BRUNA TERESO SANTILLO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE IFN-DCs
DERIVADAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

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
2015**

BRUNA TERESO SANTILLO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE IFN-DCs
DERIVADAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

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. Telma Miyuki
Oshiro Sumida

Versão original

**São Paulo
2015**

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

© reprodução total

Santillo, Bruna Tereso.

Caracterização fenotípica e funcional de IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1 / Bruna Tereso Santillo. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Telma Myiuki Oshiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunoterapia anti-HIV.

Versão do título para o inglês: Immunophenotypic and functional characterization of IFN-DC derived HIV-1 infected patients.

1. HIV 2. Células dendríticas 3. Interferon tipo I 4. Imunoterapia I. Oshiro, Profa. Dra. Telma Myiuki II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB097/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Tereso Santillo.

Título da Dissertação: Caracterização fenotípica e funcional de IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1.

Orientador(a): Profa. Dra. Telma Myiuki Oshiro.

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) 3091-0405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 01 de outubro de 2013.

PARECER 1139/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na reunião realizada no dia 25.09.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Caracterização fenotípica e funcional de ifn-dcs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1"* da pesquisadora TELMA MIYUKI OSHIRO SUMIDA e aluna BRUNA TERESO SANTILLO.

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. conforme modelo constante no site.icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.09.2014**.

Atenciosamente,

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

*Dedico este trabalho à minha avó Maria do
Pranto, minha rainha e guerreira por ser a
minha fonte de inspiração e aprendizado.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu guia protetor, fonte de força e pelo acompanhamento a cada dia desta trajetória.

Agradeço aos amigos e familiares, especialmente aos meus pais Guida Santillo e Roberto Santillo, pelo amor e por terem me proporcionado o estudo; ao meu irmão Willian Santillo e ao meu noivo Thiago Bonatti pelo carinho, confiança e por acreditarem no meu potencial! Agradeço a vocês pelas palavras amigas, pelo carinho, amor, sorriso e reconhecimento em todos os momentos. Obrigada por toda admiração demonstrada.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências LIM 56 (FMUSP), sem exceção, pelo acolhimento, aprendizado e todas as formas de ajuda.

Agradeço principalmente à minha orientadora e pesquisadora Dra. Telma Oshiro pela oportunidade, paciência, atenção, compreensão, pelo auxílio, ensinamento e carinho doados a mim. Agradeço à Prof^a Dra. Alessandra Pontillo pelo conhecimento transferido e auxílio na confecção deste trabalho; ao médico Alexandre de Almeida pela sabedoria e recrutamento dos pacientes; às amigas Ana Paula Vieira, Denise Reis, Laís Teodoro, Marcella Vassão, Wanessa Cardoso, Edione Cristina dos Reis, Nathália Romani, Alana Dias e Sadia Samer por terem feito este trabalho acontecer de forma tão alegre! Grupo Vacina e 'agregadas', com vocês eu aprendi o que é Ciência, Pesquisa, Ética, trabalho em equipe, parceria, harmonia e amizade reunidos em um só lugar! Obrigado por terem me proporcionado este aprendizado único!

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pela oportunidade de trabalho e crescimento no LIM 56.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela oportunidade, acolhimento e aprendizado. Dedico a minha gratidão especial aos componentes do Departamento de Imunologia do ICB/USP pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

Agradeço aos pacientes pela doação de amostras, compreensão e colaboração.

Muito obrigada a todos!

“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro.”

(Chico Xavier)

RESUMO

Santillo BT. Caracterização fenotípica e funcional de IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1. Dissertação (Mestrado em Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) constitui uma estratégia promissora para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV. Protocolos para obtenção de MoDCs maduras, capazes de adequadamente apresentar antígenos a linfócitos T específicos em geral utilizam como mediadores da diferenciação celular as citocinas IL-4 e GM-CSF que originam DCs com características mielóides, aqui denominadas IL4-DCs. Por outro lado, alguns estudos propõem a obtenção de DCs através do cultivo de monócitos na presença de IFN tipo I (IFN-alfa) e GM-CSF, originando as IFN-DCs. Tais células exibem um fenótipo combinado de DCs mielóides e DCs plasmocitóides, associadas a características de células NK. Estudos utilizando avaliando IFN-DCs de doadores saudáveis mostraram que essas células são capazes de capturar antígenos e migrar para os linfonodos, produzir citocinas e quimiocinas, incluindo mediadores que estimulam resposta do tipo Th1, como IL-12. Em nosso laboratório desenvolvemos um protocolo de vacinação terapêutica para indivíduos infectados pelo HIV, utilizando DCs diferenciadas na presença de IL-4 e GM-CSF. Neste contexto, considerando o perfil misto das IFN-DCs no contexto de uma infecção viral, protocolos alternativos para a obtenção de DCs capazes de adequadamente estimular o sistema imune do paciente podem trazer elementos para o aperfeiçoamento desta imunoterapia. **OBJETIVOS:** Avaliar *in vitro* características fenotípicas e funcionais de IFN-DCs derivadas de monócitos de pacientes infectados pelo HIV e comparar com as IL4-DCs convencionalmente obtidas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Monócitos obtidos de indivíduos HIV+ foram cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 ou IFN- α por 5 dias e estimuladas por mais 48 horas com pulso de HIV quimicamente inativado por Aldritol-2 e/ou coquetel de citocinas pró-inflamatórias. Posteriormente, foram avaliadas a expressão de moléculas de superfície e a habilidade das IFN-DCs em induzir proliferação e produção intracelular de IFN- γ de linfócitos T CD4+ e CD8+ alogênicos e autólogos, respectivamente, por citometria de fluxo. Além disso, avaliamos a produção de citocinas IL-10 e IL-12p70 por ELISA. **RESULTADOS:** IFN-DCs de indivíduos infectados pelo HIV apresentaram características morfológicas e fenotípicas de células semi-ativadas já no estado basal de maturação, além de exibirem características de DCs plasmocitóides e células NK, diferente do observado nas IL4-DCs. Além disso, as IFN-DCs foram capazes de produzir IL-12p70 após estímulo para ativação/pulso, com reduzida secreção de IL-10, assim como observado nas IL4-DCs. Por fim, as IFN-DCs foram capazes de estimular a proliferação e a produção de IFN- γ por linfócitos TCD4+ e CD8+ em níveis comparáveis às IL4-DCs. **CONCLUSÕES:** embora IFN-DCs e IL4-DCs constituem populações distintas de MoDCs apresentando morfologia e fenótipo distintos, observamos que a capacidade de reconhecer e apresentar antígenos virais e estimular resposta de linfócitos T foram semelhantes entre estas duas populações.

Palavras-chave: HIV. Células dendríticas. Vacina terapêutica. Interferon tipo I.

ABSTRACT

Santillo, B.T. Immunophenotypic and functional characterization of IFN-DC derived HIV-1 infected patients. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUCTION: Immunotherapy based on dendritic cells derived from monocytes (MDDCs) is a promising strategy for treating HIV-infected individuals. Alternatively to the conventional protocol for DC differentiation based on IL-4 (IL4-DCs), some studies suggest obtain DCs by culture of monocytes in the presence of IFN type I (IFN- α), yielding the IFN-DC. These cells exhibit a combined phenotype of myeloid and plasmacytoid DCs, associated with characteristics of NK cells. In healthy donor IFN-DCs are able to capture antigens and migrate to the lymph nodes, produce cytokines and chemokines, including mediators to stimulate Th1 response, as IL-12. In our laboratory we developed a therapy vaccine protocol to HIV-infected individuals based on DCs differentiated in the presence of IL-4 and GM-CSF. Considering the mixed profile of IFN-DCs in the context of a viral infection, alternative protocols ensure an effective patients response are taking in account because they can bring novel elements for immunotherapy improvement. **OBJECTIVES:** Evaluate phenotypic and functional features of IFN-DC derived from monocytes of HIV-infected patients and compare them with the IL4-DC conventionally obtained. **METHODS AND RESULTS:** Monocytes derived from HIV-infected patients were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 or IFN- α . On day 5 of culture, DCs were pulsed with chemically Aldrithiol-2-inactivated HIV and stimulated for 48 hours with a cocktail of proinflammatory cytokines. Subsequently, we assessed IFN-DC surface markers' expression and the ability of IFN-DCs present antigens and induce proliferation and IFN- γ production by allogeneic and autologous CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, respectively, by flow cytometry. Moreover, we available the IL-10 and IL-12p70 secretion by ELISA. **RESULTS:** IFN-DCs isolated from HIV-infected individuals showed morphological and phenotypic characteristics of semi-activated cells already in the basal state of maturity, and exhibit features of plasmacytoid DCs and NK cells, different from that seen in the IL4-DCs. Furthermore, the IFN-DCs were able to produce IL-12p70 after activate/viral pulse stimuli accompanied of lower IL-10 secretion, like observed in IL4-DCs. Finally, the IFN-DCs showed capable of stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes proliferation and IFN- γ production in comparable levels to IL4-DCs. **CONCLUSIONS:** Although IFN-DCs and IL4-DCs are distinct populations of MDDCs presenting distinct morphology and phenotype, we observed that the ability to recognize and present viral antigens and stimulate T lymphocytes response were similar between the two populations.

Keywords: HIV. Dendritic cells. Therapeutic vaccine. Type I Interferon.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Estrutura e genes do HIV	18
Figura 2 - Ciclo replicativo do HIV-1	19
Figura 3 - Processo de produção de vacina terapêutica de células dendríticas para pacientes HIV+	28
Figura 4 - Estratégia de análise utilizada na caracterização fenotípica de MoDCs.....	36
Figura 5 – Estratégia de análise utilizada na avaliação da proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+.....	39
Figura 6 - Estratégia de análise utilizada na avaliação da produção intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD4+ e CD8+	43
Figura 7 - Análise morfológica do 7º dia de cultura de IL4-DCs e IFN-DCs de indivíduo infectado pelo HIV-1	47
Figura 8 - Análise morfológica do 7º dia de cultura de IL4-DCs e IFN-DCs de doador sadio	47
Figura 9 – Expressão de HLA-DR em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-	49
Figura 10 – Expressão de CD1a em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	50
Figura 11 – Expressão de CD86 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	51
Figura 12 – Expressão de CD80 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	52
Figura 13 – Expressão de CD83 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	53
Figura 14 – Expressão de CD40 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	54
Figura 15 – Expressão de BDCA-4 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-.....	55
Figura 16 – Expressão de BDCA-2 em MoDCs de indivíduos HIV+.....	55
Figura 17 – Expressão de CD56 em MoDCs de indivíduos HIV+.....	56
Figura 18 - Expressão dos genes do inflamassoma e produção de IL-1 β de IL4-DC e IFN-DC de indivíduos HIV+ pulsadas com HIV-1	59
Figura 19 - Expressão dos genes do inflamassoma e produção de IL-1 β de IL4-DC e IFN-DC de indivíduos sadios pulsadas com HIV-1	60

Figura 20 – Secreção de IL-1 β por IFN-DCs e IL4-DCs de indivíduos HIV+ e HIV-	61
Figura 21 - Níveis de secreção de IL-12p70 e IL-10 dosadas em sobrenadantes de cultura de MoDCs de indivíduos infectados pelo HIV-1 e indivíduos saudáveis.....	62
Figura 22 - Proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por MoDCs ...	64
Figura 23 - Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por IL4-DCs ou IFN-DCs	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos indivíduos HIV+ participantes do estudo com relação ao gênero, idade, contagem de células TCD4+ e carga viral plasmática (PVL) ...	30
Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização fenotípica de células dendríticas	35
Tabela 3 - Anticorpos monoclonais utilizados na avaliação da produção de IFN- γ por linfócitos T	43

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AIM2	Ausente em melanoma 2 (do inglês: <i>absent in melanoma 2</i>)
AIM-V	Meio para imunoterapia adotiva versão 5
APC	Célula apresentadora de antígenos
AT-2	Aldrithiol-2
BDCA	Antígeno de células dendríticas do sangue (do inglês: <i>blood dendritic cells antigen</i>)
CTL	Linfócito T citotóxico (do inglês: <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DCs	Células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cells</i>)
DC-SIGN	Molécula não integrina, que capta a molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (do inglês: <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HAART	Terapia antirretroviral altamente potente (do inglês: <i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano – MHC classe II

IFN	Interferon
IFN-DC	Células dendríticas geradas na presença de GM-CSF e IFN- α
IL	Interleucina
IL4-DC	Células dendríticas geradas na presença de GM-CSF e IL-4
ISG	Genes estimulados pelo interferon (do inglês: <i>interferon-stimulated genes</i>)
LOX	Receptor de lipoproteína de baixa densidade oxidada semelhante à lectina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MFI	Intensidade média de fluorescência (do inglês: <i>mean fluorescence intensity</i>)
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
NK	Natural killer
NLRP	(do inglês: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing</i>)
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficocianina-eritrina 5
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão (do inglês: <i>pattern recognition receptor</i>)
PVL	Carga viral plasmática (do inglês: <i>plasma viral load</i>)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
T CD4+	Linfócito T CD4+
T CD8+	Linfócito T CD8*
TCR	Receptor de linfócito T
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i> (do inglês: <i>Toll Like Receptor</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNE	Tampão Tris/HCl, NaCl e EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1	Casuística.....	29
2.2	Obtenção de HIV inativado.....	31
2.3	Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos	32
2.3.1	<i>Diferenciação de células dendríticas por meio do protocolo IL4-DC.....</i>	<i>33</i>
2.3.2	<i>Diferenciação de células dendríticas por meio do protocolo IL4-DC.....</i>	<i>33</i>
2.4	Determinação do perfil fenotípico de MoDCs por citometria de fluxo	34
2.5	Expressão dos componentes do inflamassoma	36
2.6	Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura	37
2.6.1	<i>Dosagem de IL-12p70 e IL10</i>	<i>37</i>
2.6.2	<i>Dosagem de IL-1β.....</i>	<i>37</i>
2.7	Ensaio de proliferação	38
2.8	Avaliação da produção intracelular de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por MoDCs.....	41
2.9	Marcação de linfócitos para citometria de fluxo	42
2.8.1	<i>Marcação de superfície.....</i>	<i>42</i>
2.8.2	<i>Marcação intracelular.....</i>	<i>42</i>
2.10	Descongelamento de células	44
2.11	Análise de resultados.....	45
3	RESULTADOS.....	46
3.1	Avaliação do aspecto morfológico de MoDCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1 e indivíduos saudáveis.....	46
3.2	Avaliação do perfil de expressão de moléculas de superfície de MoDCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1	48
3.3	Análise da expressão de genes constituintes do inflamassoma e secreção de IL-1 β	57
3.4	Avaliação do perfil de secreção de IL-12p70 e IL-10 por IFN-DCs e IL4-DCs	61
3.5	Análise da proliferação de linfócitos T estimulados por MoDCs	63
3.6	Análise da proliferação de linfócitos T estimulados por MoDCs	66
4	DISCUSSÃO	68

5 CONCLUSÃO	81
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	82
--------------------------	-----------

AXENO

A – Artigo científico publicado: Pontillo A, <u>Santillo BT</u> , Duarte AJ, Oshiro TM. Differential inflammasome expression and IL-1beta secretion in monocyte-derived dendritic cells differentiated with IL-4 or IFN-alpha. <i>AIDS research and therapy</i> . 2013;10(1):35.....	91
--	----

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um lentivírus da família Retroviridae, composto de um invólucro formado por uma bicamada lipídica e um nucleocapsídeo em forma cônica associado a um genoma viral composto por duas fitas de RNA. O HIV tem seu genoma composto basicamente pelos genes *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas com funções diversas (Figura 1). As proteínas originadas do gene *gag* compõem a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo; o gene *pol*, por sua vez, gera as proteínas com função enzimática, denominadas integrase, protease e transcriptase reversa; e por fim, o gene *env* codifica as glicoproteínas de membrana gp120 (porção extramembrana) e gp41 (porção transmembrana) (Barré-Sinoussi, 1996; Cullen, 1991; Levy, 1993).

Figura 1 – Estrutura e genes do HIV.

Esquema ilustrativo da estrutura do HIV, moléculas envolvidas no processo de infecção e componentes do genoma viral. (Adaptado de Abbas, 2011 e Arroyave Johanna C et al., 2013).

O HIV utiliza-se de receptores e coreceptores presentes principalmente na superfície de linfócitos T, macrófagos, células dendríticas (DC), para que haja a ligação e a adsorção viral, proporcionando a infecção celular. A interação ocorre entre os receptores CD4 que estão presentes na membrana da célula alvo e as moléculas gp120. No entanto, para que haja a ligação e a entrada do HIV na célula hospedeira há necessidade também da interação com coreceptores (receptores de quimiocina) que estão adjacentes aos receptores CD4, sendo as moléculas CCR5 e

CXCR4 as mais bem caracterizadas. Após o estabelecimento dessas interações moleculares ocorre fusão do envelope viral com a membrana celular e o nucleocapsídeo viral entra no citoplasma da célula hospedeira para que ocorra o processo de replicação do genoma viral (Figura 2) (Engelman, Cherepanov, 2012).

A infecção do HIV causa a ativação crônica do sistema imune e a destruição maciça de linfócitos T CD4+ provocando um profundo comprometimento da resposta imune do hospedeiro, que culmina em um quadro de imunossupressão profunda, característico da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) (Brenchley et al., 2006).

Figura 2 - Ciclo replicativo do HIV-1.

