NÁTALLI ZANETE PEREIRA

**EXPRESSÃO EX VIVO DE FATORES ANTIVIRAIS EM
MÃES INFECTADAS POR HIV-1 E RECÉM-NATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

NÁTALLI ZANETE PEREIRA

**EXPRESSÃO EX VIVO DE FATORES ANTIVIRAIS EM
MÃES INFECTADAS POR HIV-1 E RECÉM-NATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Maria Notomi Sato

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pereira, Nátalli Zanete.

Expressão ex vivo de fatores antivirais em mães infectadas por HIV-1 e recém-natos / Nátalli Zanete Pereira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunidade inata.

Versão do título para o inglês: Ex vivo expression of antiviral factors in mothers infected by HIV-1 and newborns.

1. Imunidade natural 2. Recém-nascido 3. HIV 4. Interferon 5. Gestação I. Sato, Profa. Dra. Maria Notomi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB032/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):   Nátalli Zanete Pereira.

Título da Dissertação: Expressão ex vivo de fatores antivirais em mães infectadas por HIV-1 e recém-natos.

Orientador(a):   Profa. Dra. Maria Notomi Sato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
                              Nome: .....
                              Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                              Nome: .....
                              Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
                              Nome: .....
                              Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de outubro de 2010.

PARECER 971/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 26.10.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Interface Materno-fetal na infecção por HIV-1: Análise da expressão de Fatores antivirais Ex vivo e na ativação in vitro via receptores Toll"* sob responsabilidade de execução dos autores Profa Dra. **MARIA NATOMI SATO** e a aluna **NÁTALLI ZANETE PAGANI**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
26.10.2011

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho as gestantes infectadas pelo HIV que anseiam por tratamento,
perspectivas e um futuro para seus filhos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Notomi Sato, por ter me aceitado como aluna, pela confiança depositada em mim e pela sua paciência e incentivos maternos neste período de orientação.

Aos meus pais, José e Cleuza pela paciência e estímulo às minhas perguntas e curiosidades da infância, vocês cultivaram a semente da ciência em mim.

À minha irmã Carmem, minha alma gêmea, pelo simples fato de existir e me trazer paz, calma e me fazer sentir única e especial.

Aos meus irmãos, Paulo, Rodrigo e Roseli pelo apoio afetivo, financeiro, emocional e amor sem precedentes.

Aos meus sobrinhos Marcella, Anne e Francisco, sempre tão lindos, que iluminam a minha vida.

Ao Cyro pelo exemplo de solidez moral, caráter, amor e apoio incondicional.

Às amigas nascidas no laboratório que ajudaram a manter a calma, a seguir a diante mesmo nas horas de desânimo, que pacientemente dividiam seus conhecimentos práticos, teóricos e pessoais e por todos os momentos de convívio e companheirismo: Bruno Pacola, Juliana Santos, Isabela Fernandes, Shinai Gregório, Nilson Lima, Mayce Azor, Elaine Cardoso, Eliana Futata, Jefferson Russo, Orlando Piubelli, Carolina Freggine, Ana Elisa Fusaro, Anna Claudia Branco, Adrielli Costa, Tiago Titz, Camila de Lollo, Cesar Cervantes, Kelly Manfrere, Luanda Oliveira, Luana Mendonça, Aline Lira, Marina, Marília Garcia, Rosana Domingues, Gabriel Costa, Raquel Orfali, Vanessa Gonçalves, Gabrielle Mitsunari, Raissa Barska, Claudia Oshiro e Beatriz Shida.

A todos os integrantes do LIM 56 que de maneira direta ou indireta contribuíram neste trabalho.

Agradeço a cooperação do departamento de Citometria Noemi Mie Ori, Rosângela e Patrícia.

Ao Professor Dr. Alberto José da Silva Duarte por ceder o espaço de trabalho.

A Luiz Gazotto pela ajuda, de grande valia, na organização dos dados.

À Maria Gabriela Simensen e Raquel Mitchel por me acolherem como irmãs e pelo conhecimento científico compartilhado.

À Fernanda Guedes, Dra Miriam Nakagami Soto, e Dra Maria Irma Seixas Duarte pela ajuda nos ensaios de imunohistoquímica.

À banca de qualificação Dra Hiro Goto, Dr. José Maria Alvarez Mosig e Dra Maria Isabel de Moraes Pinto pelas contribuições e melhorias na dissertação.

Ao Departamento de Obstetrícia HC-FMUSP - Dra Rosa Maria de Souza Aveiro Ruocco, Dra Rossana Pulcinelli Vieira Francisco e Dr. Marcelo Zugaib.

Ao Departamento de Pediatria HC-FMUSP - Dra Heloisa Helena Sousa Marques

À secretaria do laboratório LIM 56, pela ajuda burocrática na realização do trabalho.

Agradeço a colaboração do Dr. João Bosco Oliveira, Dra Hyesun Kuehn, Dra. Andréia Rangel dos Santos.

Agradeço a Deus, por ter me dado forças e ânimo para a realização desta importante etapa, e por ter colocado em minha vida todas estas pessoas a quem agradeço, pois sem elas este trabalho seria muito mais difícil.

“Tudo pela glória de Deus e bem estar da humanidade.”

Anônimo

RESUMO

ZANETE PEREIRA, N. **Expressão *ex vivo* de fatores antivirais em mães infectadas por HIV-1 e recém-natos**. 2013.71 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A transmissão vertical mãe-recém-nato é a principal fonte de infecção pediátrica. O tratamento antirretroviral vem reduzindo a transmissão vertical, mas também tem elevado o número de infantes expostos não infectados, os quais vêm mostrando maior risco de morbidade e mortalidade. Este dado salienta a importância de avaliar as características imunológicas, relacionadas à resposta inata no binômio mãe e recém-nato. A proposta do trabalho foi avaliar a expressão de fatores antivirais em mães infectadas por HIV e cordão umbilical (RN), comparadas com mães-RN controle não infectadas. Os fatores antivirais incluem peptídeos antimicrobianos, como as α 1-defensinas, proteínas endógenas antivirais, APOBEC (Apolipoproteína B)3F e APOBEC3G, TRIM (Tripartite Motif)-5 α , TRIM22, STING (gene estimulador de interferon), fatores induzidos por IFN tipo I, como MxA (de resistência A ao mixovírus), e as teterinas, os quais foram avaliados em células mononucleares (CMN), tecido placentário e no colostro. Os resultados mostram que a expressão APOBEC3G, APOBEC3F, TRIM-5 α , TRIM22, MxA e IFN- β estão aumentados em CMN de mães infectadas e RN expostos em relação ao grupo controle. Além disto, os RNs de mães infectadas por HIV mostram perfil de expressão de APOBEC3G, TRIM22, MXA e teterina similar ao seu grupo de mães. No RN, a expressão de α 1-defensina, foi superior ao grupo adulto. No tecido placentário, foi observada menor expressão da proteína APOBEC3G nas decíduas e de TRIM5 α nas faces fetais de mães infectadas comparadas às mães controles. Este dado revela que a infecção por HIV altera a expressão destes fatores na fase pós-traducional, mas não altera os níveis transcricionais. Nas células do colostro de mães infectadas foi detectado aumento da expressão de RNAm de teterina e IFN- β e, níveis reduzidos de RANTES. Além disso, os níveis séricos de IP-10, MCP-1, IL-8 e RANTES estiveram elevados nos RN expostos em relação ao grupo controle. Os dados mostram que há uma ativa expressão dos fatores antivirais, sejam constitutivos ou induzíveis por IFN, nas mães infectadas por HIV e nos RN expostos. No sítio de interface materno-fetal, decídua e face fetal da placenta, foi detectado um perfil alterado de expressão dos fatores antivirais, especialmente da proteína APOBEC3G. Apesar da relativa imaturidade imunológica dos RNs, a infecção materna por HIV gerou um perfil semelhante de expressão dos fatores antivirais nos RN, por uma complexa interação de fatores relacionados a gestação e a infecção.

Palavras-chave: Imunidade Inata. Fatores antivirais. HIV.

ABSTRACT

ZANETE PEREIRA, N. ***Ex vivo* expression of antiviral factors in mothers infected by HIV-1 and newborn.** 2013. 71 p. Thesis (Masters in Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Vertical transmission mother-newborn is the main source of pediatric infection. The antiretroviral therapy has reduced vertical transmission, but also has increased the number of exposed uninfected infants, which have shown increased risk of morbidity and mortality. This finding emphasizes the importance of evaluating the immunological characteristics, related to innate response in both the mother and newborn. The purpose of this study was to evaluate the expression of antiviral factors in HIV-infected mothers and umbilical cord (RN), compared with control mothers-uninfected infants. The antiviral factors, including antimicrobial peptide such as α 1-defensins, endogenous proteins antiviral APOBEC (apolipoprotein B) APOBEC3G and 3F, TRIM (Tripartite Motif) -5 α , TRIM22, STING (stimulator of interferon gene), induced by factors IFN type I as MxA (resistance A to mixovirus), and teterinas were assessed in mononuclear cells (MNC), placental tissue and colostrum. The results show that the expression of APOBEC3G, APOBEC3F, TRIM-5 α , TRIM22, MxA and IFN- β CMN are increased in infected mothers and infants exposed in the control group. Moreover, the newborns of mothers infected with HIV show expression profile of APOBEC3G, TRIM22, MxA and teterina similar to its group of mothers. In RN, the expression of α 1-defensin, was higher than the adult group. The placental tissue showed a shorter protein expression for APOBEC3G and TRIM5 α on fetal infected mothers compared with control mothers. This data shows that HIV infection alters the expression of these factors in the post-translational, but does not change the transcriptional levels. Colostrum cells from infected mothers showed increased expression of mRNA and IFN- β teterina and reduced levels of RANTES. Moreover, serum levels of IP-10, MCP-1, IL-8 and RANTES were higher in NB exhibited in the control group,. The data show that the active expression of antiviral factors, are constitutive or inducible by IFN in HIV-infected mothers and newborns exposed. At the site of maternal-fetal interface, decidua and placental villi, a profile was detected altered expression of antiviral factors, especially the APOBEC3G protein. Despite the relative immunological immaturity of the newborn, maternal HIV infection generated a similar profile of expression of antiviral factors in RN, by a complex interaction of factors related to pregnancy and infection

Keywords: Innate Immune. Antiviral Factors. HIV

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Epidemiologia da infecção	12
1.2 Características da infecção pelo HIV	13
1.3 Imunopatogênese na infecção pediátrica	16
1.4 A resposta inata: fatores antivirais	18
1.4.1 Defensinas	19
1.4.2 Proteínas TRIMs	21
1.4.3 APOBEC	22
1.4.4 Teterina	23
1.4.5 STING	24
1.4.6 IFN tipo I e MxA	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Casuística	28
3.2 Coleta de Amostras	28
3.3 Obtenção de células Mononucleares	29
3.4 Análise da expressão dos fatores antivirais por PCR em tempo real	29
3.5 Análise da expressão de proteínas por <i>immunoblotting</i>	31
3.6 Dosagem de CCL5 e MIP1- α por ELISA	32
3.7 Determinação de quimiocinas por citometria de fluxo (<i>Cytometric Bead Array</i> - CBA)	32
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Características demográficas das mães infectadas por HIV	34
4.2 Análise <i>ex vivo</i> da expressão de fatores antivirais em células mononucleares do sangue periférico de mães infectadas por HIV	36
4.3 Análise <i>ex vivo</i> da expressão de fatores antivirais no tecido placentário de mães infectadas por HIV	42
4.4 Análise <i>ex vivo</i> da expressão de fatores antivirais no colostro de mães infectadas por HIV	46

4.5 Análise da secreção de citocinas no soro de mães infectadas por HIV e recém-natos	49
4.6 Análise da secreção de citocinas no colostro de mães infectadas por HIV	51
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da infecção

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), constitui num grande problema de saúde pública, com elevada taxa de morbidade e mortalidade. Estima-se que cerca de 33,4 milhões de pessoas estão infectadas com o HIV, sendo 15,7 milhões de pessoas compostas por mulheres e 2,1 milhões por crianças menores de 15 anos (UNAIDS, 2009). Em 2008, o total global de óbito de adultos e crianças a causas relacionadas à aids foi de 2 milhões, sendo que 1,4 milhão de mortes ocorreram na África Subsaariana. Nesta região há uma estimativa de 22,4 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, sendo que 60% dos adultos são mulheres. Na Europa Oriental e Ásia Central o número de infectados pelo HIV aumentou de 900 mil em 2001 para 1,5 milhão em 2008 (UNAIDS, 2009).

Atualmente, estima-se que 2 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV nos países latino-americanos. Desde 1980, no Brasil, foram identificados cerca de 608 mil casos da doença sendo 65,4% do sexo masculino e 34,6% do sexo feminino (Ministério da Saúde, 2011). Com a introdução do tratamento antirretroviral, que combina drogas com diferentes formas de ação (terapia antirretroviral altamente potente, HAART), houve uma importante queda na mortalidade no país, estabilizada para 6,4 óbitos por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2008).

