CESAR AUGUSTO CUNHA CERVANTES

EFEITO DA ATIVAÇÃO DE STING E RECEPTORES TOLL-
LIKE EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES E
MIELOIDES DE INDIVÍDUOS INFECTADOS POR HIV E DE
EXPOSTOS NÃO INFECTADOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de mestre em
Ciências.

São Paulo

2015

CESAR AUGUSTO CUNHA CERVANTES

EFEITO DA ATIVAÇÃO DE STING E RECEPTORES TOLL-
LIKE EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES E
MIELOIDES DE INDIVÍDUOS INFECTADOS POR HIV E DE
EXPOSTOS NÃO INFECTADOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Notomi
Sato

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 não autorizada pelo autor

Cervantes, Cesar Augusto Cunha.

Efeito da ativação de STING e receptores toll-like em células dendríticas plasmacitóides e mielóides de indivíduos infectados por HIV e de expostos não infectados / Cesar Augusto Cunha Cervantes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato.

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

Versão do título para o inglês: Effect of STING and toll-like receptors activation in plasmacytoid dendritic cells in infected and exposed non infected patients.

1. HIV-1 2. Células dendríticas 3. Fatores antivirais 4. STING 5. APOBEC3G 6. Casais sorodiscordantes I. Sato, Profa. Dra. Maria Notomi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0106/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cesar Augusto Cunha Cervantes.

Título da Dissertação: Efeito da ativação de STING e receptores toll-like em células dendríticas plasmacitóides e mielóides de indivíduos infectados por HIV e de expostos não infectados.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

A Professora **Maria Notomi Sato**, pela orientação e cumplicidade. Pelas experiências compartilhadas e a amizade.

Aos companheiros de linha de pesquisa e amigos Luanda Mara e Josenilson Feitosa de Lima, pelas discussões e colaboração.

As companheiras Kelly Manfrere e Natalli Zanete cuja colaboração e amizade foram essenciais para o acontecimento do trabalho.

Aos amigos do laboratório experimental por momentos únicos em bancada, almoços, aniversários, *happy hour*, reuniões e encontros extracurriculares.

Aos professores da Banca de Qualificação, Dr^a Telma Oshiro, Prof^o Dr^o Jean Pierre Schatzmann Peron, Dr^a Maria Carolina Luque

Aos colegas e funcionários do LIM56 e outros LIMS da FMUSP

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia (FMUSP)

A minha mãe, Sandra Mara Cunha Cervantes e Pai, Pedro Cesar Cervantes por todo apoio. Se consegui ver longe foi por me erguerem e por serem o alicerce de tudo.

A minha Avó Nair, que faleceu durante a execução desse trabalho. A ela agradeço por sempre me energizar com sua alegria. Com certeza ela estaria muito feliz comigo, mesmo não sabendo o que eu tanto fiz nesses dois anos.

A Thamiris Miranda e sua família, que percorreram comigo toda essa jornada, sempre com paciência, dedicação, amizade e cumplicidade.

A todos os companheiros de estrada e vida Luiz Fernando, Antonio, Higor, Ricardo, Bruno, Ewerton, Diego, Gustavo, Raul, Pedro, As Marias, Canata, Canossa, Zé Tito, os Carneiro, William, Luis Cesar, Petrus, Marcela, Nathalia, Vanessa, Valéria, Marília, Gugu e todos outros amigos que de maneira indireta estão presentes nesse trabalho.

“Não é o bastante ver que um jardim é bonito sem ter que acreditar também que há fadas escondidas nele?”

Douglas ADAMS (1952-2001)

Resumo

CERVANTES, C. A. C. Efeito da Ativação de STING e Receptores Toll-like em Célula Dendríticas Plasmocitóides e Mielóides de Indivíduos Infectados Por HIV e de Expostos Não Infectados. Dissertação (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015

A epidemia promovida pela infecção com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) é um fator agravante de saúde pública mundial, representando altas taxas de morbidade, com perda de qualidade de vida e mortalidade. Contudo, existem indivíduos que são expostos ao HIV-1 e não se infectam apesar de contínuas exposições. Os fatores genéticos, virais e imunológicos, como também os fatores de imunidade inata devem ser importantes na resistência viral desses indivíduos que são expostos ao HIV-1, mas não se infectam (ENI). Uma vasta gama de fatores de resposta inata exercem atividade antiviral, sendo a maior parte deles regulados pelo interferon tipo I. Desta forma, a proposta de estudo foi avaliar a expressão de fatores antivirais e fatores reguladores da resposta de interferon tipo I em células mononucleares do sangue periférico e em células do lavado bucal, de indivíduos expostos ao HIV-1 e não infectados, seu parceiro infectado por HIV-1, de indivíduos infectados por HIV-1 com carga viral (CV) detectável (acima de 5000 cópias/ μ L) e indivíduos saudáveis. O perfil de quimiocinas no lavado bucal foi dosado por citometria de fluxo, e a frequência de células dendríticas mielóides (mDC) e dendríticas plasmocitoides (pDC) secretoras de citocinas após estímulo com o ligante de STING/cGAMP e de TLR7/TLR8/CL097 também foi avaliado nos casais sorodiscordantes e nos indivíduos saudáveis. Um aumento da expressão de mRNA para APOBEC3G em células mononucleares foi detectado nos parceiros infectados por HIV-1 e nos indivíduos infectados virêmico sem relação ao grupo ENI e controle. Similarmente, elevada expressão de mRNA de IFN- β e de TBK1 foi observado nos indivíduos infectados por HIV-1 em relação ao grupo ENI e controle. Já a expressão de STING e TRIM-5 α foi mais pronunciada no grupo virêmico em relação ao grupo ENI. A expressão do mRNA dos fatores de restrição TRIM22 e SAMHD1 não diferiu entre os grupos analisados. A expressão dos fatores reguladores que regulam a resposta de IFN tipo I como IL-10, SOCS3 e Trex1 foi identificada nos indivíduos infectados por HIV, principalmente nos indivíduos virêmico sem relação ao

grupo ENI. O perfil de expressão de fatores antivirais nas células do lavado bucal foi muito baixo, somente poucas amostras de indivíduos infectados por HIV mostraram expressão detectável de fatores, contudo, não diferiram entre os grupos analisados. Quanto a determinação de quimiocinas no fluido bucal, elevados níveis de IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2 e CXCL9 foram detectados no grupo indivíduos infectados por HIV em relação ao grupo ENI. A frequência de pDC secretoras de IFN- α após estímulo com CL097 aumentou no grupo HIV e ENI em relação ao controle. Já as mDCs produtoras de TNF- α não foi diferente nos grupos do estudo. Os resultados obtidos até o momento mostram que a exposição ao HIV-1 não é capaz de induzir a expressão de fatores antivirais regulados por IFN tipo I, mostrando que é preciso a infecção ativa para indução dos fatores. Além disto, há baixa expressão de fatores reguladores, como também do nível de quimiocinas no lavado bucal do grupo ENI. Os resultados sugerem um importante mecanismo de controle nos indivíduos ENI para evitar inflamação e/ou ativação celular que propiciam permissividade e infecção por HIV-1.

Palavras-Chave: HIV-1. Células Dendríticas. Fatores Antivirais. APOBEC3G. STING. Casais Sorodiscordantes.

ABSTRACT

CERVANTES, C. A. C. Effect of the STING and Toll-like Receptors activation in Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells in Infected and Exposed non Infected Patients. Masters Thesis (Immunology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015

The quality of life and morbidity are the most important hallmarks of the HIV-1 infection worldwide. However, some subjects are exposed but non-infected, after being exposed sometimes. Some important factors have been connected with this protection, likewise genetic, viral and immune host factors. The type I Interferon (IFN-I) is the major factor in HIV-1 inflammatory response. Therefore, we investigate the expression levels of activation and regulation IFN-I factors expressed in peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) and cells of buccal wash of Exposed non-infected subjects, your infected partner, high viremia subjects (under 5.000 copies/mL) and health controls. Profile of chemokines are dosed in buccal wash supernatant and after treatment of PBMCs with STING/TLR 7 ligand we investigate frequency of interleukine secretory Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells. We observed an increase expression of APOBEC3G in high viremia subjects. Likewise an increase on mRNA levels of IFN- β and TBK-1 as observed too on HIV-1 infected patients relative to exposed and health controls. Already the expression of STING and TRIM-5a was increased in high viremia subjects. Some regulatory factors of IFN- β production cascade (IL-10, SOCS3 and TREX1) has low expression in ENIs when compared to subjects with HIV-1 infection. The expression profile of antiviral factors in cells buccal wash it was low, some samples showed expression levels but don't differentiated between groups. When we look to concentration of chemokines in buccal wash supernatant we observed high levels of IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2 e CXCL9 in infected subjects. Already, the frequency of IFN- α secretory cells stimulated with CL097 increased in HIV-1 group. Whereas TNF- α mDCs showed no difference in both groups. Our results indicated an important control mechanism to avoid inflammation who provide the permissiveness and infection with HIV-1. This indicates that expression

of antiviral factors is upregulated by the active infection and the lower exposure was ineffective.

Keywords: HIV-1.Dendritic Cells. Antiviral Factors. APOBEC3G. STING. Serodiscordant couples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da cascata e ativação de STING, promovendo a ativação de genes relacionados ao IFN tipo I e outros genes pro-inflamatórios.....	25
Figura 2 - Expressão de mRNA de fatores de restrição viral em indivíduos expostos e não infectados por HIV-1.....	37
Figura 3 - Expressão de mRNA de fatores indutores de Interferon tipo I de indivíduos expostos e não infectados por HIV-1.....	39
Figura 4 - Expressão de mRNA de fatores que regulam a resposta de Interferon tipo I.....	41
Figura 5 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1,SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos HIV-1.....	43
Figura 6 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1,SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos ENIs.....	44
Figura 7 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1,SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos controles saudáveis.....	45
Figura 8 - Análise por PCR em Tempo Real da expressão de APOBEC3G, TBK-1 e IFN- β em células mononucleares estimuladas com cGAMP. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão.....	48
Figura 9 - Expressão de mRNA de APOBEC3G, IFN- β , TREX1,TBK-1e FOXO3 em células de lavado bucal de indivíduos saudáveis, ENI e HIV.....	46
Figura 10 - Perfil de quimiocinas no lavado bucal de casais sorodiscordantes e indivíduos saudáveis.....	49
Figura 11 - Análise da frequência de células dendríticas plasmocitóides (HLA-DR+ CD123+) produtoras de IFN- α	51
Figura 12 - Análise da frequência de células dendríticas mielóides (HLA-DR+ CD11c+) produtoras de TNF- α	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados Demográficos dos indivíduos expostos não infectados (ENIs), Parceiro infectado pelo HIV-1 (INF), Paciente com viremia alta (INF VIR) e controles saudáveis (CTL).....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CpG	<i>Cytosine-Guanine rich site</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ENI	<i>Exposed non Infected</i>
FOXO	<i>Forkhead box O3</i>
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus</i>
IFNAR	<i>Interferon Receptor A</i>
IFN-I	<i>Type I Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ISG	<i>Inteferon estimated transcription</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
mDC	<i>Myeloid Dendritic Cells</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
pDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cells</i>
RIG-1	<i>RIG-like receptor</i>
SAMDH	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>

SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STING	<i>Stimulator of Interferon Gene Protein</i>
TBK-1	<i>Tank-Binding Kinase</i>
TCD4+	<i>T helper cells CD4+</i>
Th17	<i>T helper cells 17</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TREX	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM	<i>Tripartite motif-containing</i>
TYK	<i>Tyrosine kinase</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>uL</i>	microlitro
<i>ng</i>	nanograma
<i>g</i>	grama
<i>mL</i>	mililitro
<i>ug</i>	micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.8
2.1 Casuística.....	28
2.2 Determinação de células T CD4 ⁺ no sangue periférico.....	28
2.3 Quantificação do HIV-1 no plasma.....	29
2.4 Obtenção de células e fluido do lavado bucal.....	29
2.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMN).....	29
2.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.....	29
2.7 Avaliação de pDCs e mDCs por citometria de fluxo.....	31
2.8 Quantificação de quimiocinas no fluido bucal por citometria de fluxo.....	31
2.9 Análise Estatística.....	31
3 RESULTADOS	23
3.1. Dados Demográficos dos Casais Sorodiscordantes e Indivíduos Controles.....	34
3.2. Análise <i>ex vivo</i> da expressão de mRNA de fatores antivirais em células mononucleares do sangue periférico de casais sorodiscordantes.....	36
3.3 Expressão <i>ex vivo</i> de mRNA STING, IFN- β e TBK1 em CMN de casais sorodiscordantes.....	38
3.4 Expressão <i>ex vivo</i> do mRNA de fatores que regulam a produção de IFN do tipo I em CMNs de casais sorodiscordantes.....	40
3.5 Correlação da expressão de APOBEC3G com outros fatores indutores de IFN-I e reguladores.....	42
3.6 Análise da expressão do mRNA de fatores antivirais induzidos por ligante de STING (cGAMP) e de TLR-7/8 (CL097).....	45
3.7 Expressão <i>ex vivo</i> do mRNA de fatores que regulam a produção de IFN do tipo I em Células de Lavado Bucal de casais sorodiscordantes.....	47
3.8. Detecção de quimiocinas no lavado bucal de casal sorodiscordantes.....	48
3.9 Frequência de células dendríticas mielóides (mDC) produtoras de TNF- α e células dendríticas plasmocitóides (pDC) produtoras de IFN- α	50

4 DISCUSSÃO.....	52
5 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Epidemiologia do HIV-1

A epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1 – *human immunodeficiency virus type 1*) é um fator agravante de saúde pública mundial, representando altas taxas de morbidade e mortalidade. Atualmente, o HIV-1 infecta cerca de 35,3 milhões (32,2 – 38,8) de pessoas no mundo. O número de mortes relacionadas a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*), bem como de novas infecções diminuiu desde o último senso, e a principal razão foi o aumento ao acesso à terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (World Health Organization, UNAIDS, 2013).

No Sub-Saara da África, região que concentra a maior incidência da infecção, o HIV-1 infecta cerca de 22,5 milhões (20,9–24,2) de pessoas, aproximadamente 70% do total de infectados no mundo. Nas Américas Central e do Sul, existe aproximadamente 1,4 milhões (1,2–1,6) de infectados. No Brasil estima-se que 718 mil indivíduos vivam com HIV/AIDS no Brasil, representando uma taxa de prevalência de 0,4% na população geral. Numa escala global, na população de faixa etária de 15 a 49 anos a incidência é de cerca de 0,6%. Levando em consideração a população de vulneráveis acima de 18 anos, um levantamento realizado em 10 municípios brasileiros entre 2008 e 2009, estimou a taxa de prevalência do HIV-1 em 5,9% entre os usuários de drogas injetáveis, 4,9% entre trabalhadoras do sexo e 10,5% entre homossexuais (Boletim Epidemiológico, DST/AIDS, BRASIL, 2013).

Os mecanismos que regem a patogênese da infecção pelo HIV-1, ou mesmo a resistência à infecção resultam da interação entre o sistema imune e o vírus (MOGENSEN et al, 2010). Entre os infectados pelo HIV-1, essa interação origina três grupos que se distinguem pela cinética da progressão para AIDS. Os *Progressores Rápidos (PR)*– cujo curso da doença evolui com uma rapidez pouco usual em cerca de 3 a 4 anos e representam de 5 a 10% dos infectados (SHEPARD et al., 1993). Os *Progressores Típicos (PT)*– onde a progressão ocorre em cerca de 8 a 10 anos da infecção, representados por 80 a 90% dos infectados (DEEKS et al., 2007) e o terceiro e último grupo que é formado pelos *Progressores Lentos (PL)* – cuja característica é o retardo pouco comum da progressão da doença, onde mesmo na ausência do tratamento antirretroviral os indivíduos se mantêm sem sinais da progressão por mais de 10 anos. Um subgrupo dentro dos progressores lentos são os *Controladores de Elite* cuja

característica é a manutenção do número de células T CD4⁺ no sangue periférico acima de 500/mm³, além de reduzida carga viral, por mais de 10 anos na ausência de tratamento (PANTALEO et al., 1995).

Por outro lado, há aqueles indivíduos que se expõem e não se infectam com HIV-1. Esse grupo é conhecido como *Expostos não Infectados* (ENI). Não existem informações a respeito da frequência desses indivíduos em escala mundial. Porém, em alguns países africanos a frequência de casais heterossexuais sorodiscordantes onde um(a) dos membros é infectado(a) pelo HIV-1 e o outro não, é de dois terços (HUGONNET et al., 2002).

O mecanismo central que rege a resposta imune nos indivíduos ENIs parece recrutar a resposta T_H1 HIV-1-específica de maneira eficaz para evitar a infecção. O estudo mais detalhado dos mecanismos de resposta imunológica nesta população poderá ser importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas anti-HIV-1.

A exposição e a não infecção pelo HIV-1

Desde o final da década de 80 é conhecido que alguns indivíduos mantêm-se soronegativos a despeito de repetidas exposições ao HIV-1 (FOWKE et al., 1996). Esse efeito foi inicialmente observado em trabalhadoras do sexo em Nairóbi no Quênia, mas coortes de indivíduos que se expõem ao HIV-1 e não se infectam são encontradas em diversos países do mundo. Um fenômeno que é observado em mulheres e homens (CARPENTER et al., 1999; QUINN, et al 2000).

Porém, esses indivíduos ENI apresentam um risco elevado de se tornarem infectados. Na África, cerca de 10% dos indivíduos ENI (que vivem relacionamentos estáveis) se infectam ao longo de 1 ano com repetidas exposições HIV-1 (QUINN, et al 2000). Os indivíduos ENI representam a principal fonte de novas infecções pelo HIV-1 em países africanos, onde se observa que até 95% das novas infecções pelo vírus ocorrem em indivíduos ENI, e em especial aqueles que vivem relacionamentos estáveis (DUNKLE et al., 2008).

A exposição ao HIV-1 sem infecção é observada em trabalhadoras do sexo (JENNES et al., 2006), casais hetero e homossexuais (CLERICI et al., 1992), em recém-nascidos filhos de mães infectadas pelo HIV-1 (BALLAN et al., 2007), em indivíduos expostos intravenosamente, como trabalhadores da saúde (PINTO et al., 1995), hemofílicos transfundidos (KRONER et al., 1994), e usuários de drogas intravenosas

(BOULET et al., 2008). Entre as diferentes rotas de exposição ao HIV, a exposição sexual possui um papel importante no contexto da infecção, pois é a principal rota de exposição das novas infecções em adultos (QUINN et al., 2000).

Na busca por um mecanismo que explicasse esse fenômeno, os estudos iniciais sugeriram que a coorte de trabalhadoras do sexo de Nairobi com sorologia negativa para o HIV-1, mostrava resposta das células T CD4⁺ específicas para as proteínas do envelope e do *core* viral (RANKI et al., 1989). Estudos posteriores confirmaram essa resposta das células T CD4⁺ HIV-1-específicas, e a hipótese era que a soroconversão não ocorria nos indivíduos ENI porque a exposição ao vírus primária às células T produzindo uma resposta “protetora” nesses indivíduos. Posteriormente, um novo conceito foi proposto, o de “resistência” a infecção pelo HIV-1 nos indivíduos ENI, com a evidência observada em trabalhadoras do sexo de Nairóbi que parte delas se tornaram infectadas por HIV-1 ao longo de um ano (FOWKE et al., 1996).

A contribuição do sistema imune inato nesse mecanismo de resistência entre os indivíduos ENIs ainda é pouco conhecida. Mas, a capacidade para recrutar a resposta antiviral precoce e aguda, como a produção de interferon tipo I (IFN-I) pode representar um importante mecanismo de resistência do hospedeiro ao HIV-1. Com efeito, esse mecanismo pode restringir a replicação e disseminação do vírus para outras células (BOASSO et al., 2008).

A imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 na mucosa

A cavidade oral é considerada um sítio privilegiado quanto a transmissão do HIV-1, dos quais são estimados que 4 em cada 10,000 contatos resultam em infecção (VITTINGHOFF et al., 1999). A transmissão vertical durante a amamentação, também pode ocorrer e é uma via de infecção oral. (SCARLATTI, 2004). Em relação a proteção da mucosa oral, salientamos a presença de altas concentrações de fatores antiretrovirais e antimicrobianos solúveis presentes na saliva. (GREENWELL-WILD et al., 2006; SHUGARS AND WAHLL, 1998). O poder de inibição viral dessas proteínas não está bem determinado mas em alguns casos foi observado que anticorpos específicos ao HIV podiam ligar-se ao vírus e neutralizá-lo, recrutando elementos da resposta imune específica para promover o clearance do mesmo. Outro exemplo é o aumento de proteínas ricas em prolina ácida, trombosplatina, proteínas poliânionicas, lactoferrina,

mucinas e aglutininas salivares na cavidade oral após a interação com a gp120 do HIV-1.

Nos últimos anos muitos estudos mostraram a atividade do HIV em superfícies de mucosa intestinal. Muitos dados mostram subpopulações de células TCD4+ e Th17 são predominantes na mucosa do intestino, sendo células alvo para a replicação viral do SIV e também no decorrer da infecção natural pelo HIV-1. Em estudos experimentais em macacos *Rhesus*, Ocorreu a depleção desses subtipos celulares na mucosa, após a infecção. Além disso uma alta frequência de células Th17 que expressa a integrina $\alpha 4\beta 7$ foram depletadas e ainda mostraram um alvo preferencial para albergar DNA viral (KADER, M. *et al.* 2009). Em humanos o fenômeno se confirmou, quando indivíduos infectados pelo HIV foram comparados com indivíduos controle e o número de células também era menor. Na mucosa intestinal a porcentagem de células Th17 não foi afetada e em alguns indivíduos houve uma restauração dessas células após início do tratamento antiretroviral (KIM, CJ. *et al.* 2013). Além disso a infecção pelo HIV-1 também danifica a arquitetura intestinal por induzir apoptose dos enterócitos e mecanismos de reparo. Graças a esse comprometimento produtos de bacterianos translocam para a circulação periférica e ativa mecanismos inflamatórios, contribuindo assim para progressão para a AIDS (BRENCHLEY, M. *et al.* 2006)

Interferon tipo I (IFN-I)

As observações iniciais sobre a resposta do organismo a exposição viral, remetem-nos ao início do século XIX, quando os ensaios realizados por Jenner demonstraram que indivíduos desafiados com um macerado de lesões provocadas por vaccinia, gerou um efeito protetor após o segundo contato com o vírus em sua forma infectante, desenvolvia-se assim vários conceitos importantes entre eles o da imunização.

Em meados do século XX Isaacs e Lindeman (1957) desenvolveram um ensaio experimental onde células em cultura estimuladas com vírus inativado por calor, inibiram o crescimento viral após cultura dessas células com vírus íntegro, esse fenômeno foi denominado “interferência viral”. Eles sugeriram que esse efeito aconteceu graças à secreção de um fator solúvel, cuja função primária era bloquear a infecção viral, esse fator foi então denominado de interferon (IFN).