A infecção é iniciada quando glicoproteínas de membrana do envelope ligam-se ao CD4 e ao CCR5 (ou CXCR4) (etapa 1) favorecendo a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira (etapa 2) e posterior liberação do nucleocapsídeo viral no interior da célula (etapa 3). Uma vez no citoplasma ocorre o desnudamento do material genético e a transcrição reversa do RNA viral no citoplasma da célula seguida da entrada do DNA proviral no núcleo (etapa 5), onde o material genético do vírus é integrado ao DNA da célula formando o provírus (etapa 6). A transcrição proviral (etapa 7) mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro gera novos mRNAs que ao saírem do núcleo da célula (etapa 8) são utilizados como fitas molde para a produção de proteínas virais (etapa 9). Com os componentes virais prontos ocorre a montagem do vírus (etapa 10) seguido do brotamento (etapa 11) e liberação de partículas virais imaturas (etapa 12), as quais sofrem o processo de maturação por protease específica quando fora da célula (etapa 13), deste modo gerando a partícula viral infecciosa (Adaptado de Elgeman, Cherepanov, 2012).

No Brasil, os primeiros casos de AIDS foram identificados no início da década de 1980, tendo sido registrados predominantemente entre homens que fazem sexo com homens (HSH), usuários de drogas injetáveis (UDI) e hemofílicos. Passados 40 anos, o país apresenta uma epidemia estável e concentrada em alguns subgrupos populacionais em situação de vulnerabilidade, como HSH, UDI e mulheres profissionais do sexo (Brasil, 2012). Segundo o último Boletim Epidemiológico HIV-AIDS (ano base 2013), no ano de 2012 foram notificados 39.185 casos de AIDS no Brasil, número que vem mantendo-se estável nos últimos 5 anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. Além disso, estimativas realizadas pelo Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), AIDS e Hepatites Virais mostram que aproximadamente 718 mil pessoas vivem com HIV/AIDS no Brasil, sendo que de um total de 709.477 casos de AIDS identificados no Brasil desde 1980 até junho de 2013, 64.268 (9,1%) evoluíram para óbito.

Com o advento da terapia antirretroviral altamente potente (HAART – do inglês: *highly active antiretroviral therapy*), a AIDS passou a ser considerada uma doença crônica, que se manejada e tratada de maneira adequada, diminui consideravelmente a probabilidade de adoecimento e morte. Além disso, estudos evidenciaram que o tratamento não só é eficaz para o controle da doença e melhoria da qualidade de vida, mas também para a diminuição da transmissão do vírus (Cohen et al., 2011; Cohen, Gay, 2010; Wilson et al., 2008).

Por outro lado, sabe-se que a terapia antirretroviral não é capaz de proporcionar a erradicação definitiva dos vírus devido à persistência de reservatórios celulares de infecção. Além disso, alterações clínicas e laboratoriais importantes relacionadas ao uso desta terapia, que leva muitos pacientes a não adesão ao tratamento, constituem fatores importantes a serem considerados. Também deve ser ponderada a parcela de pacientes que a despeito do uso destas drogas altamente potentes apresentam um quadro de falência terapêutica.

A infecção pelo HIV-1 não tratada normalmente progride para AIDS em um período médio de 10 anos, porém uma pequena parcela (menos que 1%) dos indivíduos infectados, denominados controladores de elite, permanece saudável e tem contagem de células TCD4+ normais e carga viral indetectável, havendo relato

de alguns indivíduos que permaneceram dessa forma por 35 anos (Olson et al., 2014). Deste modo, o sistema imune dos controladores de elite pode representar um modelo de controle da infecção e pode fornecer elementos para a determinação dos correlatos de proteção na infecção pelo HIV, até o presente não definidos, já que não há relatos de cura espontânea na infecção pelo HIV.

Os mecanismos utilizados pelo sistema imune dos controladores de elite ainda não estão totalmente definidos, mas sabe-se que eles apresentam resposta efetiva de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CLT – do inglês: *cytotoxic T lymphocytes*) HIV-específicas (Olson et al., 2014).

As células T CD8⁺ HIV-específicas, que constituem a parte efetora da resposta celular, tornam-se capazes de eliminar células infectadas pelo HIV. Tais células atuam diretamente na citólise de células infectadas e também na secreção de fatores que controlam a replicação viral (Musey et al., 1997; Walker et al., 1986). Ainda, foi demonstrada uma correlação inversa entre a frequência da atividade de CTLs HIV-específicos e a carga viral plasmática em todos os estágios da infecção (Ogg et al., 1998).

Deste modo, estudos avaliando os mecanismos de resposta imune anti-HIV em controladores de elite demonstraram potentes respostas de CTLs HIV-específicos, os quais exibem alta capacidade em inibir a replicação viral em células TCD4⁺ autólogas, além de elevada habilidade em sintetizar componentes dos grânulos citotóxicos, como granzimas, perforinas e granulosinas, que promovem potencial atividade citotóxica e induzem a apoptose de células infectadas (Walker, Yu, 2013). Ainda, células TCD8⁺ HIV-específicas apresentam níveis proliferativos elevados provavelmente devido à ação autócrina de IL-2. As habilidades simultâneas (citotóxica e de produção de citocinas específicas) realizadas por essas células compõem as múltiplas funções efectoras, também denominada polifuncionalidade, e que constitui uma característica chave das células TCD8⁺ HIV-específicas (Olson et al., 2014; Walker, Yu, 2013). Estes indivíduos também possuem respostas de células TCD4⁺, que por sua vez demonstram produção de múltiplas citocinas, que aumentam a atividade antiviral de células TCD8⁺ HIV-específicas (Walker, Yu, 2013).

Até o momento, os principais mecanismos descritos, referente ao controle da infecção pelo HIV-1 pelos controladores de elite se resumem às respostas imunes específicas de células TCD4+ e CD8+, especialmente respostas de CTLs HIV-específicos. Com base no papel fundamental da resposta imune celular desempenhada durante a infecção pelo HIV e nos mecanismos imunes exibidos pelos controladores de elite, o estudo destes mecanismos em amostras de indivíduos infectados pelo HIV constitui potencial estratégia em fornecer modelos de tratamento para induzir uma cura funcional do HIV.

Considerando o exposto, fazem-se necessárias novas estratégias com o objetivo de diminuir a replicação do vírus e obter a melhora do paciente. Neste sentido, inúmeros esforços têm sido despendidos a fim de se desenvolver novas alternativas de tratamento, dentre estes, protocolos de imunoterapia baseada em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs). Uma vez que a quantidade de células dendríticas circulantes diminui drasticamente durante a progressão da infecção pelo HIV (Barron et al., 2003), a administração de uma quantidade suficiente de células dendríticas estimuladas *in vitro* com antígenos de HIV poderia auxiliar no controle da infecção, através do estímulo do sistema imune do próprio hospedeiro.

As células dendríticas (DCs) constituem as principais células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune e são consideradas sentinelas naturais, por apresentarem alto potencial de acesso aos patógenos invasores uma vez que estão posicionadas em regiões estratégicas do organismo tais como: pele, superfícies mucosas e sangue. Nestes locais as DCs em geral encontram-se no seu estágio imaturo, durante o qual possuem grande capacidade de reconhecimento, captura e processamento antigênico. O encontro com o patógeno leva à ativação das DCs tornando-as maduras e capazes de aumentar a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I e II associadas com a apresentação de antígenos (MHC – do inglês: *major histocompatibility complex*), além de elevar os níveis de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, moléculas de ativação CD83 e CD40 e de receptores de quimiocinas, como o CCR7, que permite a sua migração para órgãos linfóides secundários. Assim, durante o processo de maturação as DCs migram para os órgãos linfóides drenantes e ao atingirem a zona de linfócitos T, encontram-se aptas a apresentarem os antígenos via moléculas de MHC classe I e

classe II aos linfócitos T CD8+ e CD4+, respectivamente, sendo capazes de iniciar as respostas imunes mediadas por linfócitos T contra patógenos invasores (Banchereau, Steinman, 1998; Lambotin et al., 2010).

DCs possuem alta plasticidade e dependendo de sua origem precursora e das citocinas presentes no microambiente onde se encontram podem ser gerados diferentes subtipos que apresentam funções tanto distintas, quanto compartilhadas a fim de atuar eficazmente na defesa do hospedeiro. Existem pelo menos 2 principais subtipos de DCs: as células dendríticas mielóides e as células dendríticas plasmocitóides. Ambas participam da imunidade inata e da imunidade adaptativa formando uma importante ligação entre essas vertentes do sistema (Steinman, Haemmi, 2006).

As DCs mielóides são mais abundantes e estão principalmente envolvidas no processo de captura e apresentação antigênica, desempenhando um papel fundamental na iniciação das respostas imunes mediadas por linfócitos T. Estas células são potenciais produtoras de IL-12 durante a apresentação antigênica, além de produzirem IL-15 após ativação. Em conjunto estas citocinas estimulam a secreção de interferon-gama (IFN- γ) por células matadoras naturais (células NK – do inglês: *natural killer*) e promovem a diferenciação de células T auxiliares CD4+ em células do tipo Th1 (do inglês: *T helper*) e de células T CD8+ em linfócitos T citotóxicos (CTLs). Por sua vez as CTLs são células que contribuem principalmente com a morte direta de células tumorais ou infectadas por vírus através do reconhecimento de complexos MHC (classe I)-peptídeo tumoral/viral expresso por células tumorais/infectadas. Uma vez que haja o reconhecimento ocorre a secreção de mediadores citolíticos, como granzimas e perforinas; ou morte indireta por meio de IFN- γ , uma citocina capaz de amplificar a resposta CTL e potencializar a atividade microbicida de macrófagos (Lambotin et al., 2010).

Com relação às DCs plasmocitóides, estas células são também capazes de atuar como APCs (Colonna et al., 2004), embora em menores níveis comparadas às DCs mielóides. Por outro lado apresentam um papel importante na resposta imune inata antiviral por serem capazes de produzir altas quantidades de IFN do tipo I na presença de infecções virais (Liu, 2005). Os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) produzidos pelas DCs plasmocitóides não apenas possuem uma atividade antiviral,

mas também auxiliam nas etapas subsequentes da imunidade contra os vírus, como na ativação de células NK mediada por citotoxicidade e na diferenciação e sobrevivência de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Liu, 2005). Além disso, as DCs plasmocitóides são também capazes de atuar como APCs (Colonna et al, 2004), embora em menores níveis comparadas às DCs mielóides.

A população de DCs circulantes é relativamente rara, constituindo menos que 1% do número total de células do sangue (Steinman, 1991). Por este motivo, a utilização de DCs em protocolos terapêuticos só se tornou possível com o desenvolvimento de técnicas capazes de produzir estas células em escalas maiores, através da diferenciação a partir de populações precursoras. DCs mielóides podem ser diferenciadas a partir de monócitos, permitindo a obtenção destas células em larga escala, sendo mais extensivamente estudadas (Sallusto, Lanzavechia, 1994). Embora DCs plasmocitóides apresentem um exuberante efeito antiviral devido à capacidade em produzir grandes quantidades de IFN- α , sua diferenciação em larga escala pode ser realizada somente a partir de células precursoras, como CD34⁺, o que pode ser um fator limitante para alguns estudos (Siena et al., 1995).

No contexto da infecção pelo HIV as DCs são as principais iniciadoras da resposta imune adaptativa, uma vez que a resposta de linfócitos T é dependente da apresentação de antígenos. Deste modo DCs infectadas apresentando produção de proteínas virais no citosol induz a ativação de células T CD8⁺, enquanto proteínas virais, debris de células apoptóticas e antígenos de HIV processados resultam na ativação de células T CD4⁺ (Rinaldo, Piazza, 2004). Além disso, as células dendríticas podem processar antígenos extracelulares de HIV para apresentação via MHC classe I, na ausência de replicação viral, cujo processo é denominado apresentação cruzada (Buseyne et al., 2001). Tal processo requer uma interação adequada do receptor de superfície para HIV e fusão do vírus com a membrana celular. Esta apresentação tem papel crucial na ativação de células T CD8⁺ (Buseyne et al., 2001).

Considerando a natureza adjuvante das DCs, a imunoterapia para pacientes infectados pelo HIV oferece uma oportunidade ímpar para estudo dos mecanismos imunes contra o vírus, podendo ainda fornecer elementos importantes para o esclarecimento dos correlatos de proteção na infecção pelo HIV.

Protocolos de vacinação terapêutica utilizando células dendríticas em indivíduos infectados pelo HIV tiveram início no final da década de 90 e desde então é crescente o número de estudos avaliando esta estratégia. Por se tratar de um protocolo individualizado, o número de pacientes nos ensaios é sempre limitado, nunca ultrapassando poucas dezenas de indivíduos. Uma análise geral dos trabalhos conduzidos até o presente mostra que, embora todos demonstrem a segurança do produto, tanto o desenho dos estudos quanto os resultados obtidos são bastante heterogêneos (Lévy et al., 2014; revisto por Vanham, Van Gulck, 2012).

Embora o protocolo básico para a diferenciação de DCs a partir de monócitos já esteja bem estabelecido, aspectos mais específicos do processo de diferenciação como modo de purificação de monócitos, tempo de cultivo e estímulo para maturação são muito variáveis.

Em geral a purificação de monócitos pode ser feita através de aderência em plástico, elutriação ou seleção positiva utilizando microesferas magnéticas. Na grande maioria dos protocolos a diferenciação dos monócitos em DCs é induzida através do cultivo por 5-7 dias na presença das citocinas interleucina (IL)-4 e GM-CSF (do inglês: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), originando as IL4-DCs. A citocina GM-CSF é necessária para a sobrevivência e diferenciação dos monócitos *in vitro*, enquanto a IL-4 induz a diferenciação por exercer um efeito inibitório na diferenciação de monócitos em macrófagos (Conti, Gessani, 2008).

Classicamente, a cultura de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF origina DCs imaturas que podem ser ativadas através da adição de fatores indutores de maturação como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, LPS (lipopolissacarídeo), CD40L, agonistas de TLR (receptores tipo *Toll* - do inglês: *toll like-receptors*), entre outros. Alternativamente, foi demonstrada a obtenção de DCs através da cultura de monócitos ou células progenitoras CD34+ na presença de IFN- α e GM-CSF, sendo denominadas IFN-DCs (Paquette et al., 1998).

Os interferons foram descritos como moléculas endógenas efetoras antivirais e foram assim nomeados após observarem sua capacidade em interferir na replicação viral na célula hospedeira. Entretanto os interferons medeiam uma variedade de funções biológicas que não se limitam apenas ao combate às infecções virais, sendo

capazes de atuar também na resposta imune contra tumores, além de apresentarem efeitos imunomoduladores (Ludgins et al., 2012; Ng, Gommerman, 2013).

As principais células produtoras de IFN do tipo I são as DCs plasmocitóides. Os IFNs do tipo I compreendem diferentes subtipos, sendo o IFN- α e o IFN- β os mais estudados e melhor caracterizados. Ambos podem ser produzidos por quase todos os tipos celulares sob estímulo de PRRs (receptores de reconhecimento de padrões – do inglês: *pattern recognition receptor*), porém em níveis reduzidos. Fisiologicamente, esta sinalização basal de IFN é importante para manter as células imunes em um estado semi-ativado para garantir uma resposta imune antiviral rápida e efetiva. Os IFN do tipo I ligam-se exclusivamente ao receptor de interferon-alfa (IFNAR), um receptor dimérico composto por 2 subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, desencadeando sinalização intracelular que leva à ativação dos ISGs (genes estimulados pelo interferon – do inglês: *interferon-stimulated genes*), que por sua vez induzem a produção de fatores antivirais que atuam de forma autócrina e parácrina. Além disso, os IFN do tipo I induzem a ativação do sistema imune podendo atuar sobre linfócitos T e DCs, por exemplo (Ng, Gommerman, 2013).

Estudos conduzidos tanto em humanos quanto em camundongos sugeriram que o IFN- α pode ser utilizado como um adjuvante imune eficaz na indução da imunidade antiviral e antitumoral e que os efeitos desta citocina na diferenciação e ativação de DCs apresentam um papel importante na indução de respostas protetoras. Além disso, demais estudos revisados por Aricò e Belardelli (2012) sugerem que a aplicação do IFN- α como adjuvante vacinal pode contribuir na confecção de vacinas, uma vez que exibiu vantagem nas estratégias de vacinação terapêutica de pacientes com câncer.

Devido ao fato do IFN- α ser rapidamente produzido em resposta a infecções virais, esta citocina também representa um fator fisiológico para a diferenciação de DCs uma vez que durante uma infecção viral o IFN- α produzido localmente pela DC plasmocitóide poderia levar à diferenciação de precursores em IFN-DCs que por sua vez poderia contribuir para o controle do vírus (Lambotin et al., 2010).

Embora as IFN-DCs apresentem alguns aspectos compartilhados com IL4-DCs tais como expressão de CD11c, HLA-DR e CD86 e capacidade de estimular uma resposta celular, estudos mais aprofundados enfocando a expressão do perfil gênico

mostram tratar-se de duas populações distintas. Enquanto IL4-DCs apresentam um perfil mielóide, IFN-DCs exibem um fenótipo misto de DCs mielóides e DCs plasmocitóides, associadas a características de células NK, desta forma sendo capazes de reconhecer PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos – do inglês: *pathogen-associated molecular pattern*), expressar DC-SIGN, TLR 1-8, LOX-1, além de expressarem receptores típicos de células NK, tais como CD56, granzimas e TRAIL (Farkas, Kémeny, 2011; Korthals et al., 2007; Papewallis et al., 2008).

Devido às características descritas anteriormente, as IFN-DCs vêm apresentando um papel emergente em ensaios enfocando respostas contra doenças autoimunes e inflamatórias, câncer e infecções virais, e alguns protocolos clínicos utilizando IFN-DC em imunoterapia para tumores, particularmente melanoma, vem sendo realizados (Banchereau et al., 2005; Oshita et al., 2012; Trakatelli et al., 2006).