O perfil de transmissão da doença em 1986 era de 15 homens para 1 mulher, atualmente, a relação é de 1,7 para 1, indicando uma mudança nos padrões de disseminação da infecção pelo HIV. O crescimento de casos de infecção pelo HIV entre mulheres consequentemente aumentou a transmissão vertical. Na África e na Ásia, a transmissão materno-fetal do vírus é maior, principalmente, na África subsaariana, sendo que mais de 40% das gestantes são infectadas pelo HIV e a grande maioria não recebe o tratamento antirretroviral, comprometendo a sobrevivência do infante (UNAIDS, 2009).

A transmissão vertical do HIV ocorre através da passagem do vírus da mãe para o recém-nato durante a gestação em 35% dos casos, ou 65% no parto, pelo contato com as secreções cervico-vaginais e sangue materno. Há também um risco

adicional de 7 a 22% de transmissão pelo aleitamento materno (Ministério da Saúde, 2007). A ausência da terapia antirretroviral pode contribuir para a infecção em 20 a 45% das crianças, com um risco estimado de 5 a 10% de infecção na gravidez, de 10-20% durante o trabalho de parto e de 5-20% pela amamentação. A utilização do regime profilático antirretroviral, contendo zidovudina, pode reduzir significativamente a infecção intrauterina e intraparto para até 8,3%. Entretanto, no período pós-natal, durante amamentação, é diminuída a eficácia de prevenção da infecção pelo HIV (CDC, 2007). Desta forma, a suspensão do aleitamento materno e a manutenção da quimioprofilaxia do neonato até quatro semanas de vida são recomendadas pelo Ministério da Saúde. O conhecimento precoce do estado sorológico da gestante para início oportuno da terapêutica materna e profilaxia da transmissão vertical é consenso do Ministério da Saúde do Brasil. A partir do ano 2000, a vigilância epidemiológica foi implantada no país, para estimar o número de gestantes infectadas e a taxa de transmissão vertical do HIV. No Brasil, foram notificados 41.777 casos de gestantes infectadas desde o ano de 2000 (Ministério da Saúde, 2008).

Crianças expostas e não infectadas pelo HIV representam quase 30% dos infantes nascidos na África, além disso, tem maiores índices de mortalidade que crianças nascidas de mães saudáveis, mesmo com padrões alimentares semelhantes (SHAPIRO et al., 2007). A exposição vertical do HIV oferece uma oportunidade única de investigação dos mecanismos imunológicos, de característica inata ou adaptativa, e dos fatores genéticos do hospedeiro para a proteção do HIV. Este fato desperta a atenção para avaliar quais são os fatores antivirais que podem estar ativamente expressos no hospedeiro. No Brasil, há uma importante adesão das mães infectadas por HIV ao tratamento antirretroviral, o que reduz significativamente a transmissão vertical. Contudo, o tratamento pode não prevenir a exposição da criança ao vírus, evento que pode ocorrer nos estágios iniciais de desenvolvimento fetal.

A relação materno-infante na infecção por HIV oferece a possibilidade de avaliar marcadores de proteção ou de suscetibilidade à infecção, em face à imaturidade imunológica e à terapia antirretroviral. Entre os mecanismos de ação antiviral, os fatores relacionados ao sistema imunológico inato chamam atenção no estudo da relação materno-fetal na infecção pelo HIV. A compreensão dos correlatos de proteção dos infantes mesmo em face ao tratamento antirretroviral poderão fornecer subsídios para desenvolver novas formulações de vacinas anti-HIV.

1.2 Características da infecção pelo HIV

O HIV-1 e HIV-2 diferem quanto à estrutura genômica e distribuição geográfica. Ambos causam síndromes semelhantes, embora o HIV-2 possua menor potencial patogênico (WYATT; SODROSKI, 1998). Variantes genômicas (subtipos), tanto de HIV-1 como de HIV-2, têm sido descritas em pacientes infectados procedentes de diferentes regiões do mundo (KORBER et al., 1995). Os isolados de HIV-1 são classificados em três grupos M (*major*), O (*outlier*), N (não M/não O) com variabilidade genética de até 30%. No grupo M identificam-se nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H e I) e no grupo O apenas um. Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos: A, B, C, D, e E.

O HIV é um retrovírus com 110 nm de diâmetro, que apresenta material genético constituído de duas fitas simples de RNA, envolto pelo nucleocapsídeo. Como outros *Lentivirus*, o nucleocapsídeo apresenta uma estrutura cônica, sendo a proteína p24 sua principal constituinte, além das proteínas p6 e p9 que estão ligadas ao material genético. A superfície viral é constituída por um envoltório glicoproteico originado da membrana das células hospedeiras e que recobre o capsídeo viral (OZEL et al., 1988). Na parte externa do envelope viral são encontradas espículas glicoproteicas, responsáveis pela ligação do vírus aos receptores celulares. Essas glicoproteínas são derivadas da gp160, que é clivada no Complexo de Golgi da célula hospedeira, originando a gp 41 (transmembrana) e gp 120 (glicoproteína de superfície) que compõem os 72 trímeros ou tetrâmeros que recobrem o envelope.

O material genético é composto por duas fitas simples de RNA com 9,8 Kb. Há nove genes distintos: três estruturais: *env*, *pol* e *gag*; dois regulatórios *tat* e *rev*; e os genes acessórios (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu/vpx*). Nas extremidades 5' e 3' encontram-se longas repetições terminais ou LTRs (*long terminal repeats*).

As quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL3L1 (MIP-1 α P), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES), que são ligante do CCR5, e a CXCL-12 (SDF-1), ligante exclusivo do CXCR4, podem bloquear a entrada do HIV na célula do hospedeiro, pois competem com o mesmo sítio de ligação que o vírus (BERGER et al., 1999). Variantes genéticas de quimiocinas e seus receptores, que naturalmente ocorrem no hospedeiro, in-

fluenciam a resposta imune ao HIV e consequentemente na progressão da infecção para a aids (REICHE et al., 2007).

Os mecanismos de entrada do HIV são diversos e algumas moléculas são relacionadas com a suscetibilidade para entrada do vírus, como a lecitina tipo C DC-SIGN, a Syndecan-3 e a DCIR. Estas moléculas são expressas em células dendríticas (DCs) que capturam o HIV-1 em decorrência da sua alta afinidade com as moléculas de gp120 presentes no envelope do vírus (DE WITTE et al., 2007; LAMBERT et al., 2008). Como as DCs estão presentes nos tecidos de mucosa, sítio de entrada do vírus, tem sido proposto que o HIV utiliza as DC da mucosa genital como primeiro alvo contribuindo para disseminação viral (DE WITTE et al., 2008). Além disto, no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), ocorre a disseminação do HIV e intensa depleção das células T CD4+, contribuindo para a disfunção imunológica (MEHANDRU et al., 2004; JIANG et al., 2005). A gp120 do HIV pode ligar-se à integrina $\alpha 4\beta 7$ dos linfócitos, molécula que medeia a migração dos linfócitos para o GALT. O engajamento da integrina com o HIV induz a ativação da integrina LFA-1, envolvida na sinapse virológica, facilitando assim a disseminação do HIV-1 (ARTHOS et al., 2008). As lectinas ligadoras do HIV também podem influenciar na transmissão vertical do vírus, considerando que estas moléculas são expressas por macrófagos fetais (células de Hofbauer) e por macrófagos maternos da decídua (BARRÉ-SINOUSI et al., 1997).

Durante a infecção primária ou aguda do HIV-1 a replicação viral é intensa, levando a um importante aumento da carga viral seguido por um declínio relativo na viremia, devido a uma forte resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1. Com a resolução da fase aguda, ocorre a estabilização da viremia em níveis variáveis (*set points*), definidos pela velocidade da replicação e *clearance* viral, iniciando deste modo a fase assintomática da síndrome (DAVEY et al., 1999). A infecção crônica pelo HIV é caracterizada por uma ativação imunológica persistente e pelo escape do vírus da resposta imunológica. A ativação crônica das células imunocompetentes pode levar à apoptose dessas células e evolução para a depressão do sistema imunitário, sendo que este processo diminui rapidamente com o início da terapia antirretroviral. Quando não ocorre o uso de antirretrovirais, pode ter início a fase sintomática da doença.

Os infectados crônicos pelo HIV-1 que possuem a capacidade de manter o número de células T CD4+ normal por um período prolongado (> 10 anos), são denominados de não progressores por longo tempo. Alguns dos não progressores podem ter viremia não detectável, mas a maioria possui carga viral detectável. Já um sub-grupo dos não progressores faz parte de uma reduzida população, denominado de controladores de elite, permanecem com viremia indetectável por ensaios padrões (< 50 cópias RNA/ml) por longo tempo, na ausência de antirretroviral (DEEKS; WALKER, 2007).

A infecção aguda pelo HIV em crianças caracteriza-se por elevada carga viral que pode permanecer acima de 100.000 cópias/mL no primeiro ano de idade e que diminui vagarosamente em 2 a 3 anos nas crianças sobreviventes (RICHARDSON et al., 2003). O *set-point* viral é mais elevado em crianças do que em adultos, consistente com progressão mais rápida da doença. Na ausência de uma terapia eficaz, aproximadamente 10-15% morrem no primeiro ano de vida (PLINER et al., 1998). Há dois tipos de perfis de progressão clínica na infecção vertical, algumas crianças progridem rapidamente desenvolvendo um curso rápido da doença nos primeiros meses de idade (BLANCHE et al., 1990), e a maioria desenvolve um curso crônico com vários padrões da doença (MAYAUX, 1996). Os progressores lentos podem desenvolver sinais clínicos e alterações imunológicas após 2-3 anos de idade, e incluem os que sobrevivem mais do que 8 anos após a transmissão vertical. Alterações estruturais e funcionais nos genes *nef* do HIV (GEFFIN et al., 2000), bem como defeito no alelo de CCR5 (CCR5 Δ 32) (ROUSSEAU et al., 1997), têm sido correlacionados com crianças não progressoras por longo tempo. Além disto, marcadores imunológicos, como presença de menos que 5 % de células T CD8+ HLA-DR+ em crianças com um ou dois meses de idade, têm sido descritos como fator preditivo para não progressores por longo tempo (PAUL et al., 2005).

Além dos mecanismos imunológicos, as características genéticas do hospedeiro, como os haplótipos de HLA, são importantes para o controle do vírus na infecção por HIV-1, por sua influência nas respostas citotóxicas mediadas por células T CD8+ e células NK. Os alelos de HLA B14, B27, B51, B57 e C8 estão associados com uma progressão mais lenta da doença, enquanto a presença de HLA A23, B37 e B49 com o desenvolvimento rápido da imunodeficiência (WINCHESTER et al., 2004).

1.3 Imunopatogênese na infecção pediátrica

Os mecanismos relacionados à imunopatogênese da infecção pediátrica por HIV não estão completamente esclarecidos, mas agravam-se em consequência da imaturidade imunológica encontrada no neonato. São várias as diferenças imunológicas dos recém-natos em relação aos adultos, sejam qualitativas ou quantitativas (DE BRITO et al., 2009; RIGATO et al., 2009). No período neonatal, a produção de anticorpos aos antígenos T dependentes é mais tardia, de curta duração e de menor afinidade do que o encontrado em adultos (ADKINS et al., 2004). A baixa produção de anticorpos nesta fase de vida pode ser atribuída às diferenças fenotípicas e funcionais das células B ou pela falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as células T e B, ou pela deficiente expressão do membro da família de TNFR, TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor*) nas células B. A produção deficiente de anticorpos de IgG2 está relacionada com a baixa resposta aos antígenos T independentes, como os polissacarídeos da parede bacteriana, podendo resultar em infecções persistentes e recorrentes em infantes (NAHMIAS; KOURTIS, 1997).

As células T CD8+ de neonatos humanos e murinos, em circunstâncias seletivas, parecem ser capazes de desenvolver função citotóxica madura. Células de cordão umbilical são capazes de estabelecer resposta citotóxica quando transferidas em camundongos após uma semana do desafio com células alogênicas irradiadas (MARCUS et al., 2002). A resposta T citotóxica neonatal pode ser gerada na presença de agentes promotores de resposta Th1 ou por indutores potentes de ativação de células apresentadoras de antígeno (APC). As DCs são APCs profissionais que exercem um papel central na iniciação da resposta imune aos antígenos, estimulando tanto as células T CD4+ e T CD8+ *naive*. As DCs imaturas, após a estimulação com lipopolissacarídeos, citocinas ou outros estímulos, aumentam a expressão de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e de moléculas co-estimuladoras, tornam-se células maduras capazes de apresentar antígenos e ativar os linfócitos T com extraordinária eficiência.

Na ausência de terapia antirretroviral, crianças que são expostas ao vírus e que não são infectadas constituem a maioria dos casos. Em mais de 1/3 destas crianças pode-se detectar proliferação e produção de IL-2 pelas células do cordão um-

bilical e do sangue periférico em resposta a vários antígenos do HIV (KUHN et al., 2002). Algumas crianças expostas não infectadas podem gerar resposta T citotóxica aos epítomos de HIV, mas em baixa frequência. Estas crianças mostram elevação do número das populações de células T CD4+ ativadas (CD4+ CD38+ HLA DR+) e células de memória (CD4+ CD45RO+), produção reduzida de IL-2 (RICH et al., 1997) e elevada de IFN- γ e IL-10 (KUHN et al., 2001) induzidas por estímulo não específico. Em contraste, outro relato mostra que os neonatos expostos ao HIV e não infectados, cujas mães estiveram sob tratamento antirretroviral durante a gestação, podem mostrar ausência de reatividade aos antígenos de HIV, mas uma produção dominante de IL-4 e IL-10 a um estímulo policlonal quando proveniente de mães com carga viral indetectável (<80 cópias de HIV-1 RNA/mL), enquanto os neonatos de mães com carga viral detectável produzem mais IFN- γ e TNF- α (BENTO et al., 2009; HYGINO et al., 2008;).

Além disto, as crianças expostas não infectadas possuem elevado número de células com características reguladoras com fenótipo CD4+CD25+CD127+ e um baixo nível de ativação das células T CD4+ e T CD8+ do cordão umbilical (LEGRAND et al., 2006). Experimentos de depleção *in vitro* das células T reguladoras mostram potencialização da resposta celular Ag específica, o que sugere que estas células *in utero* podem reduzir a ativação das células T e contribuir para a proteção da transmissão vertical do vírus.

Em conjunto, estes dados mostram presença de resposta imune antígeno-específica em crianças expostas ao HIV que não apresentam infecção ativa, o que reforça a hipótese de que estas crianças podem ter sido infectadas, uma vez que a houve geração de resposta imunológica antígeno-específica.

1.4 A resposta inata: fatores antivirais

A relativa imaturidade imunológica na fase neonatal, somada a ausência de resposta de memória propicia um lento desenvolvimento e baixa magnitude da resposta imunológica, tornando os infantes suscetíveis a várias infecções bacterianas e virais. O período neonatal pode representar uma fase única de desenvolvimento em que as respostas apresentam importante plasticidade, mas que podem se restringir devido sua susceptibilidade a tolerância (ADKINS et al., 2004). Esta plasticidade i-

munológica no período precoce de vida desperta o interesse em estratégias para estimular as células envolvidas na resposta imune inata para influenciar no desenvolvimento da resposta adaptativa. Assim, até estabelecer uma resposta adaptativa adequada, é vital a atuação de componentes celulares ou excretados, sobretudo os que possuem atividade antiviral.

Entre os vários fatores naturais, é bem conhecido o papel do interferon tipo I nas infecções virais, considerado um potente inibidor da infecção pelo HIV-1 em macrófagos CCR5+CD4+ (MEYLAN et al., 1993). Outros fatores de resposta inata, em conjunto, podem ativamente atuar na prevenção de infecções virais. Entre os fatores que possuem atividade contra o HIV, incluem os peptídeos catiônicos, denominados alfa e beta defensinas (GANZ, 2003), as proteínas intracelulares, como a citidina desaminase, APOBEC, a proteína TRIM (*tripartite motif*) 5α (LEHNER et al., 2008) e TRIM22, reconhecidas como fatores de restrição, e também uma proteína de membrana, a teterina. Além disto, apesar desses fatores atuarem em distintas fases do ciclo viral, a maioria é induzível pelo IFN-tipo I, que potencializa um conjunto de fatores durante a resposta antiviral. A função antiviral natural destes componentes, em associação aos fatores genéticos do hospedeiro, são elementos vitais a serem analisados na interação materno-fetal na infecção por HIV, para entender o perfil desses fatores no período neonatal. Além disto, no binômio mãe-filho e seus sítios, como tecido placentário e leite materno, há escassas evidências destes fatores endógenos antivirais.

1.4.1 Defensinas

As defensinas humanas são peptídeos catiônicos com peso molecular de 3 a 5 KDa que agem como antimicrobianos naturais, produzidas principalmente por leucócitos e células epiteliais, que atuam contra bactérias gram positivas e negativas, fungos e vírus (GANZ et al., 1985; NAKASHIMA et al., 1993). As defensinas são capazes de bloquear a infecção viral atuando diretamente no vírion ou afetando a célula alvo e, assim, interferindo indiretamente na infecção (KLOTMAN; CHANG, 2006). São expressas constitutivamente nas células da mucosa oral de indivíduos saudáveis e em baixas concentrações em indivíduos infectados por HIV (SUN et al., 2005).

As defensinas são divididas em três subgrupos: α , β e θ -defensinas dependendo do tamanho, distribuição e padrão de ligação das pontes intramoleculares de dissulfeto (GANZ et al., 1985). As α -defensinas são subdivididas em seis grupos, de 1-4 são chamadas de peptídeos de neutrófilos humanos (HNP), pois são, principalmente, expressas por neutrófilos. São sintetizadas por promielócitos, precursores dos neutrófilos na medula óssea, e são estocadas como peptídeos maduros em grânulos primários de neutrófilos (GANZ et al., 1985). Já as α -defensinas 5 e 6 são produzidas principalmente pelas células de *Paneth* do trato intestinal, mas também são secretadas por células do trato genital feminino, glândulas salivares e do intestino grosso inflamado (FELLERMANN; STANGE, 2001); (QUAYLE et al., 1998).

Além disto, tem sido descrito em indivíduos infectados por HIV não progressores por longo prazo (ZHANG et al., 2002) uma elevada produção de α -defensinas por linfócitos T CD8+, que possuem ação antiviral por estimular a CAF – fator solúvel liberado pelo T CD8+ que inibe a transcrição do HIV. Entretanto, esses dados foram contestados por Mackewicz e colaboradores em 2003, que mostraram que as células T CD8+ não produzem esse peptídeo.

As HNPs, *in vitro* e na ausência de soro, inativam o vírus diretamente causando um rompimento em sua membrana e, conseqüentemente, inviabilizando sua entrada na célula (CHANG et al., 2005). Já na presença de soro, agem em células infectadas bloqueando a etapa da transcrição reversa, vital para a replicação viral. Além disso, em macrófagos, as HNPs aumentam a expressão de quimiocinas, como MIP-1 α e MIP-1 β que irão competir com os mesmos receptores de entrada do HIV-1 (GUO et al., 2006).

Quanto às β defensinas (HBD), 28 formas foram descritas, sendo a HBD1 expressa constitutivamente pelas células epiteliais (KRISANAPRAKORNIK et al., 1998), e a HBD2 expressa em monócitos, macrófagos e DCs (SØRENSEN et al., 2005). A HBD2 e HBD3 são produzidas em resposta a vírus, bactérias, produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias (HARDER; MCGOWAN, 2001).

A produção de α -defensinas por mDC está reduzida nos últimos estágios de gestação em 40% das mulheres, período em que os níveis de estrógeno estão bem elevados (ESCRIBESE et al., 2011). A presença de RNAm de HNP 1 e 3 é identificada no âmnion, fluidos amnióticos, córion e placenta (SVINARICH et al., 1997) e (AKINBI et al., 2004), de HBD1 na placenta (ZHAO et al., 1996) e de HBD1-3 no

sinciotrofoblasto (KING et al., 2007). A expressão constitutiva desses fatores tem função de proteger a cavidade uterina contra infecções e o recém-nato no momento do parto. A concentração de HNP em fluidos amnióticos e no plasma materno tem sido usada como biomarcador, sendo preditivo para o diagnóstico de inflamação intrauterina (BUHIMSCHI et al., 2005).

Além disso, níveis detectáveis de α 1-defensinas no leite de gestantes do Quênia infectadas pelo HIV-1 mostram correlação com carga viral, como também com mastite e aumento de quimiocinas (BOSIRE et al., 2007). Na placenta de mães infectadas por HIV há aumento de expressão de HBD-1 e diminuição de HBD-3 em relação às de mães controles não infectadas (AGUILAR-JIMÉNEZ et al., 2011). O promotor de HBD-3 possui um sítio funcional de ligação para a proteína ativadora 1 (AP-1) que pode ser inibida pela sinalização de outras vias, como a de TLR2 (MENZIES; KENOYER, 2006). Como todos os TLRs são expressos em placenta humana (PATNI et al., 2009), é possível que a regulação negativa de HBDs na infecção HIV-1 pode ser decorrente da ativação de outras vias de sinalização, tais como o AP-1.

1.4.2 Proteínas TRIMs

A proteína TRIM (Tripartite Motif) pertence a uma família com mais de 100 membros em humanos, e também é denominada como RBCC por possuir uma arquitetura tríplice conservada que consiste no domínio RING (*Really Interesting New Gene*) seguido por 1 ou 2 ligações de zinco nomeadas B-box e a região coiled coil (SAWYER et al., 2007; RAHM; TELENTI, 2012). A RBCC é geralmente seguida por um ou dois domínios C-terminais que são específicos para cada TRIM (NISOLE et al., 2005). Aproximadamente 60% das proteínas TRIM possuem o domínio SPRY, uma proteína transmembrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas com cerca de 140-200 aminoácidos (PONTING et al., 1997).

As proteínas TRIM podem se localizar na região citoplasmática (TRIM5) ou nuclear da célula (TRIM19) agindo principalmente em processos constitutivos como apoptose, transcrição, diferenciação e regulação da progressão do ciclo celular (MERONI; DIEZ-ROUX, 2005). Um grupo dessas proteínas possui atividades antivirais, principalmente para os retrovírus. A TRIM19, por exemplo, é capaz de inibir ci-

tomegalovírus, herpes tipo I, ebola, HIV, entre outros (BJÖRNDAL et al., 2003) (EVERETT; CHELBI-ALIX, 2007). A TRIM5 α é uma proteína citoplasmática amplamente expressa em muitos tecidos e é codificada por um gene localizado no cromossomo 11 (REYMOND et al., 2001; SAWYER et al., 2007). Utiliza as vias de sinalização, NF κ B e AP-1 e é positivamente regulada pelo IFN tipo I (PERTEL et al., 2011). Localiza-se em vesículas citoplasmáticas, reconhece o capsídeo nuclear do vírus nas células recém-infectadas e bloqueia a replicação viral durante a fase pós-entrada, antes da transcrição reversa (HATZIOANNOU et al., 2004) (OZATO et al., 2008).

Níveis elevados de expressão de TRIM5 α têm sido descritos em indivíduos infectados por HIV em relação a controles (SEWRAM et al., 2009). O aumento da expressão de TRIM5 α foi detectado em mulheres, que não soro converteram mesmo após 2 anos de alto risco de infecção, em relação às mulheres de mesmo risco que adquiriram a infecção, sugerindo que a expressão está relacionada com a redução da susceptibilidade à infecção, mas que não contribuiu para o controle primário da viremia (SEWRAM et al., 2009). Além disso, estudos revelam que não há relação da expressão do fator com a progressão da doença (GOLDSCHMIDT et al., 2006).

O TRIM22 também tem mostrado importante efeito antiviral, incluindo contra o HIV, no qual atua bloqueando a liberação do vírus da célula hospedeira, ligando-se especificamente à partícula gag do HIV (BARR et al., 2008). A expressão de TRIM22 está aumentada em CMN de indivíduos infectados, sendo positivamente regulada por IFN tipo I, assim como para o TRIM5 α (BARR et al., 2008). Além disso, quando a expressão de TRIM22 é silenciada, na presença de IFN, há um aumento na infecção e maior saída de vírus da célula (SINGH et al., 2011).

1.4.3 APOBEC

Outra proteína que atua na defesa antiviral são as Apolipoproteína B – APOBEC – proteínas da família das citidinas desaminases que incluem 11 membros em humanos: APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H, APOBEC4 e AID (ativação de desaminase induzida) (BISHOP et al., 2004). Estas proteínas são produzidas por linfócitos T, monócitos, macrófagos e DCs e fazem parte da resposta imunológica

inata na defesa antiviral, particularmente dos retrovírus. A APOBEC3G e APOBEC3F são consideradas as mais eficientes no controle antiviral (DANG et al., 2006).

A APOBEC, comumente presente no citoplasma, reconhece o RNA viral e promove em suas porções terminais, uma hipermutação, removendo um grupo amina das citosinas convertendo-as em uracilas (DANG et al., 2006). Esta alteração, impossibilita a integração do pró-vírus com o genoma do hospedeiro. Estas mutações também podem ocorrer de maneira inespecífica, inviabilizando uma nova infecção por este vírion (HOLMES et al., 2007) ou, podem ainda, beneficiar o HIV, como no caso da mutação H168R que proporciona uma melhora no *fitness* viral favorecendo a progressão da doença (AN et al., 2004).

Entretanto, os níveis de hipermutações não estão correlacionados com a carga viral de indivíduos infectados por HIV, sugerindo que APOBEC restringe a infecção por uma via independente (ULENGA et al., 2008). De fato, a APOBEC pode exercer atividade inibitória na transcrição reversa do vírus, interferindo no iniciador tRNA^{Lys-3} impedindo a polimerização da fita (GUO et al., 2006).

O escape do vírus ao fator antiviral, no caso do HIV, é mediado pela proteína acessória Vif - fator de infectividade viral –que utiliza proteínas celulares para promover a degradação da APOBEC por ubiquitinação. O vif atua como um adaptador de proteínas conectando a APOBEC ao complexo ubiquitina E3 ligase, que inclui EloginB, EloginC, Cullin5 e Rbx-1 favorecendo a degradação da APOBEC através do sistema ubiquitina-proteossoma (MEHLE et al., 2004). Na família de APOBEC, o vif possui maior atividade contra APOBEC3G (BINKA et al., 2012).

Em indivíduos expostos e não infectados por HIV há um aumento da expressão de APOBEC3G em CMN purificadas, principalmente CD14+, e em tecidos cervicais, quando comparados com um grupo saudável (BIASIN et al., 2007).

A relação de agentes antivirais endógenos na proteção da infecção vertical pelo HIV-1 mostra que a expressão de RNAm para APOBEC e TRIM5α não difere entre os infantes nascidos de mães infectadas, com carga viral indetectável aos 18 meses de idade, em relação ao grupo controle, sugerindo que não há influência destes fatores na proteção da transmissão vertical (VIGANO et al., 2007). Na transmissão vertical, a exposição *in útero* do HIV-1 pode resultar em um *imprint* de longa duração no sistema imune, contudo é importante avaliar a expressão destes fatores

representativos do recém-nato (cordão umbilical) e da mãe. É possível que o tratamento antiviral possa alterar a expressão destes agentes antivirais endógenos, entretanto, são tópicos que exigem maiores avaliações.

1.4.4 Teterina

A teterina, também conhecida como BST-2, HMI.24 e CD317 é uma proteína transmembrana cuja expressão é induzida pelo IFN- α , e atua contra diversos vírus envelopados, como retrovírus (HIV-1, HIV-2, SIV, HTLV-I, MLV, EIAV, e XMRV), filovírus (Ebola e Marburg) (JOUVENET et al., 2009) entre outros (VAN DAMME et al., 2008). É codificada pelo gene bst-2, localizado no cromossomo 19 e é expressa constitutivamente por linfócitos B, linfócitos T, monócitos, macrófagos, pDCs e em diversas linhagens tumorais (BLASIUS et al., 2006; MIYAGI et al., 2009).

O mecanismo de ação da teterina é restringir os vírions de diversos vírus envelopados de células infectadas, impedindo sua liberação e propagação (NEIL et al., 2008). Os vírions retidos podem ser endocitados e degradados pela interação da porção citoplasmática com ubiquitinas ligases, ou permanecer na superfície celular tornando-se pouco infecciosos mesmo durante a transmissão célula a célula (NEIL et al., 2006). A expressão da teterina é prevalentemente nos sítios de brotamento, o que possibilita incorporar totalmente ao vírion, de maneira independente de outro co-fator celular (PEREZ-CABALLERO et al., 2009).

A vpu, uma proteína acessória do HIV, tem a função de degradar o receptor CD4 e de inibir a ativação de NF κ B (BOUR et al., 2001) , possui um papel essencial no escape à ação da teterina, antagonizando sua função e modulando negativamente sua expressão (DUBÉ et al., 2010). Também pode levar a degradação proteossomal, via β -TrCP (proteínas com repetições de beta transducina) (MANGEAT et al., 2009). A remoção adequada de teterina da membrana plasmática por Vpu, requer a proteína celular β -TrCP, um substrato adaptador para o complexo ubiquitina ligase (DOUGLAS et al., 2009).

Os níveis de teterina estão aumentados de 2 a 3 vezes na fase aguda da infecção por HIV e também em infectados crônicos comparados com indivíduos controle (HOMANN et al., 2011). Entretanto, em indivíduos tratados com antirretrovirais há diminuição da expressão de teterina a níveis similares de indivíduos não infecta-

dos (HOMANN et al., 2011). Esses achados revelam que a diminuição da viremia no plasma, pela terapia antirretroviral, diminui a resposta imune inata, a produção de IFN e consequentemente a expressão de teterina.

Além disto, estimulação, *in vitro*, de CMN de indivíduos saudáveis com agonistas de TLR 3 e 9 aumentam significativamente a expressão de teterina a níveis similares aos indivíduos na fase crônica da doença (HOMANN et al., 2011).

1.4.5 STING

STING (gene estimulador de interferon), também chamado de TMEM317, é uma molécula de sinalização da resposta imune inata frente a ácidos nucleicos citosólicos, principalmente dsDNA (fita dupla de DNA) e dinucleotídeos cíclicos (ISHIKAWA; BARBER, 2008). E foi primeiramente descrita por interagir com as moléculas de classe II do MHC (JIN et al., 2008). Entretanto, estudos subsequentes salientam o seu papel como indutor transcricional de interferon tipo I e identificam sua importância em resposta a patógenos virais e bacterianos e por desencadear doenças auto-imunes pelo reconhecimento do DNA próprio (ISHIKAWA et al., 2009). O STING é expresso principalmente no timo, coração, pulmão, baço, placenta e leucócitos periféricos com expressão localizada no retículo endoplasmático (ZHONG et al., 2008).

Após o reconhecimento dos ácidos nucleicos, STINGs diméricos expõem sua porção carboxi-terminal, que interage com TBK1, e são relocados em compartimentos ainda não conhecidos. O TBK1, por sua vez, interage e fosforila IFR3, o que induz sua dimerização e translocação para o núcleo, culminando na transcrição de interferon e outros genes coreguladores (WATSON et al., 2012). O complexo STING-TBK1 também pode recrutar fatores autofágicos (SAITOH et al., 2009), ou ainda, ativar a via STAT6 induzindo a produção de CCL2 e CCL20 (CHEN et al., 2011). Não há referências relacionando o STING com a infecção pelo HIV, nem tampouco com a transmissão vertical do vírus, o que salienta a necessidade de se estudar os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo.

1.4.6 IFN tipo I e MxA

A dosagem sérica de IFN- α e/ou expressão de IFN- α pode ser utilizada como marcador de progressão de doença ao HIV ou de falha terapêutica (BADOLATO et al., 2008). Níveis elevados são detectáveis na infecção aguda (VON SYDOW et al., 1991), e baixos na infecção crônica pelo HIV, devido a meia vida curta ou devido a rápida ligação no receptor. Em crianças infectadas por HIV são detectados baixos níveis séricos de IFN- α , mas elevados níveis de RNAm de IFN- α nas células do sangue periférico, o que sugere que as pDC estão em estado ativo e potencialmente capazes de secretar a citocina (BADOLATO et al., 2008). Um dos marcadores de resposta ao IFN- α é a proteína antiviral MxA, de resistência A ao mixovírus, que é induzível por IFN- α e IFN- β e pode inibir a replicação viral (CHING et al., 2010). Em crianças infectadas por HIV, há uma correlação direta da expressão de MxA e cópias de RNA ao HIV RNA sugerindo que a carga viral elevada pode influenciar a indução de RNAm para MxA (BADOLATO et al., 2008).

Em indivíduos infectados por HIV, há aumento na expressão de RNAm de IFN- β e MxA em CMN em comparação com indivíduos saudáveis (SINGH et al., 2011) . Esse resultado não corresponde com os achados para IFN- α que não tiveram diferença estatística entre os mesmos grupos, indicando um importante papel de IFN- β no controle da infecção (SINGH et al., 2011) .

O IFN tipo I influencia na regulação positiva de vários fatores antivirais, como APOBEC, TRIM, teterina e MxA. A expressão de IFN- tipo I e MxA, correlaciona positivamente com TRIM22 em uma coorte de mulheres africanas com alto risco para a infecção por HIV, mas não com a expressão de TRIM5 α em CMN, sugerindo que oTRIM22 atua como efetor antiviral *in vivo* (SINGH et al., 2011) .

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A proposta do trabalho foi avaliar a resposta imune inata de mães infectadas pelo HIV-1 e seus recém-natos, pela expressão dos fatores antivirais constitutivos e induzíveis por interferon.

2.2 Objetivos secundários

Avaliar no binômio mãe infectada por HIV ou não, e seu respectivo cordão umbilical e comparar com mães-RN não infectadas:

1. a expressão *ex vivo* de RNAm de fatores antivirais, como APOBEC3F e 3G, TRIM-5 α , TRIM22, α 1-defensina, teterina, STING, MxA e IFN- β em células mononucleares (CMN), células do colostro e tecido placentário, decídua e face fetal;
2. a presença das proteínas APOBEC3F e 3G, TRIM-5 α em CMN e tecido placentário, decídua e face fetal, por *immunoblotting*,
3. dosagem de quimiocinas (RANTES, MIP-1 α , IP-10, MCP-1, IL-8) no colostro e soro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O grupo de estudo composto por parturientes portadoras da infecção pelo HIV-1 (n=23), com sorologia negativa, principalmente, para sífilis, hepatite B e C, toxoplasmose e outras doenças, em tratamento antirretroviral, atendidas na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O grupo controle é constituído por parturientes clinicamente sadias (n=21), com sorologia negativa para sífilis, hepatite B e C, toxoplasmose, HIV-1 e outras doenças, conforme exames realizados durante o pré-natal, de idade similar, atendidas na Maternidade do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Critérios de exclusão: intercorrências clínicas ou obstétricas associadas ao aumento de complicações pós-operatórias (diabetes, hipertensão arterial, descolamento prematuro de placenta, placenta prévia, doenças do colágeno, etc), pacientes que apresentaram sinais ou sintomas compatíveis com quadro infeccioso de qualquer etiologia e localização, parturientes pacientes portadoras do HIV que não tenham sido submetidas ao tratamento durante a gravidez. Também foram excluídos bebês prematuros ou pós-termo. Outras condições que alterassem o estado imunológico (ex: uso de corticóides/citostáticos, desnutrição, etc).

Para obtenção das amostras, as gestantes foram informadas do conteúdo da pesquisa e da necessidade da coleta de sangue no pós-parto e de cotilédones placentários, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo nº0034/11.

3. 2 Coleta das amostras

Sangue de cordão umbilical: Aproximadamente 50 mL de sangue foram coletados em tubos heparinizados, logo após sua ligadura ou somente depois da dequitação da placenta com auxílio de agulha e seringa descartáveis. Cerca de 15 mL

de sangue foram coletados em tubo contendo EDTA e 5mL em tubo seco. As amostras foram armazenadas a 4 °C até serem transportadas ao laboratório.

Sangue periférico: Aproximadamente 15 mL de sangue periférico materno foram coletados, no pós-parto, em tubo heparinizado, 5 mL em tubo contendo EDTA e 5mL em tubo seco. O plasma coletado foi estocado a -70 ° C até a utilização.

Colostro: Amostras de colostro foram coletadas em até 48 h após o parto e submetidas a centrifugação por 15 min a 3000 g a 4 °C para deslipidação. A parte lipídica foi descartada, o sobrenadante foi estocado a -80 °C e o *pellet* celular procedido como descrito abaixo.

Tecido placentário: Foram retirados cotilédones da placenta logo após o parto, e transportados até o laboratório em solução salina. Foram lavados com esta mesma solução e separados aproximadamente 30 ug da decídua e da face fetal. Para os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) as amostras foram acondicionadas em RNA Later (Sigma, USA) e congeladas a -20 °C.

3.3 Obtenção de células mononucleares

As amostras de sangue periférico heparinizadas foram diluídas em solução fisiológica e centrifugadas por 30 min a 700 g em solução de gradiente de densidade Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) para obtenção das células mononucleares (CMN). As células obtidas foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e a concentração ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripán a 10%.

3.4 Análise da expressão dos fatores antivirais por PCR em tempo real

A avaliação dos fatores antivirais por PCR em tempo real foi realizada em CMN, colostro e tecido placentário. O tecido foi submetido à maceração com o uso do TissueRuptor (Qiagen) e a extração de RNA total das células e do tecido foi obtido com o auxílio dos kits RNeasy Plus Mini Kit e QIAshredder (Qiagen, Alemanha) que conferem pureza e eliminação do DNA. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizada a metodologia do kit Sensiscript

RT Kit (Qiagen). Para a realização da reação de amplificação em tempo real foi utilizada, para cada amostra: 5 µL cDNA (30 ng/µL), 7 µL da solução SYBR® Green (Applied Biosystem) e 2 µL (10 µM) dos *primers* sense e anti-sense.

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Invitrogen:

APOBEC3F:

5'- TGGAAGTTGTAAAGCACCACTCA - 3' (forward)

5'- AGCACCTTTCTGCATGACAATG - 3' (reverse);

APOBEC3G:

5' - GGCTCCACATAAACACGGTTTC - 3' (forward)

5' - AAGGGAATCACGTCCAGGAA - 3' (reverse);

TRIM5 α

5'- CTGGCATCCTGGGCTCTCAAAGT-3' (forward)

5'- CATACCCCCAGGATCCAAGCAGTT-3' (reverse)

TRIM22

5'- GGTGAGGGGATCGTCAGTA -3' (forward)

5'- TTGGAACAGATTTTGGCTTC -3' (reverse)

α 1-defensina

5' - GCAAGAGCTGATGAGGTTGC- 3' (forward)

5' - GTTCCATAGCGACGTTCTTCC- 3' (reverse)

MxA

5'- AAGCTGATCCGCCTCCACTT-3' (forward)

5'- TGCAATGCACCCCTGTATACC -3' (reverse)

IFN- β

5'- GGCTGGCCCTGTGATATTTCTGTG -3' (forward)

5'- ACCTGGCTCTCCTCCTCCCTTCCT -3' (reverse)

Teterina

5'- CTGGGGATAGGAATTCTGGTGCTC-3' (forward)

5'- CTCGCTGTTGGCCTTGATGGTGAA -3' (reverse)

STING

5'-ATATCTGCGGCTGATCCTGC -3' (forward)

5'-GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT-3' (reverse)

GAPDH

5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (forward)

5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' (reverse)

A amplificação foi realizada no aparelho StepOne (Applied Biosystem) e os resultados foram avaliados pelo *threshold cycle* (Ct) do gene de interesse normalizado com o Ct do controle interno (GAPDH). O aumento da expressão do gene foi comparado em relação às células não estimuladas de acordo com a fórmula de Livak et al em 2001 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

3.5 Análise da expressão de proteínas por *immunoblotting*

A análise da expressão de APOBEC3G, APOBEC3F e TRIM5 α e β -actina (como controle interno) por *immunoblotting* foi realizada a partir de CMN e de fragmentos de tecido placentário (decídua e face fetal). A obtenção de proteínas foi feita utilizando a solução de lise contendo: Tris pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%, Nonidet Np40 1%, H₂O ultrapura e inibidor de Protease (Roche, Basileia, Suíça) adicionado no momento do uso. A amostra foi homogeneizada com a solução de lise e incubada no gelo por 30 minutos, centrifugada a 13000 rpm a 4 °C por 10 minutos para ressuspensão das proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada por BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, USA) e estocada a -70 °C. O sistema de corrida utilizado foi NuPage (Invitrogen, USA) com adição de ditiotritol (DTT – 500 mM) e LDS (dodecil sulfato de lítio pH de 8,4) (Invitrogen) sob o tampão de corrida MES SDS (Invitrogen) e com o marcador de peso molecular Novex Sharp pre-stain (Invitrogen) as condições de corrida foram 200 V / 40 minutos. A transferência do gel foi realizada com o sistema iblot (Invitrogen). A membrana foi bloqueada com 1 g de leite desnatado em tampão TRIS e 0,05% de Tween 20, por 2 horas sob agitação. Foi adicionado o Ac primário monoclonal anti-Apobec 3G (Abcam, USA, 1:100), policlonal anti-Apobec 3F (Abcam, USA, 1:160) ou policlonal anti-TRIM 5 α (Abcam, USA, 1:100), incubado por 18 horas a 4°C sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos sob agitação constante com a solução de TBS, foi incubada por 1 hora com Ac secundário (peroxidase) (Amersham), sendo anti-coelho para as proteínas alvo e anti-camundongo para o controle interno. Após outra etapa de lavagem foi adicionado à membrana o reagente revelador Western Lightning ECL (Perkin Elmer) para APOBEC3G, APOBEC3F e β -actina e para e TRIM5 α SuperSignal West Dura (Thermo) conforme instruções do fabricante. A membrana foi exposta ao filme CL-XPosure (Thermo) por 10 min para APOBEC e 30

segundos para β -actina e TRIM5 α . Após a exposição, as membranas, previamente lavadas com TBS, foram submetidas à reação de *stripping* com Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo) para detecção da proteína de controle interno. As membranas foram reveladas com o auxílio do aparelho de revelação de radiografia, escaneadas pelo Gel Doc EZ e analisadas no Image Lab Software, (Biorad). Os valores foram expressos em intensidade de densidade e são normalizados com controle interno.

3. 6 Dosagem de CCL5 e MIP1- α por ELISA

A determinação de RANTES/CCL5 e MIP1- α nos soros foi realizada por ELISA seguindo as especificações do fabricante (Hycult Biotechnology, Netherlands). Resumidamente, microplacas com 96 poços (A-2, Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-CCL5 ou anti MIP1- α diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente (t.a.). As placas foram bloqueadas com PBS/BSA 4% (Sigma) e incubadas por uma hora à t.a. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com tampão PBS/0,05% Tween-20, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por uma hora à t.a. e, posteriormente, com os respectivos anticorpos anti-CCL5 ou anti MIP1- α biotinilados por 1 hora. Após as lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase (Sigma) seguida de uma incubação de 45 minutos, após novas lavagens, foi adicionado o substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB, Calbiochem, EUA). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA) com filtro de 450 nm.

3.7 Determinação de quimiocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA)

As dosagens de quimiocinas no colostro e soro foram realizadas pelo método Cytometric Bead Array (CBA), utilizando-se o kit Human Chemokine, (CXCL8, CXCL9, CCL2, CXCL10) (BD Pharmingen, CA, USA). Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas/quimiocinas e com o anti-

corpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300µL da solução de lavagem as amostras foram ressuspensas para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

3.8 Análise estatística

A comparação de dois grupos foi realizada pelo teste não paramétrico de *Mann Whitney* e a análise da cultura em condição espontânea (basal) comparada com a estimulada pelo teste pareado não paramétrico *Wilcoxon*. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando o erro alfa foi $\leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas das mães infectadas por HIV

As gestantes infectadas por HIV-1 apresentaram níveis indetectáveis de carga viral (CV) antes do parto (exceto a nº9) e as contagens de células CD4+ e CD8+ com média de 541 céls/mm³ e 817 céls/mm³, respectivamente. O NADIR – menor contagem de células CD4+ – durante a gestação teve media de 424 céls/mm³. Como preconizado pelo Ministério da Saúde, todas estavam em tratamento com medicamentos antirretrovirais durante a fase gestacional e durante o parto.

As gestantes controles (n=19) mostraram média de idade de 30,8 anos (de 23 a 36 anos) e foram submetidas à cesárea sem intercorrências durante o parto.

Tabela 1 – Dados demográficos de mães infectadas por HIV-1

ID	Idade	IG	CD4	CD8	NADIR (gestação)	CV
1	21	37,9	793	566	588	<50
2	36	37,7	345	760	250	<50
3	36	38,1	156	745	156	<50
4*	18	37,4	522	498	522	<50
5	36	37,8	540	713	376	<50
6	21	-	243	310	96	<50
7	32	38,3	392	662	376	<50
8	32	37,2	688	1053	405	<50
9	29	38,4	666	-	610	1911
10	21	37,3	856	725	491	<50
11	27	-	1132	721	1053	<50
12	22	-	517	474	517	<50
13*	20	37,4	327	734	279	<50
14*	18	-	828	2035	791	<50
15	28	37,9	656	1721	354	<50
18*	22	37,6	243	310	96	<50
17	29	36,0	-	-	-	-
18	26	37,7	588	-	404	<50
19	32	37,7	394	798	394	<50
20*	16	38,2	842	625	506	<50
21*	18	37,3	459	820	459	<50
22	24	37,7	326	-	326	<50
23	35	-	388	1246	280	<50
Médias	26,13	37,64	541	816,6	424	
DP	±6,45	±0,54	±245,8	±437,3	±218,5	

Nota: * Infectadas por transmissão vertical - As mães infectadas por HIV, nº 4, 13, 14, 16, 20 e 21, são filhas procedentes de mães infectadas por HIV-1.

4.2 Análise *ex vivo* da expressão de fatores antivirais em células mononucleares do sangue periférico de mães infectadas por HIV

Diversos fatores antivirais da imunidade inata desenvolvem um papel protetor contra o HIV, membros da família de citidinas desaminases, como APOBEC3G e 3F induzem hipermutações nas fitas de cDNA viral impossibilitando a integração ao genoma do hospedeiro (DANG *et al*, 2006). As proteínas intracelulares TRIM, também exercem um papel protetor, impedindo e bloqueando a evolução do ciclo de vida do vírus em diversas fases (HATZIOANNOU *et al.*, 2004). Fatores induzidos por IFN tipo I, como as proteínas de membrana celular MxA e teterinas agem impedindo a saída de vírions da célula hospedeira, impedido assim sua propagação e infecção em outras células (JOUVENET, *et al.*, 2009).

Desta forma foram selecionados estes fatores antivirais para serem analisados no binômio mãe-RN infectado por HIV. As amostras de células mononucleares (CMN), tecido placentário, colostro de mães infectadas por HIV e sangue do cordão umbilical (recém-nato, RN) foram comparadas com mães-RN controle não infectados por HIV.

Inicialmente, foi analisada a expressão de RNAm por PCR em tempo real para APOBEC3G, 3F, TRIM5 α , TRIM22, MxA, teterina, STING e IFN- β e a reação de *immunoblotting* para identificar APOBEC3G, 3F e TRIM5 α em CMN. A Figura 1 mostra que há aumento significativo da expressão de RNAm de APOBEC3G, APOBEC3F, TRIM5 α e TRIM22 no grupo de mães infectadas quando comparado ao grupo de mães controle. A expressão de RNAm de APOBEC3G e TRIM22 está diminuída no grupo de RN em relação ao grupo de mães saudáveis, mas no binômio mãe-RN infectado por HIV não houve expressão similar. Os níveis de STING, MxA e IFN- β estão aumentados no grupo de mães infectadas quando comparados ao grupo de mães controle (Figura 2), demonstrando uma resposta imune antiviral. A expressão de MxA e teterina aparece diminuída no grupo de RN quando comparado ao grupo de mães saudáveis, essa diferença não é vista no binômio infectado. Os resultados para α 1-defensina mostram uma inversão da expressão do fator entre os grupos mães e RN, em que a expressão foi superior no grupo de RN em relação às mães, seja no grupo controle ou infectado (Figura 2).

A expressão dos fatores antivirais foi positivamente correlacionada nas mães infectadas por HIV e recém-natos, em contraste com a fraca correlação entre os fatores no grupo controle (Tabela 2).

Além disto, foi avaliada a expressão da proteína já formada, por ensaios de *immunoblotting* em CMN de mães e RN, para APOBEC3G e 3F, que revelaram aumento da expressão de APOBEC3F em RN controle em relação às mães deste grupo (Figura 3). A expressão de TRIM5 α não foi detectável em CMN.

Os resultados evidenciam que há expressão ativa dos fatores antivirais nas mães infectadas por HIV, e que seus recém-natos expressam níveis similares e por vezes superiores aos adultos. Os resultados de *immunoblotting* são preliminares e necessitam de aumento do número amostral para confirmar os eventos.

Figura 1 - Expressão *ex vivo* de RNAm de APOBEC e TRIM em CMN de mães infectadas por HIV e seus recém-natos

CMN de mães infectadas por HIV (n=15) e RN (n=16) e de mães saudáveis (n=13-14) e RN (n=11-13) foram analisadas por PCR em tempo real. A expressão de: A) APOBEC3G, B) APOBEC3F, C) TRIM5α e D) TRIM22 está representada como mediana. *p≤ 0,05, **p≤0,01 quando comparado ao grupo controle, +p≤ 0,05, ++**p≤0,01 quando comparado com o grupo de mães.

Figura 2 - Expressão *ex vivo* de RNAm de fatores antivirais em CMN de mães infectadas por HIV e seus recém-natos.

CMN de mães infectadas por HIV (n=15) e RN (n=16) e de mães saudáveis (n=13-14) e RN (n=11-13) foram analisadas por PCR em tempo real. A expressão de: A) $\alpha 1$ -Defensina, B) Teterina, C) MxA, D) IFN- β e E) STING está representada como mediana. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle, + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$ quando comparado com o grupo de mães.

Figura 3 - Expressão *ex vivo* da proteína APOBEC em CMN de mães infectadas por HIV e seus recém-natos

0251803648251802624251801600

CMN de mães infectadas por HIV (n=2) e RN (n=3) e de mães saudáveis (n=7) e RN (n=6) foram analisadas por PCR em tempo real. As figuras A e C, B e D ilustram a expressão de APOBEC3G e 3F, respectivamente, e de β-actina (controle interno) de mães controle (-) e infectadas por HIV (+) e recém-nato. Os dados estão representados como mediana.

Tabela 2 – Correlação da expressão de APOBEC3G em relação aos fatores anti-virais

	APO3F	T5 α	T22	α -1	MXA	INF- β	Tet	STING
Mãe Controle	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
Mãe HIV+	***	***	**	*	***	***	***	ns
RN Controle	**	***	ns	ns	ns	**	ns	ns
RN Exposto	***	***	***	ns	***	***	***	***

Nota: Abreviaturas:

APO3F: APOBEC3F

T5 α : TRIM5 α

T22: TRIM22

α -1: α -1 defensina

Tet: teterina

*p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ns= não significativo

4.3 Análise *ex vivo* da expressão de fatores antivirais no tecido placentário de mães infectadas por HIV

Prosseguindo com as avaliações, foi realizada a análise da expressão dos fatores antivirais *in situ*, no local de crescimento fetal (face fetal da placenta) e no sítio onde há imunorregulação (decídua). Os fragmentos da placenta foram submetidos a duas etapas da expressão, pós-transcricional (RNAm) e pós-traducional (proteína) por PCR em tempo real e *immunoblotting*, respectivamente.

A Figura 4 mostra que houve diferença de expressão apenas para α 1-defensina, onde na decídua infectada há diminuição dos níveis quando comparada com decídua de mães controle. Já a expressão de teterina e α 1-defensina está diminuída na face fetal das placentas controles em relação à decídua, o que não ocorre no tecido infectado. A expressão de IFN- β está aumentada na face fetal da placenta infectada quando comparada com a decídua, esse aumento, também não é acompanhado no tecido saudável.

A avaliação da expressão da proteína, por *immunoblotting*, mostra diminuição da expressão de APOBEC3G (Figura 5B) em decíduas de mães infectadas por HIV em relação ao grupo de decíduas de mãe controle. Este resultado mostra que na infecção por HIV há alteração de APOBEC3G na fase pós-traducional da proteína, mas não altera os níveis transcricionais.

A expressão da proteína APOBEC3F é aproximadamente três vezes inferior ao de APOBEC3G e não difere entre os grupos (Fig 6B). A expressão de APOBEC3F da decídua e da face fetal são semelhantes.

A Figura 7B mostra que a expressão de TRIM5 α da face fetal de mães infectadas por HIV está diminuída em relação ao grupo controle.

Os resultados mostram que os perfis traducionais dos fatores antivirais da decídua e face fetal são distintos, bem como do obtido com células mononucleares do sangue periférico.

Figura 4 - Expressão *ex vivo* de RNAm de fatores antivirais em tecido placentário de mães infectadas por HIV e seus recém-natos

Decidua de mães infectadas por HIV (n=12-13) e face fetal (n=12-13) e decidua de mães saudáveis (n=10) e face fetal (n=9) foram analisadas por PCR em tempo real. A expressão de: A) APOBEC3G, B) TRIM5 α , C) α 1-Defensina, D) IFN- β , E) Teterina e F) STING está representada como mediana. *p $\leq$ 0,05 quando comparado ao grupo controle, +p $\leq$ 0,05, ++p $\leq$ 0,01 quando comparado com o grupo respectivo de mães.

Figura 5 - Expressão *ex vivo* da proteína APOBEC3G em tecido placentário de mães infectadas por HIV e seus recém-natos.

Decídua de mães infectadas por HIV (n=5) e face fetal (n=4) e decídua de mães saudáveis (n=6) e face fetal (n=6) foram analisadas por *immunoblotting*. A) Ilustra a expressão APOBEC3G e de β-actina (controle interno) de decídua de mães controle (-) e infectadas por HIV (+) e da face fetal da placenta. Os dados estão representados como média. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 6 - Expressão *ex vivo* da proteína APOBEC3F em tecido placentário de mães infectadas por HIV e seus recém-natos.

Decídua de mães infectadas por HIV (n=5) e face fetal (n=5) e decídua de mães saudáveis (n=6) e face fetal (n=6) foram analisadas por *immunoblotting*. A) Ilustra a expressão APOBEC3F e de β -actina (controle interno) de decídua de mães controle (-) e infectadas por HIV (+) e da face fetal da placenta. Os dados estão representados como média.

Figura 7 - Expressão *ex vivo* da proteína TRIM5 α em tecido placentário de mães infectadas por HIV e seus recém-natos.

Decídua de mães infectadas por HIV (n=5) e face fetal (n=5) e decídua de mães saudáveis (n=5) e face fetal (n=5) foram analisadas por *immunoblotting*. A) Ilustra a expressão TRIM5 α e de β -actina (controle interno) de decídua de mães controle (-) e infectadas por HIV (+) e da face fetal da placenta. Os dados estão representados como média. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.4 Análise *ex vivo* da expressão de fatores antivirais no colostro de mães infectadas por HIV

As células do colostro de mães infectadas e controles foram isoladas e as expressões de RNAm para os fatores antivirais foram analisadas. Apesar da pequena amostragem, pode-se observar que a expressão de teterina e IFN- β está aumentada nas mães infectadas em relação às mães controle (Figura 8).

Figura 8. Expressão *ex vivo* de fatores antivirais em células do colostro de mães infectadas por HIV.

Células do colostro de mães infectadas por HIV (n=2-6) e de mães saudáveis (n=6-9) foram analisadas por PCR em tempo real. A expressão de: A) APOBEC3G, B) TRIM5 α , C) α 1-Defensina, D) IFN- β e E) Teterina está representada como média. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.5 Análise da secreção de citocinas no soro de mães infectadas por HIV e recém-natos

A determinação de IP-10, MCP-1, MIG e IL-8 no soro das mães e seus RNs foi avaliado por citometria de fluxo pelo método de cytometry bead array (CBA). E RANTES foi avaliado por ELISA.

A Figura 9 mostra diminuição dos níveis de IP-10, MCP-1 e IL-8 no soro de RN de mães infectadas comparado com o grupo de RN de mães controle. Essa diminuição de IL-8 também foi detectada no soro de mães infectadas comparado com o grupo saudável. Além disto, os níveis de MCP-1 e IL-8 estão elevados nos RNs comparados com o seu grupo de mãe controle diferença que não foi observada para IL-8 no binômio infectado. Ainda a diminuição de IP-10 no RN em relação a mãe infectada não foi observada no binômio saudável. Foram detectados níveis aumentados de RANTES no soro de RN expostos comparados com grupo controle, e diminuídos em RN controle comparados com o grupo de mães, o que não foi visto no binômio infectado.

Figura 9 - Dosagem de citocinas no soro de mães infectadas por HIV e seus recém-natos.

Soro de mães infectadas por HIV (n=21-23) e RN (n=21-23) e de mães saudáveis (n=20-21) e RN (n=20-21) foram analisadas por CBA e E) ELISA. A expressão de: A) IP-10, B) MCP-1, C) MIG, D) IL-8 e E) RANTES (ELISA) está representada como mediana. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle, + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$, +++ $p \leq 0,001$ quando comparado com o grupo respectivo de mães.

4.6 Análise da secreção de citocinas no colostro de mães infectadas por HIV

A determinação de quimiocinas IP-10, MCP-1, MIG, CCL-5 (RANTES) e IL-8 no colostro foi avaliada por citometria de fluxo (CBA). A dosagem de CCL-5 (RANTES) também foi realizada por ELISA.

Os níveis de IP-10, MCP-1, MIG e IL-8 foram semelhantes entre os grupos analisados (Figura 10). Contudo, os níveis de CCL-5 foram diminuídos no colostro de mães infectadas comparado com o grupo controle, seja quando mensurados por CBA (Figura 11A), ou ELISA (Figura 11B).

Figura 10 - Dosagem de citocinas no colostro de mães infectadas por HIV

Colostro de mães infectadas por HIV (n=4-6) e de mães saudáveis (n=5-11) foram analisadas por CBA. A expressão de: A) IP-10, B) MCP-1, C) MIG e D) IL-8 está representada como mediana.

Figura 11 - Dosagem de RANTES no colostro de mães infectadas por HIV

Colostro de mães infectadas por HIV (n=5-6) e de mães saudáveis (n=10-11) foram analisadas por A) citometria de fluxo (CBA) e B) ELISA e estão representadas como mediana. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados, em mães infectadas por HIV e seus recém-natos, fatores de resposta inata que participam da defesa antiviral em diferentes compartimentos, como nas células mononucleares, células do sítio da interface materno-fetal e em células do colostro.

Na coorte de parturientes infectadas por HIV-1, todas estavam em tratamento antirretroviral, sendo que apenas 5/20 tiveram NADIR de células T CD4+ na gestação < 300/mm³. A gestação foi a termo, sendo o tempo médio de 37,54 semanas. Chama atenção que o tempo de diagnóstico de 5/23 foi a idade atual das pacientes, pois eram filhas de mães infectadas por HIV-1 (Anexo 1). Apesar de 22% das mães infectadas por HIV serem provenientes de transmissão vertical, não temos dados se a primeira geração de mães foi submetida ao tratamento. É possível que as mães não tenham recebido tratamento, considerando que no Brasil o consenso da obrigatoriedade de tratamento ocorreu a partir de 1998. Nas avaliações dos resultados foram consideradas essas peculiaridades, contudo, não houveram alterações específicas, seja da carga viral, contagem de CD4+ ou na expressão dos fatores antivirais.

Os fatores antivirais foram selecionados pela atuação nas diversas fases do ciclo viral, desde a entrada até o brotamento viral. A plataforma de fatores antivirais analisada, APOBEC3G, APOBEC3F, TRIM5 α , TRIM22, STING, MxA e IFN- β mostrou aumento de expressão nas CMN de mães infectadas em relação as mães controle. A expressão desses fatores foi positivamente correlacionada nas mães infectadas por HIV, em contraste com a fraca correlação entres os fatores no grupo controle. Até o momento não há evidência de estudos sobre a expressão desses fatores em parturientes infectadas por HIV e até mesmo em mães e RN não infectados. Entretanto, em indivíduos expostos e não infectados por HIV de uma coorte do Senegal, com parceiros infectados tratados, mostram similar expressão de RNAm e de níveis de proteoma de APOBEC3G, TRIM α e teterina em relação ao grupo controle (MOUS et al., 2012). Em contraste, há relato de que indivíduos expostos não infectados por HIV possuam aumento de expressão de APOBEC3G em relação a indivíduos saudáveis. Contudo, após o tratamento dos parceiros infectados, há uma diminuição da expressão de APOBEC3G dos indivíduos expostos. Esses dados sugerem que, mesmo na ausência da infecção, a exposição ao HIV pode induzir a ex-

pressão de APOBEC3G em CMN. A cessação da exposição ou o avanço da doença podem diminuir a expressão de APOBEC3G (VÁZQUEZ-PÉREZ et al., 2009). Esse contraste de dados pode ter uma relação direta do estágio de infecção do parceiro infectado, na qual, o sexo sem proteção e carga viral são os fatores que engatilham a expressão de APOBEC3G. No indivíduo infectado por HIV há aumento na expressão de IFN- β , MxA e TRIM22 comparados aos saudáveis (SINGH et al., 2011).

Em nossos dados, as CMN de RN de mães infectadas por HIV-1 mostraram elevada expressão de APOBEC 3G e 3F, o que evidencia que tenham sido expostas ao HIV no microambiente uterino.

Além disto, a expressão dos fatores antivirais nas CMN de mães não infectadas detectada em nosso estudo foi muito baixa, não só para APOBEC, mas também para TRIMs e teterina. É importante verificar o perfil de expressão dos fatores antivirais na condição não gestante, para compreender se a baixa expressão é decorrente a um padrão da gestação ou de não exposição viral.

Níveis similares de expressão APOBEC3G, TRIM22, MxA e teterina foram detectados nos grupos de mães infectadas por HIV e seus RNs. Em contraste, no binômio não infectado os RN mostraram expressão diminuída dos fatores antivirais. Chama atenção que fatores como α 1-defensina foram mais acentuados nos RN, de ambos os grupos estudados, do que os adultos. Ainda não há estudos com recém-natos e é possível que o aumento desse peptídeo seja característico dessa fase inicial de vida. Em um estudo com mulheres sexualmente expostas e não infectadas com HIV não foi observada diferenças na expressão de α 1-defensinas em relação a adultos não expostos (TRABATTONI et al., 2004).

Esses dados mostram que na infecção por HIV, as células do cordão umbilical, composta em grande maioria por células de perfil naive, possuem ativação dos fatores antivirais em níveis equivalentes ao adulto. Apesar da carga viral indetectável das mães infectadas, é possível que os RNs possam ter sido expostos ao vírus, ou aos seus fatores e assim, ter ativado a expressão dos fatores antivirais. Esses dados mostram que a resposta imune inata antiviral, está íntegra e induzível mesmo durante o período de desenvolvimento fetal. Até o momento, não há evidências na literatura sobre os fatores antivirais no período neonatal, e salienta a importância da ativação da imunidade inata considerando o desenvolvimento mais lento da resposta a-

daptativa nesta fase de vida (ADKINS et al., 2004). Além disto, na gestação, vários fatores de imunorregulação estão ativos, em defesa à manutenção do feto semi-alogênico como também, os relacionados com proteção às infecções, sejam bacterianas ou virais.

Apesar da quantitativa e qualitativa imaturidade imunológica no período neonatal (DE BRITO et al., 2009) a expressão de RNAm para alguns fatores de resposta inata antiviral, estão íntegras, entretanto, se fez necessário avaliar o nível da expressão da proteína. Contudo, a análise proteômica dos fatores em CMN do binômio mãe-RN infectado por HIV precisa ser ampliado.

No tecido placentário foram analisadas as expressões de fatores antivirais em dois fragmentos distintos: na decídua, onde há componentes maternos, e na face fetal (HUANG et al., 2009). Não foi observada alteração para nenhum dos fatores analisados entre os grupos controle e infectado, em contraste com os dados de expressão transcricional em CMN. De fato, a decídua é um sítio de privilégio imunológico, com peculiaridades e tipos celulares bem distintos aos encontrados no sangue periférico, onde, entre as células imunes, as mais encontradas são as células NK uterinas e, em menor proporção, de macrófagos, células dendríticas e células T (KING et al., 1989).