A família dos IFNs é classificada em três grupos: IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III. Os IFNs tipo I são as principais citocinas da resposta imune inata do hospedeiro

contra infecções virais, e seu uso é clinicamente importante como adjuvante em terapia anticancer e antiviral (SHEILA et al., 2002). Em humanos essa família é composta por 16 membros, sendo 12 subtipos do IFN- α , 1 IFN- β , 1 IFN- ϵ , 1 IFN- κ e 1 IFN- ω (GONZÁLEZ-NAVAJAS, et al 2012). Os genes que codificam essas citocinas localizam-se no cromossomo 9. O IFN-II tem como único representante o IFN- γ , uma citocina que participa do mecanismo de diferenciação das células T_H0 em T_H1 , e desenvolvimento da resposta citotóxica das células NK e T $CD8^+$. Os IFNs tipo III, constituem a classe mais recente de citocinas da família dos IFNs, são denominadas IFN- $\lambda 1$ (IL-29), IFN- $\lambda 2$ (IL-28A) e IFN- $\lambda 3$ (IL-28B) (KOTENKO et al., 2003). Os IFNs-III também possuem atividade antiviral, mas se ligam a receptores distintos dos receptores do IFN-I e INF-II.

As citocinas da família do IFN do tipo I são produzidas por alguns tipos celulares, como leucócitos, fibroblastos e células endoteliais, e a via de sinalização para essa produção difere quanto ao estímulo, o microambiente e o tipo celular sensibilizado, mas não está totalmente elucidado o que leva a célula a se comprometer com a produção de IFN do tipo I (SCHAFER et al., 1998; HACKER et al., 2006). No sistema imune as células dendríticas plasmocitóides (pDCs – *plasmocitoid Dendritic Cells*) são consideradas as principais produtoras de IFN tipo I em resposta à infecções e em resposta à estímulo dos TLRs (CELLA et al., 1999; GIBSON et al., 2002; SIEGAL et al., 1999). As pDCs podem secretar 1000 vezes mais IFN-I que outros tipos celulares em resposta ao desafio microbiano (SIEGAL et al., 1999).

Os IFN-I também são induzidos pela ativação dos receptores *Toll-like* (TLR), receptores cruciais na resposta antimicrobiana do hospedeiro por reconhecerem assinaturas moleculares de patógenos (MONROE et al., 2010). Em humanos foram descritos 11 TLRs, expressos em uma variedade de células e tecidos. Os receptores TLRs que induzem a produção de IFN-I são TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9. Os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são intracelulares, localizados nos endossomos, enquanto o TLR4 está localizado na membrana plasmática.

Os receptores *Toll-like* se ligam a diferentes padrões moleculares expressos nos patógenos (PAMPs), bem como a moléculas que induzem danos aos tecidos, expressas pelo hospedeiro (DAMPs). O TLR3 reconhece RNA de dupla fita viral (dsRNA), o TLR4 reconhece lipopolissacárides (LPS), os TLR7 e TLR8 reconhecem a fita simples de RNA viral (ssRNA), e o TLR 9 reconhece DNA não metilado, rico em motivos de

citossinas e guanossinas (CpG) de bactérias e vírus. Uma vez ativados os TLRs induzem a produção de IFN-I via proteína de diferenciação mielóide de resposta primária 88 (MYD88), exceto o TLR3 que utiliza a proteína adaptadora TRIF (KUMAR et al., 2009). A expressão dos TLR nas células dendríticas (DCs) pode variar de acordo com dois subtipos, as células dendríticas mielóides (mDC) expressam TLR3 e TLR8, enquanto o TLR7 e o TLR 9 é expresso nas pDCs (HOMUNG, 2002; KADOWAKI, 2001).

Contudo, a produção de IFN-I não é restrita a ativação de TLRs. Estudos em animais *knockout* para os genes dos TLRs mostraram uma via de produção do IFN-I, independente da ativação de TLRs (STETSON, 2006). As vias independentes de TLRs são geradas por sensores de DNA citoplasmáticos, como o gene induzível por ácido retinóico I (RIG-I) e gene associado à diferenciação de melanoma (MDA5). (KAWAI et al, 2009).

Recentemente, identificou-se uma via de indução de IFN-I que é mediada pelo sensor de DNA denominado sintase de monofosfato guanossina/monofosfato de adenosina (cGAS) (WU et al., 2013). A ligação do DNA ao cGAS, cataliza a síntese do isômero de cGAMP de trifosfato de adenosina (ATP) em trifosfato de guanossina (GTP). Este isômero, chamado 2'3'-cGAMP, contém ligações fosfodiéster 2'-5' e 3'-5' e funciona como um mensageiro secundário que ativa a proteína STING na membrana do retículo endoplasmático (ABLASSER et al., 2013). Além da função de reconhecer dinucleotídeos cíclicos o STING também reconhece fitas de DNA duplas no citoplasma, direcionando a ativação da quinase TBK1 (*tank binding kinase*), induzindo a ativação de NF- κ B que fosforila o fator 3 regulador de IFN (IRF3). IRF3 sofre homodimerização e esse complexo é translocado ao núcleo, onde estimula a produção de IFN-I (WOODWARD et al., 2010). (FIGURA 1)

Após sua secreção, os IFN-I ativam a uma cascata de sinalização via receptor IFN α/β (IFNAR). O IFNAR é constituído por duas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2) e está associado na porção citoplasmática a duas enzimas, a Janus quinase 1 (JAK1) e a tirosina quinase não receptora (TYK2) (HONDA et al., 2006; PLATANIAS et al., 2005). A ativação de JAK1 e TYK2 resulta na fosforilação e ativação do sinal transdutor e fator de transcrição (STAT). Na maioria das células esse sinal se dá por STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5, mas em linfócitos essa ativação é regida por STAT4 e STAT6. (MATIKAINEN et al., 1999). A ativação de STAT1 e STAT2 muda a conformação proteica, se dimerizam e recrutam o Fator Regulador de Interferon 9

(IRF9) que juntos formam um complexo chamado de Fator 3 estimulador do gene do IFN (ISGF3), sendo translocado ao núcleo, se liga a elementos de resposta estimulados por IFN (ISREs) e promove a transcrição dos genes induzíveis por interferon (ISGs). Além desse complexo, outros complexos formados por STATs são induzidos por IFN I, como os homodímeros STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5, STAT6-STAT6, e heterodímeros STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3 e STAT5-STAT6 (PLATANIAS et al., 1999).

Outro fator importante na produção de IFN-I é também a homeostase do sistema em terminar essa síntese. A produção de IFN-I induz proteínas chamadas SOCS1 e SOCS3 (*supressor of cytokine signaling*) como função de *feedback* negativo, limitando a duração da resposta pelo IFN-I. As proteínas SOCS competem pelo sítio de ligação do receptor IFNAR com a proteína STAT e suprime a atividade de JAK1. (YOSHIMURA et al., 2007). Além disso a resposta de IFN-I pode ser interrompida por elementos transcricionais. Um fator recém identificado como FOXO3 (*transcription factor forkhead Box protein O3*) reprime elementos de transcrição de promotores de ISGs, como o IRF7. (LITVAK, et al., 2012)

A importância da via cGAS/STING na resposta antiviral é demonstrada em estudos *in vitro* com retrovírus e outros vírus de DNA. A linhagem de monócitos humanos THP-1 ativaram a via STING-TBK1 quando cultivadas com o HIV-1. E outro fator importante desse estudo é que a inibição do ciclo viral com antagonistas da transcriptase reversa do HIV-1 reprimiu a transcrição de IFN- β , já os inibidores da enzima integrase do HIV-1, que inibe a integração do vírus no genoma hospedeiro, não ocorreu, sugerindo que a transcrição reversa também ativa a resposta imune inata. Além disso, quando inibia-se o cGAS em linhagens celulares humanas e linhagens celulares de camundongos a indução de citocinas pelo HIV-1, vírus da leucemia murina e o Vírus da imunodeficiência Simia (SIV) também foi bloqueada. (GAO et al., 2013).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que parturientes infectadas pelo HIV-1 possuem elevada expressão de mRNA de STING, em relação as parturientes não infectadas (PEREIRA et al., 2013). Dado o fato que na gravidez há um predomínio da resposta T_H2 em detrimento da resposta T_H1, e, portanto um modelo mais apropriado para o estudo da resposta antiviral “protetora” seja os observado nos indivíduos ENIs, salienta-se a importância de se estudar numa coorte de ENIs, a via cGAS/STING para geração de IFN-I, para entendermos melhor o papel dessa via na resposta antiviral ao HIV-1 nesses indivíduos.

Figura 1. Esquema representativo da cascata e ativação de STING, promovendo a ativação de genes relacionados ao IFN tipo I e outros genes pro-inflamatórios. (ALTFELD ; GALE JR, M 2015)

Fatores antivirais induzíveis por IFN tipo I

A ativação da cascata JAK-STAT induzida a partir do IFNAR induz a transcrição dos denominados genes estimulados por IFN (ISGs). Centenas de ISGs são transcritos, de onde se possibilita a criação de um “estado antiviral” efetivo contra vírus de RNA, vírus de DNA, bactérias e parasitas intracelulares. A sinalização induzida por

IFN ainda coopera para a resposta imune adaptativa (GONZALES-NAVAJAS et al., 2012).

Apenas alguns ISGs foram estudados em detalhes, mas os mecanismos dos ISGs podem esclarecer como o estado celular induzido por IFN reprograma a biologia dessas células, primando-as para permitir aumento do reconhecimento de patógenos e uma resposta imune efetiva (RONNBLOM et al., 2011). Alterações na via dos IFNs são demonstradas em uma variedade de doenças autoimunes, sugerindo a importância do controle sobre a sinalização induzida por IFN.

Os ISGs possuem uma ampla variedade de atividades. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), IRFs, proteínas transdutoras de sinais (JAK e STAT) são expressas constitutivamente, mas reforçam a resposta induzida por IFN. Os IFN-I podem induzir ISGs que controlam o ciclo de vida dos patógenos (SCHEINDER et al., 2014). As proteínas APOBEC, TRIM e TREX1, são exemplos de moléculas coletivamente denominadas fatores antivirais, e são fortemente induzidas via ativação mediada por IFN-I.

APOBEC

Um fator importante na defesa antiviral são as Apolipoproteínas B – APOBEC – proteínas da família das citidinas desaminases que incluem 11 membros em humanos: APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H, APOBEC4 e AID (ativação de desaminase induzida) (BISHOP et al, 2004). Estas proteínas são produzidas por linfócitos T, monócitos, macrófagos e DCs e fazem parte da resposta imunológica inata na defesa antiviral, particularmente dos retrovírus. A APOBEC3G e APOBEC3F são consideradas as mais eficientes no controle antiviral (DANG et al, 2006)

A proteína acessória Vif (fator de infectividade viral) do HIV utiliza proteínas da célula hospedeira para promover a degradação da APOBEC através do processo de ubiquitinação. Este fator age como um adaptador de proteínas conectando a APOBEC ao complexo ligase de ubiquitina E3, que inclui EloginB, EloginC, Cullin5 e Rbx-1 favorecendo a degradação da APOBEC através do sistema ubiquitina-proteossoma (MEHLE et al., 2004). Na ausência de Vif, comumente presentes no citoplasma, hipermuta as extremidades do RNA do HIV-1, removendo um grupo amina das citosinas, e convertendo-as em uracilas (DANG et al, 2006). Esta alteração impossibilita a integração do pró-vírus no genoma do hospedeiro. Estas mutações também podem

ocorrer de maneira inespecífica, inviabilizando uma nova infecção por este vírion (HOLMES et al, 2007). A APOBEC também possui atividade inibitória na transcrição reversa, interferindo no iniciador tRNA^{Lys-3} impedindo a polimerização da fita (GUO et al, 2006). Por outro lado, a mutação H168R do RNA do HIV-1 provocada pela APOBEC, proporcionou uma melhora no *fitness* viral favorecendo a progressão da doença (NA et al., 2004).