No contexto da infecção pelo HIV foi demonstrado que as IFN-DCs pulsadas com HIV-1 inativado inoculadas em camundongos humanizados (hu-PBL-SCID mice) apresentaram número de células T CD8+ específicas aumentado comparado aos camundongos que receberam o inóculo contendo IL4-DCs (Lapenta et al., 2006). Em nosso laboratório, tanto em ensaios *in vitro* quanto em ensaio clínico para vacinação de pacientes infectados pelo HIV, utilizamos IL-4 e GM-CSF para a obtenção de DCs imaturas e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e HIV quimicamente inativado por AT-2 (composto que bloqueia a infectividade do vírus pela modificação covalente das estruturas de zinco do nucleocapsídeo viral) para sua ativação (esquema ilustrado na figura 3). Assim, considerando que IFN-DCs exibem características de DCs plasmocitóides e DCs mielóides, e considerando a natureza viral da infecção em questão torna-se interessante avaliar aspectos fenotípicos e funcionais de IFN-DCs geradas a partir de monócitos de pacientes infectados pelo HIV e compará-las com IL4-DCs diferenciadas por meio do protocolo convencionalmente utilizado em nosso laboratório.

Estudos de IFN-DCs derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV são pouco descritos. Desta forma, resultados advindos deste projeto podem permitir a compreensão dos aspectos funcionais destas células e fornecer elementos para aperfeiçoar a metodologia de diferenciação de DCs de indivíduos infectados pelo HIV em uso em nosso laboratório. Tal fato poderia otimizar tanto aspectos relacionados à pesquisa básica em projetos *in vitro* para avaliação de DCs de pacientes infectados pelo HIV, quanto projetos de pesquisa clínica de vacinação terapêutica para tratamento de indivíduos infectados pelo HIV.

Figura 3 – Processo de produção de vacina terapêutica de DC para pacientes HIV+.

Monócitos isolados de indivíduos infectados pelo HIV são cultivados *in vitro* e diferenciados em DCs imaturas. Estas células imaturas, por sua vez, são pulsadas com o HIV isolado do mesmo indivíduo e inativado quimicamente por AT-2, originando as DCs pulsadas utilizadas na vacinação.

Sendo assim, o objetivo desse estudo é avaliar *in vitro* aspectos fenotípicos e funcionais de IFN-DCs geradas a partir da diferenciação de monócitos de pacientes infectados pelo HIV e comparar com as células dendríticas convencionalmente utilizadas, obtidas por meio do protocolo IL4-DC. Incluem-se nos objetivos específicos comparar IFN-DCs com as IL4-DCs quanto à expressão de moléculas de superfície; expressão de genes do inflamassoma; produção de citocinas IL-12p70 e IL-10; capacidade de estimular a proliferação e de apresentar antígenos de HIV e induzir a produção de IFN- γ em linfócitos TCD4+ e CD8+ alogênicos e autólogos, respectivamente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 12 pacientes cronicamente infectados pelo HIV (Tabela 1), os quais nunca haviam feito uso de tratamento antirretroviral e no momento da coleta apresentavam contagem de células T CD4+ acima de 350 células/mm³.

Como fatores de exclusão foram considerados idade menor de 18 anos, gravidez e uso de drogas/ medicamento ou imunodisfunção que gerasse alteração generalizada do sistema imune, como outras infecções virais, infecções bacterianas e fúngicas, crises alérgicas, câncer, entre outros.

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório ADEE - 3002 do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e participaram voluntariamente após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução nº. 466/12 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Além do grupo infectado foi incluído um grupo controle constituído por 5 indivíduos saudáveis.

O projeto tem a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob nº de protocolo 0756/11 aprovado em 01 de fevereiro de 2012 e da Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do ICB sob nº de parecer 412.005 aprovado em 23 de setembro de 2013.

Tabela 1 - Características dos indivíduos HIV+ participantes do estudo com relação ao gênero, idade, contagem de células TCD4+ e carga viral plasmática (PVL).

Sujeitos da pesquisa	Gênero	Idade	Contagem de células TCD4+ (cél/s/μL)*	PVL (cópias/mL)*	PVL (log10 cópias/mL)*
Indivíduos HIV+					
1	F	31	432	3245	3,511
2	M	44	810	3538	3,549
3	M	58	520	42748	4,631
4	F	23	622	1238	3,093
5	F	28	1427	385	2,585
6	M	58	595	24608	4,391
7	M	45	868	<50	-
8	M	43	566	12352	4,092
9	M	-	434	15793	4,198
10	M	27	569	24530	4,39
11	M	30	485	5003	3,699
12	M	38	375	52602	4,721
Média	-	38,63	632,6	16085,63	3,90

* Valores de testes realizados no período da coleta de amostra para o estudo representando o estado do paciente no momento da coleta.

3.2 Obtenção de HIV inativado

O antígeno utilizado para o pulso das MoDCs foi constituído por um pool de isolados de diferentes subtipos de HIV quimicamente inativados com aldrithiol-2 (AT-2), cuja ação é manter a integridade conformacional das proteínas virais e concomitantemente neutralizar a infectividade dos retrovírus, por meio de uma modificação covalente das estruturas de zinco do nucleocapsídeo viral (Rossio et al, 1998).

Para a obtenção do material, isolados virais dos subtipos B, C e F (predominantes no Brasil) obtidos através do AIDS Reagent Program (NIH) foram expandidos segundo o protocolo obtido da ACTG *Laboratory Technologist Committe*, com algumas modificações. Em resumo, culturas de PBMCs de doador sadio previamente ativadas por 48-72 horas com 5 µg/mL fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO®, Life Technologies) – uma lectina que apresenta atividade mitogênica sobre PBMCs - foram inoculadas separadamente com cada um dos isolados virais e as culturas foram mantidas em meio de cultura RPMI1640® (GIBCO®, Life Technologies) contendo 10% de SFB (GIBCO®, Life Technologies) e 20 UI/mL de IL-2 (PeproTech) em estufa de CO₂ a 37 °C. O meio de cada cultura foi trocado a cada 3 dias e semanalmente as culturas foram realimentadas com PBMCs de doador sadio previamente ativadas com PHA (GIBCO®, Life Technologies). Sobrenadantes sabidamente positivos para partículas virais de cada cultura foram armazenados a cada repique. As culturas foram monitoradas com relação à presença da proteína p24 do HIV (HIV-1 p24 Antigen ELISA, ZeptoMetrix Corporation) em sobrenadante.

A inativação dos vírus foi realizada de acordo com protocolo descrito por Rossio et al (1998). Em resumo, o volume acumulado de sobrenadante de cada cepa viral armazenado foi incubado com 250 µM de AT-2 (Sigma-Aldrich) sob agitação constante por 1 hora a 37 °C para inativação. Após a inativação, o material foi centrifugado a 3000 g por 20 minutos para remoção de *debris* celulares e, em seguida, foi concentrado em dispositivo de ultrafiltração Amicon (Millipore) com membrana de 100 kDa, por meio de centrifugação a 3200 g por 20 minutos em cada ciclo.

O concentrado de sobrenadantes contendo as partículas virais foi então submetido a ultracentrifugação para purificação dos vírus em centrífuga L80

Beckman, utilizando rotor de ângulo móvel (SW41 Ti). Para tanto, o material foi acondicionado sob solução de sacarose 20% em TNE (20 mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e 2,5 mM de EDTA), na proporção de 1 parte de sacarose: 2 partes de sobrenadante concentrado e em seguida centrifugado a 4 °C por 1 hora a 100.000 g. Após este período, todo o material acima da sacarose foi removido e o *pellet* ressuspensionado em TNE. Foi realizada uma nova centrifugação por mais 1 hora a 100.000 g e em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640® (GIBCO®, Life Technologies) e quantificado com relação ao número de partículas virais através da reação de cadeia de polimerase (PCR), utilizando kit Cobas Amplicor (Roche Diagnostics).

Quantidades equivalentes de cada isolado foram agrupadas para a composição do pool a ser utilizado nos ensaios.

3.3 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), provenientes de material excedente armazenado sob congelamento em nosso laboratório, foram utilizadas nos ensaios. Para tanto, as PBMCs foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e lavadas com RPMI duas vezes a 1500 rpm por 10 minutos e a viabilidade monitorada com Trypan Blue® (Sigma-Aldrich). Foram utilizadas apenas amostras que apresentassem um mínimo de 75% de viabilidade. Posteriormente, a concentração de PBMCs foi ajustada para 5×10^6 células/mL e cerca de 1 mL desta suspensão foi distribuída em cada poço da placa de cultura de 24 poços. As células foram então incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 2 horas, tempo necessário para que as células aderentes (predominantemente monócitos) aderissem à placa de cultura. As células não aderentes (predominantemente linfócitos) foram em seguida coletadas por meio de duas lavagens do poço com o próprio meio de cultura.

As células aderentes remanescentes na placa foram cultivadas em meio AIM-V® (GIBCO®, Life Technologies) e estimuladas com citocinas de acordo com os protocolos de diferenciação de células dendríticas, denominados protocolo IL4-DC e protocolo IFN-DC.

3.3.1 Diferenciação de células dendríticas por meio do protocolo IL4-DC

Para induzir a diferenciação de DCs por meio do protocolo IL4-DC, as células aderentes foram cultivadas na presença de 50 ng/mL de IL-4 (PeproTech) e 50 ng/mL de GM-CSF (PeproTech) e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 5 dias, dando origem às IL4-DCs imaturas. No quinto dia de cultura, parte destas células imaturas foram estimuladas com um coquetel de citocinas pró-inflamatórias composto por 50 ng/mL de TNF- α (PeproTech), 10 ng/mL de IL-1 β (PeproTech) e 100 ng/mL de IL-6 (PeproTech) a fim de induzir a maturação celular e originar as IL4-DCs maduras e, concomitantemente, uma segunda parte das IL4-DCs imaturas foi pulsada com HIV inativado (*pool* de vírus HIV inativado com AT-2) na proporção de 10⁹ partículas virais para 3 x 10⁷ DCs. Após 2 horas foi acrescentado o coquetel de citocinas pró-inflamatórias com o intuito de obtermos as IL4-DC pulsadas. No sétimo dia de cultura, ou seja, 48 horas após o estímulo para a ativação das MoDCs, as células foram coletadas e ressuspensas em meio de cultura AIM-V® (GIBCO®, Life Technologies) de modo que a concentração estivesse ajustada adequadamente para a utilização nos ensaios fenotípicos e funcionais.

3.3.2 Diferenciação de células dendríticas por meio de protocolo IFN-DC

Para a obtenção de IFN-DCs as células aderentes foram cultivadas na presença de 1000 UI/mL de IFN- α -2b (Schering-Plough) e 100 ng/mL de GM-CSF (PeproTech) e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 5 dias, dando origem às IFN-DCs imaturas. No quinto dia de cultura, parte destas células imaturas foram estimuladas com um coquetel de citocinas pró-inflamatórias composto por 50 ng/mL de TNF- α (PeproTech), 10 ng/mL de IL-1 β (PeproTech) e 100 ng/mL de IL-6 (PeproTech) a fim de induzir a maturação celular e originar as IFN-DCs maduras. Concomitantemente, uma segunda parte destas células imaturas foi pulsada com HIV inativado (*pool* de vírus HIV inativado com AT-2) na proporção de 10⁹ partículas virais/3x10⁷ DC se após 2 horas foi acrescentado o coquetel de citocinas pró-inflamatório, dando origem às IFN-DCs pulsadas. No sétimo dia de cultura, ou seja, 48 horas após o estímulo para a ativação das MoDCs, as células foram coletadas e ressuspensas em meio de cultura AIM-V® (GIBCO®, Life Technologies) de modo

que a concentração estivesse ajustada adequadamente para a utilização nos ensaios fenotípicos e funcionais.

3.4 Determinação do perfil fenotípico de MoDCs por citometria de fluxo

Para a marcação de moléculas presentes na superfície das células para análise por citometria de fluxo, as DCs a uma concentração de 2×10^5 DCs/100 μ L em meio AIM-V® (GIBCO®, Life Technologies), foram incubadas com anticorpos monoclonais, mantidas sob refrigeração (4 °C) e protegidas de luz durante 20 minutos. Após este período, foi realizada uma centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos com tampão de coloração (PBS contendo 0,2% de BSA) e, posteriormente, adicionamos a solução isotônica BD FACS Flow® (BD Biosciences) para aquisição de células e análise da expressão de moléculas de superfície por meio de citometria de fluxo (BD LSRFortessa).

Foi investigada a expressão das moléculas CD11c, CD14, CD86, CD80, CD83, CD40, CD1a, CCR7, BDCA-2/CD303, BDCA-4/CD304 e CD56 (Tabela 2).

Foram adquiridos no mínimo 10.000 eventos de uma população celular determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de linfócitos e células mortas.

A análise dos dados obtidos foi realizada através do software FlowJo®, na qual primeiramente foi selecionada a população de células que passaram individualmente pelo fluxo celular do equipamento, denominada “single cell”, seguida pela delimitação da população de células dendríticas com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade, característicos destas células. Posteriormente, foi selecionada a população de células CD11c+, da qual foram derivadas as combinações do marcador CD11c com os demais citados, como ilustrado na Figura 4.

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização fenotípica de células dendríticas.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Anti-CD11c	PE-Cy5	B-ly6	BD Bioscience
Anti-HLA-DR	FITC	G46-6	BD Bioscience
Anti-CD14	PE	M5E2	BD Bioscience
Anti-CD86	FITC	FUN-1	BD Bioscience
Anti-CD80	PE	L307.4	BD Bioscience
Anti-CD83	FITC	HB15e	BD Bioscience
Anti-CD40	FITC	5C3	BD Bioscience
Anti-CD1a	PE	HI149	BD Bioscience
Anti-CCR7	PE	3D12	BD Bioscience
Anti-BDCA-2 (CD303)	FITC	AC144	Miltenyi Biotec
Anti-BDCA-4 (CD304)	PE	AD5-17F6	Miltenyi Biotec
Anti-CD56	APC	AF12-7H3	Miltenyi Biotec

Figura 4 - Estratégia de análise utilizada na caracterização fenotípica de MoDCs.

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares das células dendríticas (MoDCs). Selecionamos primeiramente a população de células dendríticas segundo tamanho e granulosidade característicos desse tipo celular (A), seguido da população de células CD11c+ (B) e, por fim, selecionamos as populações de DCs que expressaram simultaneamente as moléculas CD11c e demais moléculas características de MoDCs marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos PE (C) e FITC (D). A delimitação das células marcadas (azul) foram baseadas nos gates das células não marcadas (vermelho). Análise realizada por meio do software FlowJo®.

2.5 Expressão dos componentes do inflamassoma

Para o estudo da expressão dos componentes do inflamassoma IFN-DCs ou IL4-DCs imaturas foram pulsadas com $0,5 \times 10^9$ partículas de HIV inativado por AT-2 por um período de 4 horas. O controle positivo consistiu as culturas estimuladas com 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich). Após o estímulo o sobrenadante de cultura foi descartado e o RNA total das MoDCs foi coletado por meio do kit RNAqueous-MicroTM (Ambion, AppliedBiosystems) seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante.

Em seguida procedeu-se à retrotranscrição do material para obtenção do cDNA, utilizando kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen). A análise da

expressão dos genes do inflamassoma foi realizada por meio de sonda específica para os genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1* e *IL1B*. Para tal, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), os genes específicos foram amplificados utilizando TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Para cada 2 µL de cDNA foram utilizados 5 µL de 2x PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), 5 µL de água estéril e 0,5 µL de sonda 20x.

A amplificação foi realizada a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, sendo finalizada a uma temperatura de 60 °C com duração de 60 minutos em termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados foram gerados na forma de threshold cycle (Ct) por meio do software 7300 System SDS (Applied Biosystems), dos quais foram considerados apenas os valores $Ct < 35$. A análise da expressão relativa dos genes foi realizada segundo o cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak et al (2001). Este cálculo visa subtrair o Ct do gene de interesse pelo Ct do gene do controle interno (*ACTB*), desta forma obtendo-se o ΔCt . Em seguida, subtraímos o ΔCt do gene de interesse pelo ΔCt do gene pertencente às células imaturas (estado basal), cuja expressão relativa será considerada 1, desta forma gerando o $\Delta\Delta Ct$. Por fim, calculamos o $2^{-\Delta\Delta CT}$, cuja representação consiste em quantas vezes a expressão do gene de interesse está aumentada ou diminuída com relação à expressão basal.

2.6 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura

2.6.1 Dosagem de IL-12p70 e IL-10

Sobrenadantes de cultura do 7º dia de cultivo de MoDCs imaturas, maduras e pulsadas obtidas por meio dos protocolos IL4-DC e IFN-DC foram coletados para a dosagem das citocinas IL-12 p70 e IL-10 seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante dos kits Human IL-12p70 ELISA Ready-SET Go!® (eBioscience) e Human IL-10 Quantikine ELISA® (R&D systems).

2.6.2 Dosagem de IL-1B

Para a dosagem de IL-1B, IFN-DCs ou IL4-DCs imaturas foram pulsadas com $0,5 \times 10^9$ partículas de HIV inativado por AT-2 por um período de 24 horas. O

controle positivo consistiu as culturas estimuladas com 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich). Após o estímulo, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de IL-1β por ELISA seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante do kit Human IL-1β ELISA Ready-SET Go!® (eBioscience). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.7 Ensaio de proliferação

A capacidade das MoDCs em estimular a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi avaliada através de ensaio de reação leucocitária mista. Para tanto MoDCs de indivíduos saudáveis e/ou indivíduos infectados pelo HIV foram cocultivadas 144 horas com linfócitos alogênicos derivados de doadores saudáveis e marcados com 2 µM/mL de CFSE na proporção de 1 MoDC: 5 linfócitos em placa de 96 poços de fundo chato.

O controle positivo foi composto por linfócitos estimulados por 72 horas com 0,02 UI/mL de PHA (Sigma-Aldrich). O controle basal foi composto por linfócitos mantidos em AIM-V® (GIBCO®, Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma-Aldrich) durante 144 horas.

