Elaine Cristina Cardoso

**Transmissão materno-fetal do HIV-1:
efeito da sinalização via TLR7/8 na
ativação de células dendríticas para
produção de resposta anti-viral em mães
infectadas por HIV-1 e seus recém-
nascidos**

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

São Paulo
2013

Elaine Cristina Cardoso

**Transmissão materno-fetal do HIV-1: efeito da sinalização via
TLR7/8 na ativação de células dendríticas para produção de
resposta anti-viral em mães infectadas por HIV-1 e seus recém-
nascidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra Maria Notomi Sato

Versão: Original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Cardoso, Elaine Cristina.

Transmissão materno-fetal do HIV-1: efeito da sinalização via TLR7/8 na ativação de células dendríticas para produção de resposta anti-viral em mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos / Elaine Cristina Cardoso. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profª Dra. Maria Notomi Sato.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia materno-fetal.

Versão do título para o inglês: Maternal-fetal transmission of HIV-1: effect of signaling via TLR7/8 in dendritic cells activation to the production of anti-viral response in mothers infected by HIV-1 and their newborns.

1. Mãe 2. Recém nascido 3. Células dendríticas 4. Placenta
5. Citocinas 6. HIV-1 I. Sato, Profª Dra. Maria Notomi
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0144/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elaine Cristina Cardoso.

Título da Tese: Transmissão materno-fetal do HIV-1: efeito da sinalização via TLR7/8 na ativação de células dendríticas para produção de resposta anti-viral em mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.09, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 3784/09, intitulado: "TRANSMISSÃO MATERNO FETAL DO HIV-1: EFEITO DA SINALIZAÇÃO VIA TLR7/8 NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE RESPOSTA ANTIVIRAL EM MÃES INFECTADAS POR HIV-1 E SEUS RECÉM-NASCIDOS".

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. MARIA NOTOMI SATO

Pesquisador(a) Executante: ELAINE CRISTINA CARDOSO

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2009

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Dedicatória

Com muita felicidade que dedico esta tese:

*À minha mãe por me ensinar com amor a ser
forte e me estimular aos estudos.*

*Ao meu pai (in memoriam) que me ensinou a
viver com simplicidade e por ter me amado...*

*Ao Otto por trazer mais amor e principalmente
por me instigar a enfrentar o novo.*

Agradecimentos

Ao final deste trabalho gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram para a realização desta tese:

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Notomi Sato pela grande oportunidade dada, acolhimento em seu laboratório e principalmente por ter contribuído para a minha formação enquanto Imunologista.

Ao Dr. Alberto da Silva Duarte por ter aberto as portas do LIM-56 e assim permitido a utilização de toda infraestrutura contida neste espaço.

Aos professores membros da banca de qualificação: Profa. Dra. Hiro Goto, Prof. Dr. José Mosig e Profa. Dra. Maria Isabel Moraes Pinto, as sugestões foram imprescindíveis para melhor delineamento da tese, muito obrigada.

Aos professores Estela Bevilacqua, Sergio Ferreira de Oliveira e todo grupo por terem me ensinado visualizar as células trofoblásticas.

Ao Prof. Dr. Gil Mor da Universidade de Yale por ter me acolhido em seu laboratório e por ter-me ensinado a importância do trofoblasto na Imunologia Materno-fetal.

À profa. Dra. Mirian Sotto e Fernanda Guedes por disponibilizar o laboratório durante a realização dos experimentos de Imunoistoquímica.

Às gestantes e seus familiares que fizeram parte deste estudo pela dedicação e comprometimento.

Às técnicas e auxiliares de enfermagem do Hospital Universitário Ana Regina, Francisca(s), Goretti, e todas as técnicas e auxiliares as quais guardo o rosto na memória, mas, infelizmente não recordo o nome, agradeço pela pronta disponibilidade nas coletas e pelo eterno bom-humor.

Às técnicas e auxiliares de enfermagem do HC-FMUSP.

Aos residentes da obstetrícia e pediatria do Hospital Universitário e HC-FMUSP, pelo apoio durante a coleta.

Ao Dr. Marcelo Zugaib, pela oportunidade em poder coletar no centro obstétrico do Hospital Universitário e do HC-FMUSP.

À Dra. Rossana pelo apoio a coleta no HC-FMUSP

À Dra. Rosa Ruocco por ter nos acolhido no centro obstétrico e durante o pré-natal das gestantes infectadas por HIV-1. Mas, agradeço principalmente por sua constante presença e profissionalismo os quais foram fundamentais para a articulação bem sucedida da coleta e desenvolvimento do trabalho.

À Enfermeira Silvana por estar presente no Centro Obstétrico do HC-FMUSP sempre disposta a contribuir com as coletas.

Às enfermeiras do Hospital Universitário, Claudia Érica (Claudinha), Ana Claudia, Fatime, Ruth, admiro vocês pelo trabalho que desenvolvem na obstetrícia e agradeço pelo acolhimento durante todos estes anos de coleta.

À Nátalli Zaneti por estar junto nos duros e ardos períodos de coleta, muito obrigada por deixá-los menos hostil.

À Gabrielli Metisunari e Luanda Oliveira pela ajuda nos experimentos, foi muito bom compartilhar estes momentos com vocês.

Às meninas da experimental: Anna Claudia, Camila (Lolo), Luanda, Rosana e Wanessa, vocês deixam o laboratório mais divertido, obrigada por estarem sempre presentes.

Aos meninos da experimental: César, Cyro, Jeferson, Josenilson, Gabriel e Thiago, obrigada pelo companheirismo.

À Eliana Futata e Mayce Helena Azor, obrigada por vocês terem me acolhido!

Ao Otávio Marques, Guilherme e à Paula Rigato, agradeço pela grande ajuda nas análises de citometria.

A toda equipe de trabalho que constituem o LIM-56: Nôemia, Rosangela (citometria de Fluxo); Soraya (sala de Cultura); Eduardo (carga viral); Adriana, Edna, Juliana, Lucio, Luiz, Angelo (parte administrativa); Silvinha, Adriana (manutenção da parte estrutural e limpeza), muito obrigada por tornar o espaço do LIM-56 funcional e adequado para as nossas atividades de pesquisa.

Ao Dr Mauricio Abrão e toda sua equipe de saúde e administrativa por ter amenizado a dor e as sequelas da endometriose, sem a ajuda de vocês seria impossível continuar este trabalho, muito obrigada!

Ao meu amigo Cleverson Busso (Bigode) e à minha amiga Silvia Busso por proporcionarem momentos tão aconchegantes, neste período.

Ao extinto laboratório de Imunologia das Mucosas: Ana Lúcia Lessa, Crhistina Arslanian, Leuridan Torres, Mariana Acenjo, Patrícia Palmeira e Simone Corrêa, obrigada pelos nossos encontros regados de algumas cervejas, estes momentos foram muito importantes!

Ao meu amigo Josias por estar sempre presente nos momentos de cervejada, obrigada pelo carinho.

Às minhas amigas da Enfermagem e CRUSP: Ana Paula, Lucinéia e Luciana, obrigada por terem sido minhas companheiras!

À Leila Guissoni pelas dicas com o photoshop e principalmente por dividirmos o mesmo espaço no Conjunto Residencial da USP.

Aos(às) vizinhos(as) do Conjunto residencial da USP - CRUSP. Por tornarem este espaço mais acolhedor e divertido!

Aos meus tios (as) e primos (as) sempre presentes na minha vida, principalmente nas confraternizações que ocorreram ao longo deste doutorado, obrigada por tornar a minha vida mais feliz!

À minha mãe Sebastiana por ter me educado com amor, dignidade e principalmente ter me ensinado a importância do respeito ao outro. Muito obrigada por ser minha mãe, meu amor!

Ao meu pai Mário que me ensinou a valorizar as coisas simples da vida, e tantas outras coisas das quais me emociono ao lembrar...

À Rosa e ao seu César por terem me acolhido como filha, vocês são muito importantes para mim, meus amores! Muito obrigada!

Ao meu irmão Ivan por estar presente em momentos importantes da minha vida, muito obrigada.

À minha avó Narducha que sempre me deu tanto amor.

À minha avó Brandina (in memorian) que sempre teve tanto orgulho de ter uma neta que estudava na USP, minha companheira de extravagâncias!

Aos meus avós José e Sebastião que em vida me deram muito amor e carinho

Ao meu grande amor Otto, agradeço pela ousadia de me ensinar desejar o inusitado, o novo, por compartilharmos os mesmos sonhos e por tornar mais concreto o desejo de querer ter os nossos filhos.

Às Universidades pública deste país, principalmente a Universidade de São Paulo a qual me acolhe há quase quinze anos!

À FAPESP pelo suporte econômico.

Enfim, é a minha enorme e maravilhosa família e aos meus amigos que eu agradeço com muito amor por terem estado sempre presentes, enquanto eu elaborava esta tese, sem vocês este trabalho teria sido impossível!

*“Que nada nos defina. Que nada nos
sujeite. Que a liberdade seja a nossa
própria substância.”*

SIMONE DE BEAUVOIR

Resumo

Cardoso EC. **Transmissão materno-fetal do HIV-1: efeito da sinalização via TLR7/8 na ativação de células dendríticas para produção de resposta anti-viral em mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos** [tese (Doutorado em Imunologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A transmissão vertical do HIV-1 da mãe para criança foi significativamente reduzida com o uso de terapias antirretrovirais, resultando um aumento do número de crianças que foram expostas ao vírus. Estudos evidenciam a expressão de receptores *Toll-like* (TLR) em células trofoblásticas que pode ser uma ferramenta importante para regular a diferenciação e ativação de células do sistema imunológico, orquestrando um ambiente imunorregulador, contribuindo para o sucesso gravidez e proteção do feto. Considerando que as consequências da infecção por HIV-1 no microambiente placentário, na mãe e no recém-nascido (RN) não são bem entendidos, salienta-se a necessidade de investigar estratégias que possam potencializar a resposta imune inata, neste contexto. Com isso, no presente trabalho, foram avaliados as células mononucleares (CMN) do sangue periférico e cordão umbilical (RN) de parturientes infectadas por HIV-1 e parturientes-RN não infectados, a secreção de TNF- α , IL-10 e IFN- α induzida por agonistas de TLRs extracelular (TLR2, TLR4 e TLR5) e agonistas de TLRs intracelulares (TLR3, TLR7, TLR7 / 8, TLR9). Além disso, como sensor da resposta imune inata foi avaliado o perfil de resposta de células dendríticas mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC), após ativação com ligantes relacionados com resposta antiviral (TLR7, TLR7/8 e TLR9). No microambiente placentário foi verificada a expressão de CD123, TLR8, CD14/CD16 e HLA-G de amostras da decídua e vilo de mães infectadas por HIV-1 e grupo controle. Os resultados mostraram que as CMNs de mães infetadas por HIV-1 e de seus RNs têm um déficit na secreção TNF- α após ativação pelas vias de TLR2, TLR5, TLR3, TLR7, contudo, preservada para estimulação TLR7/TLR8 (composto CL097), principalmente pelas células de recém-nascidos. Além disso, apenas a ativação com CL097 foi eficaz para induzir a secreção IL-10 e IFN- α pelo grupo infectado, tanto na mãe quanto no RN. O CL097 também foi capaz de induzir a expressão de RNAm para o fator regulador de interferon-7 (IRF-7), IFN- α e TNF- α em níveis similares entre os grupos, confirmando o potencial de ativação TLR7/8. A ativação via TLR7/TLR8 foi capaz de controlar o déficit na da produção de TNF- α pelas mDC, mas não reverteu a resposta funcional de IFN- α por pDCs nas mães e RN infectados por HIV-1. No tecido placentário infectado por HIV-1, houve aumento da expressão de TLR8, CD123, e HLA-G. Os achados mostraram a importância da via TLR8 tanto na resposta sistêmica como no microambiente placentário, ressaltando a importância dos ligantes naturais e/ou sintético no papel adjuvante para melhorar a resposta antiviral na interação materno-fetal.

Palavras chave: parturientes, recém-nascido, placenta, células trofoblásticas, HIV-1, resposta imune inata e célula dendrítica.

ABSTRACT

Cardoso EC. **Mother-to-child transmission of HIV-1: TLR7/8 pathway activation of dendritic cells to produce anti-viral response in mothers infected with HIV-1 and their newborns** [PhD. thesis (Immunology)] Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University; 2013.

Mother-to-child transmission of HIV-1 has been significantly reduced with the use of antiretroviral therapies, resulting an increased number of HIV1-exposed uninfected infants. Studies have been evidenced that expression of Toll-like receptors (TLR) in trophoblast cells may be a relevant tool to regulate the differentiation and activation of immune cells, orchestrating an immunoregulatory environment, contributing to successful pregnancy and fetal protection. Since the consequences of HIV-infection in the immune innate system from placental microenvironment, mother, and newborn are not well understood, emphasize to investigate the strategies to potentiate the innate immune response. We evaluated in mononuclear cells (CMN) of peripheral blood and cord blood from HIV-1-infected pregnant and uninfected mother-cord blood the TNF- α , IL-10 and IFN- α secretion induced by agonists of extracellular Toll-like receptor (TLRs) (TLR2, TLR4 and TLR5) and agonists for intracellular TLRs (TLR7, TLR7/8, TLR9). Moreover, as checkpoint of innate immune response we evaluate the myeloid dendritic cells (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) responsiveness to TLRs related to antiviral response (TLR7, TLR7/8 e TLR9). Were also evaluated expression of CD123, TLR8, CD14/CD16 and HLA-G of maternal samples of decidua and villi both infected by HIV-1. The results showed that HIV-1 infected mother-cord blood have a deficit in the TNF- α response induced by TLR2, TLR5, TLR3, TLR7 PBMC activation, but preserved for TLR7/8 (CL097) stimulation, mainly by the newborn cells. Moreover, only CL097 activation was efficacious to induce IL-10 and IFN- α secretion by the infected group, in both mother and cord blood cells. Up-regulation of IFN- α secretion level was achieved with CL097 by cord blood from HIV-infected mother compared to control mothers. CL097 stimulation was also able to induce Interferon-regulator factor-7, IFN- α and TNF- α mRNA expression in PBMC at similar levels between groups, confirming the potential of TLR7/8 activation. TLR7/TLR8 activation overcomes the impairment of TNF- α production by mDC, but maintained the dysfunctional type I IFN response by pDCs in HIV-infected pairs. Expression of TLR8, CD123 and HLA-G was increased in placental tissue from infected-mother compare to uninfected control. Our findings highlight the dysfunction of innate immune response in HIV-treated mother-newborn. Adjuvant potential of TLR8, in the systemic response as well as in the placental microenvironment, emphasizes the use of natural and /or synthetic TLR agonists to improve antiviral response at the maternal-fetal interface.

Keywords: pregnant, newborn, placenta, trophoblast cells, HIV-1, innate immune response and dendritic cells

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome de imunodeficiência adquirida
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV - Anti-retroviral
AZT - Zidovudina
BSA - Soroalbumina bovina
CD – *Clauster Differentiation*
CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA
CMN – Células mononucleares
CV - Carga viral
DAB - Diaminobenzidina
DNA - Ácido desoxirribonucleico/ *Deoxyribonucleic acid*
Dp - Desvio-padrão
DST - Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA - Etilenodiaminotetracetatodossódico
ELISA -Enzyme linked immunosorbent assay
EUA - Estados Unidos da América
FDA - *Food and Drug Administration*
Foxp3 - *Forkhead box P3*
gp 41- Glicoproteína 41
gp120 - Glicoproteína 120
h - Hora
H&E – Hematoxilina e Eosina
HAART- *Highly active antiretroviral therapy*
HC - Hospital das Clínicas
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HU – Hospital Universitário
IFN- γ - Interferon gama
IFN- α Interferon alfa
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
MHC- Complexo maior de histocompatibilidade
Min - Minutos
mL – Mililitro

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

NK - *Natural Killer*

°C - Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

p24 - Proteína 24

PBMCS - Peripheral blood mononuclear cells

PBS - Phosphate buffered saline

PCR - *Polymerase chain reaction*

RN - Recém-nascido

RNA - Ácido Ribonucleico/ *Ribonucleic acid*

rpm - Rotação por minuto

RT - Transcrição reversa

RT-PCR - Reação em cadeia de polimerase em tempo real

TARV - Terapia antirretroviral

TBS - *Tris buffer saline*

TGF-β - Fator de crescimento tumoral beta

TLR – *Toll Like Receptor*

TNF-α

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Citocinas secretadas por CMN(s) após ativação de TLR(s).....	48
FIGURA 2 - Indução de TNF- α por ligantes de TLRs e correlação com a carga viral de mulheres não gestantes infectadas por HIV-1.....	51
FIGURA 3 - Produção intracelular de IFN- α em pDCs após estímulo com Imiquimode CL097.....	52
FIGURA 4 - Efeito da ativação via TLRs na produção de FN- α por pDC.....	54
FIGURA 5 - Efeito da ativação via TLRs na produção de TNF- α por mDC.....	56
FIGURA 6 -Avaliação sérica de IFN- α , TNF- α e IL-10.....	59
FIGURA 7 -Efeito da ativação via TLRs na secreção de IL-10 de mães e recém-nascidos.....	61
FIGURA 8 - Efeito da ativação via TLRs na secreção de TNF- α de mães e recém-nascidos.....	63
FIGURA 9 - Efeito da ativação via TLRs na secreção de IFN- α de mães e recém-nascidos.....	65
FIGURA 10 – A expressão de IRF-7, IFN- α e TNF- α em CMN(s) avaliadas por PCR.....	66
FIGURA 11 - Análise da ativação via TLRs na secreção de TNF- α em mDC de mães e RN.....	80
FIGURA 12 - Análise da ativação via TLRs na secreção de IFN- α em pDC de mães e RN.....	70
FIGURA 13 – Coloração por HE das faces Decidual e Fetal.	72
FIGURA 14 - Detecção da expressão de CD123 por imunoistoquímica na face decidual.....	74
FIGURA 15 - Quantificação da expressão de CD123 na face decidual.....	75
FIGURA 16 -Detecção da expressão de TLR8 por imunoistoquímica na face decidual e fetal.....	77
FIGURA 17 -Quantificação da expressão de TLR8 por imunoistoquímica na face decidual e fetal.....	78
FIGURA 18 – Detecção de CD14/CD16 por imunofluorescência na face decidual.....	80

