Kallert S, Morgelin M, Lindstrøm T, et al. Azurophil granule proteins constitute the major mycobactericidal proteins in human neutrophils and enhance the killing of mycobacteria in macrophages. *PLoS One.* 2012;7(12):e50345.
272. Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp.* 2010;(February):36–8.
273. Pires RH, Felix SB, Delcea M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2016;8(29):14193–202.
274. Gehrke N, Mertens C, Zillinger T, Wenzel J, Bald T, Zahn S, et al. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity.* 2013 Sep 19;39(3):482–95.
275. Neumann A, Völlger L, Berends ETM, Molhoek EM, Stapels D a C, Midon M, et al. Novel Role of the Antimicrobial Peptide LL-37 in the Protection of Neutrophil Extracellular Traps against Degradation by Bacterial Nucleases. *J Innate Immun.* 2014 Jul 8;
276. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science (80-).* 2015 Jul 17;349(6245):316–20.

277. Barrera-Vargas A, Gómez-Martín D, Carmona-Rivera C, Merayo-Chalico J, Torres-Ruiz J, Manna Z, et al. Differential ubiquitination in NETs regulates macrophage responses in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2018;annrheumdis-2017-212617.
278. Chamilos G, Gregorio J, Meller S, Lande R, Kontoyiannis DP, Modlin RL, et al. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood*. 2012;120(18):3699–707.
279. Coorens M, van Dijk A, Bikker F, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Importance of Endosomal Cathelicidin Degradation To Enhance DNA-Induced Chicken Macrophage Activation. *J Immunol*. 2015;195(8):3970–7.
280. Jan M, Huang Y, Yan Y, Liao K, Li C. CC Chemokines Induce Neutrophils to Chemotaxis ., 2006;41(1):6–16.
281. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014 May;20(5):511–7.
282. Heit B, Jones G, Knight D, Antony JM, Gill MJ, Brown C, et al. HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 2006;177:6405–14.
283. Brownlie R, Zhu J, Allan B, Mutwiri GK, Babiuk LA, Potter A, et al. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol*. 2009;46(15):3163–70.
284. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 2003;544(1–3):129–32.
285. Pham CTN. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6–7):1317–33.
286. Bristow CL, Mercatante DR, Kole R. HIV-1 preferentially binds receptors copatched with cell-surface elastase. :4479–86.
287. Congote LF. Serpin A1 and CD91 as host instruments against HIV-1 infection: are extracellular antiviral peptides acting as intracellular messengers? *Virus Res*. 2007 May;125(2):119–34.
288. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(2013):3813–27.
289. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: A critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev*. 2018;
290. Arshad O, Gadawska I, Saththa B, Côté HCF, Hsieh AYY. Elevated Cell-Free Mitochondrial DNA in Filtered Plasma Is Associated With HIV Infection and Inflammation. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018;78(1):111–8.
291. Gardinassi LG, DeSouza-Vieira TS, da Silva NO, Garcia GR, Borges VM,

Campos RNS, et al. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):285.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

Tabela 9.1. Dados clínicos dos pacientes infectados pelo HIV-1 que forneceram plasma para este estudo, e quantificação de DNA e elastase plasmáticos.

Pacientes	Sexo*	Carga viral (cópias/mL)	Células T CD4+/ μ l	DNA (ng/mL)	Elastase (nM)
D2	M	423810	22	< limite de detecção	3,11
D3	F	42	326	502,7	1,89
D4	M	< limite de detecção	728	< limite de detecção	3,05
D5	M	< limite de detecção	696	203,1	3,38
D6	M	< limite de detecção	875	650,7	1,92
D8	F	< limite de detecção	640	325,0	3,64
D9	F	< limite de detecção	359	226,2	3,54
D10	F	< limite de detecção	486	299,2	2,59
D12	F	189	935	15,2	2,97
D13	M	< limite de detecção	158	384,2	2,9
D16	F	23434	10	162,6	2,92
D19	F	234	1308	99,0	2,68
D21	F	< limite de detecção	243	130,7	2,33
D24	M	< limite de detecção	819	4,9	2,43
D27	M	< limite de detecção	616	356,5	2,52
D28	F	< limite de detecção	795	329,9	3,75
D29	M	46	621	163,0	3,24
D30	F	< limite de detecção	818	181,5	2,34
D31	F	< limite de detecção	428	525,4	3,88
D32	F	< limite de detecção	503	73,5	2,98
D33	F	< limite de detecção	628	292,2	2,64

Tabela 9.1. Continuação

Pacientes	Sexo*	Carga viral (cópias/mL)	Células T CD4+/ μ l	DNA (ng/mL)	Elastase (nM)
D34	F	< limite de detecção	432	93,1	3,04
D35	M	< limite de detecção	825	552,6	5,53
D38	M	< limite de detecção	355	330,3	6,21
D39	F	< limite de detecção	685	101,3	3,66
D43	M	898	678	100,6	3,85
D49	M	10714	289	340,6	4,52
D50	M	1097	512	126,8	3,57
D51	F	372	248	194,8	3,68
D52	M	3393	348	304,6	3,57
D56	M	1370	419	61,4	3,67
D57	M	216470	7	740,3	4,1
D58	M	190	771	321,7	3,83
D59	F	145	752	191,1	4,07
D60	F	4313608	116	< limite de detecção	2,83
D61	F	33827	3	76,1	2,69
D62	M	42220	213	121,6	4,03
D63	M	91709	67	61,3	3,51
D68	M	106804	131	192,1	3,08
D69	F	159605	102	432,6	3,38
D71	F	68561	189	462,4	4,43
D72	M	173	477	11,4	3,25

Tabela 9.1. Continuação

Pacientes	Sexo*	Carga viral (cópias/mL)	Células T CD4+/ μ l	DNA (ng/mL)	Elastase (nM)
D73	M	760	306	105,1	2,82
D76	F	35601	125	137,3	4,21
D80	M	39669	304	221,1	3,03
D81	F	28920	354	129,6	2,69
D82	M	37560	306	220,8	3,06
D83	F	100612	16	< limite de detecção	6,72
D84	M	904	188	51,4	3,68
D85	F	79573	119	99,2	5,92
D87	M	51125	145	< limite de detecção	4,08
D88	M	187658	35	395,1	2,52
D89	M	311538	64	265,1	5,21
D90	M	182375	28	< limite de detecção	2,34
D91	F	197275	136	118,8	3,94
D92	M	117985	159	229,5	3,2
D93	M	106763	8	6,1	3,73
D94	F	488484	72	400,2	5,21
D95	M	104210	68	< limite de detecção	3,76
D96	M	234777	205	< limite de detecção	2,94
D97	M	1867	71	< limite de detecção	3,73
D98	?	23011	602	388	
D100	?	35281	139	386	
D101	F	42465	322	358	

Tabela 9.1. Continuação

Pacientes	Sexo*	Carga viral (cópias/mL)	Células T CD4+/ μ l	DNA (ng/mL) Elastase (nM)
D102	F	32393	185	300
D103	F	17304	508	117,7
D104	M	641131	47	283,5
D105	F	17428	183	14,2
D106	F	124528	26	309,2
D108	F	144626	156	219
D109	F	22524	205	234,4

PRODUÇÃO INTELECTUAL

- **Participação em eventos**

XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology.2014. Búzios, Brasil

XI Curso Avançado de Patogênese do HIV. 2015. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2016. Campos do Jordão, Brazil. **Apresentação do pôster: *Neutrophil extracellular traps enhance macrophage resistance to HIV-1 infection***

XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2018. Ouro Preto, Brazil. **Apresentação do pôster: *Neutrophil Extracellular Traps Restrain HIV-1 Infection in Macrophages***

- **Artigo**

Neutrophil extracellular traps carry microRNAs

Leandra Linhares-Lacerda, Estefania P. Azevedo, Marcelo Ribeiro-Alves, **Andrés Mojoli**, Michelle T. C. Nascimento, Wilson Savino, Dumith Chequer Bou-Habib, Debora Foguel, Elvira Saraiva.

(Artigo em colaboração, atualmente submetido)