Ao final do cocultivo, as células foram coletadas e incubadas 30 minutos com LIVE/DEAD® Cell Viability (Life Technologies) para a marcação de células mortas. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos as células foram incubadas com anticorpos monoclonais CD3 PE-Cy5, CD4 PE e CD8 APC-H7 (BD Bioscience) sob refrigeração (4 °C) e protegido de luz por 20 minutos. Por fim, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow® (BD Bioscience) e adquiridas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa®.

Foi adquirido um mínimo de 60.000 eventos de uma população celular determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade e excluindo-se a região de células mortas, utilizando citômetro BD LSRFortessa. A análise dos dados obtidos foi realizada através do software FlowJo®, na qual primeiramente foi selecionada a população de linfócitos com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade característicos dos linfócitos. Posteriormente, foi selecionada a população de células viáveis, seguida da população de células CD3+, da qual foram

derivadas as populações CD4+ e CD8+. Em seguida, foi considerada a população de células proliferativas aquela que apresentou baixa marcação para o marcador CFSE (CFSE^{low}), como ilustrado na Figura 5. A delimitação dos *gates* utilizada na análise dos resultados originou-se dos dados obtidos da proliferação basal dos linfócitos.

Figura 5 - Estratégia de análise utilizada na caracterização fenotípica de MoDCs.

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares e da proliferação de linfócitos T (azul: basal / vermelho: células sob estímulo). Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos segundo tamanho e granulosidade característicos dessas células (A), seguida da população de células viáveis (B), população de células CD3+ (C), populações expressando simultaneamente os marcadores CD3 e CD4 (D) ou CD8 (G). Por fim, foi considerada proliferação as células expressando simultaneamente CD3, CD4 ou CD8 e baixa expressão de CFSE (CFSE^{low}) (E, F, H, I). A delimitação dos *gates* das células proliferativas foi baseada na proliferação basal (J). Análise realizada por meio do software FlowJo®.

2.8 Avaliação da produção intracelular de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por MoDCs

A capacidade das MoDCs em induzir uma resposta *in vitro* dirigida ao HIV foi avaliada por meio da detecção intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD4+ e T CD8+ em ensaio de co-cultivo, através de citometria de fluxo.

Para isto, células não aderentes (predominantemente linfócitos) foram descongeladas 24 horas antes do início do ensaio e mantidas em garrafa de cultura contendo AIM-V® (GIBCO®, Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma-Aldrich) em estufa de CO₂ a 37 °C.

Em seguida, estas células foram cocultivadas por 96 ou 120 horas com IFN-DCs ou IL4-DCs imaturas, maduras ou pulsadas em placa de cultura de 96 poços (fundo U) em meio de cultura AIM-V® (GIBCO®, Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma-Aldrich). A proporção de células foi de 1 MoDC: 5 linfócitos.

O controle positivo foi composto por células estimuladas por 25 horas com PMA (Sigma-Aldrich) e ionomicina (Sigma-Aldrich). Todas as culturas foram tratadas com 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) por 24 horas antes do término da cultura. O controle negativo foi composto por linfócitos mantidos em AIM-V® (GIBCO®, Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma-Aldrich) durante 4 horas na presença de Brefeldina A (Sigma-Aldrich).

Após o término de cada período de cultura os linfócitos foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD3 e CD8 e para a citocina IFN- γ para ensaio por citometria de fluxo.

Foram adquiridos no mínimo 60.000 eventos de uma população celular determinada segundo suas características de tamanho e granulosidade, excluindo-se a região de células mortas utilizando citômetro BD LSRFortessa. A análise dos dados obtidos foi realizada através do software FlowJo®, na qual primeiramente foi selecionada a população de linfócitos com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade característicos dos linfócitos. Posteriormente, foi selecionada a população de células CD3+, da qual foram derivadas as populações CD8+ e CD8-. Em seguida, foram consideradas as células produtoras de IFN- γ aquelas

pertencentes às populações derivadas da última seleção e que apresentaram positividade para o marcador IFN- γ , originando populações CD3+CD8+IFN γ + e CD3+CD8-IFN γ +, como ilustrado na Figura 6. A delimitação dos *gates* utilizada na análise dos resultados foi baseada nos dados das células não marcadas.

2.9 Marcação de linfócitos para citometria de fluxo

2.9.1 Marcação de superfície

Linfócitos coletados após os tempos de cultivo foram incubados com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas extracelulares CD3 e CD8 (Tabela 3) sob refrigeração (4 °C) e protegido de luz por 20 minutos. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos com tampão de coloração (PBS contendo 5% de BSA) foi adicionada a solução de fixação/permeabilização (BD Cytotfix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization Kit), seguida de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e protegido de luz. Posteriormente, após realizar uma nova lavagem (1500 rpm/ 5 minutos) com tampão de coloração, as células foram ressuspensas novamente em tampão de coloração e armazenadas à 4 °C e protegido de luz até a realização da marcação intracelular.

2.9.2 Marcação intracelular

Os linfócitos previamente submetidos à marcação extracelular foram submetidos a duas lavagens (1500 rpm/ 5 minutos) com a solução BD Perm/Wash® (BD Cytotfix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization Kit) e, em seguida, foram incubados com o mesmo reagente juntamente com o anticorpo monoclonal específico para IFN- γ (Tabela 2) e incubados a 4°C e protegidos de luz durante 30 minutos. Posteriormente, os linfócitos foram submetidos a novas lavagens com a solução BD Perm/Wash® (BD Cytotfix/Cytoperm® Fixation/Permeabilization Kit). Por fim, as células foram ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow® (BD Bioscience) e adquiridas em citômetro de fluxo em até 24 horas.

Tabela 3 – Relação de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da produção de IFN- γ por linfócitos T.

Marcador/ Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Live/Dead® Fixable AquaDead Cell Stain Kit	V500	-	Life Technologies
Anti-CD3	PE-Cy5	UCHT1	BD Bioscience
Anti-CD4	PE	RPA-T4	BD Bioscience
Anti-CD8	APC-H7	SK1	BD Bioscience
Anti-IFN-γ	PE	B27	BD Bioscience

Figura 6 - Estratégia de análise utilizada na avaliação da produção intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD4+ e CD8+.

Representação gráfica da estratégia de análise utilizada na caracterização da expressão dos marcadores extracelulares e da produção intracelular de IFN- γ em linfócitos. Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos segundo tamanho e granulosidade característicos dessas células (A), seguida da população de células CD3+ (B), populações CD3+CD8+ ou CD3+CD8- (C) e, por fim, foram selecionadas as populações CD3+CD8-IFN γ + (C) e CD3+CD8+IFN γ + (D). A delimitação dos *gates* das células marcadas (azul) foi baseada nas células não marcadas (vermelho). Análise realizada por meio do software FlowJo®.

2.10 Descongelamento de células

Para o descongelamento de células o tubo criogênico foi parcialmente descongelado em banho-maria a 37° C e em seguida seu conteúdo foi transferido para um tubo contendo meio de cultura. As células foram então lavadas 2 vezes a 1500 rpm por 10 minutos para a remoção completa do DMSO (Labsynth) e utilizadas para os ensaios.

2.11 Análise de resultados

A geração dos gráficos e a análise estatística foram realizadas por meio do software Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc). Foi utilizado o teste One-way ANOVA para comparar os diferentes grupos com pós-teste Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos.

Para a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo foi utilizado o software FlowJo®.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do aspecto morfológico de MoDCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1 e indivíduos saudáveis

Monócitos isolados de 12 indivíduos infectados pelo HIV e de 5 doadores saudáveis foram submetidos aos protocolos de diferenciação de células dendríticas em IL4-DC e IFN-DC, a partir dos quais foram originadas MoDCs imaturas, maduras e pulsadas. Deste modo, após 7 dias de cultura foram capturadas imagens de IL4-DCs e IFN-DCs nos diferentes estágios de maturação. As Figuras 7 e 8 ilustram o aspecto de uma cultura de IFN-DCs e IL4-DCs derivadas de pacientes HIV+ e doadores saudáveis, respectivamente, que representam as amostras estudadas.

Observamos em ambos os grupos (HIV+ e HIV-), como esperado, as IL4-DCs imaturas apresentaram aspecto mais arredondado, tornando-se mais fusiformes após estímulo de maturação e/ou pulso viral. As IFN-DCs, por sua vez, apresentaram-se mais fusiformes e delgadas ainda no estado imaturo tornando-se ainda mais espreiadas e delgadas com relação às IL4-DCs quando maduras e/ou pulsadas.

Estas observações sugerem que as IFN-DCs apresentam características de células ativadas já no estado basal sugerindo um maior estágio de ativação que aquele encontrado nas IL4-DCs.

Além disso, baseados na metodologia utilizada para a avaliação morfológica dessas células, as MoDCs de pacientes HIV+ mostraram-se semelhantes às MoDCs de indivíduos saudáveis.

Figura 7 - Análise morfológica do 7º dia de cultura de IL4-DCs e IFN-DCs de indivíduo infectado pelo HIV-1

MoDCs foram obtidas por meio do protocolo IL4-DC e analisadas durante os estágios imaturo, maduro (após estímulo com citocinas pró-inflamatórias) e no estágio pulsado (MoDCs pulsadas com HIV inativado por AT-2). A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

Figura 8 - Análise morfológica do 7º dia de cultura de IL4-DCs e IFN-DCs de indivíduo sadio.

MoDCs foram obtidas por meio do protocolo IL4-DC e analisadas durante os estágios imaturo, maduro (após estímulo com citocinas pró-inflamatórias) e no estágio pulsado (MoDCs pulsadas com HIV inativado por AT-2). A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, com aumento de 200x.

3.2 Avaliação do perfil de expressão de moléculas de superfície de MoDCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1

IL4-DCs e IFN-DCs imaturas, maduras e pulsadas derivadas de monócitos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 ou indivíduos saudáveis foram caracterizadas fenotipicamente por meio da técnica de citometria de fluxo através da avaliação, em células expressando simultaneamente a molécula CD11c (marcador da linhagem mielóide), dos marcadores de superfície celular, HLA-DR (molécula de apresentação antigênica), CD1a (marcador de subtipo de DC), CD86, CD80 e CD40 (moléculas coestimuladoras), CD83 (marcador de ativação celular), BDCA-4, BDCA-2 (marcadores de células dendríticas plasmocitóides), CD56 (marcador de células NK), CD14 (marcador de monócitos) e CCR7 (receptor de quimiocina envolvido com migração celular).

Os resultados obtidos, representados pelo percentual de células positivas e intensidade média de fluorescência (MFI) estão ilustrados nas Figuras 9 a 17. De modo geral observa-se uma grande variação interindividual, ilustrada pela dispersão dos dados plotados no gráfico.

Com relação à expressão de HLA-DR (Figura 9), em amostras de DCs provenientes de indivíduos infectados, não observamos diferenças significativas entre os diferentes estágios de maturação das MoDCs, nem entre IFN-DC e IL4-DCs, tanto no que se refere ao percentual de células positivas quanto ao MFI. Entretanto observa-se, principalmente nas IL4-DCs uma tendência em aumentar a expressão desta molécula após pulso e/ou estímulo para maturação. Por sua vez, indivíduos saudáveis apresentaram aumento no percentual de IL4-DCs maduras e pulsadas, com relação às imaturas e aumento no MFI de IFN-DCs e também de maduras e pulsadas, com relação às DCs imaturas (Figura 9).

Figura 9 – Expressão de HLA-DR em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para a molécula de superfície HLA-DR. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Com relação à expressão de CD1a, observamos uma grande variabilidade na expressão deste marcador tanto para IL4-DCs quanto para IFN-DCs de indivíduos saudáveis e infectados. Em particular para indivíduos infectados observamos que as IFN-DCs apresentam uma tendência a expressar CD1a em menores níveis percentuais em comparação com IL4-DCs (Figura 10).

Figura 10 – Expressão de CD1a em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para a molécula de superfície CD1a. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Com relação à expressão de CD86 observamos um perfil bastante similar ao observado para HLA-DR, e novamente, somente nos indivíduos saudáveis observamos que IL4-DCs imaturas apresentam níveis percentuais de expressão de CD86 significativamente menores com relação às maduras ou pulsadas. Além disso, IFN-DCs imaturas provenientes de indivíduos saudáveis apresentaram intensidade de fluorescência menor com relação às DCs maduras ou pulsadas (Figura 11).

Figura 11 – Expressão de CD86 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para a molécula de superfície CD86. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Com relação à molécula CD80 (Figura 12) observamos que nas IL4-DCs tanto de indivíduos infectados como de controles, o pulso viral e/ou estímulo para maturação levou a um aumento significativo na expressão desta molécula, comparado ao estágio imaturo. O mesmo não é observado nas IFN-DCs, cuja expressão de CD80 entre os estágios de maturação e/ou ativação estudados não alcança diferença estatística. Além disso, com relação ao percentual de positividade, podemos observar que IFN-DCs imaturas de ambos, pacientes e controles, apresentam uma tendência a expressar maiores níveis de CD80 comparadas às IL4-DCs imaturas, sugerindo maior nível de ativação das IFN-DCs (Figura 12).

Figura 12 – Expressão de CD80 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores sadios (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície CD80. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Referente à expressão de CD83 em indivíduos infectados e controles, observamos diferenças significativas entre o percentual de células positivas para esta molécula nas IL4-DCs imaturas com relação às IL4-DCs maduras/ pulsadas. O mesmo, não foi observado nas IFN-DCs, cujos níveis, em todos os estágios de maturação, foram comparáveis aos observados nas IL4-DCs imaturas, sugerindo que o estímulo de ativação não induziu o aumento da expressão de CD83 nas IFN-DCs (Figura 13).

Figura 13 – Expressão de CD83 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície CD83. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Com relação à expressão de CD40, observamos um perfil de expressão similar ao observado para HLA-DR e CD86, nos quais indivíduos infectados apresentaram níveis de expressão similares tanto em IL4-DCs quanto em IFN-DCs e indivíduos saudáveis apresentaram aumento de expressão de CD40 por IL4-DCs após estímulo para maturação (Figura 14).

Figura 14 – Expressão de CD40 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície CD40. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Analisamos em seguida a expressão dos marcadores de DCs plasmocitóides BDCA-4 (Figura 15) e BDCA-2 (Figuras 16). A expressão de BDCA-4 demonstrou-se similar entre IL4-DCs e IFN-DCs, tanto com relação ao percentual quanto MFI, independente do estágio de ativação das células. Com relação à expressão de BDCA-2, observamos que as IL4-DCs expressam este marcador em percentuais reduzidos, diferente do observado nas IFN-DC, que exibem tendência em expressar maiores níveis independente do estágio de ativação.

Figura 15 – Expressão de BDCA-4 em MoDCs de indivíduos HIV+ e HIV-

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV (gráficos à esquerda) ou doadores saudáveis (gráficos à direita) foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície BDCA-4. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Figura 16 – Expressão de BDCA-2 em MoDCs de indivíduos HIV+

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície BDCA-2. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Finalmente analisamos a expressão da molécula CD56 (Figura 17). Diferentemente do esperado, observamos que IL4-DCs são capazes de expressar esta molécula, ainda que em níveis reduzidos. Por sua vez IFN-DCs, independente do estado de ativação, são capazes de expressar CD56 em níveis maiores, apresentando diferença significativa com relação às IL4-DCs maduras.

Figura 17 – Expressão de CD56 em MoDCs de indivíduos HIV+

No 7º dia de cultura IL4-DCs (azul) e IFN-DCs (vermelho) de indivíduos infectados pelo HIV foram marcadas com anticorpo monoclonal específico para a molécula de superfície CD56. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média da frequência (gráficos superiores) e do MFI (gráficos inferiores) $\pm$ erro padrão.

Com relação às moléculas CD14 e CCR7 os valores encontrados demonstraram, respectivamente, altos níveis de ligação inespecífica e valores muito baixos e não foram apresentados nesta figura.

Vale ainda salientar que tivemos problemas com os anticorpos anti-CD40 e anti-CD56, impossibilitando a análise de algumas amostras, de modo que os dados apresentados para estes marcadores apresentam número amostral reduzido.

Também cabe mencionar que não foi possível avaliar os níveis de expressão de BDCA-2 e CD56 em amostras de indivíduos saudáveis devido a problemas técnicos com o anticorpo monoclonal utilizado, o que prejudicou nossos ensaios.

3.3 Análise da expressão de genes constituintes do inflamassoma e secreção de IL-1 β

Este ensaio foi realizado com o objetivo de averiguar se existiriam diferenças entre IFN-DCs e IL4-DCs com relação à expressão de genes dos componentes do inflamassoma, através da análise de mRNA de: *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B*. Além disto, também foi avaliada a secreção de IL-1 β , produto final da cascata do inflamassoma.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 18. Com relação à expressão de mRNA, observamos que o estímulo de ambas IFN-DCs e IL4-DCs com vírus inativado não foi capaz de induzir a expressão de quaisquer dos componentes do inflamassoma investigados ($1,5 > FC > 0,5$) (FC = fold change) (Figura 18A). Corroborando estes dados, observamos que de fato o estímulo com HIV-1 não foi capaz de aumentar a secreção de IL-1 β , tendo sido encontrados valores similares entre as culturas não estimuladas e estimuladas com HIV, tanto em sobrenadante de IFN-DC quanto de IL4-DC (Figura 18B).

Trabalho anterior publicado por nosso grupo demonstrou haver diferenças na expressão de inflamassoma por MoDCs de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados pelo HIV (Pontillo et al, 2012). Neste contexto, decidimos investigar a expressão do inflamassoma por IFN-DCs e IL4-DCs derivadas de indivíduos saudáveis. Os resultados estão ilustrados na Figura 19.