TRIM

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

As proteínas TRIM podem se localizar na região citoplasmática (TRIM 5) ou nuclear da célula (TRIM 19) agindo principalmente em processos constitutivos como apoptose, transcrição, diferenciação e regulação da progressão do ciclo celular (Meroni, et al. 2005). Um grupo dessas proteínas possui atividades antivirais, principalmente para os retrovírus, como a TRIM 19, é capaz de inibir citomegalovírus, herpes tipo I, ebola e HIV (BJORNDAL et al, 2003; EVERETT et al, 2007).

O TRIM22 tem mostrado importante efeito antiviral contra o HIV-1, inibindo a liberação do vírus da célula hospedeira, ligando especificamente à partícula gag do HIV. A expressão de TRIM22 e TRIM 5alfa está aumentada em PBMCs de indivíduos infectados, sendo positivamente regulada por IFN-I (BARR et al., 2008). Além disso, quando a expressão de TRIM22 é silenciada, na presença de IFN-I, há um aumento na infecção e maior saída de vírus da célula (SINGH et al., 2011).

TREX1

A proteína citosólica TREX1(*three prime repair exonuclease 1*) tem um papel importante na infecção pelo HIV-1. Ela é uma exonuclease que degrada retrovírus endógenos, e foi descrita também com a função de degradar o DNA do HIV-1.

Entretanto, o HIV-1 tem um mecanismo que sequestra TREX1 como mecanismo de evasão (YAN, 2010). Perdas de função por mutações em humanos têm sido correlacionadas com a Síndrome de Aicardi-Goutières, uma patologia semelhante ao *Lupus* que tem como sinal a elevada expressão de citocinas inflamatórias e genes estimuladores de interferons (CROW et al., 2006).

Em estudo com fibroblastos murinos onde o TREX1 foi deletada ocorreu o acúmulo de elementos retrovirais de DNA endógeno induzindo uma produção excessiva de IFN-I (STETSON et al., 2008; YANG et al., 2007). E na ausência de uma infecção viral, camundongos que são transgênicos para o TREX1 desenvolveram uma miocardite inflamatória, causada por elevados níveis de IFN-I (MORITA et al., 2004; GALL et al., 2012). Além disso, quando ocorre dano oxidativo na molécula de DNA, esse efeito confere resistência ao TREX1, potencializando a ativação por STING (GEHRKE et al., 2013). Esses dados sugerem que TREX1 é um regulador negativo da resposta antiviral, ativada pela via de sinalização STING-TBK1-IRF3.

SAMDH1

Outro fator que está descrito como um fator de restrição viral frente a infecção pelo HIV-1 é o SAMDH1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1). SAMDH1 atua diminuindo a oferta de nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), que são necessários para a síntese do DNA viral, bloqueando assim a transcrição reversa. (LAHOUASSA H. et al., 2012)

A proteína Vpx do HIV-2 e SIV interage com SAMDH1 degradando-a, permitindo uma síntese viral efetiva e aumentando assim a replicação em células dendríticas. No HIV-1 a proteína homóloga ao Vpx é o fator chamado Vpr, que também foi descrito como fator que degrada SAMDH1 (TRISTEM M. et al., 1988).

Sendo assim, é de suma importância um estudo que vise evidenciar o perfil de expressão desses fatores em indivíduos infectados e os indivíduos que se expõem mas não se infecta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Casuística

O grupo de estudo foi composto por indivíduos expostos e não infectados por HIV, grupo ENI (n=15), e seu parceiro infectado por HIV-1, grupo INF (n=17), e indivíduos controles saudáveis (n=14). Um grupo de HIV-1 com carga viral detectável acima de 5000 cópias/ μ L foi acrescentado (n=5). Os indivíduos do grupo ENIs e HIV-1 foram provenientes de dois ambulatórios: Ambulatório de Imunodeficiências Secundária (AEED) do Hospital das Clínicas de São Paulo e do Ambulatório de Vulneráveis do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Os indivíduos controles não infectados foram provenientes do Instituto de Medicina Tropical da USP. Todos os indivíduos foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido. Esse trabalho foi submetido a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, e a Comissão de Ética do Instituto de Biociências da USP

Critério de Inclusão: história regular de sexo sem proteção com o parceiro por pelo menos 1 ano.

Critério de Exclusão: Foram excluídas co-infecções, infecções oportunistas ativas e uso de imunomoduladores ou supressores.

2.2 Determinação de células T CD4⁺ no sangue periférico

Para quantificação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ utilizou-se o kit BD Multitest™ CD3 FITC/ CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC Reagent (BD Pharmingen – San Jose-USA). Realizado pelo Setor de Citometria de fluxo do LIM 56. As marcações foram feitas com 50 μ L de sangue periférico coletados em tubos contendo EDTA. Adicionou-se 50 μ L de sangue periférico em tubos Trucount contendo microesferas marcadas com os anticorpos anti-CD3 (FITC), anti-CD45 (PerCP), anti-CD4 (APC) e anti-CD8 (PE). Na análise, o número absoluto das células positivas (células/ μ L) foi determinado com o auxílio do software BD Multiset™ de acordo com o protocolo padrão do Ministério da Saúde.

2.3 Quantificação do HIV-1 no plasma

O ensaio para determinação da carga viral foi realizada pelo método Abbott Real Time HIV-1 (Illinois, USA) no Setor de Carga Viral do LIM-56. O ensaio *in vitro* utiliza o processo de RT-PCR a partir do RNA viral plasmático extraído. O limite mínimo de detecção é 40 cópias de RNA/mL, e o limite máximo é de 10 milhões de cópias de RNA/mL. A região alvo no genoma do HIV-1 amplificada engloba o gene pol.

2.4 Obtenção de células e fluido do lavado bucal:

O **fluido do lavado bucal** foi coletado por meio de bochecho vigoroso com salina estéril. Para obter a suspensão celular o material foi centrifugado a 500g por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a -80°C e o pellet celular armazenado em RNA Later (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA) foram estocados a -80°C até a utilização.

2.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMN):

O sangue periférico foi coletado em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica. O sangue foi diluído 1:2 em solução fisiológica (0,9%). Em seguida, o sangue foi acondicionado em tubos contendo solução de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL) Ficoll-Paque Plus (GE® Healthcare, Uppsala, EUA) e centrifugado (800g/20minutos). Posteriormente, as células mononucleares foram coletadas e lavadas 2x em solução fisiológica e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640, para serem quantificadas e devidamente cultivadas.

2.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

As CMNs obtidas ($1,0 \times 10^6$) foram armazenadas em solução de RNA Later (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA) até o momento da extração. Para extração do RNA foi utilizado o kit Qiagen RNeasy mini kit PLUS (*Hilden, Germany*) que confere pureza e eliminação do DNA genômico. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific, EUA) e convertido em cDNA (BIO-RAD – Hercules, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a

realização da reação de amplificação em tempo real foi utilizada para cada amostra: 5 µL cDNA (30 ng/µL), 7 µL da solução *SYBR[®] Green* (Applied Biosystem – Carlsbad, CA, USA) e 2 µL (1µM) dos *primers* (inicializadores) sense e anti-sense.

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Invitrogen:

APOBEC3G

5' – GGCTCCACATAAACACGGTTTC - 3' (forward)

5' - AAGGGAATCACGTCCAGGAA - 3' (reverse);

TRIM5α

5'- CTGGCATCCTGGGCTCTCAAAGT-3' (forward)

5'- CATACCCCCAGGATCCAAGCAGTT-3' (reverse)

TRIM22

5'- GGTGAGGGGATCGTCAGTA -3' (forward)

5'- TTGGAAACAGATTTTGGCTTC -3' (reverse)

STING

5'-ATATCTGCGGCTGATCCTGC -3' (forward)

5'-GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT-3' (reverse)

TREX1

5' - GCCAAGACCTCTGCTGTAC - 3' (forward)

5' - CAGGGTCCTTCACTGGAGGAA - 3' (reverse)

SAMDH1

5' - GGATTACTAAAAACCAGGTTTCACAACT - 3' (forward)

5' - GCTCTGCAAATTTCTCTGGCAG - 3' (reverse)

IFN-β

5'- GGCTGGCCCTGTGATATTTCTGTG -3' (forward)

5'- ACCTGGCTCTCCTCCTCCCTTCCT -3' (reverse)

TBK-1

5'- GCAGTTTGTTTCTCTGTATGG - 3' (forward)

5' - ATTGTTACCCCAATGCTCCA - 3' (reverse)

GAPDH

5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (forward)

5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' (reverse)

2.7 Avaliação de pDCs e mDCs por citometria de fluxo.

As CMNs foram cultivadas ($2,0 \times 10^6/500 \mu\text{L}/\text{poço}$) em placas de 48 poços em RPMI 1640 (Gibco-Life TechnologiesTM – Grand Island, NY-USA) com 10% de soro humano AB (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA) e 40 mg/mL de gentamicina (Novafarma – Anápolis, GO-Brasil), L-glutamina (Gibco-Life TechnologiesTM – Grand Island, NY-USA), e 1% aminoácidos não-essenciais (Gibco-Life TechnologiesTM – Grand Island, NY-USA). As culturas foram incubadas na presença ou não de $20 \mu\text{g/mL}$ do ligante de STING (cGAMP), ou com $10 \mu\text{g/mL}$ de CL097, ligante dos receptores *Toll-like* 7 e 8, por 6 horas em estufa a 5% CO_2 a 37°C . Após quatro horas de estimulação, foi adicionado $10 \mu\text{g/mL}$ de Brefeldina A (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO-USA). Ao final, as células foram coletadas com solução salina tamponada (PBS) gelado, para facilitar a remoção das células aderentes, lavadas com PBS (1.500 rpm por 5 min.). Após a coleta, as células foram incubadas com $100 \mu\text{g/mL}$ de solução contendo IgG humana (Sandoglobulina) por 15 min. no escuro a 4°C . Em seguida as células foram incubadas por 30 min a 4°C com Live/Dead (PE-Texas Red – Invitrogen – Oregon, USA) na proporção 1:25, para excluir as células mortas das análises. Posteriormente as células foram lavadas em PBS (1.500 rpm por 5 min) e fixadas com $50 \mu\text{L}$ de do reagente BD Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), por 20 min. Em seguida as células foram lavadas com $500 \mu\text{L}$ o tampão Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Logo após, as pDCs, mDCs foram marcadas incubando as CMNs com $1 \mu\text{L}$ dos seguintes anticorpos monoclonais: CD11c (Alexa Fluor 700), HLA-DR (Horizon V500), CD80 (APC-H7), CD83 (PECy7), LIN-1 (FITC), CD86 (APC), CD123 (PerCP Cy5.5), TNF(PE) e IFN- α (Horizon V500). Ao final as células foram lavadas, ressuspensas em $300 \mu\text{L}$ de PBS. e 300 mil eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo (LSRFortessa-BD – CA, USA), com o auxílio do software FACS Diva. Os dados foram analisados em FlowJo versão 9.4.11 (Tree Star – Ashland, OR-USA).