FIGURA 19 - Detecção de CD14/CD16 por imunofluorescência no vilo.....	81
FIGURA 20 - Detecção da expressão de HLA-G nas faces decidual e fetal.....	83
FIGURA 21 - Quantificação da expressão de HLA-G nas faces decidual e fetal.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos de pacientes femininos infectados por HIV-1.....	50
Tabela 2 – Dados demográficos de parturientes infectadas por HIV-1.....	57
Tabela 3 – Dados demográficos de parturientes não infectadas por HIV-1.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Características genéticas, moleculares e biológicas do HIV	25
1.2 Imunidade Inata e HIV-1	27
1.3 Imunologia Materno-fetal na patogênese do HIV	32
1.4 Receptores Toll Like expressos na placenta e a resposta anti-patógenos	35
2 OBJETIVO	38
2.1 Objetivos específicos	38
3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Casuística	40
3.2 Materiais e métodos	41
3.2.1 Coleta das amostras	41
3.2.2 Obtenção de células mononucleares	41
3.2.3 Criopreservação das CMN(s)	41
3.2.4 Indução de citocinas in vitro por agonistas de TLR 2, 3, 4, 7, 7/8 e TLR9	41
3.2.5 Determinação de citocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA)	42
3.2.6 Indução da expressão de citocinas intracelulares em pDC e mDC por agonistas de TLR7, TLR7/8 e TLR9	42
3.2.7 Análise da indução de mRNA de fatores de transcrição por reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real (Real-Time PCR)	43
3.2.8 Imunoistoquímica e imunofluorescência	44
3.2.9 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	47

4.1 Resultados da padronização.....	47
4.1.1 <i>Indução de citocinas por ligantes de TLR(s) em culturas de CMN(s) de indivíduos saudáveis</i>	<i>47</i>
4.1.2 <i>Dosagem de TNF-α em sobrenadante de culturas de CMN(s) de pacientes infectados por HIV-1 estimulados com agonistas de TLR(s)</i>	<i>49</i>
4.1.3 <i>Padronização da indução de células dendríticas plasmocitóides secretoras de IFN-α em indivíduos e controles</i>	<i>52</i>
4.1.4 <i>Produção de IFN-α intracelular após estímulo com agonistas de TLR(s) em pDCs de indivíduos infectados por HIV-1 e controles</i>	<i>53</i>
4.1.5 <i>Efeito dos agonistas de TLR(s) 7/8 e 9 na secreção de TNF-α em células dendríticas mielóides de indivíduos infectados por HIV-1 e controles</i>	<i>55</i>
4.2 Resultados de grupo gestantes infectadas ou não por HIV-1	57
4.2.1 <i>Produção e secreção de citocinas após estímulo com agonistas de TLR(s) em gestantes infectadas por HIV-1 e grupo controle</i>	<i>59</i>
4.2.2 <i>Avaliação da secreção de IL-10 após estímulo de CMN(s) com agonistas para TLRs em gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>60</i>
4.2.3 <i>Avaliação da secreção de TNF-α de CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>62</i>
4.2.4 <i>Avaliação da secreção de IFN-α por cultura de CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>64</i>
4.2.5 <i>Avaliação da expressão de RNA mensageiro de IRF-7, IFN-α e TNF-α em CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>66</i>
4.2.6 <i>Avaliação da expressão de TNF-α em mDC de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>67</i>
4.2.7 <i>Avaliação da expressão de IFN-α em pDC de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle</i>	<i>69</i>
4.3 Avaliação da face decidual e fetal de placentas de mães infectadas ou não por HIV-1.....	71
4.3.1 <i>Coloração em Hematoxilina e Eosina em cortes de tecido placentário de mães</i>	

<i>infectadas por HIV-1</i>	71
<i>4.3.2 Expressão de CD123 em cortes de tecido placentário de mães infectadas pelo HIV-1</i>	73
<i>4.3.3 Expressão de TLR8 em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1</i>	76
<i>4.3.4 Expressão de CD14/CD16 em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1</i>	79
<i>4.3.5 Expressão de HLA-G em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1</i> ...	82
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da Imunodeficiência adquirida (aids) é uma doença causada pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), um vírus citopático que infecta células que expressam a molécula CD4 e o receptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4. O HIV pode ser adquirido durante o intercuro sexual, pelo contato com o sangue e hemoderivados, contato com agulhas, seringas ou outros perfuros-cortantes contaminados pelo vírus.

O HIV-1, desde o início da epidemia, infectou mais de 60 milhões de pessoas. Com introdução da terapia antirretroviral altamente potente, HAART, que combina drogas com diferentes formas de ação, a estimativa de vida do indivíduo que vive com HIV melhorou. Atualmente, estima-se que mais de 14 milhões de pessoas recebam a terapia antirretroviral, sendo que em 2011 foram 1.4 milhões de pessoas a mais que 2010, recebendo antirretroviral, aumentando assim o número de indivíduos com HIV. Sabe-se que hoje há 34.2 milhões [31,8–35,9 milhões] de pessoas vivendo com HIV, sendo que deste número metade da população é mulher (49% [46-51%]) (RELATÓRIO GLOBAL DA AIDS, 2012).

No Brasil, em 2010, foram diagnosticados 34.212 novos casos de infecção por HIV, uma queda comparada ao ano anterior que foi de 35.979 novos casos, mas a proporção de aproximadamente dois infectados do sexo masculino para cada mulher permanece, aumentando o risco da transmissão vertical. No final da década de 90, o Ministério da Saúde do Brasil introduziu o antirretroviral ao tratamento de pacientes infectados pelo HIV, provocando queda da mortalidade no país. O HAART também foi introduzido ao calendário de pré-natal da gestante infectada com o vírus e na profilaxia do recém-nascido (BRASIL, 2007).

Com a introdução do HAART ao tratamento de indivíduos infectados pelo HIV, o Ministério da Saúde começou a incentivar o conhecimento precoce do estado sorológico do indivíduo. Principalmente da gestante, cujos testes sorológicos foram preconizados a acontecer o mais cedo possível durante o pré-natal. Para assim, poder dar início à terapêutica materna e consequente profilaxia da transmissão vertical. Atualmente, foram notificados, em 2010, 5.666 casos de HIV em gestantes, com taxa de detecção de 2,0 casos por 1.000 nascidos vivos (BRASIL, 2011).

Mundialmente, a porcentagem de gestantes vivendo com HIV que receberam tratamento aumentaram de 35% em 2007 para 57% em 2011 (Relatório Global da Aids, UNAIDS, 2012). Conforme, o aumento de países que passaram a utilizar esquemas efetivos de tratamento, houve uma diminuição do número de crianças que nasceram com HIV. Estima-se que 330 mil [280–380 mil] crianças foram infectadas pelo HIV em 2011, representando uma redução de 24% entre 2009 e 2011 (RELATÓRIO GLOBAL DA AIDS, UNAIDS,

2012). Avanços significativos também foram observados na África Subsaariana, onde as novas infecções pelo HIV em crianças caíram em 25%, comparado a 2009 (Relatório Global da Aids, UNAIDS, 2012).

Com isso, o número de novas infecções pelo HIV entre crianças com menos de 15 anos de idade em 2012 na América Central e do Sul foi relativamente baixo, em torno de 4.000, e parece estar diminuindo (UNAIDS, 2011). Globalmente, as mortes das crianças abaixo de 15 anos de idade vem declinando. Estima-se que 260.000 [150.000–360.000] crianças morreram de doenças relacionadas à aids em 2009, o que representa 19% a menos que o ocorrido em 2004 (320.000 mortes). Esta tendência reflete a expansão dos serviços de prevenção da transmissão de HIV para os infantes e o acesso ao tratamento (UNAIDS 2010).

Com a terapia antirretroviral, em 2011, cerca de 330 000 crianças adquiriram a infecção pelo HIV, este percentual representa um declínio de 43% comparado a 2003, destas crianças infectadas pelo vírus 90% vivem no sub-Saharian africano (UNAIDS, 2012) HIV. Com o uso do HAART aproximadamente 98% dos infantes nascem com sorologia negativa para o HIV-1 (BRASIL, 2009; LUZURIAGA, 2007). A ausência destes medicamentos pode levar a infecção em cerca de 20 a 45% das crianças, como um risco estimado de 5 a 10% de infecção na gravidez, de 10-20% durante o trabalho de parto e de 5-20% pela amamentação. Além do tratamento antirretroviral, o Ministério da Saúde recomenda no período pós-natal a suspensão do aleitamento materno e manutenção da quimioprofilaxia do neonato até quatro semanas de vida (BRASIL, 2007).

Contudo, mesmo na ausência de profilaxia, grande parcela das crianças (65-80%) nascidas de mães infectadas por HIV-1 não adquirem a infecção (Brasil, 2007), despertando a atenção para avaliar os fatores do hospedeiro, os quais distinguem os infantes que sucumbem e os que escapam da infecção. A compreensão dos mecanismos protetores dos infantes mesmo em face ao tratamento antirretroviral nos permite compreender supostos mecanismos imunológicos, pertinentes à resposta inata, envolvidos na proteção do neonato exposto ao HIV-1. Os fatores genéticos e imunológicos no binômio mãe – recém-nascido (RN), assim como os virológicos, oferecem possibilidade de avaliar marcadores de proteção ou de suscetibilidade à infecção, em face à imaturidade imunológica e a terapia antirretroviral.

Com isso, o atual contexto abre a oportunidade para avaliar marcadores de proteção ou de suscetibilidade à infecção por HIV-1 no âmbito materno-fetal, uma vez que há poucos estudos sobre resposta inata no período gestacional. O estudo nesta área pode fornecer informações e subsídios para desenvolver melhor estratégia de proteção ao vírus e formulações de vacinas anti-HIV-1.

1.1 Características genéticas, moleculares e biológicas do HIV

O HIV pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*, um retrovírus subdivido em HIV-1 e HIV-2 que foram descritos como agente etiológico da síndrome da imunodeficiência humana (aids) (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; CLAVEL et al., 1986), diferem quanto à estrutura genômica e distribuição geográfica. Ambos causam síndromes semelhantes, embora o HIV-2 possua menor potencial patogênico (WYATT et al., 1998). Em pacientes infectados procedentes de diferentes regiões geográficas, foram encontrados fragmentos genômicos virais (subtipos) tanto de HIV-1 como de HIV-2, que por análise filogenética foram classificados em diferentes grupos e subtipos.

O HIV-1 foi classificado em três grupos: M (main ou major); O (outlier) e N (new), com variabilidade genética de até 30%, os quais podem ter origem zoonótica a partir de eventos independentes de cruzamento de barreira interespecie (NOWAK et al., 1991). O grupo M é representado por linhagens geneticamente distintas que são agrupadas filogeneticamente em nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H e I). As linhagens muito divergentes, que não se agrupam com nenhuma dessas variantes, são coletivamente classificadas no grupo O (GEIER et al., 1994). Mais do que 90% das infecções por HIV-1 pertencem ao grupo M. A coexistência de dois diferentes subtipos em uma célula do indivíduo infectado, pode criar um novo vírus híbrido (JASTY et al., 1997). Muitas linhagens não sobrevivem, mas os que infectam mais do que uma pessoa, são conhecidos como formas recombinantes circulantes (CRF). Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos: A, B, C, D, e E. Embora não tenha sido ainda determinado, é possível que as variantes virais possuam diferentes índices de transmissibilidade e/ou patogenicidade (BRASIL, 2010).

O HIV-1 possui duas fitas simples de RNA de polaridade positiva e sua estrutura genética básica é composta por genes: *gag* (core de proteínas), *pol* (polimerase/transcriptase reversa) e *env* (proteínas do envelope) (WYATT et al., 1998). O gene *gag* codifica as proteínas que compõem o capsídeo viral, ou seja, que formam a sua estrutura proteica. O gene *pol*, por sua vez, codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase. Estas enzimas são produzidas como uma poliproteína precursora Gag-pol que posteriormente é processada pela protease viral. O gene *env* codifica glicoproteínas que, na partícula viral, estão inseridas na membrana lipídica, também chamada de envelope, que recobre o envoltório proteico do vírus. As glicoproteínas do envelope, gp41 e gp120, desempenham um papel crucial no processo de infecção, pois é através delas que o vírus interage com os receptores localizados

na superfície das células do hospedeiro, e penetrando nestas células. Há também os genes adicionais como, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, que participam do processo de replicação viral e exercem atividade reguladora positiva ou negativa (WYATT et al., 1998). Estes genes controlam a replicação do HIV-1, seja ativando a transcrição do seu genoma (gene *tat*), promovendo a exportação do RNA mensageiro viral do núcleo para o citoplasma (gene *rev*) ou potencializando a liberação do vírus para fora da célula infectada (*vpu*) (WYATT; SODROSKI, 1998).

As glicoproteínas do envelope do HIV-1 têm como precursora a gp160, esta poliproteína é clivada em duas subunidades que originam a proteína de superfície gp120 e a proteína transmembrana gp41. A proteína de superfície viral gp120 possui alto grau de variabilidade genética apresentando, em sua sequência de aminoácidos, cinco regiões variáveis (V1-V5) interespaçadas por quatro regiões constantes (C1-C4). Essas glicoproteínas estão associadas em um complexo trimérico, que medeia à entrada do vírus na célula hospedeira. A entrada do vírus depende da interação sequencial da gp120 com o receptor CD4 e membros de receptores da família das quimiocinas. A gp120 é uma molécula muito flexível (nas partes V₁, V₂ e V₃), que apresenta uma estrutura de *hairpin* em U com domínio interno, externo e local de ligação ao CD4 e outros receptores (MOORE et al., 1993). Após a ligação do vírus com a molécula CD4, os receptores de quimiocinas, o CCR5 e o CXCR4, funcionam como correceptores do HIV-1. Assim, há uma mudança conformacional na gp120 que expõe a alça V3 e a interação da alça V3 e o correceptor possibilita um melhor ancoramento do CD4 com a gp120. Este ancoramento leva a exposição da proteína gp41, promovendo a fusão das membranas. A gp41 possui uma conformação de seis hélices aproximando as membranas para formar o poro de fusão para internalizar o material genético do vírus (MOORE et al., 1993). A mudança conformacional que ocorre nessas proteínas leva a entrada efetiva do vírus na célula do hospedeiro.

Os receptores de quimiocinas o CCR5 e o CXCR4 expressos em macrófagos e células T, respectivamente, indica o tropismo do HIV, o que permite caracterizá-lo como M-trópico ou T-trópico (BARRE-SINOUSSE et al., 1997; SATTENTAU, 1988). Apesar do CCR5 e CXCR4 representarem *in vivo* os correceptores mais relevantes para o HIV-1, foram identificados *in vitro* outros receptores como o CCR2, CCR3, CCR8, CCR9, STRL33, Gpr15, Gpr1, APJ e ChemR23 que são utilizados para a entrada de certos isolados de HIV-1 (MUNERATO et al., 2003). As quimiocinas são proteínas pró-inflamatórias quimiotáticas produzidas por células T e fagócitos nas zonas inflamatórias que durante a infecção por HIV-

1 podem bloquear a replicação viral, por competir com mesmo sítio de reconhecimento de seus ligantes naturais.

O CCR5 é o ligante das quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL3L1 (LD78 β), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES), estas proteínas podem bloquear a entrada do HIV na célula do hospedeiro, pois competem com o mesmo sítio de ligação que o vírus. Variantes genéticas de receptores de quimiocinas que naturalmente ocorrem no hospedeiro mostram importante papel na resposta imune ao HIV-1 (O'NEILL, 2004). Indivíduos expostos ao vírus que apresentam heterozigose para o alelo CCR5 Δ 32, podem não adquirir a infecção pelo HIV ou impedir a progressão rápida da doença. Crianças com fenótipo de deficiência na produção de CCL3 têm aumento de risco em adquirir a infecção por HIV-1 (WASIK et al., 2005). Já em algumas crianças expostas ao HIV-1 não infectadas produzem elevados níveis de CCL3, CCL4 e CCL5, o que sugere que estas quimiocinas medeiam inibição de maneira não citotóxica na infecção perinatal (WASIK et al., 2005).

Os mecanismos de entrada do HIV-1 são diversos e algumas moléculas estão relacionadas com a entrada do vírus, como a Lectina Ligante de Manose (MBL), a molécula de adesão DC-SIGN e outra molécula relacionada, denominada DC-SIGNR. As DC-SIGN e DC-SIGNR são expressas em DCs que capturam o HIV-1, em decorrência da sua alta afinidade com as moléculas de gp120 presentes no envelope do vírus (HARDY et al., 2007). Como as DCs que expressam o DC-SIGN estão presentes nos tecidos de mucosa, sítio de entrada do vírus e rico de células TCD4⁺, pode contribuir para disseminação do vírus HIV-1 (HARDY et al., 2007). Estas lectinas ligadoras do HIV-1, podem também influenciar na transmissão vertical do vírus (SOILLEUX et al., 2001), considerando que estas moléculas são expressas por macrófagos fetais (células de Hofbauer) e por macrófagos maternos da decídua (BARRE-SINOUSSE et al., 1997).

1.2 Imunidade Inata e HIV-1

A resposta imune inata é constituída por células que expressam receptores sentinelas, capazes de reconhecer motivos conservados de patógenos, presentes em bactérias, fungos e vírus (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), denominados receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors*- PRRs). Entre estas estruturas moleculares, incluem os receptores *Toll* (*Toll-like receptor* – TLR), que após o reconhecimento dos PAMPs, iniciam vias de sinalização que resultam na modulação de componentes do sistema imune inato o qual induz uma cascata de sinalização que leva a

ativação de NF κ B, resultando na produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias e geração da resposta adaptativa (OZINSKY et al., 2000); (HALLMAN et al., 2001).

Há 11 tipos de TLR caracterizados em humanos, sendo que alguns são detectados na superfície das células, como o TLR2, que reconhece PAMPs de bactérias Gram-positivas como as lipoproteínas, lipomananas e ácido lipoteicoico. Além de ligantes naturais, existe o agonista sintético o Pam3CSK4, um potente ativador do fator de transcrição NF pró- κ B1.

Outros TLRs expressos em superfícies celulares são os TLR4 e 5 ambos reconhecem estruturas presentes em bactérias. O TLR4 tem como ligante natural moléculas de lipopolissacárides (LPS) presentes estruturalmente na parede externa de bactérias gram negativas. O reconhecimento do LPS é predominantemente mediado por TLR4 que envolve a ligação do LPS com a proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP), posteriormente, com CD14 que fisicamente se associa com um complexo que inclui TLR4. A formação deste complexo induz a produção de citocinas pró-inflamatórias pela via MyD88. A cascata de sinalização também envolve uma via de sinalização independente de MyD88, que medeia a ativação de genes que expressão IFNs tipo I. Outra estrutura bacteriana reconhecida por TLRs é a flagelina que pode ser reconhecida por TLR5.

Além dos receptores *Toll* expressos na membrana extracelular há TLRs localizados intracelularmente, tais como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, localizados em compartimentos endossomais e no retículo endoplasmático. Estes receptores estão envolvidos na imunidade inata contra viroses por serem potentes indutores de IFN tipo I. O ligante natural do TLR3 é a dupla fita de RNA viral (dsRNA), o TLR7 e 8 reconhecem a fita simples de RNA viral (ssRNA) e o TLR 9 reconhece o DNA não metilado, rico em motivos de citosinas e guaninas (CpG), de bactérias e vírus. Estes receptores são expressos principalmente nas APCs, sendo que o TLR3 está expresso nas mDC, o TLR7 e o TLR 9 nas pDCs e o TLR8 nas mDC e monócitos (KADOWAKI et al., 2001; HORNUNG et al., 2002). O HIV-1 possui múltiplos oligonucleotídeos ricos em uridina codificados pelas sequências ssRNA do *gag*, *vpr*, *vif*, *pol* e *env* (HEIL et al., 2004; BEIGNON et al., 2005);. Estas sequências do HIV-1, são ligantes naturais para TLR7 e TLR8 e são capazes de estimular as pDC e monócitos, gerando uma ativação secundária das células T. A ativação de pDC leva a produção de IFN- α , que exibe importante atividade antiviral, capaz de inibir *in vitro* a replicação do HIV-1 (YAMAMOTO et al., 1986).

As vias de sinalização do TLR são reguladas por moléculas adaptadoras intracelulares, tais como MyD88, MAL, TRIF, TRAM e SARM (O'NEILL, 2007) . A maioria dos receptores *Toll*, com exceção do TLR3, sinaliza via MyD88, iniciando a sinalização de uma série de

quinasas e outras proteínas que culmina na ativação do NFκB. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), particularmente o IRF 1, 3, 5 e 7 são ativados pela MyD88 ou TRIF e são cruciais para produção de IFN tipo I. Além disto, os TLRs que reconhecem ácidos nucleicos (TLRs 3, 7 e 9) requerem acidificação dos compartimentos endossomais, sendo que os TLR 3 e 7 encontram-se associados ao retículo endoplasmático (BRINKMANN et al., 2007) e o TLR9 no próprio retículo endoplasmático, mas uma vez ativado locomove-se para o endossomo (LEIFER et al., 2004).

Estes receptores são expressos em várias células do sistema imune inato como as DCs, macrófagos, células B e natural killer (NK) (HALLMAN et al., 2001). As mDC e as pDC, após o reconhecimento do patógeno pelo TLR, iniciam um processo de ativação celular paralelamente ao processamento e apresentação de peptídeos antigênicos no contexto das moléculas do MHC para as células T. O processo de sinalização intracelular culmina na produção de quimiocinas, citocinas e aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e de classe II do MHC nas DC apresentadoras de antígenos (APCs) (HALLMAN et al., 2001).

Além dos ligantes naturais dos TLRs, alguns compostos sintéticos têm sido utilizados, como as imidazoquinolinas ligantes TLR7, o Poly (I: C) é um análogo sintético da fita dupla de RNA (dsRNA), viral. O Poly (I: C) é reconhecido pelo TLR3, após o reconhecimento há a ativação do IRF3, através da proteína adaptadora o *Toll-IL-1 receptor* (TIR) de domínio contendo adaptador (TRIF, também conhecido como indutor de IFNs- TICAM-1) 3, que acaba gerando a produção de IFNs tipo I, principalmente IFNα (HEIL et al., 2004).

A ativação de TLR 9 também está relacionada à produção de IFNs tipo I, que ocorre a partir do reconhecimento de DNA não metilado, rico em motivos de citosinas e guaninas, – os oligodeoxinucleotídeo CpG (citosina – fosfodiéster – guanina). O CpG está presente no DNA de bactérias, vírus, na forma não metilada em porção vinte vezes maior do que nos vertebrados (HORNER; RAZ, 2002). A estimulação do sistema imune pelo CpG inicia-se pela captura do DNA pela célula. Este processo é independente da presença de sequências de CpG no DNA. Após a maturação endossomal ocorre o reconhecimento do CpG pelo TLR9 no retículo endoplasmático (AKIRA, 2001). A ativação de TLR9 induz uma cascata de sinalização que envolve as moléculas, MyD88, IRAK, TRAF-6, resultando na ativação de MAP quinase e NFκB (WAGNER, 2002). Após a ativação celular ocorre a produção e secreção de citocinas como IL-2, IL6, IL-12, IFNγ e IFN-α.

As imidazoquinolinas (imiquimode e R-848), ligantes sintéticos de TLR7, são compostos de baixo peso molecular, utilizam uma via sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88 que leva a indução de NF-κB (LEE et al., 2003). Estes compostos,

indutores da produção de IFN- α são utilizados na terapia tópica na infecção pelo papiloma vírus devido sua potente ação antiviral (HARANDI et al., 2003). Os neonatos possuem uma resposta inadequada para múltiplos ligantes de TLR, entretanto, a resposta ao composto R-848, ativador de TLR8, está preservada (LEVY, R. W. et al., 2004). Este fator pode representar uma oportunidade para estimular a resposta inata e consequentemente adaptativa nesta fase de imaturidade imunológica.

O HIV-1, pelos múltiplos ligantes de TLR, pode exercer um efeito na ativação do sistema imune, contribuindo diretamente na persistente ativação imunológica que ocorre durante a infecção virêmica (HEIL et al., 2004). Neste contexto, experimentos de ativação de TLR7/8 por fita simples de RNA do HIV-1 ou compostos sintéticos mostram interferência na replicação viral (SCHLAEPFER et al., 2006). A ação anti-HIV-1 parece ocorrer após a fusão do vírus, antes da integração do DNA viral no genoma, inibindo a replicação do HIV-1 nas células do tecido linfóide. Já a ativação via TLR7/8 em células pró-monocíticas infectadas latentes, induziu a liberação de virions. Estes achados sugerem que a ativação via TLR, pode ter resultados diferentes na infecção aguda e crônica. Na infecção aguda, a resposta antiviral induzida pela ativação de TLR7/8 pode restringir a replicação do HIV-1 até a geração da resposta adaptativa, prevenindo assim o estabelecimento ou manutenção de reservatórios latentes. Enquanto que na infecção crônica, o processo para restringir a replicação viral pode ser mais lento (SCHLAEPFER et al., 2006).

Na resposta antiviral a ativação dos TLRs 7/8 desencadeia a produção de IFN- α por pDCs, que são capazes de produzir 1000 vezes mais esta citocina do que outro tipo celular (KADOWAKI et al., 2001). Na infecção pelo HIV-1 a diminuição do número de pDCs circulantes e a escassez da produção de IFN- α é considerada um fator de progressão da doença (MULLER-TRUTWIN; HOSMALIN, 2005). Experimentos *in vitro* mostram que o HIV-1 induz a secreção de IFN- α pelas pDC, promovendo a expressão do ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL) em células T CD4 (HERBEUVAL et al., 2005). Além disto, virions de HIV-1, são capazes de induzir a ativação de pDC via TLR7, tornando as células pDC *killer*, capazes de exercer atividade citotóxica (HARDY et al., 2007). Estas células que são ativadas pelo RNA viral, produzem IFN- α e expressam TRAIL, marcadores de ativação (HLA-DR, CD80, CD83 e CD86) e de migração (CCR7). As pDCs também são capazes de induzir apoptose em linhagem de células CD4, por um mecanismo dependente de TRAIL. Por outro lado, a molécula TRAIL exerce efeito anti-apoptótico nas pDCs (HARDY et al., 2007).

Deste modo, agonistas sintéticos ou ligantes naturais do vírus (ssRNA) levam a ativação via TLR7/8, estimulação das APCs e promovem efeito anti-HIV-1 (SCHLAEPFER et al., 2006). Além disto, agonistas desta via têm sido utilizados como adjuvante vacinal para a proteína Gag do HIV-1 em macacos, mostrando aumento na magnitude e na qualidade da resposta T CD8+ anti-HIV-1 (WILLE-REECE et al., 2005). O processo de ativação via TLR7/8 pode ser uma estratégia terapêutica para estimular a resposta imune inata e adaptativa.

Os TLRs reconhecem os motivos conservados de patógenos invasores, resultando em ativação celular e liberação de fatores inflamatórios. Estudos, envolvendo indivíduos heterossexuais expostos ao HIV-1, mas que não se infectaram (ESN) reporta a importância do papel dos receptores *Toll* na proteção ao HIV-1, pois indivíduos ESN mostraram maior capacidade de resposta aos estímulos poly I:C, LPS, Imiquimode e ssRNA40, associado com um aumento significativo da produção de IL-1, IL-6, TNF- α , CCL3 (MIP-1 α) e ciclooxygenase (BIASIN et al., 2010). Os TLRs7, 7/8 e 9, além de induzir a produção de IFN- α e TNF- α envolvidos ativamente na resposta antiviral, podem modular a expressão de genes de β -quimiocinas (SCHLAEPFER et al., 2006). O CCL3 (MIP-1 α), CCL3L1 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) podem bloquear a entrada do HIV-1 na célula do hospedeiro, pois competem com o mesmo sítio de ligação que o patógeno (BERGER et al., 1999). Para tanto, variantes genéticas de quimiocinas e seus receptores que naturalmente ocorrem no hospedeiro influenciam a progressão da infecção pelo HIV-1 para a aids e a resposta imune ao HIV-1 (REICHE et al., 2007). A ativação crônica das células imunocompetentes, pode levar a apoptose dessas células e evolução para a depressão do sistema imunitário, sendo que este processo diminui rapidamente com o início da terapia antirretroviral. Quando não ocorre o uso de antirretrovirais pode dar início a fase sintomática da doença, manifestando os sintomas da aids (REICHE et al., 2007).

O uso de antirretrovirais na gestação reduz a taxa de transmissão viral para 99%. Contudo, na interface materno-fetal durante a infecção pelo HIV-1, são vários os parâmetros imunológicos que envolvem a participação de elementos da resposta inata e sua influência na geração da resposta adaptativa, que ainda não foram abordados até o momento. Vários aspectos precisam ser compreendidos desde a complexidade dos fatores genéticos do hospedeiro, qualidade da resposta inata e adaptativa materna ao HIV, intensidade e tempo da exposição do vírus no período de desenvolvimento imunológico do feto e fatores maternos gerados na gravidez para a tolerância dos aloantígenos fetais. O microambiente placentário no

qual o feto está envolvido traz a possibilidade de avaliar possíveis marcadores de proteção ou de suscetibilidade à infecção pelo HIV-1.

1.3 Imunologia Materno-fetal na patogênese do HIV

Compreender os processos imunológicos desenvolvidos durante a gestação é fundamental para investigar a infecção pelo HIV-1 no contexto materno-fetal. O perfil imunológico da gestante tem sido amplamente estudado nas últimas décadas, mas alguns aspectos ainda não estão totalmente esclarecidos. Entre os fatores envolvidos na tolerância aos aloantígenos paternos expressos pelo embrião, regulação do desenvolvimento fetal e formação da placenta são vitais a influência hormonal sobre o sistema imune materno, as citocinas, o controle da citotoxicidade direta das células NK uterinas (uNK) e atividade das células T reguladoras (Treg).

As mudanças do perfil hormonal feminino com repercussão no sistema imune não ocorrem apenas durante a gestação, estas modificações podem acontecer durante todo o ciclo menstrual. Os hormônios esteróides induzidos durante a ovulação, por exemplo, podem modular a atividade das APC, tanto da linhagem mielóide como linfóide. Estudos com as pDCs revelam que altos níveis de progesterona aceleram a ativação destas células repercutindo na ativação de células TCD8 (HERING et al., 1998).

Durante a gestação a progesterona é capaz de suprimir a função efetora das células T, exercendo um efeito direto de modulação de canais de potássio da membrana celular e de íons-cálcio (HERING et al., 1998). Um dos efeitos imunorregulatório da progesterona está relacionado com a sua ação sobre os linfócitos T, cujos receptores de célula T (TCR) são do tipo $\gamma\delta$. Este tipo de linfócito T, sob o estímulo alogênico, passa a expressar também receptores para a progesterona. A partir disso, sob altas concentrações desse hormônio, os linfócitos $T\gamma\delta$, sintetizam a proteína imunomodulatória, chamada de Fator Bloqueador Induzido pela Progesterona (PIBF), que inibe a liberação de ácido aracdônico e a atividade das células NK e interfere no balanço de citocinas (SZEKERES-BARTHO; POLGAR, 2010). Casos patológicos de gestação mostram baixos níveis de PIBF comparados a gestações normais (SZEKERES-BARTHO; POLGAR, 2010).

A partir da implantação do blastocisto, o principal tecido em contato com o sistema imune materno é constituído pelas células trofoblásticas, as quais passam a representar a interface materno-embrionária. O trofoblasto divide-se em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. O sinciotrofoblasto é mais abundante e forma a superfície externa das vilosidades e está em contato direto com o sangue materno (BOYD; HAMILTON, 1967). São

células multinucleadas, mais globosas e com múltiplos núcleos aglomerados, os nós sinciciais, cujo número aumenta com a progressão da gravidez. As células do citotrofoblasto são bem menos numerosas, situam-se abaixo do sinciciotrofoblasto, são individualizáveis, globosas, com núcleo redondo e cromatina mais frouxa (BOYD; HAMILTON, 1967).

Em humanos, células do sinciciotrofoblasto não expressam as moléculas clássicas MHC de classe II (HLA-DR) ou de classe I (HLA-A e HLA-B). Por outro lado, expressam um grupo particular de moléculas pertencentes ao MHC de classe I, com baixo polimorfismo, representadas por moléculas HLA-C, HLA-E e HLA-G (KING et al., 2000). Essas moléculas são ligantes específicos de células NK uterino (MOFFETT-KING, 2002) encontradas no tecido decidual, o qual também é infiltrado por macrófagos e células T CD3+. As células NK possuem receptores de ativação (KAR) e de inibição (KIR) e sua atividade citotóxica, contra células fetais ou do trofoblasto, é regulada por sinais inibitórios, originados da interação com moléculas HLA-G (HUNT et al., 2005). Na gestação normal, as células trofoblásticas produzem IL-4 e IL-7, citocinas que aumentam a expressão do número de receptores inibidores nas células NK deciduais, mantendo as células NK com fenótipo não ativado, ou seja, CD56+CD16-. Este é um importante fator a ser considerando, uma vez que respostas inibitórias na placenta são necessárias para a gestação normal, ou seja, é necessária a tolerância materna aos aloantígenos fetais. No contexto do HIV, por exemplo, é possível que as células NK e as células T CD8 que se acumulam na placenta possam inibir a transmissão do vírus pela produção de quimiocinas CC ou outros mecanismos relacionados à resposta antiviral (MARTIN et al., 2003).

Além da tolerância das células NK por interação com moléculas MHC classe I, há também indução de tolerância aos antígenos MHC classe II. Os debris do trofoblasto que circulam no sangue materno, contêm antígenos HLA-DR fetais intracitoplasmáticos (RANELLA et al., 2005) que as DC imaturas podem capturar e induzir tolerância periférica, pela geração de células T reguladoras CD4+CD25+CD127^{low}FoxP3 (Treg). Já no estágio inicial da gestação o hormônio gonadotrofina coriônica é capaz de atrair as células Treg na interface materno-fetal (SCHUMACHER et al., 2009). A imunorregulação local, também envolve outros mecanismos de resposta imune como atuação de células Th3 secretoras de TGF- β , Treguladora do tipo 1 (Tr1) secretoras de IL-10, e a atividade da enzima indolaminadioxigenase (IDO), as quais têm papel importante na manutenção da gestação (SAITO et al., 2008) (STEINMAN et al., 2003).

No sangue periférico de gestantes saudáveis, ocorre uma expansão do número de Treg, que atingem ao máximo no segundo trimestre e diminuem após o parto. (SOMERSET et al.,

2004). Entretanto, em pacientes infectadas pelo HIV, mostram contagens de Treg mais baixa quando comparadas a controles, o que explica um maior risco de aborto (KOLTE et al., 2011). Por outro lado, neonatos expostos ao HIV-1 não infectados possuem um número elevado de células T reg $CD4^+CD25^+CD127^+Foxp3^+$ associado a um baixo nível de ativação das células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ no cordão umbilical (LEGRAND et al., 2006; KOLTE et al., 2011).

No período gestacional o padrão de citocinas é variável, sendo o $TNF-\alpha$ importante para a manutenção/diferenciação placentária, desenvolvimento embrionário e parturição. Por outro lado, $TNF-\alpha$ pode promover trombose impedindo a irrigação necessária do desenvolvimento fetal e causar até necrose do embrião (PICCINNI, 2007). O $IFN\gamma$, citocina Th1, é um elemento fundamental nas etapas iniciais da implantação do blastocisto favorecendo a reação inflamatória que viabiliza a nidação do blastocisto (CHAOUAT et al., 2007). O $IFN\gamma$ em associação com a IL-12, IL-15 e IL-18 produzidas por células NK, tem ação determinante sobre a angiogênese e o processo de invasão trofoblástica (ASHKAR et al., 2003). A ação sinérgica da IL-12 crítica para indução de resposta imune de padrão Th1, e o equilíbrio de ambas são essenciais para a evolução da gestação. A IL-18 está presente na interface materno-fetal, sendo constitutivamente expressa na decídua e córion humano, durante a gestação sua produção aumenta, atingindo valores máximos no momento do parto (CHAOUAT et al., 2007).

O equilíbrio da resposta imune materna, com controle dos mecanismos inflamatórios depende de IL-10 e do $TGF-\beta$. O $TGF-\beta$ produzido precocemente na interface materno-fetal pelo embrião e pela decídua promove a adesão das células trofoblásticas à matriz extracelular, influenciando a implantação e o desenvolvimento placentário e fetal. O papel de $TGF-\beta$ fundamental para indução e manutenção da imunotolerância ao conceito (ROBERTSON et al., 2004), incluindo sua atuação na indução de células T reguladoras e Th17. A subpopulação celular Th17, caracteriza-se pela produção de IL-17 e por sua participação na mediação da angiogênese e da inflamação (ALUVIHARE et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ podem facilitar tanto a infecção de células-alvo saudáveis quanto amplificar a replicação em células contendo o DNA pró-viral (HARRER et al., 1993). Apesar do HAART durante a gestação controlar a replicação viral, o aumento das citocinas pró-inflamatórias na gestação, pode aumentar os riscos na gravidez, como parto prematuro, restrição de desenvolvimento do feto (PATEL et al., 2005). Por outro lado, a produção de citocinas imunomodulatórias, como a IL-10, $TGF-\beta$ e IL-13 podem inibir a replicação viral na infecção aguda (WEAVER et al., 2005; CLERECI et al., 1994). A IL-10

e o TGF- β , por induzirem um ambiente anti-inflamatório, podem colaborar na proteção do feto na cavidade uterina por bloquear a atividade lítica mediada pelas células uterinas citotóxicas como NK e T CD8. Ainda com relação à proteção que o microambiente placentário pode proporcionar ao feto, os macrófagos placentários mostram menores taxas de infecção pelo HIV-1 e menor replicação viral comparados com macrófagos derivados de monócitos, que pode representar um importante fator no controle da replicação viral e da transmissão vertical (LUCIANO-MONTALVO et al., 2008).

1.4 Receptores Toll Like expressos na placenta e a resposta anti-patógenos

Os TLRs são glicoproteínas integrais da membrana do tipo 1 que expõem para o meio extracelular repetições ricas em leucinas, flanqueadas por domínios ricos em cisteínas. Na região citoplasmática esses receptores apresentam um domínio TIR responsável pelo recrutamento de proteínas adaptadoras (O'NEILL, 2007). Após o reconhecimento TLR-ligante natural ou sintético ocorre à dimerização de proteínas TLRs na membrana plasmática, recrutamento de proteínas adaptadoras e indução de uma cascata de sinalização que leva à ativação de fatores de transcrição tais como NF κ B ou IRFs, o que resulta na produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias e interferons do tipo 1 (OZINSKY et al., 2000; HALLMAN et al., 2001).

Estudos recentes têm mostrado a expressão de 10 TLRs, seus correceptores e proteínas acessórias na placenta humana (ABRAHAMS et al., 2004). Além de estarem presentes em células do sistema imunológico que povoam a decídua, esses receptores também aparecem expressos nas células do trofoblasto extra viloso (EVTs) (ABRAHAMS et al., 2004). Mitsunari e colaboradores (2006) utilizando RT-PCR mostraram a expressão de TLR2, 3, 4, 5, 6 e 9 em células citotrofoblásticas e no sinciotrofoblasto, isoladas a partir de placenta a termo e cultivadas. Este achado sugere papéis para os TLRs na proteção do feto e na manutenção da gestação.

A expressão de TLRs pelo trofoblasto, no entanto, varia de acordo com a idade gestacional e estágio de diferenciação do mesmo. TLR-6, TLR-2 e TLR-4 são expressos no primeiro trimestre nas células citotrofoblásticas vilosas e extravilosas, mas não no sinciotrofoblasto, TLR-6 não é expresso no terceiro trimestre gestacional (ABRAHAMS et al., 2004; BEIJAR et al., 2006; RINDSJO et al., 2007). TLR-2 e TLR-4 são expressos pelo

sinciciotrofoblasto no terceiro trimestre da gestação e também por células endoteliais e macrófagos placentários (MA et al., 2007).

A capacidade de produção de citocinas e quimiocinas e a expressão de TLRs pelas células trofoblásticas tem sido os marcos de propostas incluindo estas células na modulação do sistema imunológico na interface materno-fetal. Koga e Mor (2010) demonstraram que as células trofoblásticas do primeiro trimestre gestacional expressam citocinas/quimiocinas constitutivamente tais como GRO- α , MCP-1 e IL-8, são capazes de recrutar monócitos/macrófagos, células NK(s) e neutrófilos (ABRAHAMS et al., 2004; MOR et al., 2005; FEST et al., 2007). Além disto, mostrou-se também que a produção de citocinas/quimiocinas trofoblásticas pode ser potencializada utilizando-se agonistas para TLR4 ou TLR2, o que conseqüentemente, gera um microambiente propício para um maior recrutamento de células imunológicas (SCHWANDNER et al., 1999).

Os fatores imunológicos produzidos pelo trofoblasto são capazes de modular as células imunológicas maternas, determinando sua diferenciação e estado de ativação. Por exemplo, monócitos/macrófagos incubados na presença de trofoblasto ativado pelo agonista *Poly (I:C)*, ligante de TLR3, mostram significante melhora na resposta a antígenos virais. O TLR-3 reconhece dsRNA viral e induz uma rápida e potente resposta inflamatória caracterizada pela produção de quimiocinas e de interferons do tipo I (ABRAHAMS et al., 2006). A produção de IFN- β é crítica para uma resposta antiviral, o que sugere que o trofoblasto após o reconhecimento de um vírus pode dar início a uma resposta antiviral clássica.

Ainda, o trofoblasto pode expressar fatores antimicrobianos como defensinas beta 1 e 3, a enzima SLPI (inibidora de protease secretada por leucócitos) que é um potente inibidor do HIV e indutor de lise bacteriana, a enzima 2',5'-oligoadenilato sintetase (OEA), o Myxovirus resistência-A (MxA) e a apolipoproteína B-3G (APOBEC3G). Todas estas moléculas têm um efeito direto sobre a resposta antiviral sugerindo que a atividade da placenta, e particularmente do trofoblasto pode evitar a transmissão de certas infecções virais para o feto (ABRAHAMS et al., 2006; MOR, 2008; KOGA et al., 2009). Estes estudos sugerem que o trofoblasto é capaz de reconhecer produtos bacterianos ou virais através de TLRs e podem induzir respostas diferenciais.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da via de sinalização de Toll-like receptors na secreção de citocinas e na produção de resposta funcional das células dendríticas mielóides e plasmocitóides de mães infectadas por HIV-1, sob terapia antirretroviral, e seus recém-nascidos.

2.1 Objetivos Específicos

- I. Analisar a ação dos agonistas de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR7/8 e TLR9 em células mononucleares da população em estudo na secreção de IFN- α , IL-10 e TNF- α ;
- II. Analisar a ação dos agonistas de intracelulares em células mononucleares da população em estudo na expressão de RNA mensageiro para TNF- α , IFN- α e IRF-7;
- III. Avaliar a ativação das vias TLR7, TLR8 e TLR9 na expressão de IFN- α e TNF- α intracelular, respectivamente, nas células dendríticas plasmocitóides e mielóides;
- IV. Avaliar a expressão de CD123, CD14/CD16, TLR8 e HLA-G no tecido placentário da população em estudo.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

- **Grupo de Estudo**

O grupo de estudo foi constituído por 15 parturientes infectadas pelo HIV com mediana de idade de 29,5 anos e seus respectivos recém-nascidos, ambos procedentes do Ambulatório de Obstetrícia do HC-FMUSP. O grupo controle foi formado por 15 mães saudáveis com mediana de idade de 28 anos e seus respectivos recém-nascidos. No momento do parto as parturientes saudáveis apresentaram sorologia negativa para HIV-1, para sífilis, hepatite B e C, toxoplasmose e outras doenças, conforme exames pedidos durante o pré-natal. As mães saudáveis foram procedentes da Maternidade do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e selecionadas de acordo com critérios da CAPPesq número 3784/09. Todos os partos foram realizados por cesárea eletiva.

- **Critérios de exclusão das Parturientes e seus respectivos cordões umbilicais**

Foram excluídos conjuntos de amostras de parturientes que apresentaram intercorrências clínicas ou obstétricas associadas a complicações pré e pós-operatórias (diabetes, hipertensão arterial, descolamento prematuro de placenta, placenta prévia, doenças do colágeno, entre outras patologias). As pacientes que apresentaram sinais ou sintomas compatíveis com quadro infeccioso de qualquer etiologia e localização, e amostras de sangue de cordão umbilical de bebês prematuros, ou pós-termo, também foram excluídas.

- **Grupo controle não gestante**

O grupo controle não gestante foi constituído por indivíduos do sexo feminino, infectados (n=4), ou não (n=4) por HIV-1. O grupo infectado por HIV-1 foi recrutado no Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias– ADEE 3002 do HC-FMUSP, CAPPesq número 3784/09, com idade adulta (mediana: 39 anos). O grupo controle não infectado por HIV-1 foi constituído por maiores de 18 anos (mediana 26 anos), estudantes e trabalhadoras do Laboratório de Investigação Médica LIM-56, da FMUSP.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Coleta das amostras

- **Sangue periférico:** Foram coletados, no dia da cesárea, em tubos heparinizados aproximadamente 30 mL de sangue periférico de parturientes infectadas pelo HIV-1 e controles saudáveis.

- **Sangue de cordão umbilical:** Aproximadamente 50 mL de sangue foram coletados em tubos heparinizados. A coleta de sangue das pacientes saudáveis foi obtida logo após a dequitação da placenta com auxílio de agulha e seringa descartáveis. Enquanto, as amostras de sangue de cordão das pacientes infectadas pelo HIV foram coletadas antes da dequitação da placenta com tubo de 50 mL autoclavado e heparinado. As amostras foram armazenadas a t.a. até serem transportadas ao laboratório. O soro foi coletado e estocado a - 70° C até a utilização.

3.2.2 Obtenção de células mononucleares

As amostras de sangue periférico foram diluídas em solução fisiológica, volume a volume em tubo de 50 mL. As suspensões das células mononucleares (CMN) foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 2000 rpm através de gradiente de Ficoll Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA). As células obtidas foram contadas em contador automático (CellDyn 1400, Abbott) e a viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripan e a concentração foi ajustada de acordo com o ensaio realizado.

3.2.3 Criopreservação das CMN(s)

Para a criopreservação, as CMN obtidas do cordão e do sangue periférico das mães, foram colocadas em solução de 10% de dimetil sulfoxido (Sigma) contendo 90% de soro fetal bovino (Sigma).

3.2.4 Indução de citocinas *in vitro* por agonistas de TLR 2, 3, 4, 7, 7/8 e TLR9

A capacidade dos agonistas de TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR7/ 8 e TLR 9 em induzir a produção de citocinas IFN- α , TNF- α e IL-10 de CMN(s) de parturientes infectadas pelo HIV-1 e de CMN de sangue de cordão umbilical e de controles não infectados por HIV-1. As CMN (2×10^5 /mL) foram diluídas em meio de cultura RPMI enriquecido (RPMI-S) com 5% de soro AB humano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado de

gentamicina (10 µg/mL). O volume de 100 µL da suspensão de CMN foi distribuído em microplaca de cultura com 96 orifícios (Costar) com 100 µL de solução dos agonistas para TLRs: Pam3Cks4 (TLR 2, 0,5 µg/mL), Poly I:C (TLR 3, 1 µg/mL), LPS purificado de *S. minnesota* (TLR 4, 1,25 µg/mL), Imiquimode e- R837 (TLR 7, 1,25 µg/mL), CL097 derivado de R848 (TLR7/TLR8, 2,5 µg/mL) e CpG (TLR9, 2µM/mL) por 48 hrs a 37°C em estufa de CO₂. Os ligantes de TLRs foram procedentes da InvivoGen (San Diego, CA, EUA), sendo que o CpG foi obtido da Eurofins. Os sobrenadantes foram coletados e as citocinas dosadas por citometria de fluxo (*cytometric bead array*).

3.2.5 Determinação de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* - CBA)

As dosagens de citocinas no soro e sobrenadantes de cultura estimuladas por 48 horas com os agonistas de TLR foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se os o sistema *flex set* para IFN-α, TNF-α, IL-10 (BD Pharmingen, CA, USA). Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300µL da solução de lavagem as amostras foram ressuspensas para as aquisições em citômetro de fluxo, LSR Fortessa (BD Biosciences). Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

Limites de detecção: IL-10 (0,13 pg/mL), TNF-α (1,2 pg/mL), IFN-α (1,5 pg/mL).

3.2.6 Indução da expressão de citocina intracelular em pDC e mDC por agonistas de TLR7/TLR7/8

A influência da ativação via TLR na expressão de IFN-α e TNF-α intracelular foi avaliado, respectivamente, nas subpopulações de DCs plasmocitóides e mielóides em CMN(s) de parturientes infectadas pelo HIV-1 e saudáveis e do cordão umbilical. As CMN(s) (2x10⁶/500µl) foram incubadas em microplacas de 48 orifícios (Costar) contendo RPMI suplementado com 5% de soro AB, em concentração pré-estabelecida dos ligantes de TLR-7 (Imiquimode), TLR7/8 (CL097) e TLR9 (CpG) por 20 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 5 horas de estímulo foi acrescentado o inibidor de secreção de proteína (10 µg/ml de brefeldina A, Sigma) e incubada por mais 15 horas. Posteriormente, as células foram

lavadas por duas vezes em PBS-soro albumina bovinas (SAB) 0.1% de azida sódica e marcada extracelularmente com anticorpos monoclonais para DCs. As DCs de origem mielóide foram identificadas como: células CD11c+, lineage 1- (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20 e anti-CD56) e HLA-DR+ e as DCs de origem plasmocitóide como: células CD123+, HLA-DR+ e lineage-. As mDCs foram avaliadas para expressão intracelular de TNF- α e as pDCs para IFN- α . Os anticorpos utilizados foram o isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) e aloficocianina (APC) com os seus respectivos controles isotípicos, procedentes da BD Biosciences (San Jose, CA). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS-SAB, fixadas e permeabilizadas em tampão (Fix Perm A e B, Caltag Lab. Inc) e incubadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α e anti-IFN- α (marcados com PE ou anticorpos isotípicos (BD Biosciences). As células foram ressuspensas em solução isotônica e o número relativo de cada população avaliado pela aquisição de 100.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (FacsCalibur). A análise e reanálise foi realizada obtidos foram analisados com o Programa Flowjo (Tree Star, INC., Ashland, OR, EUA).

3.2.7 Análise da indução de mRNA de IFN- α , IRF-7 e TNF- α por reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real (Real-Time PCR)

Para averiguar se a ativação das vias TLR 7/8 e TLR9 leva a expressão de IFN- α , IRF7 e TNF- α as CMN(s) obtidas do sangue periférico foram cultivadas RPMI-SAB em microplacas de 24 orifícios na presença ou não dos ligantes de TLRs intracelulares (CL097 ou CpG) a 37°C e 5% de CO₂ com o período de incubação de 4 horas, o qual foi determinado de acordo com a cinética realizada como etapa de padronização dos experimentos. A avaliação da expressão das citocinas e fator de transcrição foram por RT-PCR.

O RNA total obtido por protocolo padrão com reagente de Trizol foi mensurado com auxílio do espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Para a remoção do DNA genômico, o RNA total extraído foi incubado por 15 minutos em uma solução contendo: 2 μ L de desoxiribonuclease I purificada (DNase, Amersham Life Science), 2 μ L de solução tampão DNase 10X e água DEPEC (20 μ L q.s.p.). O bloqueio foi realizado com EDTA 25 mM, por 10 minutos, a 65°C. Para geração de cDNA por transcrição Reversa a partir do RNA total purificado foi utilizada a metodologia do kit Sensiscript RT Kit (Qiagen). Para a

realização da reação de amplificação em tempo real, para cada amostra, foram utilizados 1,5µL cDNA (10ng/µL), 10µL da solução *Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,4µL de *ROX Reference Dye*, 7,3µL de água ultrapura livre de Rnase/DNase e 0,4µL (10µM) dos *primers* sense e anti-sense. Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Invitrogen: **IRF7**-(sense 5'- TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA -3' antisense 5'- GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG -3'), **IFN-α** – (sense 5'- GACTCCATCTTGGCTGTGA -3', antisense 5'- TGATTTCTGCTCTGACAACCT -3'), **TNF-α** – (sense 5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3', antisense 5'- GCTTGAGGGTTTGCTACAACATG-3'). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGT -3', antisense 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3').

3.2.8 Imunoistoquímica e imunofluorescência

Os fragmentos de aproximadamente 1 cm² obtidos da placenta a termo de gestações normais e de gestantes infectadas pelo HIV-1 foram, lavados em PBS gelado e fixados em 2 % paraformaldeído em 0,1 M PBS, pH 7.2 por 4 a 6 horas. Cortes de 4 µm de espessura foram encaminhados para desparafinização (submersos em xilol por 5 minutos por 3 vezes) e reidratação (em série de concentrações decrescentes de etanol). A recuperação antigênica foi realizada com tampão de ácido cítrico 10 mM, pH 7,4, seguindo-se lavagem em água corrente. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais anti-CD123, TLR8, HLA-G e CD14/CD16 diluídos a 1:25 ou 1:50 em solução de albumina bovina fração V (SERVA.1930). Nas reações de imunoistoquímica, após a incubação com os anticorpos foram realizadas lavagens com PBS, uma segunda incubação foi realizada com o anticorpo secundário biotinilado e em seguida adicionou-se o complexo de amplificação Avidina-Biotina. As amostras de tecido foram reveladas com peroxidase e diaminobenzidina (DAB) por 2 a 3 minutos. Por fim, foram realizadas novas lavagens e a contra-coloração foi marcada com hematoxilina da Mayer por 5 minutos e a análise foi realizada em microscopia de luz convencional. Controles negativos foram utilizados omitindo-se o anticorpo primário da reação. Para as reações de Imunofluorescência, após a incubação com os anticorpos CD14 e CD16 foram adicionados os anticorpo secundários Alexa 546 (*red*) e Alexa 488 (*green*) ambos da marca Invitrogen. As amostras foram incubadas por 1 hora e depois deste período

foi adicionado diamidinophenylindole – DAPI (Invitrogen), após a incubação, as amostras foram armazenadas adequadamente e avaliadas por microscopia confocal. Os resultados obtidos foram analisados com os programas *Velocity* e *Imaje J*.

3.2.9 Análise estatística:

Para análise estatística foram utilizados testes não paramétricos, *Mann-Whitney* e *Wilcoxon*, respectivamente, para amostras não pareadas e pareadas. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparação de três grupos. O valor de *P* menor que 0,05 foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

Inicialmente para padronizar os métodos foram realizadas análises dos parâmetros imunológicos em um grupo de indivíduos do sexo feminino, infectados ou não pelo HIV-1, na condição não gestante. Os resultados obtidos com a padronização foram importantes para nos nortear quanto os testes a serem aplicados nas amostras maternas.

4.1 Resultados da padronização

4.1.1 Indução de citocinas por ligantes de TLRs em culturas de CMN(s) de indivíduos sadios

A padronização de cultura celular com os agonistas de TLRs para dosagem de citocinas por ELISA foi realizada com CMN(s) de indivíduos saudáveis do sexo feminino e não gestantes (n=8). Culturas de CMN(s) a 1×10^5 células/mL foram incubadas por 24 horas ou culturas de 2×10^5 células/mL por 48 horas foram avaliadas com diversas concentrações dos ligantes para TLRs: Pam3CKS4 (TLR2); Poly I:C (TLR3); duas preparações de LPS, uma de *E. coli* que contém ligante para TLR2 e TLR4 e outra de *Salmonella minnesota*, que contém apenas ligantes para TLR4; Imiquimode (TLR7); CL097 (TLR7/8), CpG (TLR9). Na ativação de TLR7 e TLR8, que estão relacionados com a resposta antiviral foi selecionado o IFN- α e para os demais ligantes o TNF- α .

A Figura 1 mostra a produção de IFN- α e TNF- α de culturas de CMN(s) na concentração de 2×10^5 células/mL, com os ligantes de TLRs por 48 horas de incubação, pois a menor concentração de células (1×10^5 células/mL) por 24 horas não induziu níveis de citocinas detectáveis. A concentração dos ligantes de TLR7 (1,25 μ g/mL) e TLR7/8 (2,5 μ g/mL) induziu elevados níveis de IFN- α em relação aos demais ligantes. A elevada produção de TNF- α , foi detectada com 0,5 μ g/mL do ligante de TLR2, 1 μ g/mL para TLR3, 0,01 μ g/mL para TLR2/4 (*Escherichia coli*) e 1,25 μ g para TLR4 (*Salmonella minnesota*). Os ligantes de TLR9 e o seu controle foram utilizados na concentração de 2 μ M, como descrito previamente (Futata et al, 2011).

Figura 1 - Citocinas secretadas por CMN(s) após ativação de TLR(s).

IFN- α e TNF- α determinados após cultura de 48 horas, com CMN(s) de controles saudáveis (n=8) estimulados com agonistas para TLR(s) 2-9. Os valores ilustram a média $\pm$ E.P., * $P \leq 0,05$ quando comparado com culturas sem estímulo (basal), # $P \leq 0,05$ a concentração que induziu superior produção.

Fonte: Cardoso (2013)

4.1.2 Dosagem de TNF- α no sobrenadante de culturas de CMN(s) de pacientes infectados por HIV-1 estimuladas com agonistas de TLRs

Posteriormente, a produção de TNF- α induzida por ligantes de TLRs foi analisada com CMN(s) de mulheres, não gestantes saudáveis (n=8) e infectadas e não infectadas por HIV-1 (n= 10) (Tabela I). Os indivíduos com carga viral indetectável (<50 cópias/mL), mostraram uma contagem de CD4 de 525 mm³ (mediana, n= 3) e as com CV detectável de 485 mm³ (n =5).

Os resultados mostram que CMN(s) cultivadas por 48 horas a secreção espontânea de TNF- α (Figura 2A), como também a induzida por ligante de TLR2/4 (Figura 2C) foi significativamente mais elevada nos indivíduos infectados por HIV-1 comparado ao grupo controle não infectado. Além disto, a ativação via TLR2(Pam3csk4), TLR2/4 (LPS de *E.coli*) e TLR4 (LPS de *S. minnesota*) induziram secreção de TNF- α somente no grupo controle comparado ao nível espontâneo (Figura 2D).

A Figura 2 (E-H) mostra a produção de TNF- α em resposta aos agonistas de TLRs intracelulares, os TLRs 3, 7, 7/8 e 9. O ligante de TLR3 (Poly I:C) induz níveis de TNF- α mais elevados no grupo HIV-1 que o grupo controle (Fig. 2A). Já os ligantes de TLR7, TLR7/8 e TLR9 (Imiquimode) induziram aumento de produção de TNF- α em relação ao nível basal somente no grupo controle (Figura 2B).

A secreção de TNF- α induzida pelos ligantes de TLRs dos indivíduos infectados por HIV-1 foram analisados quanto à correlação com o número de CD4, CD8 e de carga viral. Houve correlação de TNF- α somente com a CV dos pacientes. A Figura 2 (I-K) mostra a existência de correlação negativa entre os níveis de TNF- α estimulados pelo ligante de TLR7, TLR7/8e TLR9 com a CV dos pacientes dos sexos femininos não gestantes. Os dados mostraram elevada produção espontânea de TNF- α nos indivíduos infectados por HIV-1, contudo quando estimulado pelos ligantes de TLRs intracelular, exceto TLR3, é inversamente proporcional a CV.

Tabela I – Dados demográficos de pacientes femininos infectados por HIV-1

Amostras	CD4/mm ³	CD8/mm ³	CD4/CD8/m ³	NADIR	Carga Viral Cópias/mL	Sexo	Idade
5P	558	984	0,56707		215	F	41
6P	499	787	0,63405		<50	F	39
18P	458	1474	0,31		4562	F	49
19P	514	859	0,6		16632	F	21
20P	539	1123	0,48		8225	F	38
22P	22	468	0,047		<50	F	33
23P	124	822	0,15		<50	F	36
24P	590	1113	0,5		470	F	48
Máximo	1233	8143	1,8		26407	-	65
Mediana	512	682	0,56		509		41
Mínimo	284	495	0,045		50	-	21

Fonte: Cardoso, EC (2013).

Figura 2 – Indução de TNF- α por ligantes de TLRs e correlação com a carga viral de mulheres não gestantes infectadas por HIV-1

Secreção de TNF- α por CMN(s) de indivíduos infectados por HIV (n=8) induzido por (A) Pam3CSK4, agonista de TLR2, (B) Imiquimode, ligante de TLR7, (C) CL097, ligante de TL7/8, (D) CpG ligante de TLR9. Correlação de TNF- α induzida pelos agonistas (I) Imiquimode, (J) CL097 e (K) CpG com a carga viral.

Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.1.3 Padronização de indução de células dendríticas plasmocitóides secretoras de IFN- α em indivíduos controles

Os ensaios de padronização da expressão intracelular de IFN- α por pDC foram realizados após 20 horas de estímulo e o inibidor de secreção, a brefeldina A, foi adicionada com o agonista e após 2,5, 5 e 8 horas de incubação. As CMN(s) obtidas de controles sadios (n=3) foram estimuladas com Imiquimode ou CL097. A concentração de 1,25 μ g/mL do agonista e o tempo de incubação da brefeldina de 5 horas após o estímulo com o Imiquimode foi ideal para detectar a expressão de IFN- α em pDCs, já que a brefeldina adicionada após 8 horas de estímulo diminui o número de células secretoras (Figura 3A).

A concentração do agonista CL097 para a indução de expressão de IFN- α em pDCs foi padronizada para citometria de fluxo, nas concentrações do CL097, 1 μ g/mL e 5 μ g/mL, adicionando a brefeldina junto com o estímulo ou após 5 horas do estímulo. Apesar da pequena amostragem, a concentração de 5 μ g /mL do ligante de TLR7/8 e acrescentando a brefeldina 5 horas após o estímulo foi adequado para detectar as pDCs secretoras de IFN- α (Figura 3).

Figura 3 – Produção intracelular de IFN- α em pDCs após estímulo com Imiquimode e CL097

Avaliação por citometria de fluxo da produção (n=3) de IFN- α por pDC(s) estimuladas com (A) Imiquimode acrescentando a brefeldina após 2,5, 5 e 8 horas do estímulo e (B) adicionando brefeldina após 0 e 5 horas de estímulo com CL097.

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.1.4 Produção de IFN- α intracelular após estímulo com agonistas para TLRs em pDCs de indivíduos infectados por HIV-1

Iniciamos a avaliação da expressão intracelular de IFN- α por CMN(s) de pacientes infectadas ou não pelo HIV-1. As CMN(s) foram estimuladas com Imiquimode (TLR7) e CL097(TLR7/8) por 20 horas, acrescentando a brefeldina A após 5 horas de estímulo e as pDC foram avaliadas quanto a expressão de IFN- α . A Figura 4A ilustra a estratégia de análise para identificação de pDC HLA-DR⁺ lineage 1⁻ CD123⁺ IFN- α ⁺, estimuladas ou não com ligantes de TLRs (Figura 4A).

A Figura 4 mostra que há diminuição do número de pDC secretoras de IFN- α basal e após estímulo com Imiquimode/TLR7 (Figura 4C) e CL097/TLR7/8 (Figura 4D) em relação ao controle.

Figura 4 – Efeito da ativação via TLRs na produção de IFN- α por pDC.**A. Estratégia de análise**

(A) Dotplot ilustrativo da produção de IFN- α por pDC de CMN(s) de controle, não estimulada (basal) e após estímulo com Imiquimode (TLR7), CL097 (TLR7/8) e CpG (TLR9). Como estratégia de análise foi realizado um *gate* (PBMC) excluindo apenas linfócitos e debris, posteriormente, um novo *gate* (DC) em células HLADR⁺ e LIN⁻ para a análise da expressão de CD123 e IFN- α . As pDCs produtoras de IFN- α de mulheres infectadas (n=3) ou não por HIV-1 (n=7), na condição (B) basal e estimulado por (C) Imiquimode (TLR7) e (D) CL097 (TLR7/8). Resultados expressos em porcentagem. *P $\leq$ 0,05 quando comparado ao grupo controle; #P $\leq$ 0,05 quando comparado ao basal. Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.1.5 Efeito dos agonistas de TLRs 7 /8 e 9 na secreção de TNF- α em células dendríticas mielóides de indivíduos infectados por HIV e controles

Prosseguindo a avaliação dos agonistas relacionados à resposta antiviral, analisamos a produção de TNF- α de mDC induzida por ligantes de TLR 7/8 e 9 em mulheres, não gestantes, infectadas ou não por HIV-1 por citometria de fluxo. A Figura 5A ilustra a estratégia de análise para identificação de mDC HLA-DR⁺ lineage 1⁻CD11c⁺TNF- α ⁺, estimuladas ou não com ligantes de TLRs.

A Figura 5 (B-D) mostra que o percentual basal de mDC (CD11⁺, lineage 1⁻, HLA-DR⁺) secretoras de TNF- α de mulheres infectadas por HIV-1, foi significativamente menor comparado ao grupo controle não infectado (Figura 5B, C e D). A produção de TNF- α pelas mDC induzida pelo Imiquimode foi reduzida no grupo infectado por HIV-1 quando comparado ao grupo controle (Figura 5C).

Figura 5 - Efeito da ativação via TLRs na produção de TNF- α por mDC.

Foram avaliadas por citometria de fluxo, mDCs produtoras de TNF- α de mulheres não gestantes infectadas (n=3) ou não por HIV-1 (n=7 no gráfico aparece 5), na condição (A) não estimulada (basal) e estimulada por (B) Imiquimode (TLR7) e (C) CL097 (TLR7/8). Resultados são expressos em média. *P $\leq$ 0,05 quando comparado ao grupo basal; #P $\leq$ 0,05 quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.2 Resultados grupo de gestantes infectadas ou não por HIV-1

Após a etapa de padronização realizada com o grupo de mulheres não gestante, iniciamos a avaliação com a população de estudo: parturientes infectadas por HIV-1, seus recém-nascidos (RNs, cordão umbilical) e grupo controle constituído por parturientes e RN(s) saudáveis.

Tabela 2 – Dados demográficos de parturientes infectadas por HIV-1

Amostras	CD4/mm ³	CD8/mm ³	CD4/CD8/m ³	NADIR CD4/mm	Carga Viral Cópias/mL	Idade
1P	-	-	-	-	-	-
2P	793	566	1,4	793	<50	19
3P	345	760	0,45	384	<50	34
4P	183	398	0,45	183	111	17
5P	376	428	0,8	429	<50	35
6P	96	250	0,384	150	<50	18
7P	376	349	1,0	379	<50	33
8P	688	1053	0,65	700	<50	33
9P	854	801	1,06	854	<50	29
10P	856	705	1,21	856	<50	21
11P	200	390	0,51	204	<50	-
12P	333	428	0,77	333	<50	30
13P	801	856	0,93	802	<50	-
14P	600	700	0,8	602	<50	32
15P	300	1055	0,28	305	<50	25
Mínimo	96	250	0,45	150	<50	17
Máximo	856	1055	1,4	856	111	5
Mediana	376	633	0,785	406,5	-	29,5

Fonte: Cardoso, EC (2013)

Tabela 3 – Dados demográficos de parturientes não infectadas por HIV-1

Amostra	Idade	Tipo de parto
1	30	Cesário
2	27	Cesário
3	20	Cesário
4	31	Cesário
5	28	Cesário
6	33	Cesário
7	18	Cesário
8	27	Cesário
9	38	Cesário
10	28	Cesário
11	20	Cesário
12	29	Cesário
13	25	Cesário
14	31	Cesário
15	23	Cesário
Mediana	28	

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.2.1 Produção e secreção de citocinas após estímulo com agonistas para TLRs em gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

A dosagem de citocinas pró-inflamatórias como IFN- α , TNF- α e imunomodulatória como IL-10 foi realizada no soro e no sobrenadante de CMN(s) de parturientes infectadas pelo HIV-1 e RN(s) e grupo controle. As CMN(s) obtidos de sangue periférico e de cordão umbilical foram estimuladas com ligantes de TLRs, o sobrenadante foi avaliado por citometria de fluxo (*cytometric bead array, CBA*) e as células avaliadas quanto a frequência de pDCs secretoras de IFN- α e mDCs secretoras de TNF- α .

Avaliação sérica de IFN- α , TNF- α e IL-10

A Figura 6 mostra que os níveis de IFN- α , TNF- α e IL-10 séricos de amostras de mães infectadas por HIV e seus RN(s) e mães do grupo controle não foram detectáveis, exceto algumas amostras de IL-10 de RN controle.

Figura 6 – Avaliação sérica de IFN- α , TNF- α e IL-10

Os níveis séricos de IFN- α , TNF- α e IL-10, foram analisados por CBA. As amostras foram obtidas de sangue periférico de mães(M) infectadas por HIV e cordão (n=15) e grupo de mães saudáveis e RN (n=15). Limites de detecção: IL-10 (0,13 pg/mL), TNF- α (1,2 pg/mL), IFN- α (1,5 pg/mL).

Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.2.2 Avaliação da secreção de IL-10 após estímulo de CMN(s) com agonistas para TLRs em gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

Os níveis espontâneos de IL-10 foram superiores no grupo de mães e RN(s) controle em relação ao grupo de mães infectadas por HIV (Figura 7A). Após ativação por ligantes de TLRs extracelulares (Figura 7B-D), para TLR 2, 4 e 5, houve baixa produção de IL-10 no grupo de mães infectadas por HIV em relação aos controles, entretanto a secreção entre os RN(s) foram similares.

A indução de IL-10 pelos ligantes de TLR intracelulares (Figura 7E-H), foi diminuída para os ligantes de TLR3, 7,9 em mães infectadas pelo HIV-1 e também seus RN(s) quando comparado aos respectivos controles. Os resultados evidenciaram que para o ligante CL097, a produção de IL-10 do grupo HIV é similar ao grupo controle.

Em relação aos níveis basais, somente os RN(s) de mães infectadas aumentam a secreção de IL-10 após o estímulo com os ligantes de TLR2, 4 e 7/8, o que mostra um diferente perfil de resposta em relação aos RN(s) de mães controles.

Figura 7 – Efeito da ativação via TLRs na secreção de IL-10 de mães e recém-nascidos.

Foram avaliadas em CMN(s) de sangue periférico de mães infectadas por HIV-1 e seu cordão umbilical (n=15) e grupo controle (n=15), não estimulado (basal) e estimulado por agonistas de TLRs extracelulares (TLR2, TLR4 e TLR5) e agonistas de TLRs intracelulares (TLR3, TLR7, TLR7/8 e TLR9) foram avaliados por CBA. Resultados expressos em média de porcentagem. *P≤0,05 quando comparado ao grupo controle; #P≤0,05 quando comparado ao basal.

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.2.3 Avaliação da secreção de TNF- α de CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

Prosseguimos a análise da citocina pró-inflamatória, TNF- α , induzida por ligantes de TLRs extracelulares (TLRs 2, 4 e 5) e intracelulares (TLRs 3, 7, 8 e 9) por 48 horas de cultura.

Os resultados que produção de TNF- α das parturientes infectadas por HIV seja espontânea e após estímulo com os ligantes de TLRs foi significativamente mais baixa nas comparado ao grupo controle, exceto para os ligantes de TLR4 e TLR7/8 (Figura 8). Chama atenção que entre os grupos de RN(s), a secreção de TNF- α que foi similar para a maioria dos estímulos, entretanto, a ativação via TLR 7/8 aumentou a produção no grupo de RN(s) de mães infectadas em relação ao grupo de RN(s) controle (Figura 8 G).

Em relação aos níveis basais, a ativação pelas vias TLR2 (Pam₃csk₄) e TLR4(LPS de *S. minnesota*) induz significante aumento da produção de TNF- α somente no grupo de mães infectadas por HIV e seus recém-nascidos (Figura 8 B e C).

Os resultados indicam pronunciada secreção de TNF- α por CMN(s) de mães infectadas por HIV e RN(s) aos estímulos via TLR2, TLR4 e TLR7/8. Similarmente ao perfil de secreção de IL-10.

Figura 8 – Efeito da ativação via TLRs na secreção de TNF- α de mães e recém-nascidos.

Foram avaliadas em CMN(s) de sangue periférico de mães infectadas por HIV-1 e seu RN(s) (n=15) e grupo controle (n=15), não estimulado (basal) e estimulado por agonistas de TLRs extracelulares (B-D) e agonistas de TLRs intracelulares (E-H) foram avaliados por CBA. Resultados apresentados em mediana porcentagem. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ quando comparado ao basal.

Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.2.4 Avaliação da secreção de IFN- α por cultura de CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

A secreção de IFN- α por CMN(s) de mães infectadas pelo HIV-1, seus RN(s) e grupo controle (mãe-RN), foram estimuladas com ligantes de TLRs e analisadas para a secreção de IFN- α por CBA.

A ativação dos TLRs extracelulares com Pam₃cks₄ (TLR 2), *S. minnesota*(TLR4) e flagelina(TLR5) não induzem a secreção de IFN- α nos grupos de mães infectados ou não por HIV-1 ou seus RN(s) (dados não mostrados). Entre os agonistas de TLRs intracelulares, o Poly I:C (TLR3) não induz níveis detectáveis de IFN- α (Figura 9B). Já a ativação com Imiquimode (TLR7), CL097(TLR 7/8) e CpG (TLR9) mostra diminuição significativa dos níveis de IFN- α das mães infectadas por HIV-1 em relação às mães controles (Figura 9C-E). No grupo de RN(s) de mães infectadas por HIV-1, há uma diminuição da secreção induzida pelo ligante de TLR7/8 em relação ao grupo de RN controle (Figura 9D).

Quanto aos níveis de secreção de IFN- α entre as mães e RN(s), houve menor produção de IFN- α dos RN(s) comparado às mães saudáveis, mas devido ao baixo nível de secreção de IFN- α das mães infectadas, não foi observado alteração da secreção em relação ao RN(s) (Figura 9).

Os resultados mostram que os ligantes de TLRs intracelulares induzem reduzida secreção de IFN- α de mães infectadas por HIV-1 e RN(s).

Figura 9 – Efeito da ativação via TLRs na secreção de IFN- α de mães e recém-nascidos.

Foram avaliadas em CMNs de sangue periférico de mãe infectadas por HIV-1 e seu recém-nascido (n=15) e grupo controle (n=15), (A) não estimulado (basal) e estimulado por agonistas de TLRs intracelulares (B) Poly I:C, (C) Imiquimode, (D) CL097 (E) CpG quanto a secreção de IFN- α por CBA. Resultados expressos por mediana * $P \leq 0,05$ quando comparado ao basal; # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.2.5 Avaliação da expressão de RNA mensageiro de IRF-7, IFN- α e TNF- α em CMN(s) de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

O CL097 teve um papel de estimulação induzindo a expressão de RNAm para IRF-7, o IFN- α e TNF- α sendo semelhantes entre os grupos, confirmando o potencial de ativação TLR7/8 Figura. O agonista CpG inibiu a expressão de RNAm de IRF-7, IFN- α e TNF- α em RN(s) de mães infectadas por HIV-1 a expressão de RNAm de TNF- α também foi reduzida nas mães infectadas pelo vírus (Figura 10).

Figura 10 – A expressão de IRF-7, IFN- α e TNF- α em CMN(s) avaliadas por PCR

CMN(s) de sangue periférico de mães infectadas pelo HIV- 1 e no sangue dos seus cordões umbilicais (RN) (n = 15). Nas condições não estimuladas (basal) e estimuladas por agonistas intracelulares de TLRs (TLR7 / 8 e TLR9). Estes fatores foram quantificados após 4 horas de estímulo. Resultados expressos em média de porcentagem.* $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ quando comparado ao basal.

4.2.6 Avaliação da expressão de $TNF-\alpha$ em mDC de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

Na sequência avaliamos a resposta aos agonistas Imiquimode (TLR7), CL097 (TLR7/8) e CpG (TLR9) pela expressão intracelular de $TNF-\alpha$ em células dendríticas mielóides (mDC) de mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos, comparado ao grupo controle saudável (mãe-RN). A Figura 10 ilustra a estratégia de análise para identificação de mDC $HLA-DR^+$ lineage 1 $CD11c^+TNF-\alpha^+$, estimuladas ou não com os ligantes de TLRs. O dotplot evidência a produção de $TNF-\alpha$ de amostra materna controle, expressos nos quadrantes em porcentagens (Figura 11 A).

A Figura 10B mostra que o percentual basal de mDC secretoras de $TNF-\alpha$ de mães infectadas por HIV e de seus cordões umbilicais está significativamente diminuído em relação ao grupo controle saudável. O percentual basal de mDC secretoras de $TNF-\alpha$ é semelhante entre mães e RN(s) do grupo controle.

Além disto, o grupo materno infectado por HIV-1 mostra uma significativa diminuição de mDC secretores de $TNF-\alpha$ em resposta ao Imiquimode (TLR7) e ao CpG (TLR9) comparado ao grupo controle (Figura 11 B, C e E).

Os dados evidenciam um elevado percentual de mDC secretores $TNF-\alpha$ em mães e RN(s) saudáveis, que não se alteram em função do estímulo aos agonistas de TLRs. Já as mDCs de mães infectadas por HIV e RN(s) são capazes de secretar $TNF-\alpha$ em resposta ao estímulo CL097 (Figura 11D).

Figura 11 – Análise da ativação via TLRs na produção de TNF- α por mDC de mães e seus RN(s).

A. Dotplot ilustrativo

A) Dotplot ilustrativo da produção de TNF- α por mDC do sangue periférico de controles mães saudáveis e mães infectadas pelo HIV-1. As CMNs foram cultivadas na condição não estimulada (basal) e estimulada por Imiquimod (TLR7), CL097 (TLR7/8) e CpG (TLR9). Gráficos demonstrando a quantificação da produção de TNF- α por mDCs de controles maternos saudáveis, de mães infectadas pelo HIV-1 e de sangue umbilical pertinente aos seus RNs nas condições (B) basal e estimulado por (C) Imiquimode (TLR7) e (D) CL097 (TLR7/8) e (E) CpG. Resultados expressos em porcentagem. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ quando comparado ao basal.

4.2.7 Avaliação da expressão de IFN- α em pDC de gestantes infectadas pelo HIV-1 e grupo controle

Como foi verificado alteração na secreção de IFN- α por determinados agonistas de TLRs nas parturientes infectadas pelo HIV-1, realizamos a avaliação da expressão intracelular de IFN- α por células dendríticas plasmocitóides (pDC) por citometria de fluxo. As CMN(s) de mães infectadas pelo HIV-1, RN(s) e o grupo controle materno saudável (mãe-RN) foram estimuladas com Imiquimode (TLR7), CL097(TLR7/8) e CpG (TLR9). Após 5 horas de incubação foi acrescentado a brefeldina A e a expressão de IFN- α em pDC foi avaliada após 20 horas de incubação. A Figura 12A ilustra a estratégia de análise para identificação de pDC HLA-DR⁺ lineage 1⁻ CD123⁺ IFN- α ⁺, estimuladas ou não com ligantes de TLRs.

A Figura 12 (A) mostra que as amostras de mães infectadas por HIV e seus cordões umbilicais, apresentaram diminuição espontânea da frequência de pDC secretoras de IFN- α em relação aos controles. Além disto, as mães infectadas pelo HIV-1 e os RN mostraram significativa diminuição do percentual de pDCs IFN- α ⁺ após estímulo com Imiquimode/TLR7 (Figura 12C), CL097/TLR7/8 (Figura 12D) e CpG/TLR9 (Figura 12E) em relação ao controle.

O grupo materno saudável mostrou aumento do percentual de pDC secretoras de IFN- α após estímulo com CL097 (Figura 12B) e com CpG (Figura 12E) em relação a condição basal. Já as amostras de cordão umbilical mostraram aumento do percentual de pDC IFN- α ⁺ para Imiquimode, CL097 e CpG.

Os resultados mostraram que a reduzida produção de IFN- α pelas CMN(s) em resposta aos TLRs intracelulares de mães infectadas por HIV e RN(s) é coincidente com a diminuição da frequência de pDC secretores de IFN- α . Além disto, é possível estimular a secreção de IFN tipo I de pDC do cordão de mãe saudável, pela estimulação via TLR7, 8 e 9.

Figura 12 – Análise da ativação via TLRs na produção de IFN- α em pDC de mães e RNs**A. Dotplot ilustrativo**

(A) Dotplot ilustrativo da produção de IFN- α por pDC do sangue periférico de controles mães saudáveis e Mães infectadas pelo HIV-1. As CMN(s) foram cultivadas na condição não estimulada (basal) e estimulada por Imiquimode (TLR7), CL097 (TLR7/8) e CpG (TLR9). Gráficos demonstrando a quantificação da produção de IFN- α por pDC(s) do sangue periférico de controles maternos saudáveis, de Mães infectadas pelo HIV-1 e do sangue umbilical pertinente aos seus RN(s) nas condições (B) basal e estimulado por (C) Imiquimode (TLR7) e (D) CL097 (TLR7/8) e (E) CpG. Resultados expressos em porcentagem. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ quando comparado ao basal.

Fonte: Cardoso, EC (2013)

4.3 Avaliação da face decidual e fetal de placentas de mães infectadas ou não por HIV-1

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune do binômio mãe-RN na infecção por HIV-1, passamos a investigar a interface materno-fetal, ou seja, o microambiente placentário. Desta forma, os tecidos placentários foram avaliados quanto a sua morfologia, usando coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e por imunoistoquímica para identificação da expressão de CD123, TLR8 e HLAG e por imunofluorescência a expressão de CD16/CD14. Esta etapa foi realizada no laboratório do Professor Gil Mor, na Universidade de Yale e da Professora Mirian Sotto da Universidade de São Paulo.

4.3.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1

A análise histológica das vilosidades coriônicas e decídua de mães infectadas por HIV-1 foram avaliadas pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), sendo comparadas com tecido placentário de mães saudáveis. As amostras de mães infectadas mostraram que a morfologia destas estruturas está preservada (Fig. 13). A grande maioria dos núcleos mostrou estrutura morfológica normal e ausência de pontos de necrose. A morfologia do sinciotrofoblastos e macrófagos (células fetais Hofbauer), assim como células eritrocíticas também foram preservados nos tecidos de placentas de mães infectadas por HIV-1.

Figura 13 – Coloração por HE da face decidual e fetal

Placentas de gestações a termo de mães infectadas (A, C e E) ou não pelo HIV-1 (B, D e F) objetiva 20X.

Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.3.2 Expressão de CD123 em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1

Para avaliar a presença de células imunes na interface materno-fetal, iniciamos o estudo analisando a expressão de CD123 por imunohistoquímica. O CD123 é receptor da cadeia alfa de IL3, e está expresso em pDCs, macrófagos, vasos sanguíneos. As avaliações foram realizadas na decídua e no vilo de placentas de mães infectadas (n=6) por HIV-1 e controles não infectados (n=6).

A Figura 14 mostra a expressão de CD123 na face decidual de mães infectadas por HIV-1 (Figura 14A) e mães não infectadas (Figura 14 B). A expressão de CD123 foi mais intensa no tecido decidual de mães infectadas comparadas às mães controles (figura 15). O vilo não apresentou expressão de CD123 (dados não mostrados).

Figura 14 – Detecção da expressão de CD123 por imunoistoquímica na face decidual

Placentas de gestações a termo de mães infectadas (A) ou não pelo HIV-1 (B) objetiva 80X.
Fonte: Cardoso, EC (2014)

Figura 15 – Quantificação da expressão de CD123 na face decidual

Placentas de gestações a termo de mães infectadas ou não pelo HIV-1. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo.

Fonte: Cardoso, EC (2014).

4.3.3 Expressão de TLR8 em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1

Após avaliação da expressão de CD123 na interface materno-fetal, iniciamos o estudo analisando a expressão de TLR8 na decídua e no vilo de placentas e mães infectadas (n=6) por HIV-1 e controles não infectados (n=6).

A Figura 12 mostra a expressão de TLR8 na face fetal de mães infectadas por HIV-1 (Figura 16 A, C) e mães não infectadas (Figura 16 B, D). A expressão de TLR8 é mais intensa no vilo de mães infectadas comparadas às mães controles (Figura 17). Além disto, a decídua de mães infectadas também mostrou maior expressão de TLR8 comparado às decíduas de mães controles.

Figura 16 – Detecção da expressão de TLR8 por imunistoquímica na face decidual

Placentas de gestações a termo de mães infectadas ou não pelo HIV-1 (A) controle negativo de TLR8 (B) amostras positivas para TLR8, objetivas 80X.

Fonte: Cardoso, EC (2014)

Figura 17 - Quantificação da expressão TLR8 na face decidual e no vilo

Placentas de gestações a termo de mães infectadas ou não pelo HIV-1. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $P \leq 0,05$ comparando CD123 com HLA-G.
Fonte: Cardoso, EC (2014).

4.3.4 Expressão de CD14/CD16 em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1

A expressão de CD14/CD16 foi avaliada por imunofluorescência na decídua e vilo de mães infectadas (n=6) por HIV-1 e controles não infectadas (n=6). O CD14 e CD16 caracterizam-se por serem marcadores de monócito/macrófagos. A figura 19 evidencia que a expressão de CD14 parece ocorrer com maior intensidade no tecido placentário (vilo) de mães infectadas por HIV-1, pois quando avalia-se a expressão dos dois marcadores observa-se que as células duplo positivas de placentas infectadas apresentam visualmente maior expressão de CD14. Os resultados sugerem que as mães infectadas por HIV-1 podem apresentar no vilo maior expressão e intensidade de fluorescência deste marcador. Diferente da decídua cuja expressão de CD14 parece ser mais expresso em mães infectadas por HIV-1 (Figura 18).

Figura 18 – Detecção da expressão de CD14/CD16 por imunofluorescência na face decidual

A. Decídua

Placentas de gestações a termo de mães infectadas (A e C) ou não (B e D) pelo HIV-1, nas objetivas de 10X (A e B) e de 40X (C e D).

Fonte: Cardoso, EC (2013).

Figura 19 – Detecção da expressão de CD14/CD16 por imunofluorescência no vilo.

A. Vilo

Placentas de gestações a termo de mães infectadas (A e C) ou não (B e D) pelo HIV-1, nas objetivas de 10X (A e B) e de 40X (C e D).

Fonte: Cardoso, EC (2013).

4.3.5 Expressão de HLA-G em cortes de tecido placentário de mães infectadas por HIV-1

Em seguida foi avaliada a expressão de HLA-G na decídua e vilo de mães infectadas (n=6) por HIV-1 e controles não infectados (n=6). A figura 20 evidencia que a expressão de HLA-G ocorre preferencialmente na face decidual. Esta expressão foi maior nas placentas de gestantes portadoras do HIV-1 quando comparado ao grupo controle (Figura 20 e 21).

Figura 20 - Detecção da expressão de HLA-G por imunistoquímica na face decidual e fetal.

Placentas de gestações a termo de mães infectadas (A, e B) ou não pelo HIV-1 (E e D), objetiva 40X. EC (2013).

Fonte: Cardoso,

Figura 21 - Quantificação da expressão de HLA-G na face decidual.

Placentas de gestações a termo de mães infectadas ou não pelo HIV-1. * $P \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Resposta Inata na infecção por HIV

A transmissão placentária do HIV-1 é o resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos do vírus e gestação. Embora o HIV-1 provoque um importante dano no sistema imune adaptativo, o qual domina o cenário durante a infecção crônica, outros componentes do sistema imunológico, como a resposta imune inata também podem ser afetados (MOGENSEN et al., 2010). Durante a gestação o grau de comprometimento da resposta imune inata com HIV-1 em mães infectadas sob supressão da replicação viral pela terapia antirretroviral não é clara e pouco explorada. Este dado poderia ser crucial para compreender os mecanismos envolvidos na manutenção da gestação e proteção do feto com relação à infecção viral, assim como desenvolvimento imunológico de crianças que foram expostas ao HIV-1 durante a gestação.

Com isto foi proposto no presente trabalho avaliar a ativação via os receptores Tolls (TLR), extracelulares e intracelulares, com ênfase nos agonistas de TLR7 e/ou 8 na resposta funcional das células dendríticas mielóides e plasmocitóides de mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos, ambos sob terapia antirretroviral. A gestação é um fenômeno único no qual se evidencia três fases imunológicas distintas, a placentação e implantação período que requer forte resposta inflamatória (LOKE; KING, 2000; MOR, 2008) desenvolvimento fetal caracterizado por um período anti-inflamatório no momento do parto, que há um influxo de células imunes para miométrio, promovendo a recrudescência de um processo inflamatório (LOKE; KING, 2000; MOR, 2008). Em nosso estudo as amostras de sangue periférico, de sangue cordão umbilical e tecido placentário foram obtidos logo após o último trimestre de gravidez depois da parturição, tendendo a um perfil mais inflamatório. Com isso se fez necessário realizarmos a padronização dos experimentos com um grupo feminino não gravídico infectado ou não por HIV-1, para delimitar melhor eventos pertinentes a gestação e acontecimentos referentes à infecção pelo HIV-1 ambos sob estímulo da via de TLR 7 e ou 8.

Os testes de padronização foram realizados com um grupo não gestante com CMN(s) estimuladas com agonistas de TLRs (Pam3CKS4 (TLR2), Poly I:C (TLR3), duas preparações de LPS *E.coli*, uma que contém ligante para TLR2 e TLR4 e outra de *S.minnesota*, que contém apenas ligantes para TLR4; Imiquimode (TLR7); CL097 (TLR7/8) e CpG (TLR9), após 48 horas foram avaliados a secreção de TNF- α por ELISA.

Os resultados mostraram que a secreção espontânea de TNF- α como também a induzida por ligante de TLR2/4 foi significativamente mais elevada nos indivíduos infectados por HIV-1 comparado ao grupo controle não infectado. Estudos têm descrito que indivíduos

infectados por HIV-1 produzem elevados níveis de TNF- α por macrófagos infectados pelo vírus (LAHDEVIRTA et al., 1988). Por outro lado, alguns trabalhos descrevem que os inibidores de protease do HIV-1 têm a habilidade de induzir a produção de TNF- α e IL-6 por macrófagos (ZHOU et al., 2007). Além disto, a ativação via TLR2 (Pam3csk4), TLR2/4 (LPS de *E.coli*) e TLR4 (LPS de *S. Minnesota*) induz aumento da secreção de TNF- α somente no grupo controle. Quanto ao aumento secreção a partir da indução com agonistas para TLRs é possível que as células infectadas ou não possam estar anérgicas à sinalização via TLRs, como ocorre na infecção pelo HIV-1 com a produção de TNF α , IL-6 e IL-12 (ZIEGLER-HEITBROCK, 1995; WITTMANN et al., 1999). Na infecção crônica pelo HIV-1, também ocorre ativação imune sistêmica, possivelmente devido aos níveis aumentados de LPS circulantes, que translocam do trato gastrointestinal, em decorrência do aumento da permeabilidade intestinal (BRENCHLEY et al., 2006).

Em nossos achados chama atenção que a produção de TNF- α em resposta ao ligante de TLR3 foi mais pronunciada nas mulheres infectadas por HIV-1. O ligante natural de TLR3 é a dupla fita de RNA viral, e possui uma via de sinalização, independente de MyD88 o que difere dos demais TLRs, mas que utiliza a proteína adaptadora, TRIF/TICAM1 que leva a produção de IFN- β e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Os hormônios esteroides sexuais devem influenciar na regulação da inflamação ou imunidade, não somente na regulação da transcrição gênica, como também na sinalização dos receptores de padrões de reconhecimento de patógenos (HUGHES et al., 2008). Já os ligantes de TLR7, TLR7/8 e TLR9 (Imiquimode) induziram aumento de produção de TNF- α em relação ao nível basal somente no grupo controle.

A secreção de TNF- α induzida pelos ligantes de TLRs dos indivíduos infectados por HIV-1 foram correlacionados com o número de células T CD4⁺, CD8⁺ e carga viral. Observamos correlação inversa da secreção de TNF- α somente com a carga viral CV, ou seja, quanto maior a produção de TNF- α induzido pelo ligante de TLR7 e TLR7/8 menor é a CV dos pacientes. O aumento da produção de TNF- α nos pacientes com a ativação via TLR7 e/ou TLR7/8 pode refletir na ativação de células efectoras, como as células T citotóxicas, devido a menor CV do paciente. Além disto, o TNF- α pode inibir a replicação do HIV-1 induzindo a produção de MIP-1 α e RANTES, os quais podem bloquear a entrada do vírus na célula do hospedeiro, pois competem pelo mesmo sítio de ligação que o HIV -1 (BERGER et al., 1999). Variantes genéticos de quimiocinas e seus receptores que naturalmente ocorrem no hospedeiro

influenciam na progressão da infecção pelo HIV-1 para a aids e a resposta imune ao HIV-1 (REICHE et al., 2007).

Os ligantes para TLR7, 7/8 e 9 não induziram a secreção de TNF- α em CMN(s) de pacientes infectados por HIV-1, evidenciando a importância de averiguar-se a produção desta citocina em subpopulações específicas de DCs. Frente a estes resultados iniciamos a avaliação do potencial dos ligantes Imiquimode e CL097, em induzir a produção de TNF- α e interferon tipo I, especificamente o IFN- α . Para tanto, avaliamos a produção intracelular destas citocinas em, respectivamente, mDC e pDCs. O grupo feminino não grávidico infectado por HIV-1 mostrou diminuição da percentagem de células pDCs IFN- α e mDC TNF- α , nos níveis espontâneos e após estímulo com agonista de TLRs, em relação ao grupo controle saudável. Estes resultados corroboram com estudo que evidenciou diminuição do número de pDCs circulantes e escassez da produção de IFN- α durante a infecção pelo HIV-1 (MULLER-TRUTWIN; HOSMALIN, 2005).

Em resumo, os resultados obtidos na padronização revelaram que na infecção pelo HIV-1 há uma deficiente resposta de TNF- α aos agonistas de TLRs intracelulares (7, 8 e 9). Além disto, a secreção de TNF- α foi inversamente correlacionada com a CV, a qual foi indetectável abaixo de 50 cópias/mL, em 37.5% dos pacientes confirmando a restauração imunológica. Similarmente, pacientes com CV detectável foi detectado uma produção intracelular de TNF- α e IFN- α inferior em relação ao grupo controle saudável. Embora os resultados referentes à produção de TNF- α , a partir da indução via TLR7, 8 e 9, tenham corroborado com resultados pertinentes a secreção desta citocina após ativação com estes agonistas, a produção espontânea difere. A frequência do número basal de mDC produtoras de TNF- α em pacientes infectados por HIV-1 foi inferior ao grupo controle, diferente dos resultados pertinentes à secreção basal de CMN(s), tal fato pode ser explicado pela existência de outras populações celulares que estejam contribuindo na secreção de TNF- α . Outros trabalhos mostraram que um candidato bastante pertinente a esta situação seriam os monócitos, os quais podem estar infectados pelo vírus e responsável pela produção elevada de TNF- α na infecção pelo HIV-1 (LAHDEVIRTA et al., 1988).

Esses resultados preliminares relacionados à produção de resposta antiviral por mDCs e pDCs nortearam nossos estudos no grupo gestante.

Resposta imune inata do binômio mãe –RN na infecção por HIV-1

O grupo de gestantes infectadas por HIV-1 em tratamento com antirretrovirais, com mediana de células T CD4⁺ de 406,5 mm³ e 86% possuíam CV indetectável/<50 cópias/mL. Todos os RN(s) também foram tratados e 87% apresentaram sorologia negativa para o HIV-1 aos 15 meses de vida. Contudo, mesmo na ausência deste tratamento, há descrição que 60-70% de recém-nascidos não se infectam, assim, é possível que além de fatores genéticos, os fatores imunológicos devem estar operantes para contribuir na proteção às infecções virais em fase precoce de vida. Principalmente, a resposta inata é fundamental neste período de vida, já que qualitativamente a resposta adaptativa é menos intensa em relação aos adultos. Com isso, os parâmetros iniciais avaliados foram a dosagem no soro de citocinas relacionadas à resposta antiviral e no sobrenadante de cultura de células estimuladas com agonistas de TLR2-9.

Inicialmente, realizamos a dosagem das citocinas pró-inflamatórias como IFN- α e TNF- α e de citocina imunomodulatória como IL-10 nos soros dos grupos de estudo. As citocinas foram detectáveis apenas no grupo saudável, onde a IL-10 foi identificada em 7% das mães e 27% dos RN(s), e TNF- α foi encontrado em 20% das mães e RN(s) não infectadas.

Os experimentos com cultura de CMN(s) mostraram que mães infectadas por HIV-1 e seus recém-nascidos têm diminuída produção de TNF- α basal e após estimulação com agonistas de TLRs extracelular, de TLR2 (Pam3cks4) e TLR5 (flagelina), e para os agonistas de TLR intracelular relacionada com a resposta antiviral, como TLR3 (Poly IC) , TLR7 (Imiquimode) e TLR9 (CpG) em relação a mãe não infectada. Uma possível explicação para o decréscimo pronunciado na capacidade de resposta TLRs, poderia estar relacionado com os distúrbios relacionados à infecção crônica do HIV-1 associado com os mecanismos imunorregulatórios responsáveis pela proteção do feto e manutenção da gestação (MOLD et al., 2008; BURLINGHAM, 2009). Nos pacientes não gestantes foi observado um aumento da produção espontânea de TNF- α . Em pacientes virêmicos, há aumento da responsividade aos ligantes de TLR , pois os ligantes expressos e codificados pelo vírus são reconhecidos por TLR e podem contribuir diretamente para a ativação imune que ocorre na infecção pelo HIV-1 (LESTER et al., 2008). Neste caso, as mães foram submetidas ao tratamento com HAART, sendo que 86% apresentaram CV indetectável e nadir da contagem de T CD4 de 406,5 células / μ l durante a gestação. Em conjunto, com esses dados e o perfil imunológico gestacional podem ter contribuído para um baixo potencial de resposta para alguns ligantes de TLRs nas

mães infectadas por HIV-1. Esses eventos sugerem que na gestação há um mecanismo preponderante de tolerância para evitar a exacerbação da resposta inflamatória.

No entanto, verificou-se que a secreção de TNF- α está preservada para TLR4 (LPS) e TLR7 / 8 (CL097) nas mães infectadas por HIV-1. É possível que a via de sinalização de TLR4 pode estar parcialmente efetiva em função da reconstituição de resposta imunológica proporcionada por HAART (BENITO et al., 2005; ROSENBLATT et al., 2005). Já que a ativação imune ocorre devido à translocação microbiana intestinal (BRENCHLEY et al., 2006).

Curiosamente, recém-nascidos de mães infectadas pelo HIV-1 produzem TNF- α em níveis similares aos de adulto, e tem resposta pronunciada para o agonista de TLR7/8 comparado aos RN(s) de controles saudáveis. Tem sido descrito que o recém-nascido possui uma seletiva deficiência de TNF- α na ativação TLR com antígenos bacterianos lipopeptídeos, LPS, e os compostos de imidazoquinolina, imiquimode, e preservados para R-848 (LEVY, O. et al., 2004) (LEVY et al., 2006). Além disto, o ligante de TLR7/8 induz resposta equivalente no sangue de recém-nascido e adulto. Em humanos, o agonista de TLR8 é capaz de ativar respostas coestimuladoras em APC neonatal (LEVY et al., 2006), o que pode representar uma estratégia como adjuvante para estimular a imunidade inata e adaptativa do recém-nascido.

O binômio mãe-recém-nascido infectado por HIV-1, secreta baixo nível de IL-10 quando as CMN(s) são induzidas por agonistas extracelular ou intracelular TLRs, contudo, mostra uma importante resposta para o ligante de TLR7/8. Isso evidencia a eficácia do agonista CL097 para induzir citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias e para potencializar a resposta do recém-nascido na secreção de citocinas. Curiosamente, verificou-se que a produção de IL-10 por CMN(s) é realizada somente por mães infectadas por HIV-1 quando as contagens de células T CD4 > 350mm³ (anexo1), evidenciando que o aumento/equilíbrio da população de células T CD4 + está associado com a secreção de IL-10. O aumento da secreção de IL-10 parece ser uma peculiaridade, uma vez que este efeito não foi visto para outras citocinas, como o TNF- α e IFN- α . Por outro lado, as CMN(s) de mães infectadas quando induzidas por CL097 têm uma correlação positiva entre a IL-10 e TNF- α . Estes dados corroboram com o estudo que mostra que a secreção de IL-10 induzidas por agonistas de TLR3 e TLR4 por CMN(s) de pacientes infectados por HIV-1 e tratados estão associadas com aumento da contagem e da estabilidade das células T CD4+ (VILLACRES et al., 2012).

O papel do Interferon tipo I na infecção por HIV-1 é essencial, sendo que a produção deficiente de IFN- α um fator de progressão da doença (MULLER-TRUTWIN; HOSMALIN, 2005). Neste trabalho como esperado, os agonistas de TLRs extracelulares não induziram produção de IFN- α , somente os ligantes intracelulares de TLR. Entretanto, as CMN(s) de mães infectadas por HIV-1 e de seu RN(s) mostraram diminuída secreção de IFN- α após estimulação via TLR 3, 7 e 9. Somente a ativação de CMN(s) de recém-nascidos de mães infectadas pelo HIV-1 pela via de sinalização TLR7/8, com CL097, mostrou aumento de secreção em relação aos RN(s) de mães saudáveis.

O composto CL097 também foi capaz de induzir a expressão de RNAm para IRF-7 em CMN(s) de mães infectadas e seus RN(s), contrastando a ausência de efeito do agonista de TLR9. Desta forma, mais uma vez verificou-se a contribuição do agonista de TLR7/8 como adjuvante imunoterápico. A expressão dos níveis basais de RNAm para IRF-7 de mães infectadas pelo vírus e seus RN(s), foram inferiores aos níveis quando comparado as amostras maternas (mãe-RN) saudáveis.

Em contraste, maior expressão dos níveis basais de RNAm para TNF- α foi detectado em CMN(s) de RN(s) de mães infectadas. Embora os níveis de transcrição de IRF-7 e IFN- α da mãe infectada tenha sido semelhante ao grupo controle, os níveis de secreção de proteínas foram claramente reduzidos. Este dado, sugere a ocorrência de uma deficiência ao nível pós-traducional da de IFN tipo I na infecção crônica pelo HIV-1. Este efeito foi peculiar para IFN tipo I, pois a expressão e secreção de TNF- α que foram estimulados com a ação do agonista de TLR7/8 sejam nos sobrenadantes de cultura como nos achados de DC.

As DCs são cruciais na regulação e na promoção de respostas imunológicas que medeiam o dialogo entre o sistema imune inato e adaptativo. Neste trabalho foi evidenciado um importante efeito adjuvante do ligante CL097 na produção de TNF- α por mDC, seja na expressão gênica ou protéica por CMN(s) de mães infectadas por HIV-1 e de seus cordões-umbilicais. Estes achados provavelmente foram decorrentes da ativação via TLR8, receptor expresso por mDC, já que o receptor TLR7 (Imiquimode) e TLR9 (CpG) são expressos apenas em pDCs (BENLAHRECH et al., 2012). No entanto, é possível que a ativação via CL097 pode induzir um aumento da replicação nas DCs, considerando-se que a ligação de ambos TLR8 e DC-SIGN é necessária para a indução de vias de transdução de sinal que promovem a síntese de transcritos virais a partir de DNA proviral integrado (GRINGHUIS et al., 2010). Com isso o uso do agonista CL097, poderia não só promover a replicação viral em DC, como também melhorar a produção de TNF- α , principalmente, em recém-nascidos.

As mDCs de parturientes infectadas por HIV-1 e dos recém-natos mostraram aumento na capacidade de resposta para produção de TNF- α após ativação com CL097 em contraste com as pDCs que mostraram alteração significativa na produção de IFN- α em ambos, mãe infectada pelo HIV-1 e seu recém-nascido. Este resultado aponta para o fato que a infecção crônica pelo HIV-1 em mães e seus RN(s) induziu uma disfunção importante na resposta imune mediada pelas pDCs. Na infecção por HIV-1, as mDCs parecem ser uma população mais flexível e adaptada em comparação às pDCs. Pacientes infectados por HIV-1, sob HAART recuperam o número de mDC, em contraste com a perda sustentada da subpopulação de pDC, concomitante à diminuição da secreção de IFN- α (PACANOWSKI et al., 2001). A queda do número de pDCs correlaciona-se inversamente com a CV e associada a uma diminuição funcional da produção de IFN- α por célula e uma queda de linfócitos T CD4 + (BARRON et al., 2003; DONAGHY et al., 2003). Evidências de melhor reconstituição de pDCs em pacientes tratados precocemente HAART argumentam que um rápido início da HAART pode resultar na preservação numérica e da função das pDCs (KAMGA et al., 2005).

As DC(s) no microambiente placentário são essenciais na manutenção da gravidez. Para tanto, Ban e colaboradores (2008) mostraram por citometria de fluxo subgrupos de DC(s) na decídua de gestantes saudáveis do terceiro trimestre, evidenciando os seguintes fenótipos: DC mielóide do tipo 1 (BDCA-1+ CD19- CD14-, mDC1), DC mielóide do tipo 2 (BDCA-3+ CD14-, mDC2) e DC plasmocitóide do tipo 1 (BDCA-2+ CD123+, pDC). Com isso, frente a diversidade de populações de células imunes presentes na placenta se fez necessário no presente trabalho avaliar alguns marcadores expressos por estas populações celulares presentes no microambiente placentário.

Microambiente placentário na infecção por HIV-1

Para avaliar o microambiente placentário, iniciamos o estudo histológico das vilosidades coriônicas e decídua de mães infectadas por HIV-1 e de saudáveis pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Na gestação de mães não infectadas por HIV-1, encontra-se na decídua um número elevado de células do sistema imunológico, como macrófagos, natural killer (NK) e células T reguladoras (Treg). Cerca de 70% dos leucócitos da decídua são células NK, 20-25% são macrófagos, 1.7% são células dendríticas (DCs) e 3 a 10% são linfócitos T (BULMER et al., 1988). Nosso estudo sobre as placentas a termo mostrou um infiltrado de células imunes em ambos os grupos analisados. Embora não tenha sido quantificado, o número de células imunes

presentes na decídua, a proporção foi visivelmente maior nas decíduas de mães infectadas por HIV-1. Além disto, houve preservação da morfologia das estruturas. A grande maioria dos núcleos foi morfológicamente normal, sem pontos de necrose. A morfologia do sinciciotrofoblastos e macrófagos (células fetais Hofbauer), assim como células vermelhas também foram preservados nos tecidos de placentas das mães infectadas por HIV-1. Com isso, elencamos alguns parâmetros de análise por imunoistoquímica como a expressão de CD123, HLAG e TLR8 e por microscopia confocal a expressão de CD14/CD16.

Embora as DCs sejam importantes na produção de resposta antiviral, durante o curso da infecção por HIV-1, neste trabalho foi apenas avaliado a expressão de CD123, como indicação de pDC na decídua.

Embora Ban e colaboradores (2008) tenham identificado pDC(s) na decídua do primeiro trimestre, outros autores utilizando metodologias distintas mostraram dificuldade na caracterização de pDC(s) devido ao baixo percentual de células encontradas no tecido placentário (GARDNER & MOFFETT, 2003), sobretudo em placentas a termo, as quais apresentam menor quantidade de tecido decidual (GARDNER & MOFFETT, 2003). Além disto, não foi caracterizado subpopulações de pDCs, também porque seria necessário diferentes metodologias e número elevado de amostras.

Por outro lado, na placenta há uma rede de interações moleculares em que estão envolvidas diversas populações celulares que se imbricam na imunopatogênese da doença e no contexto materno-fetal, buscando a manutenção da gestação e proteção do feto que merecem ser caracterizados.

Na decídua de gestantes infectadas por HIV-1 observamos aumento da expressão de CD123 quando comparado ao grupo controle saudável. O CD123, é o receptor de IL-3, além de ser um dos principais marcadores de pDC, é expresso pelo trofoblasto, em outras células imunes como monócito/macrófago que são reconhecidamente abundantes na decídua a termo e importantes na resposta antiviral. A IL-3, o ligante natural de CD123 é uma citocina relacionada com proliferação, diferenciação celular, denominada multi-CSF, um fator estimulador de linhagens hematopoiéticas (TROIDL et al., 2013). Este fator induz aumento da proliferação das células mielóides precursoras (eritroblásticas, mielomonocíticas e megacarioblasticas). Com isso, o aumento de CD123 na decídua pode estar relacionado a um remodelamento placentário que pode ser bastante comum em gestante portadoras do HIV-1. Contudo, as avaliações da expressão de CD123 realizadas em conjunto com as análises histológicas sugerem que estas populações celulares que expressam CD123 são células

imunes presentes na face decidual com característica de macrófagos deciduais e não células do trofoblasto extraviloso.

Em relação à proteção que o microambiente placentário pode proporcionar ao feto, os macrófagos placentários mostram menores taxas de infecção pelo HIV-1 e menor replicação viral comparados com macrófagos derivados de monócitos, que pode representar um importante fator no controle da replicação viral e da transmissão vertical (LUCIANO-MONTALVO et al., 2008). Desta forma, prosseguimos as avaliações de macrófagos, pela expressão de CD14 e CD16, principais marcadores de macrófagos.

A avaliação da expressão de CD14/CD16 foi realizada por ensaios de imunofluorescência envolvendo a face decidual e o vilo de mães infectadas por HIV-1 e controles não infectados. Embora não tenhamos conseguido quantificar a expressão de CD14/CD16 devido sua distribuição peculiar no tecido placentário, os resultados sugerem que as células duplo-positivas, presentes no vilo de mães infectadas por HIV-1, parecem expressar mais CD14 em relação ao CD16 (CD14++CD16+). Nossos resultados corroboram com estudos que mostram que há uma elevada porcentagem de células que expressam CD14 ++ CD16 + em pacientes infectados por HIV-1 e que expressam seletivamente CCR5, o coreceptor para HIV-1 (STODDART et al., 2010). Por outro lado, o trofoblasto também pode estar produzindo fatores imunológicos capazes de modular estes macrófagos placentários, entre outras células imunológicas maternas, pois na decídua infectada a expressão de CD14 em células também CD16 positivas parece estar diminuída. Para comprovação mais exata em relação à distribuição da expressão de CD14 e trofoblasto, na placenta infectada, outras metodologias experimentais precisam ser realizadas. Provavelmente, nossos achados possam estar relacionados com estudos os quais mostram que macrófagos deciduais de decíduas saudáveis quando incubados com trofoblasto ativado pelo agonista *Poly (I:C)*, ligante de TLR3, mostram significante melhora na resposta a antígenos virais (ILIEVSKI et al., 2007).

Os TLRs são os principais receptores da imunidade inata e colaboram com a resposta antiviral. Além de estarem presentes em células do sistema imunológico que povoam a decídua, esses receptores também são expressos por células do trofoblastos extra vilosos (EVTs) (ABRAHAMS et al., 2004; KUMAZAKI et al., 2004). Mitsunari e colaboradores (MITSUNARI et al., 2006) utilizando RT-PCR mostraram a expressão de TLR2, 3, 4, 5, 6 e 9 em células citotrofoblásticas e no sinciotrofoblasto, isoladas a partir de placenta a termo e cultivadas. Este achado sugere papéis para os TLRs na proteção do feto e na manutenção da gestação.

A expressão de TLR8 também foi avaliada no tecido decidual e no vilo de placentas de mães infectadas por HIV-1 e controles não infectados. A quantificação de TLR8 evidencia maior expressão deste receptor tanto no vilo, especificamente no sinciotrofoblasto, quanto na decídua de mães infectadas comparado às mães saudáveis. Em casos de gestantes com pré-eclâmpsia também é identificado maior expressão de TLR8 na decídua (CHATTERJEE et al., 2012). O quadro de pré-eclâmpsia pode repercutir na produção excessiva de tecido em necrose, apoptose anormal durante a implantação e remodelamento de artérias em espiral presentes na placenta, levando ao aumento da expressão dsRNA (dupla fita de RNA) e ssRNA (simples fita de RNA) (CHATTERJEE et al., 2012). Tais estruturas estão presentes também em infecções virais, principalmente no HIV-1, são ligantes naturais de TLR3 (dsRNA), TLR7/8 (ssRNA) que são expressos pelo sinciotrofoblasto e citotrofoblasto (CHATTERJEE et al., 2012). A ativação da via de sinalização destes TLRs, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFN tipo 1, que podem ser produzidas pelo sinciotrofoblasto e citotrofoblasto desencadeando a migração de células imunes para a interface materno-fetal, como macrófagos (CD14/CD16) e outras populações celulares. Contudo, o diálogo entre o trofoblasto e as células imunes deciduais, no controle da transmissão materno fetal do HIV-1, é pouco conhecido e caracterizado.

A expressão de HLA-G foi avaliada na decídua de mães infectadas por HIV-1 e de controles saudáveis, reconhecidamente a expressão de HLA-G foi maior no tecido placentário das parturientes infectadas por HIV-1 comparado às não infectadas. O aumento de HLA-G, na patogênese do HIV-1, pode evidenciar um diálogo claro entre trofoblasto extraviloso e células imunes na busca da contenção viral. Para tanto é possível que o trofoblasto esteja orquestrando macrófagos, células NK e células T CD8 e outras populações celulares que se acumulam na decídua para inibir a transmissão do vírus pela produção de quimiocinas CC ou outros mecanismos relacionados à resposta antiviral (MOR et al., 2010). Embora essas moléculas sejam ligantes específicos das células NK uterina (MOFFETT-KING, 2002) (WEETMAN, 1999), elas também podem modular ligantes específicos expressos em macrófagos e células T. Na decídua, os macrófagos são ativados por HLA-G que se liga a LILRB1(LIR) (MOFFETT-KING, 2002; WEETMAN, 1999). A proteína codificada pertence à classe B da subfamília de receptores de LIR, responsável por desencadear um sinal negativo que inibe a estimulação e controla as respostas inflamatórias. A ligação de HLA-G com LILRB1 resulta na diferenciação de macrófagos deciduais. O fenótipo destes macrófagos mostra suscetibilidade à infecção por HIV-1, mas também são capazes de

produzir quimiocinas CCL3 e CCL4, ligantes naturais do coreceptor CCR5, que pode bloquear a entrada do vírus.

O fato do trofoblasto, assim como células do sistema imunológico inato, expressar receptores de padrões de reconhecimento (PRR) que funcionam como sensores ambientais que reconhecem bactérias, vírus e células danificadas no tecido é um evento de vital importância (FEST et al., 2007; PETROFF; PERCHELLET, 2010). O tipo de sinal (is) enviado ao sistema imunológico materno a partir deste reconhecimento para coordenar as atividades de cada um dos componentes celulares na interface materno-fetal também é importantíssimo (ABRAHAMS et al., 2005).

Neste estudo, iniciamos a avaliação de uma a delicada relação entre trofoblasto e células imunológicas maternas durante o curso de infecções virais, como o HIV-1. Tal fato possibilita compreender os mecanismos de proteção envolvidos na resposta antiviral durante a gestação, uma vez que a proteção do feto ocorre no primeiro trimestre de gravidez (FAYE et al., 2007). Logo, o estudo do tecido placentário infectado pelo HIV-1 é essencial, porque é neste microambiente que ocorre as principais mudanças imunológicas, as quais podem modular e regular as populações de células imunes e consequente produção de citocinas da gestante com HIV-1. Com isso, as experiências imunológicas vivenciadas pelas mães infectadas podem promover um *imprinting* imunológico no feto viabilizando a proteção viral.

Logo, este trabalho mostra a importância de se compreender as interações entre receptores presentes em células imunológicas sistêmicas, células trofoblásticas e células imunes presentes no microambiente placentário. Uma vez que, TLR8 tanto no contexto sistêmico quanto no microambiente placentário é capaz de reconhecer e ser ativado por produtos virais induzindo respostas diferenciadas. Com isso concluímos que na infecção viral, o efeito adjuvante de ligantes de TLR8, sejam naturais ou sintéticos, como CL097, merecem ser melhor explorados e conhecidos, pois esta via de sinalização está preservada e pode ser um dos correlatos de proteção ao HIV-1 na transmissão vertical.

6 CONCLUSÃO

- 1- Os resultados mostraram uma significativa disfunção da resposta imune inata na mãe infectada por HIV-1 seu recém-nascido. Ativação da via de sinalização de TLR7/TLR8 é capaz de recuperar o defeito na produção de TNF- α por mDC, seja na expressão gênica e proteica, contrastando com a deficiente capacidade de resposta das pDC. Os achados evidenciam a preservação da via de sinalização de TLR7/8 das mDC das mães e recém-nascidos na infecção por HIV-1,
- 2- As pDCs das mães infectadas por HIV-1 seu recém-nascido mostram um defeito na produção IFN- α induzida por agonistas Imiquimode, CL097 e CpG, que pode estar relacionado como um mecanismo para evitar hiperreatividade na gestação ou devido a uma alteração na via de sinalização, que precisa ser ainda explorado;
- 3- No microambiente placentário observa-se aumento da expressão de TLR8 tanto no sinciotrofoblasto quanto na decídua. Neste contexto o TLR8 pode estar sendo ativado por ssRNA do HIV-1 seu ligante natural, repercutindo no diálogo com macrófagos que expressam CD14/CD16 e outras populações celulares que não foram caracterizadas e consequentemente na produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons tipo 1 por estas células.
- 4- A possibilidade de exacerbação desta resposta antiviral pode estar sendo contida por HLA-G que está aumentado na decídua de mães infectadas. O HLA-G a partir do dialogo macrófagos e outras células imunes, pode estar regulando a resposta antiviral promovendo assim proteção ao feto e manutenção da gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAMMS, V. M. et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. J. Immunol., v. 173, n. 7, p. 4286-4296, 2004.

ABRAHAMMS, V. M. et al. Expression and secretion of antiviral factors by trophoblast cells following stimulation by the TLR-3 agonist, Poly(I : C). Hum. Reprod., v. 21, n. 9, p. 2432-2439, 2006.

ABRAHAMMS, V. M. et al. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. J. Immunol., v. 175, n. 12, p. 8096-8104, 2005.

AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. Adv. Immunol., v. 78, p. 1-56, 2001.

ALUVIHARE, V. R. et al. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat. Immunol., v. 5, n. 3, p. 266-271, 2004.

APPS, R. et al. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. Eur. J. Immunol., v. 37, n. 7, p. 1924-1937, 2007.

ASHKAR, A. A. et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. J. Immunol., v. 171, n. 6, p. 2937-2944, 2003.

BAN, I.L. et al. BDCA1, BDCA2 and BDCA3 dendritic cell in early human pregnancy decidua. Clin. Exp. Immunol., v. 151 n. 3, p. 399-406, 2008.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Characterization and titration of an HIV type 1 subtype E chimpanzee challenge stock. AIDS Res. Hum. Retroviruses., v. 13, n. 7, p. 583-591, 1997.

BARRON, M. A. et al. 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., v. 187, n. 1, p. 26-37, 2003.

BEIGNON, A. S. et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. J. Clin. Invest., v. 115, n. 11, p. 3265-3275, 2005.

BEIJAR, E. C. et al. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. Placenta, v. 27, n. 2-3, p. 322-326, 2006.

BENITO, J. M. et al. Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. J. Acquir. Immune Defic. Syndr., v. 38, n. 4, p. 373-381, 2005.

*** De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 6023: informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002**

BENLAHRECH, A. et al. Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. Clin. Exp. Immunol., v. 170, n. 2, p. 212-221, 2012.

BERGER, E. A. et al. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev. Immunol., v. 17, p. 657-700, 1999.

BIASIN, M. et al. TLR activation pathways in HIV-1-exposed seronegative individuals. J. Immunol., v. 184, n. 5, p. 2710-2717, 2010.

BOYD, J. D.; HAMILTON, W. J. Development and structure of the human placenta from the end of the 3rd month of gestation. J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw., v. 74, n. 2, p. 161-226, 1967.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat. Med., v. 12, n. 12, p. 1365-1371, 2006.

BRINKMANN, M. M. et al. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. J. Cell Biol., v. 177, n. 2, p. 265-275, 2007.

BULMER, J.N. et al: Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. Reprod. Nutr. Dev., v. 28 n. 13, p. 1599–1613, 1988

BURLINGHAM, W. J. A lesson in tolerance--maternal instruction to fetal cells. N. Engl. J. Med., v. 360, n. 13, p. 1355-1357, 2009.

CHAOUAT, G. et al. Cytokines: Important for implantation? J. Assist. Reprod. Genet., v. 24, n. 11, p. 491-505, 2007.

CHATTERJEE, P. et al. Placental Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 7/8 activation contributes to preeclampsia in humans and mice. PLoS One, v. 7, n. 7, p. e41884, 2012.

CLAVEL, F. et al. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature, v. 324, n. 6098, p. 691-695, 1986.

COLONNA, M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. Eur. J. Immunol., v. 37, n. 2, p. 306-309, 2007.

DONAGHY, H. et al. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. Blood, v. 101, n. 11, p. 4505-4511, 2003.

FAYE, A. et al. Characterization of the main placental cytokine profiles from HIV-1-infected pregnant women treated with anti-retroviral drugs in France. Clin. Exp. Immunol., v. 149, n. 3, p. 430-439, 2007.

FEST, S. et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol., v. 57, n. 1, p. 55-66. 2007.

- GARDNER, L. et al. Dendritic cell in the human decidua. Biol. Reprod., v. 64 n.4, p. 1438-46, 2003.
- GEIER, S. A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 and type 2 seroprevalence in cornea donors. Ger. J. Ophthalmol., v. 3, n. 3, p. 182-185, 1994.
- GREEN, J. A. et al. Immune-specific immunoglobulin G-mediated enhancement of human immunodeficiency virus-induced IFN-alpha production. J. Interferon Cytokine Res., v. 22, n. 12, p. 1201-1208, 2002.
- GRINGHUIS, S. I. et al. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. Nat. Immunol., v. 11, n. 5, p. 419-426, 2010.
- HALLMAN, M. et al. Toll-like receptors as sensors of pathogens. Pediatr. Res., v. 50, n. 3, p. 315-321, 2001.
- HARANDI, A. M. et al. Recent developments in mucosal immunomodulatory adjuvants. Curr Opin. Investig. Drugs., v. 4, n. 2, p. 156-161, 2003.
- HARDY, A. W. et al. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 104, n. 44, p. 17453-17458, 2007.
- HARRER, T. et al. Induction of HIV-1 replication in a chronically infected T-cell line by cytotoxic T lymphocytes. J. Acquir. Immune Defic. Syndr., v. 6, n. 8, p. 865-871, 1993.
- HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science, v. 303, n. 5663, p. 1526-1529, 2004.
- HERBEUVAL, J. P. et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 102, n. 39, p. 13974-13979, 2005.
- HERING, S. et al. Ca²⁺ channel block and inactivation: common molecular determinants. Trends. Pharmacol. Sci., v. 19, n. 11, p. 439-443, 1998.
- HORNER, A. A.; RAZ, E. Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. J. Allergy Clin. Immunol., v. 110, n. 5, p. 706-712, 2002.
- HORNUNG, V. et al. 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, n. 9, p. 4531-4537, 2002.
- HUGHES, G. C. et al. Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. J. Immunol., v. 180, n. 4, p. 2029-2033, 2008.
- HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. FASEB J., v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

ILIEVSKI, V. et al. Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse. Reprod. Sci., v. 14, n. 4, p. 315-320, 2007.

JASTY, M. et al. In vivo skeletal responses to porous-surfaced implants subjected to small induced motions. J. Bone Joint. Surg. Am., v. 79, n. 5, p. 707-714, 1997.

KADOWAKI, N. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J. Exp. Med., v. 194, n. 6, p. 863-869, 2001.

KAMGA, I. et al. Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. J. Infect. Dis., v. 192, n. 2, p. 303-310, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol., v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KING, A. et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. Placenta, v. 21 Suppl A, p. S81-85, 2000.

KOGA, K. et al. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. J. Obstet. Gynaecol. Res., v. 35, n. 2, p. 191-202, 2009.

KOGA, K.; MOR, G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. Am. J. Reprod. Immunol., v. 63, n. 6, p. 587-600, 2010.

KOLTE, L. et al. Dysregulation of CD4+CD25+CD127^{low}FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-infected pregnant women. Blood, v. 117, n. 6, p. 1861-1868, 2011.

KUMAZAKI, K. et al. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. Hum. Pathol., v. 35, n. 1, p. 47-54, 2004.

LAHDEVIRTA, J. et al. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med., v. 85, n. 3, p. 289-291, 1988.

LEE, J. et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 100, n. 11, p. 6646-6651, 2003.

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

LEIFER, C. A. et al. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. J Immunol, v. 173, n. 2, p. 1179-1183, 2004.

LESTER, R. T. et al. Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. AIDS, v. 22, n. 6, p. 685-694, 2008.

LEVY, O. et al. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. J. Immunol., v. 177, n. 3, p. 1956-1966, 2006.

LEVY, O. et al. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. J. Immunol., v. 173, n. 7, p. 4627-4634, 2004.

LEVY, R. W. et al. Multidisciplinary HIV adherence intervention: a randomized study. AIDS Patient. Care S.T.D.S., v. 18, n. 12, p. 728-735, 2004.

LOKE, Y. W.; KING, A. Immunology of implantation. Baillieres Best Pract Res. Clin. Obstet. Gynaecol., v. 14, n. 5, p. 827-837, 2000.

LUCIANO-MONTALVO, C. et al. Proteomic analyses associate cystatin B with restricted HIV-1 replication in placental macrophages. Placenta, v. 29, n. 12, p. 1016-1023, 2008.

MA, Y. et al. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. Placenta, v. 28, n. 10, p. 1024-1031, 2007.

MARTIN, L. et al. Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes. Nat. Biotechnol., v. 21, n. 1, p. 71-76, 2003.

MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr. Opin. Immunol., v. 22, n. 1, p. 20-27, 2010.

MITSUNARI, M. et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. J. Reprod Immunol., v. 72, n. 1-2, p. 46-59, 2006.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. Nat. Rev. Immunol., v. 2, n. 9, p. 656-663, 2002.

MOGENSEN, T. H. et al. Innate immune recognition and activation during HIV infection. Retrovirology, v. 7, p. 54, 2010.

MOLD, J. E. et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. Science, v. 322, n. 5907, p. 1562-1565, 2008.

MOORE, J. P. et al. Antigenic variation in gp120s from molecular clones of HIV-1 LAI. AIDS Res. Hum. Retroviruses, v. 9, n. 12, p. 1185-1193, 1993.

MOR, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 1127, p. 121-128, 2008.

MOR, G. et al. Is the trophoblast an immune regulator? The role of Toll-like receptors during pregnancy. Crit Rev Immunol, v. 25, n. 5, p. 375-388, 2005.

MULLER-TRUTWIN, M.; HOSMALIN, A. Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. Immunol. Cell Biol., v. 83, n. 5, p. 578-583, 2005.

MUNERATO, P. et al. Frequency of polymorphisms of genes coding for HIV-1 co-receptors CCR5 and CCR2 in a Brazilian population. Braz. J. Infect. Dis., v. 7, n. 4, p. 236-240, 2003.

NOWAK, M. A. et al. Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. Science, v. 254, n. 5034, p. 963-969, 1991.

O'NEILL, L. A. Immunology. After the toll rush. Science, v. 303, n. 5663, p. 1481-1482, 2004.

O'NEILL, L. A. TAMpering with toll-like receptor signaling. Cell, v. 131, n. 6, p. 1039-1041, 2007.

OZINSKY, A. et al. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. J. Endotoxin. Res., v. 6, n. 5, p. 393-396, 2000.

PACANOWSKI, J. et al. Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. Blood, v. 98, n. 10, p. 3016-3021, 2001.

PATEL, D. et al. Does highly active antiretroviral therapy increase the risk of congenital abnormalities in HIV-infected women? J. Acquir. Immune Defic. Syndr., v. 40, n. 1, p. 116-118, 2005.

PETROFF, M. G.; PERCHELLET, A. B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol., v. 63, n. 6, p. 506-519, 2010.

PICCINNI, M. P. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Reprod. Biomed. Online, v. 14 Spec No 1, p. 95-99, 2007.

RANELLA, A. et al. Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. Hum. Immunol., v. 66, n. 1, p. 43-55, 2005.

REICHE, E. M. et al. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). Curr. Med. Chem., v. 14, n. 12, p. 1325-1334, 2007.

RINDSJO, E. et al. Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta. Hum. Pathol., v. 38, n. 3, p. 468-473, 2007.

ROBERTSON, S. A. et al. Effect of beta2-glycoprotein I null mutation on reproductive outcome and antiphospholipid antibody-mediated pregnancy pathology in mice. Mol. Hum. Reprod., v. 10, n. 6, p. 409-416, 2004.

ROSENBLATT, H. M. et al. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. J. Infect. Dis., v. 192, n. 3, p. 445-455, 2005.

SAITO, S. et al. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. J. Reprod. Immunol., v. 77, n. 1, p. 14-22, 2008.

SATTENTAU, Q. J. The role of the CD4 antigen in HIV infection and immune pathogenesis. AIDS, v. 2 Suppl 1, p. S11-16, 1988.

SCHLAEPFER, E. et al. TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. J. Immunol., v. 176, n. 5, p. 2888-2895, 2006.

SCHUMACHER, A. et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. J. Immunol., v. 182, n. 9, p. 5488-5497, 2009.

SCHWANDNER, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J. Biol. Chem., v. 274, n. 25, p. 17406-17409, 1999.

SOILLEUX, E. J. et al. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. J. Pathol., v. 195, n. 5, p. 586-592, 2001.

SOMERSET, D. A. et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. Immunology, v. 112, n. 1, p. 38-43, 2004.

STEINMAN, R. M. et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 987, p. 15-25, 2003.

STODDART, C. A. et al. IFN-alpha-induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo. PLoS Pathog., v. 6, n. 2, p. e1000766, 2010.

SZEKERES-BARTHO, J.; POLGAR, B. PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. Am. J. Reprod. Immunol., v. 64, n. 2, p. 77-86, 2010.

TROIDL, C. et al. The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. Curr. Vasc. Pharmacol., v. 11, n. 1, p. 5-12, 2013.

VILLACRES, M. C. et al. Interleukin 10 responses are associated with sustained CD4 T-cell counts in treated HIV infection. J. Infect. Dis., v. 206, n. 5, p. 780-789, 2012.

WAGNER, H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. Curr. Opin. Microbiol., v. 5, n. 1, p. 62-69, 2002.

WASIK, T. J. et al. [Effects of CCR5-delta32, CCR2-64I and SDF-1-3'A polymorphic alleles on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infection in the Polish population]. Wiad.Lek., v. 58, n. 9-10, p. 500-507, 2005.

WEETMAN, A. P. The immunology of pregnancy. Thyroid., v. 9, n. 7, p. 643-646, 1999.

WICHEREK, L. et al. The characterization of the subpopulation of suppressive B7H4(+) macrophages and the subpopulation of CD25(+) CD4(+) and FOXP3(+) regulatory T-cells in decidua during the secretory cycle phase, Arias Stella reaction, and spontaneous abortion - a preliminary report. Am. J. Reprod. Immunol., v. 61, n. 4, p. 303-312, 2009.

WILLE-REECE, U. et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 102, n. 42, p. 15190-15194, 2005.

WITTMANN, M. et al. Suppression of interleukin-12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. Blood, v. 94, n. 5, p. 1717-1726, 1999.

WYATT, R. et al. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature, v. 393, n. 6686, p. 705-711, 1998.

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

YAMAMOTO, N. et al. Substances affecting the infection and replication of human immunodeficiency virus (HIV). AIDS Res., v. 2 Suppl 1, p. S183-189, 1986.

ZHOU, H. et al. HIV protease inhibitors increase TNF-alpha and IL-6 expression in macrophages: involvement of the RNA-binding protein HuR. Atherosclerosis, v. 195, n. 1, p. e134-143, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. J. Inflamm., v. 45, n. 1, p. 13-26, 1995.

ANEXOS

Anexo 1

Anexo 2