De modo geral observamos que em IL4-DCs derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis o estímulo com HIV induziu aumento na expressão de *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CASP1* e *IL1B* ($FC > 1,5$) em relação às culturas não estimuladas (Figura 20A). O mesmo não foi observado com relação à expressão destes componentes pelas IFN-DCs de indivíduos saudáveis, as quais apresentaram valores de expressão muito próximos aos valores basais.

Em particular com relação à expressão de *NLRP3* observamos que o pulso com HIV-1 promoveu aumento na expressão deste componente nas IL4-DCs ($FC=22,47$), o que não foi observado nas IFN-DCs ($FC=1,24$), tendo sido observada uma diferença estatisticamente significativa entre estes valores ($p < 0,003$) (Figura 19A).

Os resultados de dosagem dos níveis de IL-1 β em sobrenadantes de cultura corroboraram os dados de expressão gênica. Observamos que IL4-DCs derivadas de indivíduos saudáveis apresentaram aumento na produção de IL-1 β em resposta ao estímulo com HIV. Por sua vez IFN-DCs não foram capazes de responder ao estímulo viral (Figura 19B).

Um aspecto interessante observado nestes ensaios foi a diferença na resposta obtida entre indivíduos saudáveis e aqueles infectados pelo HIV. Podemos observar que em comparação a indivíduos saudáveis, os indivíduos infectados pelo HIV apresentam altos níveis de IL-1 β já na condição basal, e o estímulo com HIV não foi capaz de modificar os níveis de secreção desta citocina, tanto por IFN-DCs quanto por IL4-DCs (Figura 20).

Figura 18 - Expressão dos genes do inflamassoma e produção de IL-1 β de IL4-DC e IFN-DC de indivíduos HIV+ pulsadas com HIV-1.

(A) Expressão de mRNA dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1* e *IL1B* após 4 horas de estímulo de IL4-DC e IFN-DC com HIV-1 inativado por AT-2. O fold change (FC) da expressão de cada gene foi calculada com relação à condição não tratada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{HIV} - \Delta Ct_{não\ estimulado}$. Os resultados foram expressos como média do $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ erro padrão, $n=10$. Todos os valores foram normalizados com relação ao valor do ΔCt do controle endógeno *ACTB*. A região destacada representa o limiar de FC (0.5-1.5). Foi utilizada a análise 1-way Anova para comparar a expressão dos genes nas IFN-DCs e IL4-DCs. $*p<0,05$. (B) Sobrenadantes de cultura de IFN-DC e IL4-DC estimuladas ou não com HIV-1 foram analisados quanto à secreção de IL-1 β . Os resultados foram expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ erro padrão.

Figura 19 - Expressão dos genes do inflamassoma e produção de IL-1 β de IL4-DC e IFN-DC de indivíduos sadios pulsadas com HIV-1.

(A) Expressão de mRNA dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1* e *IL1B* após 4 horas de estímulo de IL4-DC e IFN-DC com HIV-1 inativado por AT-2. O fold change (FC) da expressão de cada gene foi calculada com relação à condição não tratada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ HIV} - \Delta Ct \text{ não estimulado}$. Os resultados foram expressos como média do $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ erro padrão, $n=15$. Todos os valores foram normalizados com relação ao valor do ΔCt do controle endógeno *ACTB*. A região destacada representa o limiar de FC (0.5-1.5). Foi utilizada a análise 1-way Anova para comparar a expressão dos genes nas IFN-DCs e IL4-DCs. $*p<0,05$. (B) Sobrenadantes de cultura de IFN-DC e IL4-DC estimuladas ou não com HIV-1 foram analisados quanto à secreção de IL-1 β . Os resultados foram expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ erro padrão.

Figura 20 – Secreção de IL-1 β por IFN-DCs e IL4-DCs de indivíduos HIV+ e HIV-

Secreção de IL-1 β analisada em sobrenadantes de cultura de IFN-DCs e IL4-DCs não estimuladas e pulsadas com HIV-1. A dosagem da citocina foi realizada através de ELISA. Os resultados foram expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ erro padrão.

3.4 Avaliação do perfil de secreção de IL-12p70 e IL-10 por IFN-DCs e IL4-DCs

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar as citocinas produzidas por IFN-DCs e IL4-DCs durante os diferentes estágios de ativação. Assim as citocinas IL-10 e IL-12p70 foram mensuradas no sobrenadante das culturas de MoDCs, isoladas de 9 indivíduos HIV+ (Figuras 21A e 21C) e 5 indivíduos sadios (Figuras 21B e 21D), através da técnica de ELISA.

Nas Figuras 21A e 21B, estão representados os resultados da dosagem de IL-12p70 em sobrenadantes de cultura, respectivamente de indivíduos infectados e indivíduos sadios. Observa-se uma variabilidade interindividual, principalmente com relação à produção desta citocina pelas IFN-DCs de indivíduos sadios, não tendo sido observada diferenças significativas entre os tipos de MoDCs, entre as células imaturas ou maduras/pulsadas ou entre os grupos de indivíduos HIV+ e HIV-. Com relação às IFN-DCs observamos que as células imaturas não produziram níveis detectáveis desta citocina, com exceção do Paciente 4 que produziu em torno de 1500 pg/mL de IL-12p70 (Figura 21A). Com relação à produção de IL-10 (Figura 21C e 21D) os sobrenadantes testados não apresentaram níveis detectáveis desta

citocina exceto a amostra de sobrenadante de IL4-DC do Paciente 5, que continha cerca de 760 pg/mL de IL-10.

Figura 21 - Níveis de secreção de IL-12p70 e IL-10 dosadas em sobrenadantes de cultura de MoDCs de indivíduos infectados pelo HIV-1 e indivíduos saudáveis.

Sobrenadantes de cultura do 7º dia de cultivo de MoDCs imaturas, maduras e pulsadas obtidas por meio dos protocolos IL4-DC e IFN-DC foram coletados e utilizados para a dosagem de IL12p70 (A) e IL-10 (B) por meio de ELISA. Foi utilizada a análise 1-way Anova para comparação entre as variáveis. Os resultados estão expressos na forma de média da concentração (pg/mL) $\pm$ desvio padrão.

3.5 Análise da proliferação de linfócitos T estimulados por MoDCs

A capacidade das IFN-DCs em estimular a proliferação de linfócitos T foi avaliada por meio do cocultivo de MoDCs com linfócitos alogênicos por 144 horas. A proliferação celular foi mensurada através da marcação dos linfócitos com CFSE.

Para tanto, foram comparados os percentuais de proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ após estímulo com IFN-DCs imaturas, maduras ou pulsadas. Para fins comparativos, foram realizados ensaios em paralelo utilizando IL4-DCs.

Os resultados apresentados referem-se à diferença entre a porcentagem da proliferação de linfócitos no tempo basal e a porcentagem da proliferação dos linfócitos induzida pelas MoDCs após as 144 horas de cocultivo, isto é:

$$\Delta = \% \text{ de proliferação estimulada por 144h} - \% \text{ de proliferação basal}$$

Os resultados obtidos estão representados na Figura 22. De modo geral observamos que os níveis de proliferação apresentaram uma grande variabilidade interindividual, o que dificulta a interpretação dos resultados.

Com relação à proliferação de linfócitos TCD4+, observamos que em indivíduos infectados pelo HIV tanto IL4-DCs quanto IFN-DCs apresentaram perfil semelhante de estímulo, independente do estágio de ativação. Por sua vez, embora não tenha sido observada diferença significativa, IL4-DCs maduras ou pulsadas de indivíduos sadios mostram uma tendência a induzir maiores níveis de proliferação em comparação às IFN-DCs e também com relação às IL4-DCs imaturas (Figura 22A e 22B).

Com relação aos linfócitos TCD8+ observamos um perfil similar ao observado para linfócitos TCD4+, com níveis de proliferação similares em culturas estimuladas com IL4-DCs ou IFN-DCs de indivíduos infectados. Com relação às DCs provenientes de indivíduos sadios, observamos que IL4-DCs maduras e pulsadas tendem a induzir maiores níveis de proliferação alogênica, em comparação às IL4-DCs ou IFN-DCs, independente do estágio de maturação.

Figura 22 - Proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por MoDCs.

Linfócitos isolados de PBMCs de doadores saudáveis foram marcados com CFSE e cocultivados durante 144 horas juntamente com IL4-DCs e IFN-DCs imaturas, maduras e pulsadas derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1 (A e C) e indivíduos saudáveis (B e D). O percentual proliferativo de linfócitos T CD4+ (A e B) ou CD8+ (C e D) foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média (n=5) ± erro padrão. Os dados demonstrados referem-se à diferença (Δ) entre a porcentagem da proliferação após 144 horas de estímulo e a proliferação basal.

3.6 Análise da expressão de IFN- γ por linfócitos T estimulados por MoDCs

A capacidade funcional de IFN-DCs de indivíduos infectados em processar e apresentar antígenos de HIV a linfócitos T e finalmente estimular uma resposta específica foi avaliada por meio de cocultivo de MoDCs com linfócitos autólogos por 96 e 120 horas, nos quais foi mensurada a produção da citocina IFN- γ .

Para tanto, foram comparados os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ após estímulo com IFN-DCs maduras ou pulsadas. Para fins comparativos, foram realizados ensaios em paralelo utilizando IL4-DCs.

Os resultados apresentados referem-se à diferença entre a porcentagem das respostas específicas e as respostas inespecíficas ao HIV induzidas pelas MoDCs, isto é, percentual de células produtoras de IFN- γ induzida por MoDCs pulsadas subtraído o percentual de células produtoras de IFN- γ induzida por MoDCs maduras não pulsadas, ou seja, que supostamente não apresentavam antígenos de HIV.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 23. A população de linfócitos TCD4⁺ produtora de IFN- γ (Figura 23A) tanto estimulada por 96 horas, quanto por 120 horas, foi capaz de produzir a citocina em estudo, porém quando comparadas IL4-DCs e IFN-DCs não foram observadas diferenças significativas. Semelhante perfil de resposta foi encontrado na população de células TCD8⁺ (Figura 23B), as quais foram similarmente estimuladas por IL4-DCs e IFN-DCs.

De modo geral observamos que as culturas estimuladas tanto com IL4-DCs quanto com IFN-DCs maduras (não pulsadas com HIV), cujos valores foram considerados valores basais, apresentaram níveis elevados, de modo que uma parcela das amostras analisada acabou por apresentar produção considerada nula de IFN- γ , o que pode ter prejudicado a análise.

Vale ainda salientar que os valores de nossos controles positivos apresentaram-se elevados, mostrando que as células estavam viáveis e tinham potencial de produzir a citocina em estudo.

Figura 23 - Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por IL4-DCs ou IFN-DCs.

Células não aderentes foram cocultivadas juntamente com IL4-DCs ou IFN-DCs estimuladas por 48 horas com HIV inativado por AT-2 durante 96 e 120 horas. A diferença do percentual de linfócitos T CD4+ (gráfico à esquerda) ou CD8+ (gráfico à direita) produtores de IFN- γ foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na forma de média (n=11) $\pm$ erro padrão. Os dados demonstrados referem-se à diferença (Δ) entre a porcentagem das respostas específicas e as respostas inespecíficas (Δ = % produção de IFN- γ induzida por MoDCs pulsadas - % produção de IFN- γ induzida por MoDCs maduras).

4 DISCUSSÃO

A habilidade das DCs em induzir e coordenar uma resposta imune antígeno-específica faz destas células ferramentas potenciais em estratégias de imunoterapia.

Os primeiros protocolos clínicos utilizando células dendríticas tiveram início na década de 90 visando o tratamento de indivíduos acometidos por tumor do tipo melanoma. Desde então é crescente o número de estudos avaliando esta estratégia, tendo sua aplicação se estendido para outros tipos de tumores e posteriormente também para doenças infecciosas, como a infecção pelo HIV (Brossart, 2000; Connolly et al., 2008; Garcia et al., 2005; 2011; 2013; Kundu et al., 1998; Levy et al., 2014; Lu et al., 2004; Nestle et al., 1998; Nestle, 2000; Schuler-Thurner et al., 2000; Thurner et al., 1999).

De modo geral o protocolo convencionalmente utilizado para a produção da vacina de células dendríticas nos estudos clínicos envolve a cultura do precursor, em geral monócito, na presença de IL-4 e GM-CSF. Entretanto alguns trabalhos passaram a propor a diferenciação de DCs na presença de IFN tipo I, geralmente IFN- α (Garcin et al, 2013; Moschella et al, 2010; Paquette et al, 1998; 2002; Santini et al, 2011). A presença de IFN- α promove a diferenciação em IFN-DCs que apresentam características mistas de DCs mielóides, DCs plasmocitóides e de células NK. Foi demonstrado que estas células são capazes de reconhecer PAMPs, expressar DC-SIGN, TLR 1-8 e LOX-1, além de receptores típicos de células NK, tais como CD56, granzimas e TRAIL, assim como estimular células CD8+ HIV-específicas (Farkas et al, 2008; Korthals et al, 2007).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar IFN-DCs derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV e comparar o perfil fenotípico e funcional destas células com MoDCs convencionalmente utilizadas, diferenciadas na presença de IL-4, denominadas IL4-DCs.

Com o propósito de estudar a morfologia apresentada pelas IFN-DCs, avaliamos as células nos diferentes estágios de diferenciação/ativação. Para fins comparativos culturas de IL4-DCs foram realizadas em paralelo e como esperado, estas culturas apresentaram as características comumente descritas. Segundo Lins e colaboradores (2003), a morfologia das DCs (diferenciadas na presença de IL-4 e

GM-CSF) depende do seu estado de maturação. A forma madura caracteriza-se por seu aspecto irregular, estrelado e com prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, enquanto a forma imatura apresenta-se mais regular com aspecto arredondado e prolongamentos ausentes ou em pequena quantidade.

Por sua vez, as IFN-DCs ainda no estado imaturo exibiram forma semelhante àquela encontrada em IL4-DCs maduras/pulsadas, isto é, as IFN-DCs demonstraram aspectos morfológicos característicos de células ativadas já no seu estado basal. Tal fato sugere que as IFN-DCs imaturas apresentam-se precocemente semi-maduras. Após estímulo para ativação, essas características tornaram-se ligeiramente mais pronunciadas quando comparadas às IL4-DCs. A presença do HIV inativado, por sua vez, aparentemente não alterou o aspecto da cultura, visto as DCs pulsadas e ativadas apresentarem-se similares às culturas também ativadas, mas que não receberam o pulso viral.

O HIV infecta principalmente linfócitos T CD4+ por meio da ligação da glicoproteína viral gp120 às moléculas CD4 e aos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. O HIV pode também infectar DCs mielóides e plasmocitóides, através destes receptores clássicos ou via DC-SIGN ou BDCA-2, respectivamente.

Deste modo o HIV invade as células e promove a inserção do seu material genético no DNA da célula hospedeira, dando origem ao provírus e, posteriormente, novas partículas virais são geradas após produção de proteínas virais durante a transcrição ativa da célula hospedeira. Em particular no citosol de DCs, o HIV pode ser reconhecido pelos TLRs endossomais ou por receptores citoplasmáticos, como RIG-like receptors (RLRs) e NOD-like receptors (NLRs), que reconhecem o material genético do vírus. Após o reconhecimento, inicia-se o processo de maturação das DCs e cascatas de sinalização intracelular são desencadeadas, as quais culminam na ativação de fatores de transcrição, tais como NF- κ B e fatores reguladores do interferon (IRFs – do inglês: **Interferon** regulatory factor), que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I, além de induzir alteração morfológica das DCs e mudanças na expressão de moléculas de superfície, que favorecem sua migração para os órgãos linfóides secundários e a apresentação dos antígenos virais aos linfócitos T CD8+ e CD4+, por meio das moléculas MHC de classe I e II, respectivamente (Manches et al, 2014).

Neste contexto, o antígeno utilizado em nossos ensaios é composto por um *pool* de HIV quimicamente inativado por aldrithiol-2 (AT-2), que é um álcool que promove uma modificação covalente nas proteínas do nucleocapsídeo viral, mantendo a integridade conformacional do vírus, mas tornando-o incapaz de inserir seu genoma no DNA da célula hospedeira (Rossio et al, 1998). Desta forma, tem-se o HIV não infeccioso, mas íntegro, capaz de se ligar às moléculas presentes na superfície das DCs e ser internalizado, permitindo o seu reconhecimento, processamento e apresentação aos linfócitos T.

Uma vantagem potencial do uso do vírus inteiro inativado é a possibilidade de oferecer ao sistema imune um repertório completo de antígenos do HIV. Além disso, até o presente os resultados de protocolos clínicos de imunoterapia baseada em células dendríticas mais promissores em termos de controle viral são os que utilizaram vírus inteiro e inativado (Garcia et al, 2013, Lu et al 2004).

Em nossos ensaios não observamos diferenças morfológicas entre as culturas de DCs ativadas com citocinas e aquelas que foram pulsadas ou não pulsadas com o HIV. Podemos especular que o coquetel de citocinas pró-inflamatórias induziu um estímulo que sobrepujou os efeitos causados pela presença do vírus nas culturas também pulsadas.

Observamos que a presença do IFN- α promoveu um aspecto semi-maduro nas IFN-DCs consideradas imaturas, ou seja, ainda não tratadas com o coquetel de citocinas inflamatórias. Além de seu potente efeito antiviral, o IFN- α está também envolvido nos processos de imunomodulação como regulação da homeostase, sobrevivência, diferenciação e recrutamento de células imunes. O IFN- α atua promovendo a maturação de DCs por meio do aumento da apresentação de antígenos e principalmente por elevar a expressão de moléculas de coestimulação e moléculas de MHC de classe I (Ng, Gomerman, 2013), o que explica a maior ativação das IFN-DCs observadas na avaliação morfológica.