2.8 Quantificação de quimiocinas no fluido bucal por citometria de fluxo:

O ensaio foi realizado com BDtm Cytometric Bead Array Human Chemokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). As amostras foram incubadas com beads de captura e posteriormente, com anticorpo de detecção PE. O analito foi incubado então por 3 horas a temperatura ambiente e analisado em citômetro de fluxo (LSRFortessa-

BD – CA, USA), com o auxílio do software FACS Diva. Os dados foram analisados com o software FCAParray 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

2.9 Análise Estatística

O test de Kruskal-Wallis seguido do pós-test de Dunn's foram utilizados para comparar as variáveis entre os grupos ENI, HIV-1 e controle. Foram considerados estatisticamente significantes quando os valores foram : $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Dados Demográficos dos Casais Sorodiscordantes e Indivíduos Controles

A Tabela mostra os dados de 18 casais sorodiscordantes ao HIV-1, onde 12 casais são heterossexuais e 6homossexuais masculinos (Tabela 1). O tempo médio de relação entre os casais sorodiscordantes foi de $11,63 \pm 2.2$ e a média de tempo de infecção apresentada no grupo HIV-1 foi de $10,7 \pm 1.4$ anos (Anexo 1). No momento da coleta apenas 4 indivíduos do grupo HIV-1 apresentaram carga viral (CV) acima de 50 cópias/ μ L de sangue (50.930, 17.511, 179 e 51) e apenas 1 indivíduo não estava em tratamento antirretroviral (TARV), com o tempo médio de $7,7 \pm 2.5$ anos. O número de células T CD4+ está significativamente diminuído em relação ao grupo HIV-1, como mostra na Tabela 1, mas em contrapartida o número de células T CD8+ não mostrou-se diferente (Tabela 1). Além disto, foi incluído um grupo de indivíduos infectados por HIV com CV acima 5000 cópias/ μ L, mediana de 8.104 cópias/ μ L, sendo 2 em TARV.

Quanto a distribuição de gênero, o grupo controle foi composto por 4 homens e 10 mulheres, para se assemelhar essencialmente ao grupo ENI, que possui 8 homens e 7 mulheres. O grupo infectado virêmico (INF vir) foi constituído de 1 mulher 4 homens. Este grupo foi acrescentado, para ter parâmetro de pacientes com HIV-1 com CV detectável, considerando que os parceiros infectados por HIV-1 possuem na sua maioria (80%) CV indetectável (Tabela 1).

Numero	Sexo	Idade	Relacionamento	CD4+	CD8+	Cópias/ml	Log
ENI 01	F	45	Hom.	940	844	<50	< 1,69
ENI02	F	39	Het.	981	606	<50	< 1,69
ENI03	F	49	Het.	1735	880	<50	<1.69
ENI04	F	55	Het.	1594	1805	<50	< 1,69
ENI05	M	47	Het.	1570	1298	<50	< 1,69
ENI06	F	46	Hom.	1441	489	<50	<1.69
ENI07	M	35	Het.	1312	868	<50	< 1,69
ENI08	M	33	Hom.	990	322	<50	< 1,69
ENI09	M	35	Het.	1263	588	<50	<1.69
ENI10	M	33	Het.	1272	1042	<50	< 1,69
ENI11	M	25	Hom.	1224	1015	<50	< 1,69
ENI12	F	26	Hom.	925	525	<50	<1.69
ENI13	F	46	Hom.	505	342	<50	< 1,69
ENI14	M	37	Het.	1238	471	<50	< 1,69
ENI15	M	28	Het.	663	435	<50	<1.69
(n=15)	(7F/8M)	(38.4±2.4)	(9 Het./6Hom)	(1177±88.8)	(768±104.6)	-	-
INF01	M	41	Het.	169	941	< 50	< 1,69
INF02	M	43	Het.	623	471	< 50	< 1,69
INF03	M	44	Het.	626	526	<50	<1.69
INF04	M	39	Het.	174	2120	50930	4,7
INF05	M	51	Het.	1032	1270	<50	<1.69
INF06	M	47	Hom.	1205	862	<50	<1.69
INF07	M	40	Het.	971	1743	<50	<1.69
INF08	M	36	Hom.	640	748	<50	<1.69
INF09	F	36	Het.	273	366	51	1.70
INF10	M	40	Het.	212	673	<50	<1.69
INF11	M	38	Hom.	934	1187	<50	<1.69
INF12	M	28	Hom.	1001	675	17511	4,243
IFN 13	M	48	Hom.	248	1367	<50	<1,69
IFN 14	F	46	Het.	413	683	<50	<1,69
IFN 15	F	38	Het.	1131	857	<50	<1,69
IFN 16	M	41	Het.	169	941	<50	<1,69
IFN17	M	46	Het.	451	1061	179	2,25
(n=17)	(3F/14M)	(40.6±1.4)	(12Het/5Hom)	(627±78.2)	(902±107.7)	-	-
CTL01	F	41	-	870	363	-	-
CTL02	F	58	-	1560	858	-	-
CTL03	F	40	-	803	410	-	-
CTL04	F	37	-	1092	469	-	-
CTL05	F	46	-	1008	337	-	-
CTL06	F	22	-	890	1272	-	-
CTL07	F	38	-	1033	341	-	-
CTL08	F	41	-	1185	759	-	-
CTL09	M	53	-	711	385	-	-
CTL10	M	30	-	1121	993	-	-
CTL11	M	32	-	687	597	-	-
CTL12	M	32	-	721	616	-	-
CTL13	F	33	-	1224	428	-	-
CTL14	F	37	-	1664	640	-	-
(n=14)	(10F/4M)	(38.1±2.7)	-	(1053±98.3)	(631±75.8)		
INF VIR001	F	52	-	341	1700	250.647	5.0
INF VIR002	M	21	-	655	678	7479	4.0
INF VIR003	M	54	-	504	620	7.993	3.903
INF VIR004	M	42	-	535	1104	11.897	4.075
INF VIR005	M	44	-	456	828	8.104	3.903
(n=5)	(1F/4M)	(42.6)		(498.2)	(986)	(7.147,73)	(3.8)

3.2 Análise *ex vivo* da expressão de mRNA de fatores antivirais em células mononucleares do sangue periférico de casais sorodiscordantes

A imunidade inata antiviral, possui fatores de restrição tais proteínas da família citidinas desaminases, como a APOBEC3G, capaz de editar as fitas de cDNA, hipermutando-as e impossibilitando a sua integração no genoma do hospedeiro (DANG *et al.*, 2006). Além disso, proteínas TRIM exercem um papel importante na proteção do hospedeiro, bloqueando em diferentes fases do ciclo viral (HATZIOANNOU *et al.*, 2004) e o fator SAMDH1 é capaz de diminuir a oferta de nucleotídeos na transcrição viral, abortando assim a incorporação do HIV-1 no genoma celular. Considerando sua importância na resposta antiviral, avaliamos a expressão de mRNA desses fatores nas amostras de células mononucleares (CMN) de indivíduos expostos não infectados (ENI), seu respectivo parceiro infectado com o HIV-1 (INF) e amostras de indivíduos controles saudáveis (CTRL e infectados por HIV-1 virêmicos (INF VIR).

A Figura 1 mostra que a expressão de APOBEC3G entre os fatores antivirais analisados foi mais expressivo que os demais fatores. A expressão de APOBEC 3G do grupo controle e ENI foram inferiores que os grupos infectados, seja dos parceiros do ENI ou dos virêmicos, evidenciando que a infecção é necessária para ativar esse fator. Além disto, a expressão de TRIM5 α foi mais pronunciada no grupo infectado virêmico do que em relação ao grupo ENI (Figura 2). A expressão do mRNA dos fatores TRIM22,e SAMHD1 estão expressas igualmente em todos os grupos do estudo.

Figura 2 - Expressão de mRNA de fatores de restrição viral em indivíduos expostos e não infectados por HIV-1 (ENI). CMNs de pacientes infectados por HIV (n=13), ENI (n=14), infectado virêmico (INF VIR, n=5) e controle saudável (CTRL, n=14) foram analisados por PCR em Tempo Real quanto a expressão de APOBEC3G, TRIM22, TRIM5α e SAMDH1. Os dados estão representados como média. * p<0.05 e ** p<0.01.

3.3 Expressão *ex vivo* de mRNA STING, IFN- β e TBK1 em CMN de casais sorodiscordantes.

Um sensor de DNA citosólico, denominado STING é capaz de reconhecer dinucleotídeos cíclicos, DNA dupla fita e estimular a produção de IFN do tipo I. Além disso, foi descrito que essa proteína é ativada na infecção pelo HIV-1 (ABLASSER, 2013). A ativação de STING acarreta em uma cascata intracelular que culmina na fosforilação de TBK-1 que fosforila e induz a dimerização de IRF3, translocando-o para o núcleo, ativando genes relacionados a produção de IFN tipo I.

A expressão de mRNA de STING foi pronunciada no grupo de infectados com CV detectável (IFN VIR) em relação aos demais grupos analisados (Figura 2). Já a expressão de TBK-1 do grupo controle e ENI são diminuídos em relação ao grupo infectado. Já o parceiro infectado mostrou aumento da expressão de IFN- β em relação aos grupos controle e ENI (Figura 2). Curiosamente, a expressão de STING relacionou com a viremia dos infectados por HIV, em contraste da expressão de IFN- β .

Figura 3 - Expressão de mRNA de fatores indutores de Interferon tipo I de indivíduos expostos e não infectados por HIV-1 (ENI). CMNs de casais sorodiscordantes , infectados por HIV (n=13) e ENI (n=15), de infectados virêmicos (INF VIR, n=5) e controle saudável (CTRL, n=12) foram analisados por PCR em Tempo Real quanto a expressão de STING, TBK-1 e IFN-β. Os dados estão representados como média. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

3.4 Expressão *ex vivo* do mRNA de fatores que regulam a produção de IFN do tipo I em CMNs de casais sorodiscordantes

Na sequência avaliamos a expressão de alguns fatores reguladores da inflamação e da produção de IFN do tipo I. A IL10 que possui um potencial anti-inflamatório, o fator FOXO3 (*Forkhead BOX O3*) um regulador de IFN- β (Luron et al., 2012) e o Supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) (Xu et al., 2014). A exonuclease TREX1 tem um papel importante na infecção viral por degradar material genético, principalmente do HIV-1 (YAN et al., 2010).

A análise desses fatores mostrou uma expressão de IL-10 está elevada nos indivíduos HIV-1+ viremicos em relação ao grupo ENI (Figura 3). A expressão de SOCS3 está elevada no grupo HIV quando comparado ao grupo controle, e ao grupo ENI. A expressão do mRNA do fator TREX1 foi elevada no grupo HIV em relação ao grupo ENI e HC, como também do grupo virêmico em relação ao ENI (Figura 3).

Os achados mostram que os fatores reguladores são induzidos pela infecção por HIV-1, nos indivíduos com CV detectável.

Figura 4 - Expressão de mRNA de fatores que regulam a resposta de Interferon tipo I . CMNs de pacientes infectados por HIV (n=17), ENI (n=15) e infectados virêmicos (INF VIR), controle saudável (CTRL, n=13) foram analisados por PCR em Tempo Real quanto a expressão de IL-10, SOCS3, FOXO3 e TREX1. Os dados estão representados como média. * p<0.05, ** p<0.01.

3.5 Correlação da expressão de APOBEC3G com outros fatores indutores de IFN-I e reguladores

A partir dos resultados de expressão dos fatores relacionados ao IFN-I, analisamos a relação da expressão de APOBEC3G com os demais fatores nos indivíduos ENI, HIV e controles saudáveis.

Há uma relação positiva na expressão de APOBEC3G nos indivíduos HIV-1 com a expressão de IFN- β , TREX1 e SAMDH1, mas não com as moléculas reguladoras, como SOCS3 e FOXO3 (Figura 4).

Nos indivíduos ENI, houve apenas relação da expressão de Apo3G com a expressão de TREX1.

Já no grupo controle a correlação é positiva na expressão de APOBEC3G com IFN- β e SAMDH1 (Figura 6).

Os resultados mostram que APOBEC3G é um fator induzível por IFN tipo I, nos demais grupos onde a expressão de A3G não foi proeminente não houve relação com os demais fatores.

Figura 5 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1, SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos HIV-1.

Figura 6 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1, SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos ENIs.

Figura 7 - Correlação da expressão de mRNA de APOBEC3G com IFN- β , TREX1, SAMDH1, SOCS3 e FOXO3 em indivíduos controles saudáveis.

3.6 Análise da expressão do mRNA de fatores antivirais induzidos por ligante de STING (cGAMP) e de TLR-7/8 (CL097)

Para avaliar se há potencialização dos fatores antivirais com indutores de IFN tipo I, as CMNs foram estimuladas com ligante de STING e de CL097/TLR7/8 por 6 horas. Não foi observado alteração da expressão de mRNA para APOBEC3G, IFN- β e TBK-1, neste período entre os casais sorodiscordantes e indivíduos controles.

Figura 8 - Análise por PCR em Tempo Real da expressão de APOBEC3G, TBK-1 e IFN- β em células mononucleares estimuladas com cGAMP. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão. (n= 5)

3.7 Expressão *ex vivo* do mRNA de fatores que regulam a produção de IFN do tipo I em Células de Lavado Bucal de casais sorodiscordantes.

Visto que em células mononucleares tínhamos uma expressão elevada de fatores antivirais bem como os de regulação nos indivíduos infectados pelo HIV-1, avaliamos também o perfil de expressão dos fatores em um compartimento de mucosa, células provenientes do lavado bucal do casal sorodiscordantes e dos indivíduos controles.

Nos parceiros infectados por HIV-1, algumas amostras mostraram expressão de fatores antivirais, contudo não houve diferença entre os grupos (Figura 7). De maneira geral, a expressão neste compartimento é baixa dos fatores antivirais.

Figura 9. Expressão de mRNA de APOBEC3G, IFN- β , TREX1, TBK-1 e FOXO3 em células de lavado bucal de indivíduos saudáveis (n=13), ENI (n=11), e HIV (n=10). Foram analisados por PCR em tempo Real. Os dados estão representados como média.

3.8 Detecção de quimiocinas no lavado bucal de casal sorodiscordantes

Na sequência avaliamos o perfil de quimiocinas no lavado bucal dos casais sorodiscordantes e indivíduos controles, por citometria de fluxo. Na Figura 9 mostra um perfil pró-inflamatório no lavado bucal dos parceiros infectados por HIV-1, considerando os elevados níveis de IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, quimiocinas induzíveis por IFN- γ , e também de MCP-1/CCL2 em relação ao grupo ENI. Já os níveis de IL-8/CXCL8 não diferiram entre os grupos analisados.

Figura 10 - Perfil de quimiocinas no lavado bucal de casais sorodiscordantes e indivíduos saudáveis. As amostras foram avaliadas por cytometric bead array por citometria de fluxo. *p<0.05 e **p<0.01. Dados expressos como media

3.9 Frequência de células dendríticas mielóides (mDC) produtoras de TNF- α e células dendríticas plasmocitóides (pDC) produtoras de IFN- α

As células dendríticas mielóides são essenciais para direcionar a resposta imune adaptativa, e são uma das primeiras células a interagir com o HIV-1 nos sítios de mucosa, podendo facilitar a transmissão para outras células (BORROW P, 2011). Já as pDCs são consideradas as principais produtoras de IFN tipo I em resposta à infecções virais (GIBSON et al., 2002). Ambas as DCs respondem a estímulos de TLRs, sendo o TLR7 expressos pelas mDCs e TLR8 nas pDCs (FIEBIG EW, et al. 2003)

Na sequência analisamos o perfil de resposta das DCs em relação aos estímulos indutores de resposta de IFN tipo I, avaliando a frequência das pDCs secretoras de IFN- α e de mDCs secretoras de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo.

Os resultados mostram que a frequência das pDCs que produzem IFN- α em situação basal não difere entre os grupos, mas quando estimulados com ligante de TLR 7/8 (CL097), a frequência de células pDCs produtoras de IFN- α no grupo ENI e HIV-1 aumentam em relação ao grupo controle (Figura 10). O estímulo cGAMP, ligante de STING, mostrou que todos os grupos foram capazes de ser estimulados, sem diferir entre os grupos.

A frequência de células mDCs produtoras de TNF- α foi avaliada e não houve diferença entre os grupos em situação basal e nas situações estimuladas por CL097 e cGAMP (Figura 11).

Os resultados são preliminares e a amostragem ainda precisa ser ampliada para confirmação dos achados.

A

B

Figura 11 - Análise da frequência de células dendríticas plasmocitóides (HLA-DR⁺ CD123⁺) produtoras de IFN- α . A) Estratégia de *gate* em células HLADR⁺CD123⁺IFN α ⁺. B) As CMNs de indivíduos ENIs (n= 6), HIV (n=5) e controles saudáveis (n= 7) foram estimuladas por 18 horas com agonista de receptor TLR7/8 (CL097) e ligante de STING (cGAMP). Os dados estão representados como média. * p<0.05.

Figura 12 - .Análise da frequência de células dendríticas mielóides (HLA-DR⁺ CD11c⁺) produtoras de IFN- α . A) Estratégia de *gate* em células HLA-DR⁺CD11c⁺TNF α ⁺. B) As CMNs de indivíduos ENIs (n= 6), HIV (n=5) e controles saudáveis (n= 7) foram estimuladas por 18 horas com agonista de receptor TLR7/8 (CL097) e ligante de STING (cGAMP). Os dados estão representados como média. * p<0.05.

4 Discussão

No presente estudo analisamos os fatores de restrição viral, fatores envolvidos na cascata de produção de IFN tipo I e fatores reguladores desta via em células mononucleares do sangue periférico e do lavado bucal de indivíduos expostos não infectados e seus parceiros infectados pelo HIV-1. Em geral a expressão dos fatores antivirais mostrou que é necessária uma infecção seja com CV indetectável ou com viremia para indução dos fatores. Além dos fatores que regulam a resposta de interferon tipo I, também regulados positivamente, como um mecanismo de feedback. Sendo assim, os dados evidenciam que há um menor potencial inflamatório nos ENI, em especial no compartimento de mucosa oral.

O casal sorodiscordante composto por ENI e infectado por HIV mostram longo tempo de relacionamento de aproximadamente 11 anos (0,5 – 22 anos) e que o parceiro infectado por HIV teve início de tratamento de 7,7 anos (0,38 – 10 anos). Apenas três dos parceiros infectados por HIV mostraram carga viral detectável até o momento da coleta e a média do tempo de diagnóstico de infecção foi de 10,7 anos (3 – 18 anos), mostrando que por uns 3 anos os indivíduos foram expostos com os parceiros ainda sem tratamento. Até o momento da coleta a sorologia dos ENIs permaneceu negativa ao HIV-1. Além disto, os casais relatam sexo sem proteção por 3-4 vezes por mês. Esses dados evidenciam que ao longo do relacionamento houve baixa exposição ao HIV-1, mas contínua, sem causar infecção.

Os achados mostraram aumento da expressão gênica de fatores antivirais como a APOBEC3G nos indivíduos infectados em relação aos indivíduos ENIs e aos controles saudáveis. Na infecção por HIV-1 há indução da expressão de Apo3G, um fator capaz de bloquear a infecção *in vitro* (DANG et al., 2006). Previamente, em nosso grupo evidenciamos que há um aumento na expressão de Apo3G em células mononucleares e da placenta de mães infectadas por HIV e em células do cordão umbilical (PEREIRA et al., 2014). O modelo de exposição vertical mostrou que a expressão desse fator no recém-nato pode ocorrer pela influência da transferência de células maternas ao feto. O que sugere que a indução do fator Apo3G é decorrente da entrada do vírus na célula, razão pelo qual evidenciamos níveis similares de expressão nos ENIs e indivíduos controle. Em contraste, tem sido descrito aumento de expressão de Apo3G em indivíduos ENI em relação aos indivíduos controles, ou seja, na ausência de infecção

(VAZQUEZ-PÉREZ, et al, 2009). Em nossos dados, o grupo ENI mostrou expressão de Apo3G semelhante ao grupo controle, é possível que a intensidade de exposição e a viremia dos parceiros infectados possa influenciar no nível de expressão do fator antiviral. Na nossa coorte na grande maioria dos parceiros infectados possuem CV indetectável, nos 3 indivíduos infectados com CV detectável e seu respectivo parceiro ENI não mostraram alterações na expressão do fator. A diminuição da exposição viral pode diminuir a expressão de fatores antivirais (VAZQUES-PEREZ, et al 2009), de fato nossa coorte de ENI é caracterizada por baixa exposição ao HIV-1, mas contínua e duradoura.

Enquanto a expressão de Apo3G é pronunciada com a infecção seja nos indivíduos infectados por HIV com CV detectável ou indetectável, a expressão de TRIM 5 α foi mais intensa nos indivíduos virêmicos sem relação ao grupo ENI. Contudo, elevados níveis de expressão de TRIM5 α tem sido descrito em trabalhadoras do sexo, ENI, em relação aos soroconvertores, infectados por HIV-1 (SEWRAM, et al 2009). Os níveis de TRIM5 α , pré e pós infecção foram similares nos soroconvertores. A expressão de TRIM5 α parece estar associada com reduzida suscetibilidade à infecção por HIV. Em nossos dados, a expressão de Apo3G, como também Trim5 α , foi expressa na vigência da infecção, sendo o Trim5 α nos virêmicos. Na coorte dos ENI, há a possibilidade de algum indivíduo ENI tornar-se infectado, contudo, durante todo o período de análise, mesmo em trabalho prévio (LIMA, et al, 2014), não verificamos casos de soroconversão.

Curiosamente, não houve alteração na expressão dos fatores TRIM22 e SAMDH1 nos indivíduos infectados por HIV-1. Esses fatores de restrição viral são induzíveis por IFN tipo I e podem ser regulados por algum fator relacionado a esta via. Nossos dados coincidem, em parte, com um estudo que mostra que indivíduos ENI possuem expressão de TRIM5 α , Apo3G e Teterina em células T CD4+ similar aos controles saudáveis (MOUS et al., 2012).

O fato de não ser detectada alteração na expressão dos fatores antivirais nos ENIs nos levou a investigar a expressão de fatores relacionados a via de sinalização do INF tipo I (STING, TBK-1 e IFN- β) e fatores que podem regular essa via (IL10, SOCS3, FOXO3 e TREX1).

A expressão do fator indutor de INF-I, STING que é expresso constitutivamente na membrana do complexo de golgi de macrófagos, células dendríticas, linfócitos e células epiteliais, está preservada em todos grupos analisados do estudo. Em

contrapartida os fatores da cascata do IFN-I, TBK1 e IFN- β estão com a expressão elevada nos indivíduos infectados pelo HIV-1, o que corrobora com a correlação positiva da expressão dos fatores de restrição viral. Em células T infectadas com vírus HIV-1 modificado esses fatores reconhecem DNA citosólico pela proteína IFI16 (*IFN-inducible protein 16*) mas falham na indução de produção de IFN tipo I. Células que são transfectadas com DNA exógeno, recrutam STING e a quinase TBK-1 mas não produzem IFN-I (BERG K et al., 2014). Fato que salienta não existir diferença de expressão de STING é por ser uma possível ativação da proteína IFI16, que já foi descrita como função reguladora replicação viral (JAKOBSEN et al., 2013).

Está descrito que o papel do IFN- I na infecção pelo SIV é de prevenir a infecção e diminuir a progressão para a doença (SANDLER et al., 2014). Além de ser descrito que quando tratados com IFN-I, macacos diminuem a taxa de replicação viral sem uma ativação imune exacerbada (VANDERFORD et al, 2012). Em humanos a produção de IFN- α é relacionada como proteína marcadora de doença, por ser uma proteína imunoativadora (HARDY et al., 2013). Nossos resultados mostraram que a produção de IFN-I está aumentada nos infectados por HIV-1 em relação ao grupo ENI e controle, salientando que ser necessária a infecção para ativação dos fatores estudados.

Quanto aos fatores reguladores da cascata de IFN tipo I, selecionamos a IL10 e os fatores Socs3 e *forkhead box protein O3* (Foxo3). O IFN tipo I induz Socs 1 e Socs 3 como *feedback* negativo para limitar a extensão e duração da resposta IFN tipo I (YOSHIMURA et al., 2012). A Foxo3 é um fator regulador negativo de vários genes antivirais, como do IRF-7 (LITVAK, et al., 2012).

As proteínas SOCS competem com STAT na ligação receptor de Interferon (IFNAR) e suprimem a atividade de JAK. De fato, verificamos o aumento da expressão de IL-10 e Socs3 estão elevados nos indivíduos infectados por HIV-1, mas com CV detectável. A elevação desses fatores pode ser um mecanismo de regulação para evitar os efeitos inflamatórios conduzidos pela resposta de IFN tipo I, sabidamente inflamatória, em especial quando há viremia e ativação imune. Essas proteínas inibidoras também são induzidas que ativam a sinalização via JAK-STAT.

Além disso, o IFN-I induz genes estimuladores de interferon (ISGs) que envolve o remodelamento da cromatina e recrutamento de vários fatores transcricionais (IVASHKIV LB et al., 2014). Em células não estimuladas a transcrição de ISG é suprimida por fatores repressores da transcrição tal como Foxo3 bem como outros complexos repressores. No ENI há baixa expressão de Foxo3 e dos fatores envolvidos

na resposta de IFN do tipo I, o que sugere que outros fatores de regulação possam estar atuantes, como os microRNAs, outros fatores epigenéticos e ou fator regulador a proteína USP18 (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18*). Não avaliamos os receptores de IFN-I, para verificar se podem estar modulados na infecção, este parâmetro será avaliado futuramente.

A maior ativação dos fatores reguladores nos indivíduos infectados por HIV-1 virêmicos, foi em paralelo a elevação dos níveis de quimiocinas pró-inflamatórias no compartimento de mucosa oral. A análise desse compartimento foi devido a constante prática de sexo oral entre os grupos de ENI e o parceiro infectado. Verificamos uma expressão muito baixa de fatores antivirais nas células epiteliais do lavado bucal, que não se alteraram com a infecção por HIV. Contudo, este tipo de fator pode estar relacionado com o tipo celular desse compartimento. Realizamos também a análise de alfa-defensina mas também encontramos níveis indetectáveis de expressão.

As quimiocinas, CXCL10 e CXCL9 são induzíveis por interferon-gama, ambos detectados em níveis elevados no lavado bucal de indivíduos infectados por HIV-1, em paralelo aos níveis de CCL2. O sexo oral é frequentemente relatado como prática comum entre os casais sorodiscordantes. O HIV-1 pode ser recuperado a partir da saliva de indivíduos infectados, geralmente as concentrações são mais baixas do que os observados no sangue ou secreções genitais (LIUZZI, et al., 1996). Indivíduos ENI, homens que fazem sexo com homens (HSH), mostram elevados níveis de quimiocinas CCL2, CCL4, CCL5 e CCL11 comparados a controles com baixo risco de infecção (HASSELROT et al., 2010). Além disto, a exposição ao HIV oral induz a produção de anticorpos IgA1 com capacidade neutralizante na saliva de homens não infectados que mantém relações com sexuais com homens infectados por HIV (HASSELROT, et al., 2009). De fato, seria importante avaliar os níveis de IgA na saliva e avaliar o potencial neutralizante no casal sorodiscordante. Em nossa coorte ENI, tem 6 casais homossexuais, contudo não está claro se os maiores níveis detectados estão relacionados com os HSH.

A quimiocina CCL2 como também CCL3, CCL4 e CCL5 são conhecidas por diminuir a expressão de receptores CC, reduzindo assim possíveis alvos do HIV-1 (LEHNER, et al., 2000). Os baixos níveis das quimiocinas analisadas na saliva dos ENI, incluindo CCL2, sugere que a integridade na expressão dos receptores CC no compartimento.

Desta forma continuamos a avaliar se seria possível modular a resposta de IFN tipo I através da ativação da via STING, o principal regulador de IFN-I e ligantes sintéticos da via TLR 7/8. Em estudo prévio foi observado que o ligante de TLR7/8 foi estratégico para ativar as mDCs secretoras de TNF- α de mães infectadas por HIV-1 e recém-natos (CARDOSO et al., 2013). Já as pDCs que possuem baixa expressão de TLR7 o ligante foi capaz de restaurar parcialmente a secreção de IFN-I dessas células, sugerindo um déficit na sinalização de IFN-I na infecção por HIV-1. Contudo não há relatos sobre a importância desses ligantes na resposta no ENI. Apesar dos dados mostrar que o ligante de TLR7/8 é capaz de aumentar a frequência de pDCs secretoras de IFN-I nos grupos HIV e ENI, é preciso ampliar a amostragem para confirmar os resultados. Esta ativação das pDCs mostra a eficiência do ligante em ativar a produção de IFN-I via TLR8, considerando a baixa expressão de TLR7 nessas células. Em indivíduos ENI tem sido descrito aumento funcional da produção de IFN- α , após estímulo com CpG, não alterando o número circulante, sugerindo que a contínua estimulação por HIV-1 pode induzir a resistência viral nesses indivíduos (SINGLAANUIJ, et al., 2012).

Além disto, as proteínas citosólicas do HIV-1 podem contribuir para a secreção de IFN- α das pDCs. A exonuclease citosólica Trex1 suprime a detecção inata em células T CD4+ e macrófagos (LEPELLEY et al, 2011), e a proteína Tat pode inibir a proteína quinase R, que pode explicar a predominância de reconhecimento TLR do HIV para secreção de IFN em pDCs. Sendo assim a busca de marcadores biológicos de proteção se faz necessário em meio a falhas de vacinas já estudadas. A questão do STING na indução de IFN tipo I e do agonista de TLR7/TLR8 ativar as células dendríticas plasmocitoides salientam o seu potencial adjuvante vacinal nas infecções virais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

1. A presença do HIV intracelular parece ser o principal fator de desencadeamento de fatores antivirais em células mononucleares do sangue periférico. Os resultados sugerem que a entrada do vírus na célula, desencadeia os fatores antivirais como também das vias de regulação da resposta de interferon tipo I, os quais não foram evidenciados com a exposição ao vírus;
2. Há baixa expressão de fatores antivirais em células do lavado bucal nos casais sorodiscordantes, contudo, nesse compartimento de mucosa, foram detectados elevados níveis de quimiocinas induzíveis por interferon-gama somente no parceiro infectado por HIV;
3. Os dados evidenciam que nos ENI há um menor potencial inflamatório, que precisam ser explorados para a compreensão dos mecanismos de resistência à infecção por HIV-1.

REFERÊNCIAS*

- ABLASSER, A.; GOLDECK, T.; CAVLAR, T.; DEIMLING, T.; WITTE, I.; ROHL, K.; HOPFNER, J.; LUDWIG, J.; HORNUNG V. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, v. 498, p. 380–384, 2013
- AN, P.; BLEIBER, G.; DUGGAL, P.; NELSON, G.; MAY, M.; MAGEAT, B.; ALOBWEDE, I.; TRONO, D.; VLAHOV, D.; DONFIELD, S.; GOEDERT, J.J.; PHAIR, J.; BUCHBINDER, S.; O'BRIEN, S.; TELENTI, S.J.; WINKLER, C.A. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J. Virol.*, v.78, p.11070, 2004
- BALLAN, W.M.; VU, B.A.; LONG, B.R.; LOO, C.P.; MICHAELSSON, J.; BARBOUR, J.D.; LANIER, L.L.; WIZNIA A.A.; ABADI, J.; FENELLY, G.J.; ROSENBERG, M.G.; NIXON, D.F. Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J. Immuno.*, v. 179(5) p. 3362-3370, 2007
- BERG, R.K.; RAHBEEK, S.H.; KOFOD-OLSEN, E.; HOLM, C.K.; MELCHJORSEN, J.; JENSEN, D.G.; HANSEN, A.L. JORGENSEN, L.B.; OSTERGAARD, L., TOLSTRUP, M.; LARSEN, C.S.; PALUDAN, S.R.; JAKOBSEN, M.R.; MOGENSEN, T.H. T cells detect intracellular DNA but fail to induce type I IFN responses: implications for restriction of HIV replication. *PLoS One*. 2014
- BISHOP, K.N.; HOLMES, R.K.; SHEEHY, A.M.; MALIM, M.H. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science*, v. 305, p. 645, 2014
- BJORNDAL, A.S.; SZEKELY, L.; ELGH, F. Ebola virus infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells. *BMC Microbiol.*, v. 126, p. 235–242, 2003
- BOASSO, A.; SHEARER, G.M. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol.*, v. 31;22(12), p. 1487-1491, 2008
- BORROW, P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*., 2011
- BOULET, S.; KLEYMAN, M.; KIM, J.Y.; KAMYA, P.; SHARAFI, S.; SIMIC, N.; BRUNEAU, J.; ROUTY, J.P.; TSOUKAS, C.M.; BERNARD, N.F. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS*. 2008
- CARPENTER, L.M.; KAMALI, A.; RUBERANTWI, A.; MALAMBA, S.S.; WITHWORTH, J.A. Rates of HIV-1 transmission within marriage in rural Uganda in relation to the HIV sero-status of the partners. *AIDS*, v. 9, p. 1083-1089, 1999
- CLERICI, M.; GIORGI, J.V.; CHOU, C.C.; GUDEMAN, V.K.; ZACK, J.A. GUPTA, P. HO, H.N.; NISHNAN, P.G.; BERZOFKY, J.A. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *Shearer GM.J. Infect. Dis.*, v. 165(6), p. 1012-1019, 1992

- CROW, Y.J.; HAYWARD, B.E.; PARMAR, R.; ROBINS, P.; LEITCH, A.; ALI, M.; BLACK, D.N.; VAN BOKHOVEN, H.; BRUNNER, H.G.; HAMEL, B.C.; CORRY, B.C.; CORRY, P.C.; COWAN, F.M.; FRINTS, S.G.; KLEPPER, J.; LIVINGSTON, J.H.; LYNCH, S.A.; MASSEY, R.F.; MERITET, J.F.; MICHAUD, J.L.; PONSOT, G.; VOIT, T.; LEBON, P.; BONTTHON, D.T.; JACKSON, A.P.; BARNES, D.E.; LINDAHL, T. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.*, v. 38, p. 917–920, 2006
- DANG, Y.; WANG, X.; ESSELMAN, W.J.; ZHENG, Y.H. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J. Virol.*, v. 80, p. 10522, 2006
- GAO, D.; WU, J.; WU, YOU-TONG.; DU, F.; AROH, C.; YAN, N.; SUN, L.; ZHIJIAN J. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other *Retroviruses* *ChenScience*, v. 341, p. 903-906, 2013
- DUNKLE, K.L.; STEPHENSON, R.; KARITA, E.; CHOMBA, E.; KAYITEKORE, K.; VWALIKA, C.; GREENBERG, L.; ALLEN, S. New heterosexually transmitted HIV infections in married or cohabiting couples in urban Zambia and Rwanda: an analysis of survey and clinical data. *Lancet*, v. 371, p. 9631, 2008
- EVERETT, R.D.; CHELBI-ALIX, M.K. K. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie.*, v. 89, p. 819, 2007
- FIEBIG, E.W. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, v. 17, p. 1871–1879, 2003
- FOWKE, K.R.; NAGELKERKE, N.J.; KIMANI, J. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*, v. 348, p. 1347-1351, 1996
- GALL, A.; TREUTING, P.; ELKON, K.B.; LOO, Y.M.; GALE, M.; BARBER, G.N.; STETSON, D.B. Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity*, 2012.
- GOUGEON, M.L.; HERBEUVAL, J.P. IFN- α and TRAIL: a double edge sword in HIV-1 disease?. *Exp. Cell Res.*, v. 36, p. 120–131, 2012
- GUO, F.; CEN, S.; NIU, M.; SAADATMAND, J.; KLEINMAN, L. Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol.*, v. 80, p. 11710, 2006
- HACKER, H.; REDECKE, V.; BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; HSU, L.C.; WANG, G.G.; KAMPS, M.P.; RAZ, E.; WAGNER, W.; HACKER, G.; MANN, M.; KARIN, M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, v. 439, p. 204–207, 2006
- HALLMAN, M.; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R.A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatric Research*, v.50, p.315, 2001
- HARDY, GA.; SIEG, S.; RODRIGUEZ, B.; ANTHONY, D.; ASAAD, R.; JIANG, W.; MUDD, J.; SCHACKER, J.; FUNDERGURG, N.Y.; PILCH-COOPER, H.A.; DEBERNARDO, R.; RABIN, R.L.; LEDERMAN, MM.; HARDING, C.V. Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One*. v.8(2), p. 5652, 2013

- HASSELROT, K. Genital and Mucosal immune response against HIV-1 in exposed uninfected individuals. *Crit. Rev. Immunol.*, 2009
- HASSELROT, K.; BRATT, G.; HIRBOD, t.; SABERG, P.; EHNLUND, M.; LOPALCO, L.; SANDSTROM, E.; BROLIDEN, K. Orally exposed uninfected individuals have systemic anti-HIV responses associating with partners viral load *AIDS*, 2010
- HOLMES, R.K.; KONING, F.A.; BISHOP, K.N.; MALIM, M.H. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.*, 2007. v. 282, p. 2587, 2007
- HONDA, K.; TANIGUCHI, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Rev. Immunol.*, p. 644–658, 2006.
- HORNUNG, V.; ROTHENFUSER, S.; BRITCH, S.; KRUG, A.; JAHRSDORFER, B.; GIESE, T.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* v. 168, p. 4531, 2002.
- HUGONNET, S.; MOSHA, F.; TODD, J.; MUGEYE, K.; KLOKKE, A.; NDEKI, L.; ROSS, D.; GROSSKURTH, H.; HAYES, R. Incidence of HIV infection in stable sexual partnerships: a retrospective cohort study of 1802 couples in Mwanza Region, Tanzania. *J Acquir Immune Defic. Syndr.*, v. 168, p. 4531, 2002
- ISAACS, A.; LINDERMAN, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 147, p. 258–267, 1957
- ISHIKAWA, H.; BARBER, GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, v. 455, p. 674–678, 2008
- JENNER, E. Letter to the Editor. *Med. Phys. J.*, v. 194, p. 863, 1804
- KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; MALEFYT, R.W.; KASTELEIN, R.A., BAZAN, F.; LIU, Y.J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.*, v. 194, p. 863, 2001
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.*, v. 21, p. 317–337, 2009.
- KRONER, B.L.; ROSENBERG, P.S.; ALENDORT, L.M.; ALVORD, W.G.; GOEDERT, J.J. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, v. 7(3), p. 279-86, 1994
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 388, p. 621–625, 2009
- LAHOUESSA, H.; DADDACHA, W.; HOFMANN, H.; AYINDE, D.; LOGUE, E.C.; DRAGI, L.; BLOCH, N.; MAUDER, C.; BERTRAND, M.; GRAMBERG, M.; PANCINO, G.; PRIET, S.; CANARD, B.; LAGUETTE, N.; BENKIRANE, M.; TRANSY, C.; LANDAU, N.R.; KIM, B.; MARGOTTIN-COGUET, F. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.*, v. 13, p. 223–228, 2012

- LEPELLEY, A.; LOUIS, S.; SOURISSEAU, M.; LAW, H.K.; POTCHLICHET, J.; SCHILTE, C.; CHAPEROT, L.; PLUMAS, J.; RANDALL, R.E.; SI-TAHAR, M.; MAMMANO, F.; ALBERT, M.L.; SCHATZ, O. Innate sensing of HIV-infected cells *PLoS Pathog.*, 2011
- LIMA, J.F.; OLIVEIRA, L.M.; PEREIRA, N.Z.; MITSUNARI, G.E.; DUARTE, A.J.; SATO, M.N. Distinct natural killer cells in HIV-exposed seronegative subjects with effector cytotoxic CD56(dim) and CD56(bright) cells and memory-like CD57⁺NKG2C⁺CD56(dim) cells. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, 2014
- LITVAK, V. A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature*, v. 490, p. 421–425, 2012
- LIUZZI, G.; CHIRIANNI, A.; CLEMENTI, M.; BAGNARELLI, P.; VALENZA, A.; CATALDO, P.T.; PIAZZA, M. Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS*, 1996
- MATIKAINEN, S.; SARENEVA, T.; RONNI, T.; LEHTONEN, A.; KOSKINEN, P.J.; JULKUNEN, I. Interferon- α activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated *IL-2Ra*, *c-myc*, and *pim-1* genes in human T cells. *Blood*, v. 93, p. 1980–1991, 1999
- MEHLE, A.; STRACK, B.; ANCUTA, P.; ZHANG, C.; MCPICK, M.; GABAUZDA, D.C. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 7792, 2004
- MERONI, G.; DIEZ-TOUX, G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*, v. 27, p. 1147, 2005
- MOGENSEN, T.H.; MELCHJORSEN, J.; LARSEN, C.S.; PALUDAN, S.R. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*, v. 7, p. 54–73, 2010
- MONROE, K.M.; MCWHIRTER, S.M.; VANCE, R.E. Induction of type I interferons by bacteria. *Cell. Microbiol.*, v. 12, p. 881–890, 2010
- MORITA, M.; STAMP, G.; ROBINS, P.; DULIC, A.; ROSEWELL, I.; HRIVNAK, G.; DALY, G.; LINDAHL, T.; BARNES, D.E. Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3=5= DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol. Cell. Biol.*, v. 24, p. 6719, 2004.
- NIOLE, S.; STOYE, J.P.; SAIB, A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* v. 3, p. 799, 1997
- PONTING, C.; SCHULTZ, J.; BORK, P. SPRY domains in ryanodine receptors (Ca(2+)-release channels). *Trends Biochem. Sci.* v. 22, p. 193, 1997
- PEREIRA, N.Z.; CARDOSO, E.C.; OLIVEIRA L.M.; LIMA, J.F.; BRANCO, A.C.; RUOCCO, R.M.; ZUGAIB, M.; OLIVEIRA-FILHO, J.B.; DUARTE, A.J.; SATO, M.N. Upregulation of Innate Antiviral Restricting Factor Expression in the Cord Blood and Decidual Tissue of HIV-Infected Mothers. *PLoS ONE*, v. 8, p. 12, 2013
- PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.*, v. 202, p. 8–32, 2004
- PLATANIAS, L.C. Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Rev. Immunol.*, v. 5, p. 375–386, 2005

- PLATANIAS, L.C.; FISH, E.M. Signaling pathways activated by interferons. *Experimental Hematology*, v. 27, p. 1583-1592, 1999
- QUINN, T.C.; WAWER, M.J.; SEWANKAMBO, N.; SERWADDA, D.; LI, C.; WABWIRE-ANGEN, F.; MEEHAN, M.O.; LOTALO, T.; GRAY, R.H. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*, n. 13, p. 921-929, 2000
- RANKI, A.; MATTINEN, S.; YARCHOAN, R.; BRODER, S.; GHRAYEB, J.; LAHDERVITA, J.; KROHN, K. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *AIDS*, v. 3(2), p. 63-69, 1989
- SANDLER, N.G.; BOSINGER, N.G.; ESTES, J.D.; ZHU, R.T.; THARP, G.K.; BORITZ, E.; LEVIN, D.; WIJEYESINGHE, S.; MAKAMDOP, K.N.; DEL PRETE, G.Q.; HILL, B.J.; TIMMER, J.K.; REISS, E.; YARDEN, G.; DARKO, S.; CONTIJOCH, E.; TODD, J.P.; SILVESTRI, G.; NASON, M.; NORGREN, R.B.; KEELE, B.F.; RAO, S.; LANGER, J.A.; LIFSON, J.D.; SCHREIBER, G.; DOUEK, D.C. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*, v. 511, p. 601-605, 2014
- SAWYERS, S.L.; EMERMAN, M.; MALIK, H.S. Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals. *PLoS Pathog*, v. 3, p. 197, 2007
- SCHAEFER, T.M.; FAHEY, J.V.; WRIGHT, J.A.; WIRA, C.R. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J. Immunol.*, v. 174, p. 992, 2005
- SEWRAM, S.; SINGH, R.; KORMUTH, E.; WERNER, L.; MLISANA, K.; KARIM, S.S.; NDUNG'U, G.; CAPRISA TEAM. Human TRIM5 α expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis.*, 2009
- SCHAFER, S.L.; LIN, R.; MOORE, P.A.; HISCOTT, J.; PITHA, P.M. Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 2714-2720, 1998
- STETSON, D.B.; KO, J.S.; HEIDMANN, T.; MEDZHITOV, R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, v. 134, p. 587-598, 2008
- STETSON, D.B.; MEDZHITOV, R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*, v. 24, p. 93-103, 2006
- SUN, W.; LI, Y.; CHEN, L.; CHEN, H.; YOU, F.; ZHOU, X.; ZHOU, Y.; ZHAI, Z.; CHEN, D.; JIANG, Z. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 106, p. 8653-8658, 2009
- TRISTEM, M.; PURVIS, A.; QUICKE, D.L. Complex evolutionary history of primate lentiviral vpr genes. *Virology*, v. 240, p. 232-237, 1998
- VANDERFORD, T.H.; SLITCHER, C.; ROGERS, K.A.; LAWSON, B.O.; OBAEDE, R.; ELSE J.; VILLINGER, F.; BOSINGER, S.E.; SILVESTRI, G. Treatment of SIV-infected sooty mangabeys with a type-I IFN agonist results in decreased virus replication without inducing hyperimmune activation. *Blood*, 2012

VAZQUEZ-PEREZ, J.A.; ORMSBY, C.E.; HERNANDEZ-JUAN, R.; TORRES, K.J.; REYES-TERAN, G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology*, 2009

WOODWARD, J.J.; IAVARONE, A.T.; PORTNOY, D.A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, v. 328, p. 1703–1705, 2010

WU, L.; SUN, X.; CHEN, F.; DU, H.; SHI, C.; CHEN, Z.J. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, v. 339, p. 826–830, 2013

YAN, N.; REGALADO-MAGDOS, A.D.; STIGGELBOUR, B.; LEE-KIRSCH, M.A.; LIEBERMAN, J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature Immunol.*, 2010

YANG, Y.G.; LINDAHL, T.; BARNES, D.E. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*, v. 131, p. 873–886, 2007

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Rev. Immunol.*, v.7, p.454–465, 2007