No vilo do tecido placentário de mães infectadas por HIV, os níveis de expressão de IFN- β foram mais elevados do que encontrado na decídua. Apesar de que os fatores antivirais serem induzíveis por IFN tipo I, não houve aumento de expressão dos fatores nesse sítio, diferente das CMN do sangue periférico. Ainda não está determinado se no vilo das placentas de mães infectadas pode ser reservatório de HIV, assim poderia ocorrer maior expressão de IFN. O TLR 7 e TLR8 reconhecem a simples fita de RNA viral do HIV, e a ativação do fator regulador de interferon, IRF-7 e consequentemente da produção de IFN tipo I. Contudo, os macrófagos da placenta são permissivos ao HIV, e estas células são mais presentes na decídua (GARCÍA-CRESPO et al., 2010). É proposta avaliar carga proviral no tecido placentário, bem como a expressão das proteínas APOBEC3G, TRIM5 α e teterina em linfócitos TCD8 e TCD4+ e associar com perfil de ativação celular entre os grupos de estudo.

A expressão da proteína APOBEC3G no grupo de RN controle está diminuída em relação ao grupo de mães, similarmente aos dados nas análises de expressão

de RNAm. Por outro lado, no grupo de mães infectadas por HIV há uma significativa diminuição da proteína APOBEC3G na decídua. Uma das hipóteses pode estar relacionada ao sistema de escape viral do HIV realizado por sua proteína acessória vif, que ubiquitina e promove a degradação de APOBEC3 (MEHLE et al., 2004). Contudo, apesar do APOBEC3G e APOBEC3F serem da mesma família de citidinas desaminases, houve apenas a diminuição da expressão de APOBEC3G, mas não de 3F, que pode ser devido a maior atividade do vif contra APOBEC3G (BINKA et al., 2012). Além disto, a expressão de APOBEC3G é superior ao de 3F na decídua, que pode favorecer a ação dos proteossomos. A presença de HIV no tecido placentário, apesar da alta vascularização, precisa ainda ser determinada. Além disto, o APOBEC3G é um fator antiviral que inibe a replicação de retrovírus endógeno e exógeno, como também de hepatite B (WICHROSKI et al., 2006). É possível que a diminuição da expressão da proteína APOBEC3G, também seja resultante da atuação de retrovírus endógenos.

As amostras de células do colostro mostraram aumento na expressão do RNAm de teterina nas mães infectadas em comparação ao grupo controle. É provável que o aumento de IFN- β nesse compartimento, tenha induzido a expressão de teterina. Esses dados, apesar da baixa amostragem, estão de acordo com achados que mostram aumento de teterina em CMN de indivíduos infectados por HIV-1 durante a fase aguda da infecção (HOMANN et al., 2011). Apesar da prática de aleitamento materno não ser indicada pelo Ministério da Saúde nos casos de infecção pelo HIV, pois o vírus pode ser veiculado pelo leite, é sem dúvida, este alimento natural é um mecanismo de proteção ao neonato. Um dos fatores de maior morbidade das crianças expostas não infectadas de mães infectadas por HIV, pode estar relacionado com a ausência de aleitamento materno (KUHN et al., 2010).

A β -quimiocina CCL5 (RANTES), ligante natural do receptor CCR5, tem sido associada à proteção ao HIV por competir, com o vírus, pelo sítio de entrada na célula hospedeira (COCCHI et al., 1995). Os níveis de CCL5 nas amostras de colostro de mães infectadas por HIV-1 foi significativamente diminuídos em relação às mães controles. Apesar da evidência de CCL5 ser considerada um competidor do vírus, elevados níveis no leite do 5º dia ao 3º mês pós-parto tem sido associado com transmissão vertical (BOSIRE et al., 2007). Em nosso estudo, é possível que os baixos níveis de CCL5 no colostro de mães infectadas possam representar o menor po-

tencial de infectividade das mães, considerando que nossa coorte de mães infectadas estava sob tratamento possuíam carga viral indetectável. Em contraste, os níveis séricos estavam elevados nos RN expostos em relação ao grupo controle. A produção de CCL5 induzida por peptídeo *env* do HIV por CMN de neonatos infectados, expostos e controle, mostra aumento dessa quimiocina na coorte exposta em relação aos infectados e controle (WASIK et al., 1999). Além disso, houve uma correlação positiva entre o aumento gradual de CCL5 nos infectados com progressão lenta e diminuição nas crianças com aids. Esses dados sugerem que os níveis séricos de CCL5, pode ter uma relação protetora enquanto que em mucosas e leite pode ter relação com transmissão vertical.

As quimiocinas, IP-10, MCP-1 e IL-8 foram detectadas diminuídas no soro de RN de mães infectadas comparado com grupo controle, que pode estar relacionada com menor possibilidade de infecção. O aumento dos níveis de IP-10 dos RN controle em relação ao indivíduo adulto, o que não acontece no binômio infectado, revela que a presença do vírus na mãe torna o RN mais imunocompetente para infecções virais. De fato, a IP-10, quimiocina pró-inflamatória, secretada por diversos tipos celulares, está associada com a progressão do HIV (JIAO et al., 2012). Há uma relação da IP-10 com aumento da replicação viral em linfócitos e macrófagos derivados de monócitos de CMN e a neutralização de IP-10 endógeno ou o bloqueio do seu receptor, CXCR3, reduz a replicação do HIV (LANE et al., 2003).

A MCP-1/CCL2, uma quimiocina pró-inflamatória quimiotática para macrófagos e células T CD4+, secretadas por monócitos, é induzida pela infecção viral pelo HIV (MENGOZZI et al., 1999), o que faz com que monócitos sejam considerados potentes reservatórios virais (CINQUE et al., 1998). Além disto, o MCP-1 regula a polarização de Th0 para Th2, favorecendo a expressão de CXCR4 em células TCD4+ o que a torna permissiva para a entrada do vírus (JOURDAN et al., 1998), podendo levar a mudança de tropismo viral de R5 para X4 (CAMPBELL et al., 2007).

Similarmente, a quimiocina, IL8/CXCL8, foi detectada diminuída em RN e mães infectadas comparados com o grupo saudável, nos indicando que na infecção há uma regulação da produção de IL-8 das gestantes que reflete no RN. A IL-8 pode estimular a replicação do HIV em macrófagos derivados de monócitos e linfócitos TCD4+ hospedeiras e anticorpos neutralizantes ou bloqueadores do receptor dessa

quimiocina, CXCR1 E CXCR2, podem inibir a replicação viral nas células hospedeiras (LANE et al., 2001).

Em conjunto, os dados mostram que mesmo sob tratamento antirretroviral, as mães infectadas por HIV possuem ativação da expressão dos fatores antivirais e dos fatores considerados de “restrição antiviral”. Vale ressaltar que o sítio da interface materno-fetal também é capaz de expressar intensamente os fatores antivirais, seja na decídua ou face fetal. É possível que a elevada expressão dos fatores antivirais pelos RN de mães infectadas sejam possíveis correlatos de proteção à infecção.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- as mães infectadas por HIV e os RN expostos possuem intensa expressão de fatores antivirais, em níveis similares entre eles. Esses dados evidenciam que houve exposição *in utero* aos fatores indutores da imunidade inata antiviral e que os RNs são potencialmente capazes de expressá-los;
- a placenta, órgão de interface materno-fetal e sítio de privilégio imunológico, expressa elevados níveis transcricionais dos fatores antivirais, seja na decídua ou face fetal. Entretanto, há um déficit na expressão proteica, para APOBEC 3G e TRIM5 α , o que indica um distúrbio pós-traducional neste compartimento;
- a alteração dos níveis das quimiocinas RANTES, MCP-1 e IL-8 séricas, nos RN expostos e no colostro de mães infectadas, pronunciam uma tentativa de escape viral;
- é possível que a expressão dos fatores antivirais constitutivos ou induzíveis nas mães infectadas por HIV seja correlato de proteção à infecção e, em face ao tratamento antirretroviral, a exposição viral induza precocemente a resposta inata antiviral do feto.

REFERÊNCIAS*

- ADKINS, B. et al. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nat Rev Immunol, v. 4, n. 7, p. 553-564. 2004.
- AGUILAR-JIMÉNEZ, W. et al. Differential expression of human beta defensins in placenta and detection of allelic variants in the DEFB1 gene from HIV-1 positive mothers. Biomedica, v. 31, n. 1, p. 44-54. 2011.
- AKINBI, H. T. et al. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol, v. 191, n. 6, p. 2090-2096. 2004.
- AN, P. et al. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. J Virol, v. 78, n. 20, p. 11070-11076. 2004.
- ARTHOS, J. et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. Nat Immunol, v. 9, n. 3, p. 301-309. 2008.
- BADOLATO, R. et al. Type I interferon-dependent gene MxA in perinatal HIV-infected patients under antiretroviral therapy as marker for therapy failure and blood plasmacytoid dendritic cells depletion. J Transl Med, v. 6, p. 49. 2008.
- BARR, S. D. et al. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. PLoS Pathog, v. 4, n. 2, p. e1000007. 2008.
- BARRÉ-SINOUSI, F. et al. Characterization and titration of an HIV type 1 subtype E chimpanzee challenge stock. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 13, n. 7, p. 583-591. 1997.
- BENTO, C. A. et al. IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. AIDS, v. 23, n. 1, p. 9-18. 2009.
- BERGER, E. A. et al. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol, v. 17, p. 657-700. 1999.
- BIASIN, M. et al. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. J Infect Dis, v. 195, n. 7, p. 960-964. 2007.
- BINKA, M. et al. The activity spectrum of Vif from multiple HIV-1 subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. J Virol, v. 86, n. 1, p. 49-59. 2012.
- BISHOP, K. N. et al. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. Curr Biol, v. 14, n. 15, p. 1392-1396. 2004.
- BJÖRNDAL, A. S. et al. Ebola virus infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells. BMC Microbiol, v. 3, p. 6. 2003.
- BLANCHE, S. et al. Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. Am J Dis Child, v. 144, n. 11, p. 1210-1215. 1990.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

- BOSIRE, R. et al. Longitudinal comparison of chemokines in breastmilk early postpartum among HIV-1-infected and uninfected Kenyan women. Breastfeed Med, v. 2, n. 3, p. 129-138. 2007.
- BOUR, S. et al. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. J Biol Chem, v. 276, n. 19, p. 15920-15928. 2001.
- BUHIMSCHI, I. A. et al. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. BJOG, v. 112, n. 2, p. 173-181. 2005.
- CAMPBELL, G. R. et al. Tat mutations in an African cohort that do not prevent transactivation but change its immunogenic properties. Vaccine, v. 25, n. 50, p. 8441-8447. 2007.
- CHANG, T. L. et al. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. J Clin Invest, v. 115, n. 3, p. 765-773. 2005.
- CHEN, H. et al. Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. Cell, v. 147, n. 2, p. 436-446. 2011.
- CHING, J. C. et al. Significance of the myxovirus resistance A (MxA) gene -123C>a single-nucleotide polymorphism in suppressed interferon beta induction of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. J Infect Dis, v. 201, n. 12, p. 1899-1908. 2010.
- CINQUE, P. et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. AIDS, v. 12, n. 11, p. 1327-1332. 1998.
- COCCHI, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science, v. 270, n. 5243, p. 1811-1815. 1995.
- DANG, Y. et al. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. J Virol, v. 80, n. 21, p. 10522-10533. 2006.
- DAVEY, R. T. 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, v. 96, n. 26, p. 15109-15114. 1999.
- DE BRITO, C. A. et al. Immune adjuvants in early life: targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response. Immunotherapy, v. 1, n. 5, p. 883-895. 2009.
- DE WITTE, L. et al. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 104, n. 49, p. 19464-19469. 2007.
- DE WITTE, L. et al. Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. Trends Mol Med, v. 14, n. 1, p. 12-19. 2008.
- DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. Immunity, v. 27, n. 3, p. 406-416. 2007.
- DOUGLAS, J. L. et al. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. J Virol, v. 83, n. 16, p. 7931-7947. 2009.

- DUBÉ, M. et al. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. PLoS Pathog, v. 6, n. 4, p. e1000856. 2010.
- ESCRIBESE, M. M. et al. Alpha-defensins 1-3 release by dendritic cells is reduced by estrogen. Reprod Biol Endocrinol, v. 9, p. 118. 2011.
- EVERETT, R. D.; CHELBI-ALIX, M. K. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. Biochimie, v. 89, n. 6-7, p. 819-830. 2007.
- FELLERMANN, K.; STANGE, E. F. Defensins -- innate immunity at the epithelial frontier. Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 13, n. 7, p. 771-776. 2001.
- GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol, v. 3, n. 9, p. 710-720. 2003.
- GANZ, T. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest, v. 76, n. 4, p. 1427-1435. 1985.
- GARCÍA-CRESPO, K. et al. Restricted HIV-1 replication in placental macrophages is caused by inefficient viral transcription. J Leukoc Biol, v. 87, n. 4, p. 633-636. 2010.
- GEFFIN, R. et al. Functional and structural defects in HIV type 1 nef genes derived from pediatric long-term survivors. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 16, n. 17, p. 1855-1868. 2000.
- GOLDSCHMIDT, V. et al. Role of common human TRIM5alpha variants in HIV-1 disease progression. Retrovirology, v. 3, p. 54. 2006.
- GUO, F. et al. Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. J Virol, v. 80, n. 23, p. 11710-11722. 2006.
- HARDER, G.; MCGOWAN, R. Isolation and characterization of the muscle-specific isoform of creatine kinase from the zebrafish, *Danio rerio*. Biochem Cell Biol, v. 79, n. 6, p. 779-782. 2001.
- HATZIOANNOU, T. et al. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 29, p. 10774-10779. 2004.
- HOLMES, R. K. et al. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. J Biol Chem, v. 282, n. 4, p. 2587-2595. 2007.
- HOMANN, S. et al. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. J Virol, v. 85, n. 20, p. 10659-10668. 2011.
- HUANG, Y. C. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. Stem Cell Rev, v. 5, n. 3, p. 247-255. 2009.
- HYGINO, J. et al. Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. Clin Immunol, v. 127, n. 3, p. 340-347. 2008.
- ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature, v. 455, n. 7213, p. 674-678. 2008.

ISHIKAWA, H. et al. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature, v. 461, n. 7265, p. 788-792. 2009.

JIANG, J. Q. et al. CD8+ T-cell-mediated cross-clade protection in the genital tract following intranasal immunization with inactivated human immunodeficiency virus antigen plus CpG oligodeoxynucleotides. J Virol, v. 79, n. 1, p. 393-400. 2005.

JIAO, Y. et al. Plasma IP-10 is associated with rapid disease progression in early HIV-1 infection. Viral Immunol, v. 25, n. 4, p. 333-337. 2012.

JIN, L. et al. MHC class II structural requirements for the association with Igalpha/beta, and signaling of calcium mobilization and cell death. Immunol Lett, v. 116, n. 2, p. 184-194. 2008.

JOURDAN, P. et al. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. J Immunol, v. 160, n. 9, p. 4153-4157. 1998.

JOUVENET, N. et al. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. J Virol, v. 83, n. 4, p. 1837-1844. 2009.

KING, A. et al. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. Cell Immunol, v. 118, n. 2, p. 337-344. 1989.

KING, A. E. et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta, v. 28, n. 2-3, p. 161-169. 2007.

KLOTMAN, M. E.; CHANG, T. L. Defensins in innate antiviral immunity. Nat Rev Immunol, v. 6, n. 6, p. 447-456. 2006.

KORBER, B. T. et al. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. AIDS, v. 9 Suppl A, p. S5-18. 1995.

KRISANAPRAKORNKIT, S. et al. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. Infect Immun, v. 66, n. 9, p. 4222-4228. 1998.

KUHN, L. et al. Interferon-gamma and interleukin-10 production among HIV-1-infected and uninfected infants of HIV-1-infected mothers. Pediatr Res, v. 50, n. 3, p. 412-416. 2001.

KUHN, L. et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cellular immune responses in newborns exposed to HIV in utero. Clin Infect Dis, v. 34, n. 2, p. 267-276. 2002.

KUHN, L. et al. Elevations in mortality associated with weaning persist into the second year of life among uninfected children born to HIV-infected mothers. Clin Infect Dis, v. 50, n. 3, p. 437-444. 2010.

LAMBERT, A. A. et al. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. Blood, v. 112, n. 4, p. 1299-1307. 2008.

LANE, B. R. et al. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. Virology, v. 307, n. 1, p. 122-134. 2003.

LANE, B. R. et al. Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy. J Virol, v. 75, n. 17, p. 8195-8202. 2001.

LEGRAND, F. A. et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. PLoS One, v. 1, p. e102. 2006.

LEHNER, T. et al. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. Vaccine, v. 26, n. 24, p. 2997-3001. 2008.

MANGEAT, B. et al. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. PLoS Pathog, v. 5, n. 9, p. e1000574. 2009.

MARCUS, H. et al. T cells from newborn humans are fully capable of developing into cytotoxic T lymphocyte effector cells in adoptive hosts. Transplantation, v. 73, n. 5, p. 803-810. 2002.

MAYAUX, M. J. [HIV transmission from mother to child: risk factors, period, prevention. Groupe Français d'études de l'infection VIH du nouveau-né]. Arch Pediatr, v. 3 Suppl 1, p. 17s-19s. 1996.

MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. J Exp Med, v. 200, n. 6, p. 761-770. 2004.

MEHLE, A. et al. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. J Biol Chem, v. 279, n. 9, p. 7792-7798. 2004.

MENGOZZI, M. et al. Human immunodeficiency virus replication induces monocyte chemotactic protein-1 in human macrophages and U937 promonocytic cells. Blood, v. 93, n. 6, p. 1851-1857. 1999.

MENZIES, B. E.; KENOYER, A. Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. Infect Immun, v. 74, n. 12, p. 6847-6854. 2006.

MERONI, G.; DIEZ-ROUX, G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. Bioessays, v. 27, n. 11, p. 1147-1157. 2005.

MEYLAN, P. R. et al. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. Virology, v. 193, n. 1, p. 138-148. 1993.

MIYAGI, E. et al. Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, n. 8, p. 2868-2873. 2009.

MOUS, K. et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. PLoS One, v. 7, n. 3, p. e33934. 2012.

NAHMIAS, A. J.; KOURTIS, A. P. The great balancing acts. The pregnant woman, placenta, fetus, and infectious agents. Clin Perinatol, v. 24, n. 2, p. 497-521. 1997.

NAKASHIMA, H. et al. Defensins inhibit HIV replication in vitro. AIDS, v. 7, n. 8, p. 1129. 1993.

NEIL, S. J. et al. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. PLoS Pathog, v. 2, n. 5, p. e39. 2006.

- NEIL, S. J. et al. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature, v. 451, n. 7177, p. 425-430. 2008.
- NISOLE, S. et al. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. Nat Rev Microbiol, v. 3, n. 10, p. 799-808. 2005.
- OZATO, K. et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. Nat Rev Immunol, v. 8, n. 11, p. 849-860. 2008.
- OZEL, M. et al. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. Arch Virol, v. 100, n. 3-4, p. 255-266. 1988.
- PATNI, S. et al. Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. Biol Reprod, v. 80, n. 2, p. 243-248. 2009.
- PAUL, M. E. et al. Predictors of immunologic long-term nonprogression in HIV-infected children: implications for initiating therapy. J Allergy Clin Immunol, v. 115, n. 4, p. 848-855. 2005.
- PEREZ-CABALLERO, D. et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. Cell, v. 139, n. 3, p. 499-511. 2009.
- PERTEL, T. et al. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. Nature, v. 472, n. 7343, p. 361-365. 2011.
- PLINER, V. et al. Incubation period of HIV-1 in perinatally infected children. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. AIDS, v. 12, n. 7, p. 759-766. 1998.
- PONTING, C. et al. SPRY domains in ryanodine receptors (Ca(2+)-release channels). Trends Biochem Sci, v. 22, n. 6, p. 193-194. 1997.
- QUAYLE, A. J. et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. Am J Pathol, v. 152, n. 5, p. 1247-1258. 1998.
- RAHM, N.; TELENTI, A. The role of tripartite motif family members in mediating susceptibility to HIV-1 infection. Curr Opin HIV AIDS, v. 7, n. 2, p. 180-186. 2012.
- REICHE, E. M. et al. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). Curr Med Chem, v. 14, n. 12, p. 1325-1334. 2007.
- REYMOND, A. et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. EMBO J, v. 20, n. 9, p. 2140-2151. 2001.
- RICHARDSON, B. A. et al. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 viral loads in Kenyan women, men, and infants during primary and early infection. J Virol, v. 77, n. 12, p. 7120-7123. 2003.
- RIGATO, P. O. et al. Maternal immunization to modulate the development of allergic response and pathogen infections. Immunotherapy, v. 1, n. 1, p. 141-156. 2009.
- ROUSSEAU, C. M. et al. CCR5del32 in perinatal HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v. 16, n. 4, p. 239-242. 1997.

- SAITOH, T. et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, n. 49, p. 20842-20846. 2009.
- SAWYER, S. L. et al. Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals. PLoS Pathog, v. 3, n. 12, p. e197. 2007.
- SEWRAM, S. et al. Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. J Infect Dis, v. 199, n. 11, p. 1657-1663. 2009.
- SHAPIRO, R. L. et al. Infant morbidity, mortality, and breast milk immunologic profiles among breast-feeding HIV-infected and HIV-uninfected women in Botswana. J Infect Dis, v. 196, n. 4, p. 562-569. 2007.
- SINGH, R. et al. Association of TRIM22 with the type 1 interferon response and viral control during primary HIV-1 infection. J Virol, v. 85, n. 1, p. 208-216. 2011.
- SØRENSEN, O. E. et al. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. J Immunol, v. 174, n. 8, p. 4870-4879. 2005.
- SUN, C. M. et al. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. Immunity, v. 22, n. 4, p. 467-477. 2005.
- SVINARICH, D. M. et al. Detection of human defensins in the placenta. Am J Reprod Immunol, v. 38, n. 4, p. 252-255. 1997.
- TRABATTONI, D. et al. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 35, n. 5, p. 455-463. 2004.
- ULENGA, N. K. et al. The level of APOBEC3G (hA3G)-related G-to-A mutations does not correlate with viral load in HIV type 1-infected individuals. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 24, n. 10, p. 1285-1290. 2008.
- VAN DAMME, N. 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, v. 3, n. 4, p. 245-252. 2008.
- VÁZQUEZ-PÉREZ, J. A. et al. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. Retrovirology, v. 6, p. 23. 2009.
- VIGANO, A. et al. Immune activation and normal levels of endogenous antivirals are seen in healthy adolescents born of HIV-infected mothers. AIDS, v. 21, n. 2, p. 245-248. 2007.
- VON SYDOW, M. et al. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 7, n. 4, p. 375-380. 1991.
- WASIK, T. J. et al. Protective role of beta-chemokines associated with HIV-specific Th responses against perinatal HIV transmission. J Immunol, v. 162, n. 7, p. 4355-4364. 1999.
- WATSON, R. O. et al. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. Cell, v. 150, n. 4, p. 803-815. 2012.

WICHROSKI, M. J. et al. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. PLoS Pathog, v. 2, n. 5, p. e41. 2006.

WINCHESTER, R. et al. Mother-to-child transmission of HIV-1: strong association with certain maternal HLA-B alleles independent of viral load implicates innate immune mechanisms. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 36, n. 2, p. 659-670. 2004.

WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science, v. 280, n. 5371, p. 1884-1888. 1998.

ZHANG, L. et al. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. Science, v. 298, n. 5595, p. 995-1000. 2002.

ZHAO, C. et al. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett, v. 396, n. 2-3, p. 319-322. 1996.

ZHONG, B. et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. Immunity, v. 29, n. 4, p. 538-550. 2008.

ANEXO 1

ID	Idade (anos)	IG (semanas)	ARV	Tempo de Infecção (anos)	Peso RN (g)	Sexo RN	Peso Placenta (g)	G	P	A
1	21	37,9	Biovir + Kaletra	-	2500	F	330	1	0	0
2	36	37,7	Tenofovir + Atazanavir + Ritonavir + Biovir	12	2750	F	sem dados	4	3	0
3	36	38,1	Biovir + Ritonavir + Kaletra	13	3260	F	440	4	3	1
4	18	37,4	Tenofovir + Atazanavir + Kaletra	18	2380	M	590	1	0	0
5	36	37,8	Biovir + Kaletra	2	2880	M	sem dados	8	3	4
6	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	32	38,3	AZT + Kaletra	3	3070	F	740	2	1	0
8	32	37,2	Biovir + Kaletra	5	3430	F	670	3	2	1
9	29	38,4	Biovir + Nevirapina	5	3420	M	sem dados	4	0	3
10	21	37,3	Biovir + Kaletra	0	3130	M	490	2	0	1
11	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	20	37,4	Kaletra + Lamivudina + Raltegravir + Tenofovir	19	2600	M	560	1	0	0
14	18	-	Abacavir + Lamivudina + Kaletra	16	2830	F	390	1	0	0
15	28	37,9	Biovir + Nevirapina	1	2900	F	500	3	1	1
16	22	37,6	Biovir + Kaletra + Tenofovir	22	2480	M	350	1	0	0
17	29	36,0	Biovir + Nevirapina	7	2294	F	810	3	0	2
18	26	37,7	Biovir + Kaletra	0	2400	F	360	1	0	0
19	32	37,7	AZT + Lamivudina + Tenofovir	13	2850	F	500	5	2	2

20	16	38,2	Biovir + Kaletra + Tenofovir	16	3060	M	650	1	0	0
21	18	37,3	Tenofovir + Biovir + Raltegravir + Dourinavir + Ritonavir	18	2720	F	480	1	0	0
22	24	37,7	Biovir + Kaletra	0	3120	F	760	3	2	0
23	35		Biovir + Nevirapina		1960	M	250	1	0	0