Com relação ao perfil fenotípico determinado através da análise da expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo, observamos que as IFN-DCs compartilham algumas características com as IL4-DCs, entretanto apresentam-se distintas em outros aspectos.

IFN-DCs e IL4-DCs dos indivíduos infectados pelo HIV apresentaram-se similares com relação à expressão de HLA-DR, CD40 e CD86, indicando que a presença do IFN- α não alterou características associadas ao processo de apresentação antigênica, independente de seu estágio de diferenciação/ativação. Quando comparamos os resultados da expressão de CD40 entre grupos de indivíduos, notamos que IL4-DCs e IFN-DCs imaturas dos indivíduos HIV+ possuem maior expressão de CD40 em relação aos indivíduos saudáveis, possivelmente causada pelo estado de ativação crônica do sistema imune em infectados. As moléculas HLA-DR, CD86 e CD40 são expressas principalmente por APCs, tendo como principal função apresentar antígenos aos linfócitos TCD4+, coestimular linfócitos T em conjunto com a molécula CD80 através da ligação com CD28 (Bugeon, Dallman, 2000) e induzir a ativação das APCs após interação com CD40L presente nos linfócitos T (Chatzigeorgiou et al, 2009), respectivamente.

Com relação à expressão de CD1a, observamos que os níveis de expressão foram em geral baixos tanto em IL4-DCs quanto IFN-DCs, sendo as médias observadas inferiores a 50% de expressão. A molécula CD1a pertence à família CD1, que são moléculas envolvidas na apresentação não clássica de antígenos (apresentação de antígenos não processados por via TAP-independente), capazes de reconhecer lipídios e glicolipídios e estimular linfócitos T $\gamma\delta$ e linfócitos intraepiteliais, sendo expressa por DCs mielóides (Banchereau et al, 2000). Uma explicação para a baixa expressão alcançada em nossos ensaios pode ser a utilização de meio de cultura livre de soro, com baixo teor de lipídios, que não favoreceu a expressão desta molécula. Além disso, observamos uma grande diferença interindividual na expressão de CD1a nas IL4-DCs. Gogolaket et al (2007) demonstraram que monócitos cultivados em AIM-V (mesma condição utilizada por nós) diferenciam-se em 2 populações distintas de DCs: CD14^{low}CD1a⁻ e CD14⁻CD1a⁺. Tais populações diferem com relação à capacidade de internalizar antígenos e produzir citocinas e quimiocinas, entretanto não diferem quanto à capacidade de ativar linfócitos. Estes mesmos autores averiguaram que a expressão de CD1a em células dendríticas derivadas de monócitos é muito heterogênea, com percentuais variando de 0 a 100% dentre os 87 indivíduos estudados.

Com relação ao CD83 observamos que o estímulo para maturação levou a um aumento significativo na expressão desta molécula por IL4-DCs, mas não nas IFN-

DCs, cujos níveis baixos de expressão apresentaram-se baixos e assim os mantiveram, independente do estímulo inflamatório e/ou viral, tanto nos indivíduos saudáveis, quanto nos indivíduos infectados pelo HIV.

CD83 é uma molécula pertencente à família das imunoglobulinas, expressa em DCs ativadas e em outras células do sistema imune. Estudo avaliando o posicionamento intracelular de CD83 constatou que embora esta molécula esteja presente no compartimento do complexo de Golgi e em endossomos tanto em DCs imaturas, quanto em DCs maduras, apenas as DCs maduras apresentam o CD83 co-localizado em vesículas endocíticas ricas em moléculas de MHC de classe II. Além disso, sugeriu-se que a expressão de CD83 é induzida pela inibição da endocitose de antígenos, cujo processo sofre redução após ativação de DCs (Klein et al, 2005). Ainda, Tze et al (2011) mostraram que CD83 auxilia na expressão de MHC de classe II e CD86 por bloquear uma proteína transmembrana (MARCH1), que é induzida por IL-10 e é responsável por internalizar moléculas de MHC de classe II e CD86. Deste modo, a baixa expressão de CD83 em DCs está relacionada com uma baixa indução na proliferação de células T alogênicas e baixa capacidade em estimular a secreção de IFN- γ por células T (Aerts-Toegaert et al, 2007). Considerando que CD83 é expresso por DCs ativadas, a expectativa era que as IFN-DCs apresentassem um aumento na sua expressão, dado que estas células demonstraram-se morfologicamente mais ativadas, porém não foi isto o observado. Podemos supor que a adição de IFN- α tenha alterado, de alguma forma, a expressão destas moléculas, uma vez que as IL4-DCs foram capazes de expressá-la em maiores níveis. Todavia, é válido ressaltar que ensaios utilizando o IFN- α como fator de diferenciação ou de ativação de células dendríticas induziu diferentes perfis de expressão de CD83. Isto se deve aos diferentes tipos de estímulos utilizados e, consecutivamente, o tipo de via de sinalização desencadeada. A aplicação de IFN- α , apenas, parece não induzir o aumento na expressão de CD83, porém a combinação com cofatores, que promovem diferentes sinais de maturação, como ligantes de TLR (p. ex. LPS e Poly I:C), ou CD40L e PGE2 produziu aumento dos níveis de CD83 nas DCs (Della et al. 2004; Padovan et al. 2002; Pham et al. 2011; Tosello et al, 2009; Trepikak et al. 2009).

Referente à molécula CD80, observamos que as IFN-DCs, independente do estágio e tipo de ativação, expressaram essa molécula em níveis semelhantes aos

exibidos pelas IL4-DCs maduras e pulsadas. Essa característica foi observada em ambos os grupos de indivíduos estudados. CD80 é uma molécula coestimuladora expressa predominantemente em APCs, como as DCs. Além de outras funções, CD80 está envolvido na ativação de linfócitos T, constituindo o 2º sinal de ativação, através da ligação ao CD28 expresso em linfócitos T. Logo, ocorre a ligação entre CD40 (expresso nas DCs) e CD40L (expresso nos linfócitos T), cuja interação induz o aumento da expressão de CD80 e CD86, além da secreção de IL-12, compondo o 3º sinal para a ativação do linfócito T (Banchereau et al, 2000; Banchereau, Steinman, 1998). Deste modo, entende-se que elevados níveis de CD80 caracterizam DCs maduras/ativadas, sugerindo o perfil ativado de IFN-DCs imaturas. Este achado corrobora com aquele demonstrado por Farkas e colaboradores (2008), cujo estudo avaliou IFN-DCs imaturas estimuladas com ligantes de TLR 7 e TLR 8 (ssRNA), tendo sido constatado elevados níveis de expressão de HLA-DR, CD86 e CD80.

Com o objetivo de estudar as IFN-DCs quanto à presença de características de DCs plasmocitóides, avaliamos a expressão das moléculas BDCA-2 e BDCA-4. Observamos que as IL4-DCs expressaram BDCA-2 em percentuais reduzidos, diferente do observado nas IFN-DCs, que exibiram tendência em expressar maiores níveis independente do estágio de ativação. A expressão de BDCA-4, por sua vez, demonstrou-se similar entre IL4-DCs e IFN-DCs, independente do estágio de ativação das células e da presença da infecção pelo HIV.

BDCA-2 é uma lectina do tipo C (tipo II) envolvida na internalização de seus ligantes (p.ex.vírus, bactérias, DNA bacteriano (DNA CpG), RNA dupla-fita (Poly I:C), DNA hipometilado) e no processamento e apresentação de antígenos. Deste modo, BDCA-2 pode ser classificada como receptor de antígenos (Dzionek et al 2001; Fitzgerald-Bocarsly et al, 2008). BDCA-4, por sua vez, também denominado neuropilina I, devido ao seu importante papel no sistema nervoso, está envolvido na facilitação da interação entre MoDCs e linfócitos T não estimulados durante a resposta imune (Grage-Griebenow et al 2007). BDCA-2 e BDCA-4 são moléculas expressas exclusivamente por DCs plasmocitóides presentes no sangue periférico, contudo, MoDCs geradas *in vitro* também são capazes de expressar BDCA-4, diferente de BDCA-2, que é expresso exclusivamente por DCs plasmocitóides (Dzionek et al 2000). Nossos achados estão em acordo com estas observações,

uma vez que observamos que tanto IL4-DCs quanto IFN-DCs expressaram BDCA-4 em níveis similares, e que a expressão de BDCA-2 é predominante nas IFN-DCs, corroborando o fato de que as IFN-DCs estudadas apresentam características de DCs plasmocitóides.

Avaliamos ainda a presença de características de células NK em IFN-DCs, através da expressão de CD56. A molécula CD56 é um marcador clássico de células NK, embora também possa ser expressa por outras células. Estudo realizado por Vallejo e colaboradores (2013) demonstrou que apenas o estímulo de CD56 foi suficiente para induzir ativação de células NK e células T (TCR-independente), constatada através do aumento da expressão de CD69 e CD25 e da produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ . A expressão de CD56 por IFN-DCs foi descrita em alguns trabalhos que demonstraram que a atividade citotóxica das IFN-DCs é mediada principalmente por um subtipo expressando CD56. Além disso, os autores demonstraram que IFN-DCs CD56⁺ expressam TRAIL, um dos mecanismos de lise utilizados na resposta citotóxica. Embora não tenhamos investigado outros aspectos com relação à atividade do CD56 em nossas IFN-DCs, e o número amostral analisado tenha sido prejudicado por problemas técnicos, ainda assim foi possível averiguar que as IFN-DCs estudadas apresentam características de células NK.

De modo geral os resultados de caracterização fenotípica mostraram que foi possível a diferenciação de IFN-DCs a partir de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV, assim como de indivíduos saudáveis. Como esperado, as IFN-DCs do grupo HIV⁺ expressaram características de DCs mielóides, plasmocitóides e células NK.

Em seguida investigamos as IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV com relação à expressão de componentes do inflamassoma e secreção de IL-1 β . O inflamassoma é um complexo citoplasmático multiproteico cujos componentes incluem uma proteína sensora (receptor intracelular que pode ser NLRP1, NLRP3, NLRC4 ou AIM-2), uma proteína adaptadora ASC e uma protease inflamatória denominada caspase 1. Os inflamassomas são expressos principalmente em células mielóides, como monócitos e células dendríticas, e em resposta ao estímulo por PAMPs e DAMPs a proteína sensora sofre alterações conformacionais, cujo processo leva à montagem da plataforma inflamassoma, que por sua vez promove a ativação de caspase 1. Uma vez ativada, a caspase 1 cliva os precursores

biologicamente inativos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, gerando suas formas inflamatórias maduras e ativas (Gross et al, 2011; Lamkanfi, 2011; Ludigs et al, 2012).

Nossos resultados mostraram que IFN-DCs derivadas de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV não foram capazes de expressar quaisquer dos componentes do inflamassoma em resposta ao estímulo com HIV, similarmente às IL4-DCs também derivadas de indivíduos infectados. Por sua vez, IL4-DCs de indivíduos sadios foram capazes de expressar o componente NLRP3 após estímulo viral, entretanto IFN-DCs derivadas destes mesmos indivíduos não foram capazes de fazê-lo.

Estudos anteriores já haviam demonstrado o papel importante de NLRP3-inflamassoma durante a maturação e ativação de DCs em camundongos (Schroder, Tschopp, 2010). No contexto da infecção pelo HIV, estudo conduzido por nosso grupo demonstrou que de fato, indivíduos infectados pelo HIV são incapazes de aumentar a expressão do inflamassoma em resposta ao estímulo viral ou a presença de LPS (Pontillo et al, 2012). Isto provavelmente se deve aos elevados níveis basais de produção de IL-1B pelos indivíduos infectados, resultado do estado de ativação crônica característico destes pacientes.

Os dados ora apresentados corroboram o estudo anteriormente publicado e enfatizam que a condição de irresponsividade de MoDCs de indivíduos infectados se mantém independente do tipo de protocolo de diferenciação de MoDCs utilizado. Além disso, os resultados demonstram que a presença de IFN- α modula a expressão do inflamassoma durante a diferenciação de DCs, já que IFN-DCs de indivíduos sadios também não foram capazes de expressar componentes do inflamassoma (Pontillo et al, 2013).

O IFN- α apresenta função pró-inflamatória e anti-inflamatória. Ao se ligar ao receptor IFNR, esta citocina induz a ativação dos ISGs como forma de controlar a infecção viral e simultaneamente estimula a produção de IL-10 e de IL-1a, como forma de regular a ativação imune. A IL-10 estimula a produção de IL-1a, que por sua vez atua como antagonista do receptor de IL-1 β bloqueando a interação da IL-1B com seu receptor (Ludigs et al, 2012). Além disso, Guarda e colaboradores (2011) demonstraram em ensaios realizados com camundongos que o IFN do tipo I

suprime os níveis de pró-IL-1B, pois reduz a ativação de NLRP1 e NLRP3, com consequente diminuição de caspase 1, enzima responsável por clivar pró-IL-1B em IL-1B madura. Ainda, a habilidade do IFN do tipo I em induzir a produção de IL-10 promove a redução da produção de pró-IL-1B. Deste modo, a atividade anti-inflamatória do IFN- α explica a baixa expressão de componentes do inflamassoma observado tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos infectados pelo HIV.

Seguindo para a análise funcional, avaliamos a secreção das citocinas IL-12p70 e IL-10 por IFN-DCs frente ao estímulo com HIV-1.

Com relação à dosagem de IL-12 observamos que IFN-DCs imaturas, tanto de indivíduos infectados quanto de controles saudáveis, produziram níveis muito reduzidos desta citocina, exibindo um aumento após estímulo para maturação, independente da presença ou não do pulso viral. Com isso, podemos dizer que as IFN-DCs dos pacientes são capazes de produzir a citocina IL-12 tanto quanto as IFN-DCs indivíduos saudáveis.

A IL-12 é uma citocina heterodimérica estruturalmente composta por uma subunidade α e uma β , denominadas p35 e p40, respectivamente, sendo que unidas formam a unidade p70, que corresponde a IL-12 ativa. Ao ser secretada por DCs, macrófagos ou linfócitos B durante a apresentação antigênica, ligam-se aos seus respectivos receptores IL-12R β 1 e IL-12R β 2, presentes em linfócitos T e células NK. Esta ligação ativa STAT4, que por sua vez promove a produção de IFN- γ por estas células. Esta atividade pró-inflamatória da IL-12 é importante para a ativação de células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$, promovendo a diferenciação em células Th1 e CTL, respectivamente, além de promover a ativação de células NK (Vignali, Kuchroo, 2012).

No contexto da infecção pelo HIV, células Th1 produzem altos níveis de IFN- γ , importante para ativação de macrófagos, pois potencializam sua atividade fagocítica, podendo auxiliar na fagocitose dos vírus, assim como de células infectadas. Além disso, o IFN- γ é importante para a produção de anticorpos neutralizantes por linfócitos B e ainda na ativação e diferenciação de linfócitos T CD8 $^{+}$ em CTL. Os CTLs, por sua vez, constituem potenciais células produtoras de mediadores citolíticos, incluindo perforinas e granzimas, que após o reconhecimento do complexo antígeno viral-MHC de classe I, exibido pelas células infectadas, agem

sobre estas células provocando a sua lise. Neste contexto, as células Th1 e CTLs são importantes controladoras da infecção viral, podendo agir diretamente sobre as células infectadas ou indiretamente pela indução da ativação de outras células do sistema imune (Benito et al, 2004; Kalams, Walker, 1998; Lambotin et al, 2010; Matloubian et al, 1994; Streeck, Nixon, 2010).

Com relação à IL-10, não observamos produção dessa citocina por IL4-DCs e IFN-DCs em níveis detectáveis, independente do estágio de diferenciação/ativação ou grupos de indivíduos sadios e infectados.

A IL-10 é uma citocina homodimérica que apresenta função reguladora no sistema imune. No ambiente de apresentação antigênica, a IL-10 inibe o desenvolvimento de respostas do tipo Th1 o que pode levar a aumento na replicação viral, favorecendo a infecção (Saraiva, O'Garra, 2010). No contexto da infecção pelo HIV, que é uma infecção caracterizada pela ativação imune persistente associada com a progressão da doença, a IL-10 atua com um mecanismo regulador que protege o hospedeiro de uma inflamação excessiva e de dano tecidual, em parte causada por respostas imunes pró-inflamatórias do tipo Th1. Embora benéfico, este mecanismo é muitas vezes explorado por patógenos oportunistas, devido à formação de um ambiente permissivo à novas infecções (Ramaseri Sunder et al, 2012).

Além disso, a IL-10 é uma citocina envolvida na indução de linfócitos T reguladores (Treg), que possuem um papel importante na autotolerância e no controle de doenças autoimunes. Durante a infecção pelo HIV, a expansão de células Treg poderia ser benéfica por suprimir a ativação generalizada de células T, ou poderia ser prejudicial por suprimir o impacto deletério causado pela ativação de respostas imunes anti-HIV e assim contribuindo com a persistência viral (Chevalier, Weiss, 2013; Jenabian et al, 2012; Sunder et al, 2012).

Tomados em conjunto, os resultados do perfil de citocinas produzido tanto por IFN-DCs quanto por IL4-DCs revela maior capacidade em induzir uma resposta imune pró-inflamatória.

Em seguida analisamos a capacidade das IFN-DCs em promover a proliferação de linfócitos alogênicos. Para tanto, linfócitos isolados de doadores sadios marcados

com CFSE foram estimulados por 144 horas com IFN-DCs imaturas, maduras e pulsadas com vírus inativado e foi avaliada a proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+.

A aloreatividade é definida como uma forte resposta primária de células T frente a variantes de moléculas de MHC não próprias (Nagy, 2011), estando relacionada à capacidade da célula estimuladora de exibir moléculas de MHC, portanto gerando grande ativação acompanhada pela proliferação dessas células. Sendo assim, observamos nos resultados obtidos que as IFN-DCs foram capazes de induzir uma resposta proliferativa de linfócitos T CD4+ e CD8+, não havendo diferenças significativas quando comparadas com as IL4-DCs. Além disso, embora não tenhamos observado diferença estatística, indivíduos sadios apresentaram uma tendência a um estímulo maior por IL-4DCs, com relação a IFN-DCs, tanto na proliferação de células T CD4 quanto T CD8.

Por fim, analisamos mais um aspecto funcional das IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV, referente à capacidade de apresentação antigênica e estímulo de uma resposta celular antiviral. Para tanto, linfócitos autólogos foram estimulados com IFN-DCs pulsadas com vírus inativado e foi avaliada a capacidade de produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ (estudadas neste trabalho como células T CD3+CD8-) e T CD8+.

Os dados apresentados referem-se ao percentual de células positivas obtidas para as culturas estimuladas com IFN-DCs ou IL4-DCs ativadas e pulsadas com HIV, subtraídos os valores obtidos para as culturas estimuladas com IFN-DCs ou IL4-DCs também ativadas, mas não pulsadas com os vírus.

Observamos que nossos resultados podem ter sido prejudicados pelos valores considerados basais muito altos, o que resultou em valores nulos em parte dos resultados. Por se tratar de culturas de células cujos precursores são monócitos de indivíduos infectados pelo HIV, cocultivadas com linfócitos provenientes destes mesmos indivíduos, podemos especular que ainda que não tenham sido pulsadas, as MoDCs poderiam apresentar algum nível de estímulo HIV-específico proporcionado pelos vírus presentes nesta células, mascarando os resultados de resposta específica, tanto nas culturas estimuladas com IFN-DCs quanto com IL4-DCs.

À parte esta observação, os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas entre IL4-DCs e IFN-DCs quanto à capacidade em induzir a produção de IFN- γ tanto em células TCD4+, quanto TCD8+, independente do tempo de estímulo.

Trabalhos anteriores demonstraram que IFN-DCs em geral são capazes de promover um aumento na resposta TCD8+ antígeno-específica. Estudos utilizando IFN-DCs estimuladas com diferentes fatores de ativação, tais como ligantes de TLR, peptídeos tumorais ou virais, assim como vírus inativados avaliaram este aspecto (Bracci et al, 2008; Lapenta et al, 2006; Parlato et al, 2010; Santini et al, 2000). No trabalho de Lapenta et al (2006) camundongos humanizados (hu-PBL-SCID) imunizados com IFN-DCs pulsadas com HIV-1 inativado por AT-2 demonstraram gerar maior frequência de células TCD8+ HIV-específicas produtoras de IFN- γ ao serem comparadas com IL4-DCs, avaliado por meio de ELISPot. Além disso, foi constatada elevada capacidade de IFN-DCs em estimular a produção de IFN- γ e granzima B, também quantificadas por ELISPot, nas células TCD8+ através de ensaio de cocultivo de células TCD8+ e IFN-DCs pulsadas com HIV-1 inativado por AT-2, quando comparadas às IL4-DCs. Nestas circunstâncias, diferentemente do esperado, não observamos em nossos resultados sequer uma tendência com relação a uma melhor resposta de células TCD8+.

Células dendríticas possuem um papel crucial na resposta imune ao HIV, pois são essenciais na indução de respostas HIV-específicas por meio da ativação de linfócitos T auxiliares CD4+, que uma vez ativados auxiliam as DCs na ativação de linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTL) capazes de controlar a replicação viral (Banchereau et al, 2000; Day, Walker, 2003; Hugues, 2004; Letvin, Walker, 2003).

Estudos empregando IL4-DCs ou IFN-DCs na confecção de vacinas terapêuticas para o tratamento de pacientes com câncer e infecções virais avaliam sua eficácia por meio de diferentes metodologias que testam a funcionalidade das DCs utilizadas. Dentre esta gama de metodologias, incluem a dosagem de IFN- γ através de ELISA, ELISPot, citometria intracelular, além da avaliação polifuncional (produção simultânea de diferentes citocinas) recentemente empregada em estudos que avaliam a resposta imune ao HIV. Foi visto que controladores de elite, que consiste em um grupo raro de indivíduos HIV+ capazes de manter carga viral

indetectável (<50 cópias/mL) na ausência de terapia antirretroviral, demonstraram resposta polifuncional de células T (Deeks, Walker, 2007; Owen et al, 2010; Van Braeckel et al, 2013).

No contexto da infecção pelo HIV as DCs podem produzir IL-12, que ao atuar sobre linfócitos T induz polarização da resposta efetora de linfócitos T para o tipo Th1, que são células capazes de produzir IFN- γ , cuja habilidade também é observada em CTL, que são células TCD8+ ativadas. Portanto, a detecção da produção de IFN- γ corresponde a uma avaliação indireta da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ polarizados para o tipo de resposta pró-inflamatória. Deste modo, assim como o nosso trabalho, demais estudos avaliaram a capacidade das DCs em polarizar a resposta de linfócitos T para o tipo Th1, por meio da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+, visando principalmente encontrar linfócitos T citotóxicos, cuja atuação é essencial em repostas imunes antivirais (Hansen et al, 2013; Kalinski et al, 2006; Lapenta et al, 2006; Mailliard et al, 2013).

Resultados recém publicados de um protocolo clínico de imunoterapia para indivíduos infectados pelo HIV utilizando MoDCs diferenciadas/ativadas na presença de IFN- α mostraram que, diferentemente dos estudos *in vitro* publicados até o presente, a vacina com estas DCs diferenciadas na presença de IFN- α estimulou preferencialmente uma resposta polifuncional mediada por linfócitos TCD4+, enquanto a resposta TCD8+ foi estimulada em níveis mais discretos (Lévy et al, 2014).

Em conjunto nossos resultados demonstram que as IFN-DCs derivadas de indivíduos infectados pelo HIV apresentam-se morfológica e fenotipicamente distintas das IL4-DCs derivadas de monócitos desses mesmos pacientes. Além disso, observamos diferenças também com relação à produção de IL-1 β e expressão dos componentes do inflamassoma, tendo sido constatado que a presença de IFN- α interfere na expressão do inflamassoma, independente se em amostras de indivíduos infectados ou controles saudáveis.

Por outro lado, similarmente às IL4-DCs, as IFN-DCs apresentam potencial para induzir resposta celular do tipo Th1, visto sua capacidade em induzir a citocina IL-12p70 e níveis indetectáveis de IL-10. Com relação à capacidade de estimular a proliferação e a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+ alogênicos e

autólogos, respectivamente, os perfis foram similares entre IL4-DCs e IFN-DCs. Entretanto, diferentemente do esperado, as IFN-DCs não foram capazes de potencializar uma resposta TCD8+.

Embora nossos resultados não tenham demonstrado diferenças na capacidade das IFN-DCs em produzir IL-12p70 e de estimular respostas linfócitos T, estudos utilizando o IFN tipo I para a obtenção de MoDCs tem demonstrado dados promissores. Estudo clínico utilizando IFN- α , IFN- γ , Poly (I:C), TNF- α e IL-1B na geração das α DC1 de pacientes com câncer demonstrou interessantes resultados funcionais que podem ser explorados em MoDCs de pacientes HIV+. Nesse estudo, Hansen et al (2013) compararam diferentes protocolos de diferenciação de MoDCs de pacientes acometidos pelo glioma, acompanhados pelo estímulo de CD40L. Foi sugerido o uso das α DC1 como importante fonte de pesquisa e aplicação na imunoterapia do câncer, pois estas demonstraram maior capacidade em produzir IL-12p70 e de estimular resposta de linfócitos T CD8+ tumor-específicos em mais de 50% dos pacientes. Além desse, Smith et al., (2014) demonstraram que MoDCs de pacientes HIV+ sob tratamento com antirretrovirais estimulados com CD40L, apenas, foram capazes de induzir resposta CTL HIV-específica e resposta polifuincional de linfócitos T.

Com base nisso, podemos sugerir que em nosso protocolo, a substituição da IL-4 pelo IFN- α , apenas, ainda não seja o suficiente para potencializar a habilidade das MoDCs em promover uma resposta imune antiviral mais eficaz. Talvez a adição de fatores de diferenciação e ativação complementares ao protocolo, como o protocolo utilizado na geração das α DC1s, possa ser um caminho promissor para a aplicação na imunoterapia da infecção pelo HIV-1.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios realizados e dados obtidos, concluímos que o foi possível diferenciar monócitos de indivíduos infectados pelo HIV em IFN-DCs, que apresentaram as características abaixo:

- Apresentam aspecto morfológico mais ativado que IL4-DCs, principalmente durante o estágio basal de maturação;
- Não são capazes de aumentar a expressão de CD83 em resposta ao estímulo para maturação;
- Possuem características de DCs plasmocitóides e células NK pela maior expressão de BDCA-2 e CD56, ao contrário de IL4-DCs, quando derivadas de indivíduos infectados pelo HIV;
- São capazes de produzir IL-12p70 com sugestivo aumento na produção dessa citocina após estímulo para ativação;
- Não foram capazes de produzir quantidades detectáveis de IL-10;
- Exibem baixa capacidade em ativar o inflamassoma;
- Apresentam elevada produção basal de IL-1 β , quando derivadas de indivíduos infectados pelo HIV-1;
- São capazes de induzir a ativação e conseqüente proliferação de linfócitos T alogênicos de modo semelhante às IL4-DCs;
- São capazes de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T similares às IL4-DCs.

Referências*

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 592 p.
- Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *European journal of immunology*. 2007;37(3):686-95.
- Aricò, Eleonora; Belardelli, Filippo. Interferon- α as Antiviral and Antitumor Vaccine Adjuvants: Mechanisms of Action and Response Signature. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2012; 32(6):1-13.
- Arroyave Johanna C, Pujol Flor H, Navas María C, Cortés-Mancera Fabián M. Interacción entre el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus GB tipo-C durante el estado de co-infección. *Rev. chil. infectol.* [revista virtual]. 2013 Feb [citado 2015 Jun 08] ; 30(1): 31-41. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000100005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000100005>.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
- Banchereau J, Ueno H, Dhodapkar M, Connolly J, Finholt JP, Klechevsky E, et al. Immune and clinical outcomes in patients with stage IV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34+ progenitors and activated with type I interferon. *Journal of immunotherapy*. 2005;28(5):505-16.
- Barré-Sinoussi, Françoise. HIV as the cause of AIDS. *Lancet*. 1996;348:31–35.
- Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(1):26-37.
- Benito JM1, López M, Soriano V. The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev*. 2004;6(2):79-88.
- Bracci L, Schumacher R, Provenzano M, Adamina M, Rosenthal R, Groeper C, et al. Efficient stimulation of T cell responses by human IFN- α -induced dendritic cells does not require Toll-like receptor triggering. *Journal of immunotherapy*. 2008;31(5):466-74.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brasil. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Ministério da Saúde. Política Brasileira de Enfrentamento da AIDS: Resultados, Avanços e Perspectivas. 2012. Disponível em:

<http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/53077/em_portugu_s_93155.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2015.

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

Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2000;96(9):3102-8.

Bugeon L, Dallman MJ. Costimulation of T cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(4 Pt 2):S164-8.

Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C, Abastado JP, Lifson JD, Arthur LO, et al. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nature medicine*. 2001;7(3):344-9.

Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors*. 2009;35(6):474-83.

Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood*. 2013;121(1):29-37.

Colonna M, Trinchieri G, Liu, YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunol*. 2004;5:1219–1226.

Cohen MS, Gay CL. Treatment to prevent transmission of HIV-1. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50 Suppl 3:S85-95.

Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2008;15(2):284-92.

Conti, Lucia; Gessani, Sandra. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: Recent advances. *Immunobiology*. 2008;213: 859-870.

Coordenação de Informações Estratégicas – CIE. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. 2013; Ano II - nº 1.

Cullen, Bryan R. Regulation of HIV-1 gene expression. *Federation of American Societies of Experimental Biology Journal*. 1991;5(10):2361-8.

Day CL, Walker BD. Progress in defining CD4 helper cell responses in chronic viral infections. *J Exp Med* 2003; 198:1773-7; PMID:14676292;

Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007;27(3):406-16.

Della Bella S, Nicola S, Riva A, Biasin M, Clerici M, Villa ML. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(1):106-16.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology*. 2000;165(11):6037-46.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(12):1823-34.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(12):1823-34.

Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(4):279-90.

Fanning SL, George TC, Feng D, Feldman SB, Megjugorac NJ, Izaguirre AG, et al. Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *Journal of immunology*. 2006;177(9):5829-39.

Farkas A, Kemeny L. Interferon-alpha in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *The British journal of dermatology*. 2011;165(2):247-54.

Farkas A, Tonel G, Nestle FO. Interferon-alpha and viral triggers promote functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *The British journal of dermatology*. 2008;158(5):921-9.

Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(1):3-19.

Garcia F, Climent N, Assoumou L, Gil C, Gonzalez N, Alami J, et al. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(4):473-8.

Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alami J, Morente V, et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(10):1680-5.

Garcia F, Plana M, Climent N, Leon A, Gatell JM, Gallart T. Dendritic cell based vaccines for HIV infection: the way ahead. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9(11):2445-52.

Garcia F, Routy JP. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. *Vaccine*. 2011;29(38):6454-63.

Garcin G, Bordat Y, Chuchana P, Monneron D, Law HK, Piehler J, et al. Differential activity of type I interferon subtypes for dendritic cell differentiation. *PloS one*. 2013;8(3):e58465.

Gogolak, P., Rethi, B., Szatmari, I., Lanyi, A., Dezso, B., Nagy, L., Rajnavolgyi, E. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Immunobiology*, 2007;109: 643-52.

Grage-Griebenow E, Loseke S, Kauth M, Gehlhar K, Zawatzky R, Bufe A. Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN- α production of plasmacytoid dendritic cells. *Immunology and cell biology*. 2007;85(5):383-90.

Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews*. 2011;243(1):136-51.

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011;34(2):213-23.

Hansen M, Hjorto GM, Donia M, Met O, Larsen NB, Andersen MH, et al. Comparison of clinical grade type 1 polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine*. 2013;31(4):639-46.

Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, Merad M. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological Reviews*. 2010; 234:55–75.

Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Franc, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nature Immunology*, 2004;5:1235- 42.

Jenabian MA, Ancuta P, Gilmore N, Routy JP. Regulatory T cells in HIV infection: can immunotherapy regulate the regulator? *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:908314.

Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(12):2199-204.

Kalinski P, Nakamura Y, Watchmaker P, Giermasz A, Muthuswamy R, Mailliard RB. Helper roles of NK and CD8+ T cells in the induction of tumor immunity. Polarized dendritic cells as cancer vaccines. *Immunologic research*. 2006;36(1-3):137-46.

Klein E, Koch S, Borm B, Neumann J, Herzog V, Koch N, et al. CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *International immunology*. 2005;17(4):477-87.

Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Maihofer D, Schott M, Papewalis C, et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of translational medicine*. 2007;5:46.

Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shapero MH, Dupuis M, van Schooten WC, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS research and human retroviruses*. 1998;14(7):551-60.

Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF, Barth H. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(5):350-60.

Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(3):213-20.

Lapenta C, Santini SM, Spada M, Donati S, Urbani F, Accapezzato D, et al. IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *European journal of immunology*. 2006;36(8):2046-60.

Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003; 9:861-6; PMID:12835706;

Levy Y, Thiebaut R, Montes M, Lacabaratz C, Sloan L, King B, et al. Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *European journal of immunology*. 2014;44(9):2802-10.

Levy, Jay A. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews*. 1993; 57(1):183–289.

Lins RDAU, Freitas RA, Figueiredo CRLV, Silveira EJD, Medeiros KB, Godoy, GP.. Godoy, Gustavo Pina. Dendritic cells: origin, distribution, morphology, structure, functional activity and identify methods - a review. *Rev. bras. patol. Oral*. 2003;2(3): 29-35.

Liu, Y. J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu.Rev. Immunol*. 2005;23:275–306

Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nature medicine*. 2004;10(12):1359-65.

Ludigs K, Parfenov V, Du Pasquier RA, Guarda G. Type I IFN-mediated regulation of IL-1 production in inflammatory disorders. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2012;69(20):3395-418.

Mailliard RB, Smith KN, Fecek RJ, Rappocciolo G, Nascimento EJ, Marques ET, et al. Selective induction of CTL helper rather than killer activity by natural epitope variants promotes dendritic cell-mediated HIV-1 dissemination. *Journal of immunology*. 2013;191(5):2570-80.

Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends in immunology*. 2014;35(3):114-22.

Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology*. 1994;68(12):8056-63.

Moschella F, Proietti E, Capone I, Belardelli F. Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1194:169-78.

Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*. 1997;337(18):1267-74.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*. 1998;4:328-32.

Nestle FO. Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19(56):6673-9.

Ng D, Gommerman JL. The Regulation of Immune Responses by DC Derived Type I IFN. *Frontiers in immunology*. 2013;4:94.

Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998;279(5359):2103-6.

Olson AD, Meyer L, Prins M, Thiebaut R, Gurdasani D, Guiguet M, et al. An evaluation of HIV elite controller definitions within a large seroconverter cohort collaboration. *PloS one*. 2014;9(1):e86719.

Oshita C, Takikawa M, Kume A, Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial. *Oncology reports*. 2012;28(4):1131-8.

Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, et al. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *Aids*. 2010;24(8):1095-105.

Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(4):669-76.

Papewalis C, Jacobs B, Wuttke M, Ullrich E, Baehring T, Fenk R, et al. IFN- α skews monocytes into CD56 $^{+}$ -expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *Journal of immunology*. 2008;180(3):1462-70.

Paquette RL, Hsu N, Said J, Mohammed M, Rao NP, Shih G, et al. Interferon- α induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo. *Leukemia*. 2002;16(8):1484-9.

Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, et al. Interferon- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology*. 1998;64(3):358-67.

Pham NL, Badovinac VP, Harty JT. Differential role of "Signal 3" inflammatory cytokines in regulating CD8 T cell expansion and differentiation in vivo. *Frontiers in immunology*. 2011;2:4.

Pontillo A, Santillo BT, Duarte AJ, Oshiro TM. Differential inflammasome expression and IL-1 β secretion in monocyte-derived dendritic cells differentiated with IL-4 or IFN- α . *AIDS research and therapy*. 2013;10(1):35.

Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *Aids*. 2012;26(1):11-8.

Ramaseri Sunder S, Hanumanth SR, Nagaraju RT, Venkata SK, Suryadevara NC, Pydi SS, et al. IL-10 high producing genotype predisposes HIV infected individuals to TB infection. *Human immunology*. 2012;73(6):605-11.

Rinaldo CR, Jr., Piazza P. Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense. *Trends in microbiology*. 2004;12(7):337-45.

Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, Schneider DK, Bess JW, Jr., Vasquez GM, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *Journal of virology*. 1998;72(10):7992-8001.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med*. 1994;179:1109-18.

Santini SM, Lapenta C, Donati S, Spadaro F, Belardelli F, Ferrantini M. Interferon- α -conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PloS one*. 2011;6(2):e17364.

Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(10):1777-88.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(3):170-81.

Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, et al. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology*. 2000;165(6):3492-6.

Siena, S., Di Nicola, M., Bregni, M., Mortarini, R., Anichini, A., Lombardi, L., Ravagnani, F., Parmiani, G., Gianni, A. M. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34⁺ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp. Hematol*. 1995;23:1463–71.

Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:17-58.

Streeck H, Nixon DF. T cell immunity in acute HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202 Suppl 2:S302-8.

Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckman D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von der Driesch P, Bröcker EB, Steinman RM, Enk A, Kämpgen E, Schuler G. Vaccination with Mage-3A1 Peptide-pulsed Mature, Monocyte-derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999;190(11):1669-78.

Tosello V, Zamarchi R, Merlo A, Gorza M, Piovan E, Mandruzzato S, et al. Differential expression of constitutive and inducible proteasome subunits in human monocyte-derived DC differentiated in the presence of IFN- α or IL-4. *European journal of immunology*. 2009;39(1):56-66.

Trakatelli M, Tounouz M, Blocklet D, Dodo Y, Gordower L, Laporte M, et al. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8⁺ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2006;55(4):469-74.

Trepiakas R, Pedersen AE, Met O, Svane IM. Addition of interferon- α to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. *Vaccine*. 2009;27(16):2213-9.

Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews Immunology*. 2010;10(3):210-5.

Tze LE, Horikawa K, Domaschew H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(1):149-65.

Vallejo A, Griffin P, Montang D, Nussbaum R, Gunawarfema N, Studenski. CD56 is a legitimate immune receptor regulating T cell and NK cell effector function, and its

expression level predicts successful aging (P1324). *The Journal of Immunology*. 2013;190:119-18.

Van Braeckel E, Desombere I, Clement F, Vandekerckhove L, Verhofstede C, Vogelaers D, et al. Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. *Vaccine*. 2013;31(36):3739-46.

Vanham G, Van Gulck E. Can immunotherapy be useful as a “functional cure” for infection with human immunodeficiency virus-1?. *Retrovirology*. 2012;9:72.

Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 2012;13(8):722-8.

Walker, Christopher M. et al. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science*. 1986; 234(4783):1563-6.

Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(7):487-98.

SHORT REPORT

Open Access

Differential inflammasome expression and IL-1 β secretion in monocyte-derived dendritic cells differentiated with IL-4 or IFN- α

Alessandra Pontillo^{1*}, Bruna T Santillo², Alberto JS Duarte² and Telma M Oshiro²

Abstract

Background: NLRP3-inflammasome activation was evaluated in monocyte-derived dendritic cells (DC) obtained through IL-4 (IL4-DC) or IFN- α (IFN-DC) protocols and pulsed with chemically inactivated HIV-1. Inflammasome genes expression and IL-1 β secretion were compared in DC isolated from 15 healthy subjects (HC) and 10 HIV-1 infected individuals (HIV+).

Findings: Whether HIV was able to increase NLRP3-inflammasome genes expression and IL-1 β secretion in IL4-DC from HC, the induction of inflammasome appeared significantly reduced in IFN-DC from HC, suggesting a different responsive state of IFN-DC compared to IL4-DC. No inflammasome activation was observed in IL4-DC as well as in IFN-DC derived from HIV+ subjects, confirming previous findings on "unresponsive" state of DC derived from HIV+ possibly due to chronic inflammatory state of these individuals.

Conclusions: Our results showed that IFN- α differently modulates inflammasome expression during monocytes DC *in vitro* differentiation. These findings could be of interest considering the on-going research about DC manipulation and therapeutic strategies for HIV+ involving DC-based immune-vaccines.

Keywords: HIV-1, Type-1 IFN, Dendritic cells, Inflammasome, NALP3, IL-1 β , Vaccine, Immunotherapy

Findings

Background and aim

In the past ten years an increasing number of dendritic cell (DC)-based therapeutic vaccination trials against HIV-1 has been developed augmenting the general interest in dendritic cell biology and in the interaction between this innate immune cell and HIV-1 [1].

There are at least two major subtypes of DC: myeloid and plasmacytoid DC. Myeloid DC (mDC) are professional antigen presenting cell capable to initiate cellular immune response. On the other hand plasmacytoid DC (pDC) exhibit an exuberant anti-viral response through the production of high levels of IFN- α [2].

In HIV infection it has been demonstrated a reduction in absolute number of mDC and pDC, especially in patients with active HIV-1 replication [3], suggesting a key role of DC in controlling viral load. Moreover the preserved functionality of pDC isolated from "elite controllers" may

be one of the mechanisms involved in the control of HIV-1 viremia in these subjects [4].

Myeloid DC obtained culturing peripheral blood monocytes with IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (IL4-DC) have been implied in immunotherapy of cancer and, most recently, of HIV infection [5].

Alternative protocols for maturation of DC included the use of interferon (IFN)- α instead of IL-4 (IFN-DC). Type I interferons markedly promotes the differentiation of peripheral blood monocytes into DC. IFN-DC are able to induce a strong cytotoxic response and cross priming of CD8+ T cells against viral or tumoral antigens both *in vitro* and *in vivo* [6,7]. IFN-DC exhibit a combined phenotype of mDC and pDC associated with characteristics of natural killer (NK) cells [8,9].

In the context of therapeutic vaccine against HIV-1, the possibility of using IFN-DC would provide several advantages, including augmented antigen presentation, cytotoxic function and type I IFN production.

Considering the key role of NLRP3-inflammasome during maturation and activation of DC in mice [10],

* Correspondence: pontilloa@gmail.com

¹Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

our group has recently started working on inflammasome activation in DC obtained *in vitro* from peripheral blood monocytes. DC response to HIV-1 through NLRP3-inflammasome could be important in HIV vaccine development especially in DC-based immune treatment.

We demonstrated that human monocyte-derived IL4-DC presented an inducible activation of NLRP3-inflammasome by lipopolysaccharide/LPS as well as by HIV-1 [10]. It is interesting to note that the same differentiation protocol used in monocytes isolated from HIV+ individuals (HIV-DC) showed a different response. NLRP3-inflammasome was not induced by LPS or HIV in HIV-DC, however its basal activation resulted higher in these cells compared with DC from healthy subjects (HC-DC), letting us hypothesize an "unresponsive" condition of HIV-DC that may affect vaccine preparation [10].

In this study we investigate the rate of inflammasome expression and activation in monocyte-derived IFN-DC obtained from healthy individuals and HIV+ patients. Our findings could be of interest considering the on-going research about DC manipulation and therapeutic strategies for AIDS involving DC-based immune-vaccines.

Individuals and methods

15 healthy subjects (HC, 7 males, 8 females; mean age 30 ± 5 standard deviation/SD) and 10 HIV-1-positive volunteers (HIV+, 8 males, 2 females; mean age 28 ± 2 SD) were recruited from "Hospital das Clinicas" (University of São Paulo, Brazil). HIV+ patients had a CD4+ lymphocytes count >500 cells/ μ l and were "naïve" for treatment. All the patients have been infected for more than 5 years and they do not presented specific clinical symptoms at the moment of recruitment. Written informed consent was obtained according to the protocol of "Hospital das Clinicas" Ethical Committee (CAPPesq) (São Paulo, Brazil).

Monocytes were isolated by adherence from peripheral blood monocytes obtained by centrifugation over Ficoll-Paque gradient and cultured at 1.5×10^6 /ml in AIM-V medium (Gibco) containing 50 ng/ml GM-CSF (Peprotech) and 50 ng/ml IL-4 (Peprotech) or IFN- α (Schering-Plough) (IL4-DC and IFN-DC, respectively). On day 5, DC were pulsed with 0.5×10^9 particles of aditrihiol-2 inactivated HIV (as reported in [10]) for 4 hours. Supernatants were harvested and used for IL-1 β secretion dosage; cells were lysed for mRNA isolation and gene expression analysis.

Total RNA was isolated using the RNAqueous micro kit (Ambion, Life Technologies) and retro-transcribed with the SuperScript-II kit (Invitrogen). *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B* genes were amplified with specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) using the ABI 7300 platform (Applied Biosystems). *ACTB* was the housekeeping gene used for normalization. Fold-change (FC) genes expression was calculated comparing stimulated (+HIV) and untreated/resting cells as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ following the indications of Livak et al. [11].

The secreted IL-1 β was evaluated with ELISA (BD Biosciences Pharmingen). Results were expressed as pg/ml.

One-way Anova analysis was used to compare different groups and a significance level of 0.05 was applied. Prism 5.01 software (GraphPad Software, Inc) was used for done graphs and statistical analysis.

Results and discussion

We evaluated the expression of *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B* genes in DC from 15 healthy subjects obtained through IL-4 or IFN- α differentiation protocol and pulsed with chemically inactivated HIV-1. IL-1 β secretion was also evaluated as marker of inflammasome activation.

Cells differentiation state was checked by flow cytometry looking at granulosity and common DC markers

(Additional file 1: Figure S1). No significant differences were observed in differentiation markers between IL4-DC and IFN-DC.

When genes expression was evaluated the following criteria were applied: only samples with Ct < 35 and with a positivity of at least 80% of the samples were included in the analysis; normalized data (ΔCt) must be homogenous for all the genes in each group (t test p-value > 0.05); FC > 1.5 or < 0.5 were taken in account as up-regulation or down-regulation.

HIV induced increased expression (FC > 1.5) of *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CASP1* and *IL1B* in IL4-DC, and of *NLRP4*, *AIM2*, *CASP1* and *IL1B* in IFN-DC (Figure 1A). However the rate of induction appeared to be significantly reduced in IFN-DC compared to IL-4 DC (p < 0.003).

Of note HIV-1 was able to increase *NLRP3* expression in IL4-DC (FC = 22.47), but it was not able to do the same in IFN-DC (FC = 1.24) (p < 0.003) (Figure 1A).

These differences in inflammasome genes expression between IL4-DC and IFN-DC were emphasized by the results obtained from IL-1 β secretion analysis in DC supernatants. HIV induced a significant increase of the pro-inflammatory cytokine in IL4-DC (+HIV = 186.5 pg/ml versus Untreated = 74.87 pg/ml; p = 0.026) but not in IFN-DC (+HIV = 21.88 pg/ml versus Untreated = 8.65 pg/

ml; $p=0.301$) (Figure 1B). Basal secretion of IL4-DC appeared augmented compared to IFN-DC however not in a statistically significant way.

These findings suggested that chemically inactivated HIV-1 is able to induce NLRP3-inflammasome activation in IL4-DC but not in IFN-DC.

As we previously hypothesized [10] NLRP3-inflammasome could play a role in response against HIV and could participate to full dendritic cell activation and to increased proliferation of specific HIV-induced T cells. However our new findings point out that the protocol implied to differentiate monocytes to DC could affect inflammasome biology. Our results agreed with previously reported data by Guarda et al. [12] about the ability of type I IFNs to suppress pro-IL-1 levels and decrease the activity of NLRP1 and NLRP3-inflammasomes in mice. Moreover it is well known that the activation of NLRP3-inflammasome in DC is related with the ability to induce a Th17 polarization in naïve T cells [13], while IFN-DC are able to induce Th1 but fail to polarize naïve T cells into Th17 [14], letting us hypothesize that in IFN-DC the inflammasomes are not induced.

When DC derived from HIV+ individuals were analysed, we observed that HIV was not able to significantly induce any of the inflammasome genes in IL4-DC as well as in IFN-DC ($1.5 < FC < 0.5$) (Figure 2A). According to our previous published data [10], in untreated cells IL-1 β secretion was higher in HIV-DC compared to HC-DC whatever protocol was used (Figure 1B and 2B; $p=0.02$). Moreover HIV was not able to induce augmented amount of cytokine in IFN-DC or in IL4-DC (Figure 2B). We have previously hypothesized that IL4-DC from HIV+ individuals presented an increased basal activation of NLRP3-inflammasome possibly due to the well-known chronic inflammatory state of HIV+ patients leading to an "unresponsive" state of monocyte-derived DC [10]. Our findings emphasized once more that this condition is independent of the protocol used for monocyte-DC differentiation.

We are aware that this study is preliminary and that deep investigation about the functionality of IFN-DC is needed, such as ability to activate a lymphocytes specific response, but we would emphasize the importance of DC differentiation protocol in experimental design. Moreover, considering the on-going trials of DC-based immune treatment against HIV-1 [15] it is interesting to remember that the *in vitro* manipulation of DC could be a limited step in vaccine preparation. Whether it will be fully demonstrated the role of NLRP3-inflammasome in human DC maturation/activation and the impact of inflammasome induction in lymphocyte specific response, our findings suggest that protocols using IL-4 may represent a better choice than IFN ones.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Characterization of monocyte-derived dendritic cells. Generated immature monocyte-derived dendritic cells obtained through IFN (IFN-DC) (A) or IL-4 (IL4-DC) (B) protocols for common markers expression (CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7). Cells were CD14 negative. Average percentage of positive cells and standard error were reported for healthy individuals ($n=15$) stimulated or not with HIV (+HIV and Untreated, respectively).

Abbreviations

DC: Monocyte-derived dendritic cells (DC); IL: Interleukin; IL4-DC: Monocyte-derived dendritic cells obtained by IL-4 and GM-CSF protocol; IFN-DC: Monocyte-derived dendritic cells obtained by IFN- α and GM-CSF protocol; HC: Healthy subjects; HIV+: HIV-1 infected individuals.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AP conceived of the study, coordinated its design, performed statistical analysis and wrote the manuscript; B.T.S. carried out the experiments; A.J.S.D. is the responsible of the laboratory and revised the work critically; T.M.H. is the responsible of the work group, contributed in conceiving and designing the study, analysis and interpretation of data and drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

AP, PhD, works on inflammasome genetics and biology; B.T.S. is a pre-PhD student working on DC biology; A.J.S.D., Prof, is the principal investigator of the on-going clinical trial of DC-based immune treatment against HIV-1; T.M.H., PhD, works on DC biology and she's the supervisor of the group involved in the preparation of DC for anti-HIV immune therapy.

Acknowledgements

This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP). We thank Alexandre de Almeida for HIV+ patients recruitment.

Author details

¹Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. ²Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency, LIM-56, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Received: 20 June 2013 Accepted: 3 December 2013

Published: 27 December 2013

References

- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF: The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunol* 2010, **10**:11-23.
- Segal FP, Kadowaki N, Shadel M, Fitzgerald-Bocanly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu Y: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999, **284**(5421):1835-1837.
- Baron MA, Blyveis N, Palmer BE, McWhinney S, Wilson CC: Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003, **187**(1):26-37.
- Machmach K, Leal M, Gras C, Viciano P, Genebat M, Franco E, Boufassa F, Lambotte Q, Herbeurath JP, Ruiz-Mateos E: Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol* 2012, **86**(8):4245-4252.
- Rivido CR: Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J Intern Med* 2009, **265**(1):138-158.
- Lapenta C, Santini SM, Spada M, Donati S, Urbani F, Accapezzato D, Franceschini D, Andreotti M, Barabba V, Belardelli F: IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur J Immunol* 2006, **36**(8):2046-2060.
- Paristo S, Romagnoli G, Spadaro F, Canini L, Striella P, Borghi P, Ramoni C, Fiesi I, Biocca S, Gabriele L, Belardelli F: LOX-1 as a natural IFN- α

- mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells. *Blood* 2010, **115**(8):1554–1563.
8. Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Mahdoff D, Schott M, Papewalis C, Diaz Blanco E, Wirtter M, Calibero A, Haas R, Kobbé G, Fenik R: **Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis.** *J Transl Med* 2007, **5**:46.
 9. Farkas A, Kemény L: **Interferon- α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology.** *Br J Dermatol* 2011, **165**(2):247–254.
 10. Schroder K, Tschopp J: **The inflammasomes [review].** *Cell* 2010, **140**:821–832.
 11. Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ: **HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients.** *AIDS* 2012, **26**(1):11–18.
 12. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.** *Methods* 2001, **25**:402–408.
 13. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Dedler T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J: **Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation.** *Immunity* 2011, **34**(2):213–223.
 14. Mills KH, Dungan LS, Jones SA, Harris J: **The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses.** *J Leukoc Biol* 2013, **93**(4):489–497.
 15. García F, Raut JP: **Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1.** *Vaccine* 2011, **29**(38):6454–6463.

doi:10.1186/1742-6405-10-35

Cite this article as: Pontillo et al.: Differential inflammasome expression and IL-1 β secretion in monocyte-derived dendritic cells differentiated with IL-4 or IFN- α . *AIDS Research and Therapy* 2013 **10**:35.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit