LÚCIO GAMA

**Mudanças em subgrupos de monócitos durante
infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência
símia (SIV);**

**Expansão de uma população inédita de células
CD14+CD16- com um fenótipo atípico CCR2-**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Programa de Alergia e Immunopatologia
Orientador: Prof.Dr. Esper Georges Kallás**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**SÃO PAULO
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gama, Lúcio

Mudanças em subgrupos de monócitos durante infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência Símia (SIV); expansão de uma população inédita de células CD14+CD16- com um fenótipo atípico CCR2- / Lúcio Gama.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Monócitos 2.Macrófagos 3.Vírus da imunodeficiência Símia
4.HIV-1 5.Síndrome de imunodeficiência adquirida 6.Receptores CCR-2

USP/FM/DBD-195/11

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Retrovirologia da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins e no Laboratório de Investigação Médica 60 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e contou com o apoio financeiro do Instituto Nacional da Saúde (NIH), EUA, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

DEDICATÓRIA

A Greg Baranoski, “... *My North, my South, my East, and West. My working week and my Sunday rest, My noon, my midnight, my talk, my song*”.

A meus pais (em memória), por terem feito das palavras “infelicidade” e “desamparo” vocábulos inexistentes em minha vida.

A meus mentores, pela sabedoria e amizade com que me apoiaram nessa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Segundo um famoso provérbio africano, “é necessária uma vila inteira para a educação de uma criança”. O mesmo pode ser dito desta tese de doutorado; um caminho aparentemente solitário, porém pavimentado com a dedicação e paciência de pessoas que amo profundamente.

Em primeiríssimo lugar, antes que minhas ideias fiquem escassas, antes que meu peito se aperte, agradeço a **Esper Georges Kallás**, que muito antes de doutor e mentor, foi e é (mais que) o irmão que nunca tive. Não há páginas suficientes para descrever o seu papel na história de minha vida. PNC, meu querido amigo!

Agradeço à **Janice Clements** e **Chris Zink**, minhas mentoras, amigas e colegas. Obrigado por terem me dado a chance de trabalhar com vocês e evoluir em minha carreira de uma maneira que nunca esperara. Obrigado por reacenderem em mim a paixão pelo método científico, e fazerem do dia-a-dia no laboratório um prazer inigualável.

Agradeço a todos que me auxiliaram na direta execução desta tese, em dois hemisférios:

A todos do **Laboratório de Retrovirologia** da Johns Hopkins University. Há dez anos vocês me acolheram de braços abertos, e hoje não sei como teria sido minha vida sem tê-los como família. Gostaria de agradecer em especial à **Erin Shirk**, pelas incansáveis horas de citometria e pela dedicação com que me ajudou no desenvolvimento deste nosso modesto projeto; a **Brandon Bullock**, **Suzanne Queen** e **Ming Li** por fazerem com que as tarefas rotineiras

do laboratório funcionem com precisão milimétrica; à **Julia Russell** e **Ada Tam**, pelo auxílio nos processos de seleção (*sorting*) e preparação das amostras para Nanostring e qPCR; a **Alireza Rabi** e **Michael Linde** pelas excelentes sugestões no manuscrito; à **Sharon Molander** e **Cathy Rada** pelo sempre eficiente apoio administrativo.

A todos do **LIM60** e da **Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia** da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo. Obrigado por me receberem com tanta alegria e me fazerem sentir orgulho de ser brasileiro. Trabalhar com vocês foi uma experiência maravilhosa e edificante. Em especial quero agradecer à **Karina Carvalho** e **Daniela Santoro Rosa** pela excepcional ajuda com citometria e por ensinar meus caminhos no laboratório; à **Fernanda Bruno**, **Sérgio Alves**, **Thaís Rodrigues**, **Bianca Natali Santos**, **Andréia Matos**, **Susan Ribeiro**, **Eliane Mairena**, **María Teresa Maidana Giret**, **Juliana Apostólico**, **Maria Inês de Oliveira**, e todos os demais membros que me auxiliaram em pequenas e grandes etapas desta tese.

Em especial, quero agradecer ao **Prof. Dr. Jorge Kalil**, pelo constante apoio e acompanhamento científico. Obrigado por ter me direcionado, talvez intuitivamente, à descoberta desta nova população de monócitos. Não foi preciso mais do que dez minutos na primeira reunião de pós-graduandos para entender o porquê do sucesso do departamento!

Quero também agradecer à **Maria Candida Dantas**, **Issler Moraes**, **Tânia Joice Mota**, **Andréia Silva**, **Prof. Dr. Aluísio Segurado** e **Zelinda Bartolomei** por toda ajuda que me deram para que a parte burocrática de minha pós-graduação fosse um processo tão tranquilo.

Um obrigado especial à minha banca de qualificação, composta pelo **Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto**, **Prof. Dr. Douglas Nixon** e **Prof. Dr. Mario Stevenson**, pelas sábias observações e sugestões.

Finalizando a parte técnica, gostaria de também agradecer aos amigos **Cláudia Contabile** e **Milton Maciel Jr.**, pela paciência com que me auxiliaram na redação em português.

Logicamente, gostaria de agradecer a todos que indiretamente me ajudaram a finalizar esta etapa de minha vida de maneira digna e saudável:

Às minhas queridas irmãs **Teresa Cristina**, **Anelise** e **Soraia**, pelo constante amor e apoio. O ano de 2010 foi extremamente difícil, mas conseguimos superar os piores obstáculos. Amo vocês!

Ao **Newton Cassiolato**, anfitrião mor e amigo de todas as horas. Obrigado por hospedar-me tão generosamente e agraciar-me com horas de alegria e descontração.

A todos meus amigos de Baltimore, uma cidade não tão fácil de ser amada, mas com um coração gigantesco e lar de pessoas maravilhosas. A todos meus amigos do Brasil, novos e antigos, por estarem sempre presentes em todas as etapas de minha vida, mesmo quando estou fisicamente tão longe.

Em especial gostaria de agradecer efusivamente pela paciência e amor de meu companheiro **Greg Baranoski**. Não sei se conseguiria passar por tudo que passei nesses últimos anos sem seu apoio e constante presença. E por último, meu agradecimento especial a meus dois Jack Russel terriers, Edgar e Stella, por me ensinarem a enxergar o mundo como um eterno “hoje e agora”.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências:

Adaptado de *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Carneiro da Cunha, A. *et al.* 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:

List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
INTRODUÇÃO.....	2
1. Prefácio	2
2. Retrovírus e o HIV	3
3. HIV e SIV	7
4. Ciclo de vida do HIV e SIV	8
5. AIDS	10
6. Monócitos e AIDS.....	11
OBJETIVOS.....	18
MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Animais	20
2. Pacientes.....	21
3. Amostras	21
4. Quantificação da carga viral em plasma	22
5. Quantificação de citocinas em plasma	22
5. Citometria de fluxo	23
6. Seleção (<i>sorting</i>) de subpopulações de monócitos	24
7. Extração de ácidos nucleicos	25
8. Quantificação de mRNAs	25
9. Quantificação de DNA viral	26
10. Ensaio de Fagocitose	26
11. Ensaio de Quimiotaxia	27
12. Ensaio de proliferação.....	27
13. Análise Estatística	28
RESULTADOS.....	30

1. Caracterização da fase aguda da infecção pelo SIV em um modelo animal consistente e acelerado para AIDS e doenças do sistema nervoso central	30
2. Alterações em subpopulações de monócitos do sangue periférico durante a infecção aguda pelo SIV	35
3. Expressão de CCR2 é modulada especificamente em monócitos clássicos durante a infecção aguda por SIV	38
4. Monócitos ACC exibem um transcriptoma distinto dos monócitos clássicos autênticos CCR2 ⁺	46
5. ACC monócitos apresentam fagocitose e quimiotaxia alteradas.....	53
6. Monócitos ACC abrigam menos cópias de DNA genômico do SIV	56
7. Fator plaquetário 4 (PF4 ou CXCL4) leva à diminuição da expressão de CCR2 de superfície em monócitos e pode estar relacionado à expansão do subgrupo ACC.....	58
8. HAART reverte subpopulações de monócitos aos níveis de pré-infecção em macacos infectados com SIV	62
9. Monócitos ACC também são detectados em pacientes infectados pelo HIV e diminuem em número após tratamento com HAART	65
10. Monócitos ACC interferem com a proliferação de linfócitos T CD8 ⁺	69
DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÕES.....	79
ANEXOS.....	81
1. Email do <i>Journal of Immunology</i> comprovando recebimento do manuscrito.....	81
2. Manuscrito submetido ao Journal of Immunology, ainda sob revisão	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACC	atypical CCR2 ⁻ classical
AIDS	acquired Immunodeficiency syndrome
APC	allophycocyanin
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptor
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CX3CL	C-X3-C motif chemokine ligand
CD	cluster of differentiation
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FFPe	formalin-fixed paraffin embedded
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gp (em “pg41”)	glycoprotein
HAART	highly active antiretroviral therapy
HAND	HIV-associated neurocognitive disorder
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
IFN	interferon
IL	interleukin
IQR	interquartile range
LPS	lipopolysaccharide
LTR	long terminal repeat
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MMR	macrophage mannose receptor
NK	natural killer
p (em “p55”)	protein

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll A protein
p.i.	pós-inoculação
PMPA	9-(R)-2-(phosphonomethoxypropyl) adenine
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (onde o meio foi formulado)
SFB	soro fetal bovino
SIV	simian immunodeficiency virus
STAT	signal transducer and activator of transcription protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HIV.....	4
Figura 2. Genomas do HIV e do SIV.....	6
Figura 3. Mudanças fenotípicas em monócitos.	15
Figura 4. Carga viral plasmática durante a fase aguda em 20 macacos inoculados com SIV.....	31
Figura 5. Número absoluto de linfócitos T CD4 ⁺ em 20 macacos inoculados com SIV.....	32
Figura 6. Número absoluto de linfócitos B CD20 ⁺ em 20 macacos inoculados com SIV.....	32
Figura 7. Número absoluto de linfócitos T CD8 ⁺ em 20 macacos inoculados com SIV.....	33
Figura 8. Número absoluto de células <i>natural killer</i> (NK) em 20 macacos inoculados com SIV.....	33
Figura 9. Número absoluto de neutrófilos em 20 macacos inoculados com SIV.....	34
Figura 10. Número absoluto de plaquetas em 20 macacos inoculados com SIV.....	34
Figura 11. Estratégia de citometria para a classificação de monócitos circulantes.....	35
Figura 12. Número absoluto de monócitos em 20 macacos inoculados com SIV.....	36
Figura 13. Número absoluto de diferentes subgrupos de monócitos em 20 macacos inoculados com SIV.....	37
Figura 14. Covariância entre número absoluto de monócitos totais e cada um dos subgrupos durante a fase aguda da infecção pelo SIV.	38
Figura 15. A expressão de CCR2 de superfícies diminui especificamente em monócitos clássicos..	39

Figura 16. A expressão de CCR2 de superfícies diminui em monócitos clássicos durante a fase aguda pelo SIV.....	40
Figura 17. A expressão de CCR2 de superfícies diminui em monócitos clássicos durante a fase aguda pelo SIV em 100% dos animais estudados.....	41
Figura 18. Número absoluto de monócitos ACC (laranja) e monócitos clássicos (vermelho) em 20 macacos inoculados com SIV.	42
Figura 19. Proporção entre monócitos clássicos CCR2 ⁺ e CCR2 ⁻ para cada dia de amostragem.	43
Figura 20. Covariância entre número absoluto de monócitos ACC e carga viral plasmática durante a fase aguda da infecção pelo SIV.	43
Figura 21. Covariâncias entre número absoluto de monócitos ACC e diversas populações de células do sangue durante a fase aguda de infecção pelo SIV.	44
Figura 22. Fluorescência média para CCR2 em monócitos clássicos aumenta após marcação intracelular.....	45
Figura 23. Estratégia utilizada para seleção de monócitos ACC e clássicos.....	46
Figura 24. Expressão relativa de mRNAs entre monócitos clássicos autênticos (CCR2 ⁺) e monócitos ACC (CCR2 ⁻) isolados de 6 macacos aos 14 dias p.i.	48
Figura 25. Número de cópias de mRNA para cada <i>Toll-like receptor</i> (TLR) em monócitos clássicos (símbolos vermelhos) e ACC (símbolos azuis) aos 14 dias p.i.	50
Figura 26. Número de cópias de mRNA para CCR2 em monócitos clássicos e ACC aos 14 dias p.i.....	51
Figura 27. Expressão de CCR2, HLA-DR e receptor para manose (MMR) em monócitos clássicos coletados antes da infecção e aos 14 dias p.i.....	52
Figura 28. Monócitos na fase aguda por infecção pelo SIV apresentam fagocitose alterada.	53
Figura 29. Monócitos ACC apresentam fagocitose reduzida.....	54

Figura 30. Monócitos ACC apresentam quimiotaxia alterada.....	56
Figura 31. Monócitos ACC abrigam menos cópias de DNA genômico do SIV.....	57
Figura 32. Níveis de CCL2 plasmático (em ng/ml) em 20 macacos infectados pelo SIV.....	59
Figura 33. Níveis de CXCL4 plasmático (em µg/ml) em 10 macacos infectados pelo SIV.....	60
Figura 34. Covariância entre número absoluto de monócitos ACC e níveis plasmáticos de CCL2 e CXCL4 durante a fase aguda da infecção pelo SIV.....	61
Figura 35. CCL7 e CXCL4 levam à diminuição de expressão de CCR2 de superfície em monócitos <i>in vitro</i>	62
Figura 36. Terapia antirretroviral controla a expansão de monócitos ACC em macacos infectados com SIV.	63
Figura 37. Proporção entre monócitos clássicos CCR2 ⁺ e monócitos ACC CCR2 ⁻ em macacos infectados pelo SIV e tratados com HAART a partir do dia 12 p.i.	64
Figura 38. Replicação viral está correlacionada a aumento da população de monócitos ACC em macacos tratados com HAART.	65
Figura 39. Subpopulações de monócitos em humanos infectados ou não pelo HIV.	66
Figura 40. Subpopulações de monócitos clássicos em humanos infectados ou não pelo HIV.....	66
Figura 41. Monócitos ACC podem ser observados em humanos e expandem-se após infecção pelo HIV.....	67
Figura 42. Frequência de monócitos ACC diminui após tratamento com HAART em pacientes HIV ⁺	68
Figura 43. Monócitos ACC interferem com a proliferação de linfócitos T CD8 ⁺	69

RESUMO

Monócitos podem ser classificados em três subgrupos de acordo com o nível de expressão dos marcadores CD14 e CD16. Monócitos clássicos são os mais abundantes no sangue. Eles expressam um fenótipo $CD14^+CD16^-CCR2^+$, conferindo a eles a habilidade de migrar rapidamente a sítios inflamatórios, através da resposta à quimiocina CCL2 (CC chemokine ligand 2). Aqui apresentamos a identificação e caracterização de uma expansão de um novo subgrupo de monócitos durante a infecção por SIV e HIV. Essas células são indistinguíveis dos monócitos clássicos quanto à expressão de CD14 e CD16; porém não expressam CCR2 de superfície. A análise do transcriptoma de células selecionadas confirmou que elas representam uma subpopulação distinta que expressa níveis mais baixos de citocinas inflamatórias e marcadores de ativação que as $CCR2^+$. Elas exibem fagocitose alterada e quimiotaxia deficiente em resposta a CCL2 e CCL7, além de serem refratárias à infecção por SIV e apresentarem atividade antiproliferativa. Nós as denominamos *monócitos clássicos atípicos CCR2⁻* (ACC monocytes), e acreditamos que elas têm um papel importante na patogenia da AIDS, possivelmente refletindo uma resposta anti-inflamatória contra a excessiva imunoativação observada durante a infecção por SIV e HIV. Tratamento antirretroviral leva a um declínio dessa subpopulação tanto em macacos como seres humanos, sugerindo que a replicação viral é capaz de induzir esse fenótipo atípico.

Descritores: monócitos; macrófagos; SIV; HIV; HIV-1; AIDS; CCR2

ABSTRACT

Changes in monocyte subsets during the simian immunodeficiency virus (SIV) acute infection; surge of a novel subpopulation of CD14⁺CD16⁻ cells with an atypical CCR2⁻ phenotype

Monocytes have been categorized in three main subpopulations based on CD14 and CD16 surface expression. Classical monocytes are the most abundant subset in the blood. They express a CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ phenotype, which confers on them the ability to migrate to inflammatory sites by quickly responding to CC chemokine ligand 2 (CCL2) signaling. Here we identified and characterized the surge and expansion of a novel monocyte subset during SIV and HIV infection. They were undistinguishable from classical monocytes regarding CD14 and CD16 expression, but did not express surface CCR2. Transcriptome analysis of sorted cells confirmed that they represent a distinct subpopulation that expresses lower levels of inflammatory cytokines and activation markers than their CCR2⁺ counterparts. They exhibited impaired phagocytosis and deficient chemotaxis in response to CCL2 and CCL7, besides being refractory to SIV infection and showing antiproliferative activity. We named these cells atypical CCR2⁻ classical (ACC) monocytes, and believe they play an important role in AIDS pathogenesis, possibly reflecting an anti-inflammatory response against the extreme immune activation observed during SIV and HIV infection. Antiretroviral therapy caused this population to decline in both macaque and human subjects, suggesting that this atypical phenotype may be induced by viral replication.

Descriptors: monocytes; macrophages; SIV; HIV; HIV-1; AIDS; CCR2

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Prefácio

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi inicialmente relatada em 1981, nos Estados Unidos da América, após o surgimento de então raras doenças oportunistas em homossexuais masculinos jovens, aparentemente saudáveis (Gottlieb et al., 1981; Hymes et al., 1981). Os cinco primeiros pacientes diagnosticados apresentavam infecções típicas relacionadas à imunodepressão, tais como pneumonia por *Pneumocystis carinii* (hoje conhecido como *P. jiroveci*), candidíase oral e retinite por citomegalovírus. Em 1983, dois artigos publicados independentemente por cientistas franceses e americanos confirmaram o agente etiológico da síndrome como sendo um vírus membro da família Retroviridae (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Devido à sua semelhança com membros do gênero *Deltaretroviridae*, o vírus causador da AIDS foi até 1986 comumente denominado *Vírus do Linfócito T humano tipo 3* (HTLV-III). Entretanto, após uma melhor caracterização das proteínas do capsídeo, o vírus foi reclassificado no gênero *Lentivirus* e denominado *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV) (Gallo et al., 1983). Também em 1986, uma segunda espécie foi identificada em pacientes africanos e denominada HIV-2 (Clavel et al., 1986).

Hoje, mais de vinte anos após o descobrimento do agente etiológico, a AIDS ainda representa uma das maiores epidemias conhecidas na história da humanidade, e tem sido responsável pela morte de mais de 23 milhões de pessoas em todo o mundo (UNAIDS, 2009). Uma vez que a transmissão do vírus se dá principalmente por contato sexual ou sanguíneo, o controle na disseminação da doença é dificultado por tabus religiosos e sociais, acentuado por falhas nos processos básicos educacionais e a carência de campanhas de prevenção efetivas. Logicamente, a falta de uma vacina representa um empecilho monumental na luta contra o vírus, embora o desenvolvimento de

drogas antirretrovirais e tratamentos eficazes das doenças oportunistas tenham auxiliado no controle da epidemia, na diminuição da mortalidade, e na melhoria do padrão de vida de pessoas que vivem com o HIV.

Oferecendo uma perspectiva otimista quanto à importância dessa epidemia na espécie humana, é importante salientar que, em resultado ao súbito aparecimento - ou pelo menos detecção - dessa síndrome no começo dos anos 80, foi observado um grande avanço nas áreas de microbiologia, biologia molecular, citologia e imunologia, tanto em conhecimento básico como no desenvolvimento de técnicas e protocolos. Pode-se dizer que, devido à AIDS, temos uma melhor compreensão das funções e regulações do sistema imune, e que descobertas feitas durante pesquisas focadas em combater o HIV também trouxeram informações cruciais para o combate e a defesa contra outras doenças infecciosas, tumores e doenças degenerativas.

Aqui, apresento os dados de meu projeto, onde a detecção de um dado aberrante durante a infecção aguda pelo *Vírus da Imunodeficiência Símia* (SIV), levou-me à descoberta de uma subpopulação de monócitos apresentando fenótipo atípico e funções alteradas. Acredito que esse subgrupo represente uma importante parte de uma atividade anti-inflamatória generalizada em resposta ao intenso processo inflamatório causado pela infecção viral durante a fase aguda.

2. Retrovírus e o HIV

Os retrovírus representam um grupo de vírus RNA fita simples positiva cuja principal característica é a expressão de uma enzima, denominada *transcriptase reversa*, que polimeriza um DNA complementar (cDNA) fita dupla a partir do RNA viral genômico (Coffin, 1996). A família é dividida em sete gêneros baseados na estrutura genômica e sequência de nucleotídeos, e apresenta um leque amplo de manifestações infecciosas, desde completamente benignas até letais, em diversas espécies animais. Independente da

classificação, todos os retrovírus têm tamanho semelhante (por volta de 120 nm em diâmetro) e apresentam estrutura similar, contendo duas cópias do RNA genômico em direta associação com proteínas do nucleocapsídeo, envoltos por um envelope formado a partir da membrana da célula hospedeira e de glicoproteínas virais, necessárias para entrada em novas células alvo (Figura 1). A estrutura genômica entre os membros dessa família também são extremamente semelhantes. Todos possuem um RNA biologicamente indistinguível de outros mRNAs celulares, apresentando os três genes principais - *gag*, *pol*, *env* - em ordem invariável.

Figura 1. Estrutura do HIV. Cortesia do website do NIAID (www.niaid.nih.gov).

O HIV, em especial, além dos genes já citados, também apresenta genes para a expressão de proteínas auxiliares necessárias a uma replicação eficiente. São elas a *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* (*vpx* para o HIV-2 e SIV) e *nef*.

Embora provenientes do mesmo RNA genômico, cada uma dessas proteínas, e também a sequência que codifica o gene *env*, são expressas a partir de variantes *spliced* do RNA (Greene, 1991; Various, 2008). Resumidamente, as funções atribuídas a cada um dos genes são (Figura 2):

Gag - Codifica proteínas para a formação do capsídeo através de um precursor p55 que é processado por proteases virais, gerando subunidades para a formação da matriz (p17), e do nucleocapsídeo (p24, p7 e p6).

Pol - Gera enzimas fundamentais para a replicação viral: a transcriptase reversa para formação do cDNA; a protease para a clivagem da p55 e consequente formação de viriões infecciosos; e a integrase para a integração do DNA genômico viral ao cromossomo da célula hospedeira.

Env - Codifica, a partir de uma proteína precursora gp160, as duas glicoproteínas necessárias para a adsorção viral à célula hospedeira, a gp41 e a gp120 (Chan et al., 1997).

Tat - Expressa o transcrito para a produção de uma proteína transativadora essencial para a transcrição de mRNAs completos para a expressão das outras proteínas estruturais e para a formação de genomas a serem incorporados em futuros viriões (Hauber et al., 1989; Strebel, 2003).

Rev - Codifica uma proteína necessária ao transporte de RNA não-*spliced* do núcleo para o citoplasma. Na ausência de *Rev*, genomas virais se acumulam dentro do núcleo, interferindo completamente com o ciclo de replicação (Strebel, 2003).

Vif - Codifica uma pequena proteína (23 kD) cuja função principal é a prevenção de hipermutações no cDNA viral causadas por deaminases celulares, especialmente a APOBEC3G (Strebel, 2003).

Vpu - É um gene encontrado apenas no HIV-1 e alguns SIVs semelhantes, como o SIV que infecta chimpanzés (SIVcpz). Codifica uma proteína que auxilia na infectividade viral através da interação com a *tetherin*, uma proteína dimérica da membrana celular que interfere na liberação de partículas virais das células hospedeiras (Bour and Strebel, 2003).

Vpr - Codifica uma proteína normalmente localizada no núcleo, e que parece interferir em processos celulares, tais como diferenciação e detenção do ciclo celular, auxiliando na expressão de proteínas virais (Muthumani et al., 2006).

Vpx - Codifica uma proteína encontrada no virião do HIV-2 e de alguns SIVs, como o SIV do mangabeu fugilento (SIVsmm) e dos clones isolados de macacos asiáticos (SIVmac). É extremamente necessária para a replicação do vírus em células de linhagem mielóide, como macrófagos, embora pareça não auxiliar a replicação viral em linfócitos (Srivastava et al., 2008).

Nef - Codifica uma proteína miristilada associada a diversas funções, relatadas mais claramente *in vivo* que *in vitro*. Entre elas, a manutenção de alto nível de replicação viral e a diminuição de expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em hospedeiros suscetíveis (Foster and Garcia, 2008).

Figura 2. Genomas do HIV e do SIV. Desenho esquemático comparando os genomas do HIV-1/SIVcpz com o HIV-2/SIVmac, baseado em ilustração de Sharp et al (Sharp et al., 2005).

Além das sequências específicas pra a codificação de proteínas, o RNA viral apresenta estruturas primárias e secundárias fundamentais para a replicação. As três principais estruturas seriam os LTRs, o TAR e o RRE. LTR,

ou Longas Repetições Terminais são sequências de nucleotídeos que flanqueiam o genoma codificante, necessárias para uma eficiente transcrição reversa e, na forma de cDNA, para a ligação com fatores de transcrição e de poliadenilação (Pereira et al., 2000). TAR (Região para Resposta Transativadora) e RRE (Elemento de Resposta ao *Rev*) são estruturas de formação secundária em forma de trevo que atuam como sítio de ligação para as proteína *Tat* e *Rev*, respectivamente (Various, 2008).

3. HIV e SIV

Tanto o HIV-1 com HIV-2 apresentam alta homologia com o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), embora o vírus humano tipo 1 possua maior semelhança com o SIVcpz, a cepa que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes*) e o vírus tipo 2, com o SIVsmm, a cepa que infecta o mangabeu fugilento (*Cercocebus atys*), uma espécie de macaco cercopitecideo africano (Gardner and Luciw, 1988; Various, 2008). Estudos de comparação dos genomas comprovaram que infecções pelos HIVs representam zoonoses originadas de patógenos símios transmitidos para os seres humanos através de contato sanguíneo causado pelo uso de macacos como fonte de alimento (De Cock, 2001). É importante ressaltar que o SIV não causa sintomas em mangabeus, mas leva ao desenvolvimento de AIDS em macacos cercopitecideos asiáticos do gênero *Macaca*, como o macaco reso (*Macaca mulatta*) e o macaco rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*) (Benveniste et al., 1988; Murphey-Corb et al., 1986). Estudos epidemiológicos em chimpanzés não cativos infectados pelo SIVcpz constataram que, ao contrário do que se acreditava, tais animais podem desenvolver sintomas semelhantes à AIDS humana (Keele et al., 2009).

Devido à semelhança entre o HIV e o SIV, vários modelos animais foram desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de simular sintomas de AIDS em animais de laboratório para estudos de patogenia e desenvolvimento de vacinas e tratamentos antivirais. Usando cepas de SIV, ou mesmo um vírus

quimérico entre o HIV e o SIV (SHIV), e diferentes espécies do gênero *Macaca*, vários grupos têm publicado resultados e descoberto aspectos da AIDS que não seriam possíveis em estudos com pacientes humanos (Zink et al., 2006). Por exemplo, há dificuldade em estabelecer precisamente a data em que um ser humano é infectado pelo vírus, uma vez que os sintomas podem levar meses ou anos para se manifestar (Baskin et al., 1986). Com isso, estudos precisos sobre fenômenos imunológicos durante a fase aguda da infecção só podem ser completamente validados em animais onde se sabe com certeza a data da inoculação viral (Barber et al., 2006; Witwer et al., 2009; Zink and Clements, 2002). Outro exemplo seria a dificuldade na coleta constante de amostras biológicas como sangue, lavado bronco-alveolar e líquido cefalorraquidiano, e também na obtenção de biópsias de órgãos vitais como cérebro (Barber et al., 2006; Clements et al., 2008).

4. Ciclo de vida do HIV e SIV

Ambos os vírus podem ser transmitidos de animal a animal através de partículas virais infectivas livres em fluídos ou através de células infectadas contendo o genoma viral integrado. Uma vez em condições favoráveis à infecção, o HIV/SIV penetra em células suscetíveis através da ligação da glicoproteína viral gp120 com um receptor de membrana celular específico, o CD4, um membro da superfamília de imunoglobulinas altamente expressado em células T CD4⁺, mas também encontrado em menor grau em células de linhagem mielóide, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (Connor and Ho, 1994; Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Little et al., 1999).

Uma vez ligada ao receptor, mudanças conformacionais na gp120 levam à exposição de outros sítios de ligação da proteína a outros co-receptores, entre eles o CCR5 (para o HIV e SIV) e CXCL4 (apenas para o HIV), estabilizando a proximidade do envelope viral à membrana celular (Clapham and McKnight, 2001, 2002). Outros correceptores podem também participar do

processo de adsorção, mas de maneira menos eficiente (Unutmaz et al., 1998). Uma vez que o vírião é adsorvido, as duas membranas, viral e celular, fundem-se num processo mediado pela gp41, permitindo com que o capsídeo viral seja liberado dentro da célula hospedeira.

Dentro do citoplasma, enzimas celulares iniciam o processo de descapsidação, enquanto, concomitantemente, proteínas virais e celulares transcrevem o genoma viral de RNA para cDNA, gerando formas circulares denominadas 2LTRs (Zazzi et al., 1997). Ainda não está completamente estabelecido o processo pelo qual o cDNA penetra no núcleo, embora saiba-se que uma estrutura peculiar típica dos Lentivírus, contendo três fitas de DNA gerada durante a transcrição reversa (“DNA flap”) seja necessária para tal translocação (Arhel et al., 2007; Zennou et al., 2000). Chegando ao núcleo, o genoma viral é integrado ao DNA da célula hospedeira e RNAs começam a ser transcritos para a expressão de proteínas virais (Stevenson et al., 1990; Zack et al., 1992).

Fatores de transcrição celulares, principalmente NFkB, SP1 e C/EBP β , ligam-se a sequências do LTR viral iniciando a síntese de mRNAs (Pereira et al., 2000). Entretanto, uma transcrição eficiente só acontece após a expressão inicial da proteína *tat*, que retorna ao núcleo e liga-se à estrutura genômica TAR, aumentando a processividade de RNAs (Feinberg et al., 1991). Assim que as proteínas virais começam a ser produzidas, viriões formados pelo capsídeo e pelo mRNA viral genômico se juntam para o processo de montagem e migram para a membrana celular (Ganser-Pornillos et al., 2008). Uma vez próximas à membrana, proteínas do capsídeo ligam-se às porções C-terminal da gp41, levando ao envelopamento das partículas virais e sua liberação ao meio extracelular. É importante ressaltar a importância das proteases virais no processo de maturação viral, já que os viriões saem das células ainda imaturos e só se tornam infectivos após clivagem da p55 (Kohl et al., 1988).

5. AIDS

As infecções pelo HIV em humanos e pelo SIV em cercopithecídeos asiáticos levam a um quadro de profunda deficiência imunológica de lenta evolução, levando de meses (para macacos) a anos (para humanos) para que os sintomas se manifestem, sendo possível dividir a síndrome em três fases distintas.

Durante a fase inicial (ou aguda), é observada uma intensa multiplicação viral acompanhada ou não de sintomas (Little et al., 1999). Pacientes podem apresentar febre alta, dor de garganta, fadiga e linfonodomegalias, sintomas esses que podem ser confundidos com outras infecções de menor seriedade (McMichael et al., no prelo). É nesse período que o vírus se espalha e invade tecidos e órgãos, iniciando o processo de estabelecimento de reservatórios virais (Graham et al., no prelo). Em macacos infectados, RNA viral do SIV pode ser detectado em baço, pulmão e cérebro, três dias após inoculação (Babas et al., 2003; Babas et al., 2001; Clements et al., 2005). É nesse período que também observamos uma intensa linfopenia no sangue e em órgãos linfóides, particularmente no tecido linfóide associado ao intestino onde aproximadamente 80% de células T CD4⁺ são depletadas nas primeiras três semanas (Chase et al., 2007; Mehndru et al., 2007). Não só a infecção viral leva essas células à morte, mas também à ativação celular acompanhada de apoptose (Shacklett et al., 2004). Logicamente, uma multiplicação viral tão intensa é recebida por uma resposta inflamatória inata via interferon, gerando uma "tempestade de citocinas" (*cytokine storm*) no sangue que só volta aos níveis normais depois de 20 dias p.i. (Stacey et al., 2009).

RNA viral pode ser detectado no sangue muito cedo, logo após a infecção, por volta de 10 dias p.i. (Little et al., 1999). Anticorpos específicos geralmente aparecem depois de algumas semanas a meses, mas respostas específicas de células CD8⁺ podem ser mensuradas entre 10 e 20 dias p.i. (McMichael et al., no prelo).

Após a fase aguda, é observado um período assintomático, com um retorno e estabilização da população de células CD4⁺ no sangue e uma queda na carga viral. Durante esta fase, também chamada crônica, os indivíduos infectados não apresentam sintomatologia visível, embora a replicação viral seja contínua (Nowak et al., 1996). Gradualmente, a população de células CD4⁺ diminui até gerar um quadro de profunda desregulação imunológica, com o aparecimento de doenças oportunistas e neoplasias raras. Antes do desenvolvimento de programas terapêuticos antirretrovirais, a presença dessas moléstias em pacientes HIV⁺ era considerada uma sentença de morte. Em alguns casos, multiplicação do próprio HIV/SIV no cérebro pode causar um quadro inflamatório intenso levando à encefalite e a sintomas neurológicos, culminando com demência (no caso de seres humanos) e morte (Power and Johnson, 1995).

Em 1996, com o advento da HAART (terapia antirretroviral altamente ativa), o número de casos de morte relacionados a AIDS foi substancialmente reduzido, embora o número de pessoas infectadas pelo HIV continue aumentando (UNAIDS, 2009). Curiosamente, os casos de demência associados a AIDS também reduziram, embora os casos de desordens neurocognitivas continuem presentes mesmo em pacientes tratados (Anthony et al., 2005). Atualmente, mais de dez anos após a introdução de HAART, novos estudos estão se concentrando nas características biológicas dos reservatórios virais, com o objetivo de estabelecer um regime terapêutico visando não só o controle da replicação viral, mas uma eliminação total do agente etiológico (Geeraert et al., 2008).

6. Monócitos e AIDS

A depleção de linfócitos CD4⁺ foi um dos primeiros eventos a serem descritos na AIDS, e ainda é amplamente utilizada como marcador de prognóstico e como parâmetro indispensável para a decisão do momento que

deve ter início a terapia antirretroviral (Hammer et al., 2008). Consequentemente, o estudo dos linfócitos recebeu uma ênfase maior do que o de outras células do sangue, embora outras populações de leucócitos, como linfócitos B, neutrófilos, células NK, células NKT e plaquetas, também tendam a declinar ou perder funcionalidade durante infecção por HIV ou SIV em hospedeiros suscetíveis (Brunetta et al.; Moir et al., 2004; Pitrak, 1997; Snyder-Cappione et al., 2009; Wachtman et al., 2006; Ward et al., 2009).

Em contraste com as células T CD4⁺, a população de monócitos parece se expandir durante a infecção por HIV e SIV, facilitando a propagação viral em diversos órgãos e tecidos através da migração de células infectadas (Burdo et al.; Crowe et al., 2003; Heinzinger et al., 1995; Zhu, 2002). Estudos também comprovaram que uma maior "rotatividade" (*turnover*) de monócitos está correlacionada à progressão para AIDS em macacos infectados por SIV, e a expansão de subpopulações fenotípicas específicas tem sido associada ao desenvolvimento de sintomas neurológicos associados ao HIV (*HIV associated neurological disease*, HAND) e ativação da tuberculose (Burdo et al.; Pulliam et al., 1997; Vanham et al., 1996).

Monócitos são frequentemente descritos como células de transição, cuja principal função é o reabastecimento da população de fagócitos em tecidos através da diferenciação em macrófagos e outras células especializadas, como microglia, osteoclastos e células dendríticas. Entretanto, durante sua curta presença no sangue, monócitos são mais do que expectadores passivos. Eles estão constantemente patrulhando os vasos sanguíneos, detectando patógenos e células indesejadas (neoplasias ou em apoptose) e eliminando-os de circulação (Cros et al., no prelo). Além disso, eles respondem rapidamente à estimulação por quimiocinas, além de mediar funções importantes na resposta imune, produzindo copiosas quantidades de citocinas (Strauss-Ayali et al., 2007; Weber et al., 1999).

O conceito de que macrófagos e monócitos são variantes de um mesmo tipo celular não ficou claro até o começo do século 20. Ambos, juntamente com neutrófilos, eram classificados como fagócitos, embora tenha sido possível

distingui-los pelas diferenças em tamanho, forma do núcleo e granularidade. Até por volta de 1920, fagócitos mononucleares do sangue eram independentemente chamados de *leucócitos endoteliais de Mallory*, *histiócitos sanguíneos de Aschoff*, e *grandes leucócitos mononucleares de Ehrlich*, e ainda hoje não está evidente quando a palavra *monócito* apareceu na literatura pela primeira vez (Doan, 1926; Doan and Sabin, 1926). Florence Sabin, em um artigo publicado no Boletim da Escola de Medicina Johns Hopkins em 1921, atribui o cunhar do vocábulo a Otto Nägeli em seu manual para técnicas em marcação do sangue, *Blutkrankheiten und Blutdiagnostika*, publicado em 1912 (Sabin, 1921). Sabin também confirma as observações feitas por outros investigadores de que dois tipos celulares distintos pertencentes à linhagem monocítica povoam o sangue: os “leucócitos mononucleares grandes”, geralmente arredondados com um núcleo levemente acêntrico com chanfraduras, e uma “célula de transição”, geralmente irregular com “partículas um tanto ativas no citoplasma” (Sabin, 1923). Embora seus comentários sejam possivelmente relacionados a estados diferentes de ativação celular, mais tarde foi observado que monócitos realmente apresentam distintas subpopulações que variam quanto a morfologia nuclear, tamanho, granularidade e função (van Furth and Cohn, 1968).

Nas décadas passadas, com o advento da citometria de fluxo multicolorida e com a melhoria de anticorpos conjugados, monócitos não só foram mais facilmente distinguidos de outros leucócitos no sangue, mas também separados em diferentes subpopulações com funções e marcadores de superfície distintos (Gordon and Taylor, 2005). Baseando-se nos níveis de expressão de CD14 (receptor para LPS) e CD16 (FcγRIII) mensurados por citometria, três subgrupos bem definidos foram identificados em humanos e outros primatas: CD14^{high}CD16⁻, denominados *clássicos* ou *inflamatórios*; CD14^{dim}CD16⁺, denominados *não-clássicos*, *residentes*, ou *pró-inflamatórios*; e um subgrupo de transição CD14^{high}CD16⁺, denominado *intermediário*. Subpopulações com funções similares foram encontradas em camundongos e ratos, embora outros marcadores de superfície (Ly6C, 7/4) sejam usados para

tal classificação (Geissmann et al., 2003; Kim et al., no prelo; Sunderkotter et al., 2004).

A origem de cada um dos subgrupos ainda se mantém polêmica. É de consenso geral que a subpopulação de monócitos clássicos, que compreende mais de 80% do total de monócitos circulantes, origina-se de células progenitoras na medula óssea, e apresenta um perfil transcriptômico semelhante aos precursores mielóides (Ancuta et al., 2009). *Eles* expressam receptor para quimiocina C-C 2 (CCR2) e migram para o sangue, e do sangue para sítios inflamatórios, basicamente através do eixo CCR2/CCL2. Uma vez alcançando os tecidos, eles se diferenciam em macrófagos ou, em alguns casos, células dendríticas (Cheong et al., no prelo; Yona and Jung, no prelo). Monócitos não-clássicos, ao contrário, parecem representar um estado de diferenciação mais avançado, próximo a macrófagos residentes. Ainda não está claro se eles se originam diretamente de células progenitoras na medula óssea, ou se evoluem a partir de monócitos clássicos através de uma fase intermediária (Figura 3). É possível que ambas vias coexistam e que o uso de modelos animais com camundongos transgênicos ajude a elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo. Independente de sua origem, estudos em camundongos e em seres humanos demonstraram que monócitos não-clássicos são os principais provedores de macrófagos residentes e células dendríticas a órgãos saudáveis (Geissmann et al., 2008). Eles migram para os tecidos em resposta a MIP-1alpha, RANTES e CX3CL1, mas não a CCL2, já que não expressam CCR2 em sua superfície (Gordon and Taylor, 2005; Sunderkotter et al., 2004). Pelo menos em camundongos, monócitos não-clássicos estão envolvidos no reparo de ferimentos e no remodelamento dos tecidos após infarto do miocárdio (Cochain et al., no prelo). Em humanos, foi recentemente demonstrado num elegante estudo por Cros et al. que essa população de CD14^{dim}CD16⁺ patrulha o endotélio dos vasos sanguíneos e responde a viroses via TLR7 e TLR8, ao contrário de monócitos clássicos e intermediários, que respondem a sinais associados à infecção bacteriana (Cros et al., no prelo).

Figura 3. Mudanças fenotípicas em monócitos. Ilustração (originada de publicação de Gordon & Taylor (Gordon and Taylor, 2005)) mostrando o desenvolvimento e funções das subpopulações de monócitos em camundongos.

Novos fenótipos de monócitos circulantes têm sido recentemente descritos na literatura, indicando que a sua heterogeneidade não está restrita aos três subtipos típicos. Alguns monócitos expressam o receptor para angiopoietina Tie-2 e, portanto, exibem intensa atividade pró-angiogênica, correspondendo a 35-75% do subgrupo não-clássico no sangue de pacientes humanos com câncer (Venneri et al., 2007). Monócitos $CD16^{++}CCR2^{-}$ que produzem altos níveis de *heme-oxygenase* (HO)-1 parecem exercer um papel anti-inflamatório durante a doença de Kawazaki e também durante a infecção pelo vírus influenza (Mizuno et al., 2005; Yachie et al., 2003). Outro exemplo seria células $CD14^{dim}CD16^{+}$ que também expressam o receptor de Fcγ tipo I, CD64, em conjunto com altos níveis de HLA-DR, CD11c e CD876, possivelmente representando um fenótipo intermediário entre monócitos e células dendríticas.

Neste presente estudo, análise de subpopulações de monócitos durante a fase aguda da infecção pelo SIV usando um modelo para HAND e HAART, levou-nos à descoberta de um subgrupo inédito de $CD14^{+}CD16^{-}$ que não expressa CCR2 de superfície, sendo assim não responsivo a CCL2. Eles apresentam um transcriptoma único, com distintos marcadores de superfície, e fagocitose alterada. Este subgrupo persiste durante todo o processo infeccioso, e apresenta uma função antiproliferativa, alterando o padrão normal de proliferação de linfócitos $CD8^{+}$ durante a fase aguda da infecção por SIV. É também demonstrado que pacientes humanos infectados pelo HIV apresentam essa subpopulação, e que o tratamento antiviral eficaz, tanto em macacos como em humanos, é capaz de reverter este subgrupo a níveis de pré-infecção.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo 1. Analisar as subpopulações de monócitos durante a fase aguda da infecção por SIV, utilizando o modelo acelerado e reproduzível de AIDS e HAND.

Objetivo 2. Caracterizar a subpopulação de monócitos $CD14^{high}CD16^{-}CCR2^{-}$ quanto ao fenótipo e função.

Objetivo 3. Avaliar a existência dessa população celular em pacientes humanos recém infectados pelo HIV.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Quarenta e quatro macacos rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*) foram inoculados por via intravenosa com uma combinação de duas cepas de SIV; a SIV/DeltaB670, composta de uma população heterogênea isolada primariamente de um macaco reso com leucemia, e a SIV/17E-Fr, uma cepa quimérica trópica para macrófagos, geneticamente desenvolvida através da substituição do gene do envelope da cepa SIVmac239 pelo da cepa SIVbrain. Tal combinação, em concentrações de 50 e 10.000 DI₅₀ respectivamente, leva ao desenvolvimento de AIDS em menos de 100 dias em 100% dos animais inoculados. Em mais de 90% dos animais, é também observado o aparecimento de sintomas neurológicos, fazendo com que esse modelo seja essencial para o estudo de distúrbios neurológicos relacionados à AIDS (Zink et al., 1999).

Aos 12 dias pós-inoculação (p.i.), seis animais foram tratados com uma combinação de quatro antirretrovirais (30 mg/kg de PMPA uma vez ao dia, saquinavir a 205 mg/kg, atazanavir a 270 mg/kg e o inibidor de integrase L-870812 a 10 mg/kg, duas vezes ao dia) e sacrificados após 160 a 186 dias p.i., como previamente descrito (Dinosa et al., 2009). Um outro grupo de três macacos foram tratados com uma combinação de três drogas (PMPA, atazanavir e L-870812) começando aos 42 dias p.i., e também sacrificados após 160 dias p.i. Grupos de macacos não tratados (seis cada) foram sacrificados após 7, 14 e 21 dias p.i.. Todos os outros animais foram sacrificados entre 50 e 90 dias p.i. Dois macacos foram inoculados com solução salina e usados como controle negativo. Antes da eutanásia, os animais foram submetidos à perfusão com solução fosfato tampão (PBS) para eliminação de células sanguíneas dos tecidos, e os órgãos foram coletados para fixação e

congelamento. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as leis federais e institucionais americanas.

2. Pacientes

Amostras humanas foram selecionadas a partir de uma coorte elaborada para o recrutamento de pessoas infectadas pelo HIV em São Paulo, Brasil (Bassichetto et al., 2008; Kallas et al., 2004). Infecções recentes foram determinadas pelo Algoritmo de Teste Sorológico para Soroconversão Recente pelo HIV (STARHS). Foram incluídos neste estudo pacientes que apresentaram resultado negativo para o Ensaio ELISA-HIV com desensibilização negativa. Tratamento antirretroviral foi iniciado quando a contagem de células T CD4⁺ atingiram valores menores que 300 células/ μ l sangue ou no caso de identificação de qualquer condição que defina AIDS. Doze pacientes foram escolhidos aleatoriamente para avaliação das subpopulações de monócitos no início do estudo, três meses mais tarde e seis meses ou mais após a data inicial. Outro grupo com seis pacientes foram avaliados antes e após a iniciação de terapia antirretroviral.

3. Amostras

Amostras de sangue foram coletadas em diferentes momentos, antes e após a inoculação (Zink et al., 1999). Sangue fresco total foi utilizado para análise de citometria e também enviado a laboratórios padrões para contagem de células. Para alguns experimentos, células periféricas mononucleares (PBMC), previamente coletadas em momentos diferentes e mantidas em nitrogênio líquido, foram rapidamente descongeladas em RPMI contendo 25% de soro fetal bovino (SFB) e manipuladas em gelo para manter a viabilidade dos monócitos. Depois de uma lavagem a frio com RPMI com 10% SFB (R10),

as células foram aliquotadas para análise de citometria e ensaios funcionais, abaixo descritos.

4. Quantificação da carga viral em plasma

A quantificação de cópias de SIV no sangue foi realizada por PCR quantitativo em amostras de RNA purificadas a partir de 140 µl de plasma, como previamente descrito (Clements et al., 2002). Reações foram feitas em triplicatas, além de uma quarta reação realizada sem transcriptase reversa, para controle de contaminação por DNA. Cópias foram determinadas pela extrapolação de uma curva padrão utilizando-se transcritos clonados produzidos *in vitro*.

5. Quantificação de citocinas em plasma

A quantificação de citocinas plasmáticas foram realizadas por ELISA de acordo com protocolos do fornecedor. Para TNF α e IFN γ , foram testados kits de várias empresas (BD, R&D, Invitrogen) e nenhum ofereceu resultados reprodutíveis usando amostras de plasma símio. Para a detecção de CCL2 utilizamos o kit Quantikine Human for MCP-1 ELISA (R&D), e para CXCL4, o kit DuoSet CXCL4/PF4 ELISA DY 795 (R&D).

Ao testarmos o ensaio para CXCL4, observamos níveis exacerbados da citocina mesmo em animais não infectados. Após várias tentativas, modificamos o processo de obtenção de sangue e ao invés de seringas padrões, passamos a utilizar tubos Vacutainer (BD) com o objetivo de diminuir a ativação espontânea de plaquetas durante a coleta.

5. Citometria de fluxo

Amostras de sangue de macacos foram coradas com anticorpos conjugados CD14 (FITC), anti-CCR2 (PE) e CD16 (PE.Cy5) por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram fixadas por 10 minutos com tampão Lise/Fix (BD), lavadas em tampão PBS e analisadas em um citômetro FACSCalibur usando o software CellQuest. Para amostras submetidas à marcação intracelular, células foram fixadas e permeabilizadas concomitantemente utilizando-se o kit Cytotfix/CytopermTM (BD). PBMCs provenientes de amostras congeladas foram coradas com combinações diferentes de anticorpos, por 30 minutos no gelo. A lista com informações de todos os anticorpos está apresentada na tabela 1 abaixo. Após fixação, as amostras foram analisadas em um citômetro BD FACSFortessa utilizando o programa DIVA. PBMCs humanas congeladas foram processadas e avaliadas de forma semelhante em um citômetro FACSCanto ou FACSFortessa utilizando o programa DIVA. Para cada amostra, cem mil eventos foram adquiridos. Todos os dados foram posteriormente analisados usando o software FlowJo (TreeStar).

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados para citometria e seleção

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD14	FITC	M5E2	BD
CD14	Qdot 655	TUK4	Invitrogen
CD14	PerCP-Cy5.5	M5E2	BD
CCR2	PE	48607	R&D
CCR2	APC	48607	R&D
CD16	PE-Cy5	3G8	BD
CD16	PE	3G8	BD
CD16	Alexa Fluor 700	3G8	BD
CD3	V500	SP34-2	BD
CD3	Pacific Blue	SP34-2	BD
CD3	FITC	SP34-2	BD
CD4	FITC	M-T477	BD
CD8	Pacific Blue	RPA-T8	BD
CD8	Qdot 565	3B5	Invitrogen
CD20	eFluor® 450	2H7	eBiosciences
CD20	FITC	2H7	BD
HLADR	Qdot 605	TU36	Invitrogen
MMR	APC-Cy7	15-2	Biolegend
LIVE/DEAD *	Aqua (AmCyan)		Invitrogen
LIVE/DEAD *	Near IR (APC-Cy7)		Invitrogen

* Marcação para distinção de células viáveis

6. Seleção (*sorting*) de subpopulações de monócitos

PBMCs de macacos foram descongeladas como acima descrito e incubadas com anticorpos anti-anexina conjugados com esferas magnéticas para eliminação de células mortas e em apoptose. Em seguida células foram

marcadas com anticorpos CD3 e CD20 (FITC), CD14 (PerCP-Cy5.5), CD16 (PE) e anti-CCR2 (APC). Depois de 30 minutos no gelo, as células foram fixadas com formol a 4% e selecionadas em um citômetro BD Aria SO.

7. Extração de ácidos nucléicos

DNA genômico e RNA total foram isolados a partir de células selecionadas usando o kit Allprep DNA/RNA-FFPe (Qiagen), com modificações. Resumidamente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PKD com 10 µl de proteinase K. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 55°C e, em seguida, mantidas em gelo por 5 minutos. Lisados celulares foram centrifugados a 10.000xg por 15 minutos. Concentrados celulares foram ressuspensos em tampão ATL e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. O sobrenadante contendo o RNA foi incubado por 15 minutos a 80°C e rapidamente misturado com dois volumes de etanol 100% e 1 mg de RNA não-específico liofilizado (*carrier*). Depois de 30 minutos a -20°C, o RNA foi peletizado por centrifugação e ressuspendido em 6 µl de água *RNase-free*.

8. Quantificação de mRNAs

Para quantificação de mRNAs utilizamos o método Nanostring, uma nova metodologia baseada em sondas hibridizantes e contagem absoluta de moléculas específicas, onde cada gene é identificado por um conjunto de esferas fluorescentes de coloração distinta. Um conjunto de sondas (*CodeSet*) específicas para 90 genes de macaco foram elaboradas de acordo com especificações da empresa, baseadas em sequências de DNA publicadas para o genoma de macaco reso. As amostras de RNA foram hibridizadas por 16 horas com o CodeSet, e os genes foram quantificados usando um Analisador Digital nCounter (Geiss et al., 2008). Os dados foram normalizados pela média

geométrica de quatro genes de expressão constitutiva (*actina*, *GAPDH*, *hipoxantina fosforribosiltransferase*, *porfobilinogênio deaminase*). Dados originais com valores abaixo do limiar de detecção foram considerados negativos.

9. Quantificação de DNA viral

Amostras de DNA foram analisadas para SIV *gag* por PCR quantitativo (qPCR), como descrito anteriormente (Clements et al., 2002). Formas 2LTR do SIV foram quantificadas concomitantemente na mesma reação com o seguinte conjunto de *primers* e sonda:

2LTRF-GAAGACCCTGGTCTGTTAGGACC

2LTRR-CTTGCACTGTAATAAATCCCTTCCA

2LTR-HEX-TTTGGGAAACCGAAGCAGGAAAATCC

O protocolo utilizado foi baseado em publicações anteriores, e consiste de 45 ciclos de 95°C (15 segundos), 55°C (30 segundos) e 60°C (30 segundos).

O número de cópias foi determinado por extrapolação a partir de uma curva padrão gerada pela diluição em série de plasmídeos contendo as sequências de DNA específicas para cada amplicon. Os resultados foram normalizados pelo número de cópias de IFN β , um gene que apresenta apenas um loco no genoma de mamíferos.

10. Ensaio de Fagocitose

PBMCs foram descongeladas como acima descrito. Duzentas mil células foram ressuspensas em R10 e transferidas para placas Hydrocell™ de baixa aderência (Nunc), misturadas com 20 μ l de partículas de *E. coli* cobertas com pHrodo™ (Invitrogen), um fluorocromo não fluorescente que passa a fluorescer em ambiente ácido, como em lisossomos. Após 30 minutos a 37°C, as células foram incubadas em gelo e coradas com anticorpos conjugados para análise de citometria. Além do cultivo de células sem pHrodo™ para controle da

viabilidade, alíquotas das mesmas células foram incubadas com pHrodo™, mas mantidas em gelo para evitar a fagocitose e serem usadas como controle negativo.

11. Ensaio de Quimiotaxia

Câmaras de Invasão BD BioCoat™ Matrigel™ foram utilizadas para experimentos de quimiotaxia, seguindo as instruções do fabricante. Este sistema contém uma câmara superior com uma membrana com poros de 10 µm coberta com uma matriz gelatinosa que impede a transmigração de células não-invasivas. Resumidamente, câmaras superiores contendo 2×10^5 PBMCs descongeladas em 500 µl de R10 foram transferidas para uma placa de baixa adesão Hydrocell™ de 24 poços, com 100 ng/ml de CCL3, CCL2 ou CCL7 em 500 µl de R10. Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como controle negativo para cada amostra. Após 24 horas de incubação a 37°C, as células que migraram para os poços inferiores foram divididos em dois grupos, de modo que 30% pudessem ser contadas em hemocítômetro e 70% pudessem ser marcadas para análise de citometria.

12. Ensaio de proliferação

Linfócitos foram purificados de PBMCs recém isoladas de um macaco saudável usando esferas magnéticas para a eliminação de monócitos CD14⁺ (Miltenyi). Após marcação com um corante de membrana (Vybrant Dil – Invitrogen) por 10 minutos, células foram lavadas com R10 e incubadas por 60 minutos em meio para proliferação (R10 contendo 25 µg/ml de fitohemaglutinina (Sigma) e 2 U/ml de IL2 (ProSpec, Israel)).

Concomitantemente, monócitos CD14⁺CD16⁻ foram isolados de PMBCs viáveis provenientes de 3 macacos não infectados e 3 macacos infectados pelo SIV e sacrificados aos 14 dias p.i., utilizando-se um kit para seleção negativa de monócitos (Miltenyi). Monócitos CCR2⁺ foram eliminados das populações purificadas de macacos infectados usando esferas magnéticas.

Uma vez purificados, os monócitos foram misturados aos linfócitos marcados (10.000 monócitos por 100.000 linfócitos) e incubados em meio de proliferação por 72 horas. Células foram então marcadas para citometria, fixadas e analisadas quanto à intensidade do marcador de membrana.

13. Análise Estatística

Diferenças no número absoluto de células e na proporção de monócitos clássicos CCR2⁺/CCR2⁻ em diferentes momentos da infecção foram analisadas pelo teste de *rank* pareado de Wilcoxon. Resultados da quantificação de RNA pelo Nanostring foram analisados pelo teste-t pareado e corrigidos pelo método para múltiplas comparações de Bonferroni. Os demais resultados foram analisados usando o teste-t de Mann-Whitney. Todos os cálculos estatísticos foram executados pelo programa Prism (GraphPad Software).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterização da fase aguda da infecção pelo SIV em um modelo animal consistente e acelerado para AIDS e doenças do sistema nervoso central

Para o estudo de mudanças populacionais de leucócitos durante a fase aguda da infecção pelo SIV, utilizamos um modelo animal consistente e acelerado para o estudo da AIDS e de doenças do sistema nervoso central relacionadas ao HIV, desenvolvido pelo Laboratório de Retrovirologia da Universidade Johns Hopkins em Baltimore, EUA. Nesse modelo, macacos rabo-de-porco (*Macaca nemestrina*) são inoculados com o enxame imunossupressor SIV/DeltaB670 em conjunção com um clone molecular neurotrópico SIV/17E-Fr, fazendo com que mais de 90% dos animais apresentem encefalite no prazo de três meses, e que 100% apresentem AIDS, aqui caracterizada pela depleção profunda dos linfócitos T CD4⁺ (Clements et al., 2005). O RNA viral pode ser detectado no cérebro aos 4 dias p.i., sendo que macrófagos perivasculares derivados de monócitos recentemente migrados do sangue periférico representam a principal fonte de replicação viral (Witwer et al., 2009).

No presente estudo, utilizamos dados obtidos de quatro grupos de macacos (dois com seis animais e dois com quatro) inoculados com o mesmo estoque padrão, porém em épocas diferentes. Amostras de sangue foram coletadas antes da inoculação e aos 7, 10, 14, 21 e 28 dias p.i. para serem analisadas por citometria de fluxo. Plasmas isolados de tais amostras foram utilizados para quantificação de RNA viral.

Sete dias após a inoculação já pôde ser observada uma elevada carga viral em todos os animais, que assim se manteve até 14 dias p.i. (Figura 4). Ao contrário da infecção pelo HIV em humanos, foi observado um controle viral reduzido logo após a fase aguda, fazendo com que esse modelo animal

apresente em geral uma fase assintomática curta, de 3 a 8 semanas (Clements et al., 2008).

Figura 4. Carga viral plasmática durante a fase aguda em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

O declínio de linfócitos T CD4⁺ durante a fase aguda, entretanto, foi semelhante ao que se observa em seres humanos com HIV. Em 3 animais, pôde-se observar um retorno a níveis semelhantes à pré-inoculação, mas a vasta maioria (17 em 20 macacos) apresentou uma visível depleção após 21 dias p.i. (Figura 5). O mesmo foi observado em populações de linfócitos B, onde um declínio ainda mais acentuado do que o observado em linfócitos T CD4⁺ nos primeiros 7 dias p.i. foi mantido durante toda a fase aguda (Figura 6).

Linfócitos T CD8⁺ e células NK, por sua vez, apresentaram uma depleção transitória aos 7 dias p.i., retornando a níveis normais ao final da fase aguda (Figuras 7 e 8). Em nosso modelo usamos o fenótipo CD3⁺CD8⁺CD16⁺ para a marcação de células NK já que CD56 é encontrado na superfície de monócitos em macacos (Carter et al., 1999).

Nem todos os leucócitos apresentaram concomitante declínio acentuado. A população de neutrófilos manteve-se praticamente constante durante os 21

primeiros dias de infecção, com a exceção de uma queda significativa e abrupta aos 10 dias p.i. em 100% dos animais (Figura 9).

Figura 5. Número absoluto de linfócitos T CD4⁺ em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Figura 6. Número absoluto de linfócitos B CD20⁺ em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada

representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Figura 7. Número absoluto de linfócitos T CD8⁺ em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Figura 8. Número absoluto de células *natural killer* (NK) em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Figura 9. Número absoluto de neutrófilos em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Plaquetas também apresentaram variações populacionais significantes durante a fase aguda, com declínio paulatino durante os 10 primeiros dias, seguido de uma fase de expansão até o dia 21 p.i., com um retorno a níveis normais (Figura 10).

Figura 10. Número absoluto de plaquetas em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

2. Alterações em subpopulações de monócitos do sangue periférico durante a infecção aguda pelo SIV

Monócitos foram inicialmente distinguidos de outros leucócitos pelo tamanho e granularidade (*FSC* e *SSC*) e depois avaliados pelos seus níveis de expressão de *CD14* e *CD16* (Figura 11). Assim como foi proposto pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional das Sociedades de Imunologia, monócitos clássicos foram definidos como $CD14^+CD16^-$, monócitos intermediários como $CD14^{high}CD16^+$ e monócitos não-clássicos como $CD14^{dim}CD16^+$ (Ziegler-Heitbrock et al.). Células expressando baixos níveis de *CD14* e *CD16* foram previamente identificadas como uma população heterogênea de leucócitos não-monocíticos e não foram consideradas em nossas análises (Kim et al., no prelo).

Figura 11. Estratégia de citometria para a classificação de monócitos circulantes.

Uma mudança significativa no número total de monócitos circulantes foi observada nos 28 primeiros dias p.i., e foi caracterizada por três fases distintas: um período inicial de declínio, seguido de expansão, e um retorno a níveis de pré-inoculação (Figura 12).

Figura 12. Número absoluto de monócitos em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha preta contínua representa a mediana para cada dia de amostragem. Asteriscos denotam valores p baseados no teste pareado de Wilcoxon comparando o número absoluto de células entre diferentes dias de amostragem: Não infectado versus 7 dias p.i. (*); 7 dias versus 14 dias p.i. (**); 14 dias versus 21 dias p.i. (***).

Apesar de todos os subgrupos apresentarem tendências semelhantes individualmente (Figura 13), suas contribuições para a população monocítica em geral em cada uma das três fases foram visivelmente diferentes. Aos 7 dias p.i., o número absoluto de monócitos clássicos e intermediários foi significativamente reduzido ($p < 0,05$ para ambos), indicando que esses subgrupos são os principais responsáveis pela depleção inicial observada na população total. Ambos subgrupos apresentam $CD14^{high}$, enquanto que nenhuma alteração significativa foi observada no subgrupo não-clássico $CD14^{dim}CD16^{+}$ ($p = 0,31$). Após este declínio transitório, todas as subpopulações se expandiram significativamente levando a uma monocitose pronunciada, ainda que temporária, aos 14 dias p.i. Na terceira fase, o declínio total de monócitos pareceu ter sido causado apenas pela flutuação de monócitos

clássicos ($p= 0,03$) uma vez que não houve variação significativa das subpopulações expressando CD16 ($p= 0,12$ para a intermediária, e $p= 0,65$ para os monócitos não-clássicos).

Figura 13. Número absoluto de diferentes subgrupos de monócitos em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e as linhas contínuas representam as medianas para cada dia de amostragem. Asteriscos denotam valores p baseados no teste pareado de Wilcoxon comparando o número absoluto de células entre diferentes dias de amostragem: Não infectado versus 7 dias p.i. (*); 7 dias versus 14 dias p.i. (**); 14 dias versus 21 dias p.i. (***).

Análises de covariância demonstraram que mudanças na população total de monócitos ocorrem por uma combinação das alterações de cada um dos subgrupos (Figura 14). Entretanto, uma maior correlação foi encontrada entre monócitos totais e monócitos clássicos ($r=0.8938$, $p<0.01$), corroborando a hipótese de que mudanças na subpopulação de monócitos clássicos $CD14^+CD16^-$ são as que melhor refletem as variações populacionais observadas nos monócitos totais durante a fase aguda da infecção pelo SIV.

Figura 14. Covariância entre número absoluto de monócitos totais e cada um dos subgrupos durante a fase aguda da infecção pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada ponto representa um dia de amostragem (0, 7, 10, 14 e 21 dias p.i.) para cada um dos 20 macacos. Covariância foi calculada por correlação não paramétrica de Spearman.

3. Expressão de CCR2 é modulada especificamente em monócitos clássicos durante a infecção aguda por SIV

É bem estabelecido que monócitos CD14⁺CD16⁻ expressam altos níveis do receptor para a quimiocina CCL2 em sua superfície (Weber et al., 2000). Curiosamente, durante a caracterização das mudanças na população de monócitos durante a infecção aguda, observamos uma dramática redução na expressão de CCR2 de superfície, especificamente no subgrupo CD14⁺CD16⁻, logo no início aos 7 dias p.i. (Figura 15). Em contraste, monócitos intermediários CD14^{high}CD16⁺, que constituem uma população heterogênea em relação à expressão de várias proteínas de superfície, não apresentaram mudança significativa na expressão de CCR2 quando comparada com os níveis normais.

Figura 15. A expressão de CCR2 de superfícies diminui especificamente em monócitos clássicos. Histogramas demonstram expressão relativa de CCR2 nas três subpopulações de monócitos. Valores para amostras não infectadas estão representados em cinza e linhas coloridas representam amostras aos 7 dias p.i. Cada fileira representa um animal (macacos Bm2, Jk2 e Rk2, respectivamente).

Depois dos 10 dias p.i., cerca de metade dos monócitos clássicos voltaram a expressar CCR2 como nos níveis de pré-inoculação, embora uma pronunciada subpopulação CCR2 negativa manteve-se presente (Figuras 16 e 17). Este subgrupo $CD14^+CD16^-CCR2^-$ expandiu-se consideravelmente aos 14 dias p.i. (64,2% dos monócitos clássicos, Figura 16), mas reduziu-se aos 21 dias p.i., mantendo-se mais alto que os níveis de pré-inoculação durante todo o processo infeccioso (Figura 18). Monócitos clássicos expressando CCR2 também expandiram-se dos 7 aos 14 dias p.i., mas lentamente retornaram a níveis de pré-inoculação após o dia 21 p.i., com um perfil longitudinal distinto do subgrupo CCR2 negativo (Figura 18).

Figura 16. A expressão de CCR2 de superfícies diminui em monócitos clássicos durante a fase aguda da infecção pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Expressão de CD14 e CCR2 em monócitos clássicos demonstrados por citometria em um animal (macaco Ne2). Retângulos azuis representam a porcentagem de células negativas para CCR2, determinadas por FMO (*fluorescence minus one*). Representativo de 20 animais.

Figura 17. A expressão de CCR2 de superfícies diminui em monócitos clássicos durante a fase aguda pelo SIV em 100% dos animais estudados. Expressão de CD14 e CCR2 em monócitos clássicos demonstrados por citometria em todos os macacos utilizados neste estudo. Cada grupo de cinco gráficos representa um animal, incluindo dois macacos inoculados com solução salina. Retângulos azuis representam a porcentagem de células negativas para CCR2, determinadas por FMO (*fluorescence minus one*). Em seis amostras de pré-inoculação (marcadas com asteriscos), a citometria foi feita em células descongeladas, e com fluorocromo diferente para CD14 (Qdot 565 ao invés de FITC).

Figura 18. Número absoluto de monócitos ACC (laranja) e monócitos clássicos (vermelho) em 20 macacos inoculados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e as linhas contínuas representam as medianas para cada dia de amostragem.

Em macacos não infectados, células $CD14^+CD16^-CCR2^-$ constituem de 5 a 20% (mediana de 14,3%) dos monócitos clássicos, sendo superadas em número pelo subgrupo $CCR2^+$ de 4 a 19 vezes (Figuras 16 a 18). Durante a infecção aguda pelo SIV, a proporção entre esses dois grupos mudou drasticamente e aos 7 dias p.i., mais de 50% dos monócitos clássicos eram $CCR2^-$. Mesmo com a expansão de células $CD14^+CD16^-CCR2^+$ após 10 dias p.i., as proporções entre monócitos clássicos $CCR2^+$ e $CCR2^-$ não foram restauradas a níveis normais, e mantiveram-se significativamente mais baixas durante todo o processo infeccioso (Figura 19).

Figura 19. Proporção entre monócitos clássicos CCR2⁺ e CCR2⁻ para cada dia de amostragem. Diferenças entre a mediana do grupo pré-inoculado e as dos demais foram analisadas pelo teste pareado de Wilcoxon. (*): $p < 0.01$ e (**): $p < 0.05$.

Não houve correlação entre as variações na frequência do subgrupo CCR2⁻ e outros parâmetros biológicos frequentemente mensurados durante a infecção pelo SIV ou HIV, como a carga viral e os níveis de linfócitos (Figuras 20 e 21).

Figura 20. Covariância entre número absoluto de monócitos ACC e carga viral plasmática durante a fase aguda da infecção pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada ponto representa um dia de amostragem (7, 10, 14 e 21 dias p.i.) para cada um dos 20 macacos. Covariância foi calculada por correlação não paramétrica de Spearman.

Figura 21. Covariâncias entre número absoluto de monócitos ACC e diversas populações de células do sangue durante a fase aguda de infecção pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada ponto representa um dia de amostragem (7, 10, 14 e 21 dias p.i.) para cada um dos 20 macacos. Covariância foi calculada por correlação não paramétrica de Spearman.

Variações na expressão de receptores podem ser reguladas em diversas etapas, desde a transcrição do mRNA até a degradação por vias proteolíticas após ligação com agonistas específicos. Marcação intracelular em monócitos

de amostras do dia 14 p.i. demonstra que a diminuição na expressão do CCR2 de superfície foi causada, pelo menos em parte, por modificações pós-traducionais como internalização do receptor ou mesmo retenção da proteína no citoplasma (Figura 22).

Figura 22. Fluorescência média para CCR2 em monócitos clássicos aumenta após marcação intracelular. Gráficos demonstram a expressão de CCR2 em monócitos clássicos de três macacos infectados por SIV (Bm2, Jk2 e Rk2), provenientes de amostras coletadas aos 14 dias p.i. Linhas cinzas representam marcação de superfície e linhas azuis, marcação intracelular.

A perda de CCR2 de superfície pode interferir com o tráfego de células aos tecidos e com respostas eficazes durante infecções e processos inflamatórios. Nós postulamos que esta dramática regulação da expressão de CCR2 em monócitos clássicos observada durante a infecção aguda pelo SIV pode não ser uma característica isolada, e que monócitos $CD14^+CD16^-CCR2^-$ possivelmente apresentam outras alterações fenotípicas e funcionais em relação aos seus homólogos $CCR2^+$. Uma vez que as amostras de sangue foram adquiridas longitudinalmente e eram limitadas em volume, para os próximos experimentos utilizamos PBMCs viáveis previamente congeladas, coletadas durante as necrópsias de macacos sacrificados aos 14 dias p.i. (e também 7 e 21 dias p.i., quando necessário) ou de animais não infectados. Para maior clareza, daqui por diante utilizaremos o termo *monócitos clássicos*

apenas para o subgrupo $CD14^+CD16^-CCR2^+$, e passaremos a nos referir às células $CD14^+CD16^-CCR2^-$ como monócitos *clássicos atípicos* $CCR2^-$ (monócitos ACC).

4. Monócitos ACC exibem um transcriptoma distinto dos monócitos clássicos autênticos $CCR2^+$

Para investigarmos se monócitos clássicos $CCR2^+$ e ACC possuem perfis de expressão de mRNA semelhantes, monócitos de seis macacos infectados com o SIV foram classificados por citometria de fluxo segundo o seu fenótipo de marcadores de superfície (Figura 23).

Figura 23. Estratégia utilizada para seleção de monócitos ACC e clássicos. Monócitos foram inicialmente identificados por tamanho e granularidade, e em seguida pela ausência do receptor CD3. Monócitos clássicos foram isolados de outros subgrupos pelo nível de expressão do CD16. Uma vez identificados, dois subgrupos foram selecionados de acordo com níveis de expressão de CCR2. Para melhor pureza durante a seleção, evitamos a coleta de células $CCR2^+$ de baixa expressão. Representativo de 6 animais.

Para a obtenção de mRNA suficiente, coletamos 3×10^7 PBMCs de animais sacrificados aos 14 dias p.i., que foi o dia de amostragem onde exibiu-se a maior população de monócitos. O transcriptoma de cada subgrupo foi analisado por Nanostring, utilizando um painel de 90 sondas especialmente

concebidas para a detecção e quantificação de genes associados a processos inflamatórios e imunomoduladores. A especificidade do conjunto de sondas foi previamente confirmada em baço e cérebro de macacos rabos-de-porco não infectados e infectados com SIV. Os resultados foram normalizados pela média geométrica de quatro genes de expressão constitutiva (*actina*, *GAPDH*, *hipoxantina fosforribosiltransferase*, *porfobilinogênio deaminase*).

Os resultados brutos deste conjunto (*array*) estão publicados no website do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob o código GSE27559.

Baseando-se nos resultados de 78 genes expressos em pelo menos um subgrupo, ficou evidente que monócitos ACC apresentam um fenótipo único. Os níveis de expressão de 46 genes entre monócitos clássicos e ACC clássico foram significativamente diferentes, com valores *p* menores que 0,05, e 16 destes genes permaneceram com valores *p* significantes após serem corrigidos para comparações múltiplas através do ajustamento de Bonferroni (Figura 24). Para maior clareza, vamos apresentar os resultados com base apenas no teste de significância *t* sem correção, uma vez que o conservadorismo do método de Bonferroni assume independência dos resultados, e pode aumentar a probabilidade de falsos negativos, ignorando a possibilidade de co-regulação entre os genes.

Figura 24. Expressão relativa de mRNAs entre monócitos clássicos autênticos (CCR2⁺) e monócitos ACC (CCR2⁻) isolados de 6 macacos aos 14 dias p.i. Gráficos mostram genes com expressão significativamente maior em monócitos clássicos CCR2⁺ em relação aos CCR2⁻ (A) ou maior em CCR2⁻ em relação aos CCR2⁺ (B). Genes são apresentados em ordem de significância calculada por teste t pareado. Asteriscos representam genes com valor $p > 0.05$ após correção por Bonferroni. Genes em amarelo (C) possuem expressão relativa diferente mas não significativa entre as subpopulações.

Dentre os 46 transcritos com expressão distinta entre os dois subgrupos, trinta e quatro deles (38% de todos os genes da matriz) expressaram níveis mais baixos em monócitos ACC, incluindo algumas citocinas inflamatórias típicas, tais como TNF α , IL6, IL7, IL12A, IL12b, IL1B, IL27, CCL3, CCL4, CCL19, CXCL3, CXCL9, CXCL10, XCL1, IFN γ e IFN α 2. Da mesma maneira, eles também apresentaram níveis mais baixos de IRF1, IRF7, STAT2, STAT5a e genes estimuladores de interferon, incluindo OAS2, MxA e ZBP.

A diminuição da expressão de CCR2 de superfície neste novo subgrupo foi acompanhada por níveis mais baixos de mRNAs de vários outros receptores de membrana, incluindo CCR4, CCR7, CXCR3 e CCR1. Monócitos ACC também apresentaram uma redução drástica nos níveis de CD4, um receptor que é expresso em monócitos em determinadas circunstâncias (Kazazi et al., 1989). Esta regulação da expressão de mRNA de CD4, em conjunção com uma maior expressão de transcritos de CD16, sugere que este subgrupo parece representar uma população mais madura, com um perfil de transcriptoma mais próximo ao fenótipo de macrófagos do que de monócitos clássicos autênticos. Surpreendentemente, não houve correlação entre a expressão de mRNA de CD16, maior em monócitos ACC, e sua respectiva proteína de superfície, que não foi detectável por citometria em nenhum dos dois subgrupos.

Monócitos de humanos saudáveis expressam níveis muito baixos de TLR3 e TLR9, mas níveis elevados de TLR2 e TLR4 (Jarrossay et al., 2001). Observamos uma baixa, porém detectável, expressão de TLR3 e TLR9 em monócitos clássicos CCR2⁺ em macacos aos 14 dias p.i., o que sugere que esses receptores devem ter sua expressão aumentada durante a infecção pelo SIV (Figura 25).

Figura 25. Número de cópias de mRNA para cada *Toll-like receptor* (TLR) em monócitos clássicos (símbolos vermelhos) e ACC (símbolos azuis) aos 14 dias p.i. Genes foram quantificados por Nanostring e normalizados pela média geométrica de quatro genes constitutivos (GGC). Diferenças entre clássicos e ACC foram analisadas pelo teste t pareado e corrigidas pelo ajustamento de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ por Bonferroni; (**) $p < 0,05$ apenas por teste t pareado.

Curiosamente, monócitos ACC apresentaram maiores níveis de TLR3 e TLR5 e menores níveis de TLR6, TLR4 e TLR7 quando comparados aos seus homólogos CCR2⁺, além de apresentarem níveis indetectáveis de TLR9. Além de TLR3 e TLR5, monócitos ACC apresentaram maiores níveis de transcrições de três receptores relacionados com interferon (IL22Rα2, IL28R, IFNR1), e algumas citocinas menos caracterizada (CCL20, CCL13, IL11).

Trinta e três dos mRNAs analisados não mostraram nenhuma mudança significativa entre as duas populações (Figura 24C), embora, em alguns casos, valores p ajustados por Bonferroni eram maiores que 0,05 devido a um simples valor atípico (*outlier*), definido como valores apresentando dois desvios padrões acima da mediana. A remoção do *outlier* fez com que níveis de CCR5 e IL12A passassem a ser significativamente maiores em monócitos clássicos (de $p=0,11$, $p=0,26$, respectivamente, para $p<0,05$). Não houve diferença significativa na expressão de marcadores típicos de superfície de monócitos, incluindo o CD14, CX3CR1, CD68 ou TLR2.

Queda do número de transcritos para CCR2 em monócitos ACC, entretanto, foram significantes apenas em três das seis amostras, e em dois dos animais observamos até mesmo um aumento da produção de mRNA (Figura 26). Esses dados corroboram a hipótese de que a variação de níveis de CCR2 de superfície durante infecção pelo SIV deve ser causada por uma confluência de fatores, como internalização do receptor e controle na transcrição.

Figura 26. Número de cópias de mRNA para CCR2 em monócitos clássicos e ACC aos 14 dias p.i. Transcritos foram quantificados por Nanostring e normalizados pela média geométrica de quatro genes constitutivos (GGC).

Não foram observadas mudanças relativas na expressão de IL4, IL10, IL18bp, CCL2, CCL8, CCL5, CCL24, CXCL2 ou CXCL11. Algumas citocinas não foram detectadas em nenhum dos dois subgrupos, incluindo IL9, IL13, IL17, IL25, IL28A/B, IL29, CCL1 e CCL7.

Estes resultados confirmam que os monócitos ACC representam um novo subgrupo com fenótipo distinto dos demais $CD14^+CD16^-$. Análise de citometria de dois genes não incluídos em nossa matriz de mRNA, HLA-DR e *receptor de manose* (MMR), demonstrou que as expressões de superfície

desses marcadores de ativação também foram diminuídas em monócitos ACC (Figura 27).

Figura 27. Expressão de CCR2, HLA-DR e receptor para manose (MMR) em monócitos clássicos coletados antes da infecção e aos 14 dias p.i. Representativo de 4 animais.

Estas mudanças observadas não representam uma queda geral não-específica na expressão de proteínas, uma vez que diversos genes apresentaram um aumento de expressão. Estes resultados indicam uma expansão de uma potencial subpopulação de monócitos hipo- ou anti-inflamatórios durante a infecção pelo SIV aguda. Já que algumas destas variações poderiam interferir com funções normalmente atribuídas a monócitos, investigamos se monócitos ACC eram capazes de fagocitar e também responder eficientemente a quimiocinas específicas.

5. ACC monócitos apresentam fagocitose e quimiotaxia alteradas

Para investigar se monócitos ACC apresentavam habilidades fagocitárias inalteradas quando comparados a células de indivíduos saudáveis, PBMCs de macacos não infectados e infectados com SIV sacrificados aos 7, 14 e 21 dias p.i. foram expostas a partículas de *E. coli* cobertas com pHrodo™, um fluorocromo que não é fluorescente em pH neutro, mas fluoresce quando localizado em meios ácidos, tais como fagossomos e lisossomos.

Mais de 80% de monócitos de macacos infectados foram positivos para pHrodo™, em contraste com 58% e 51% dos monócitos de amostras obtidas aos 7 e 14 dias p.i., respectivamente (Figura 28A). Monócitos controle apresentaram maior média de fluorescência, o que indica uma maior ingestão de partículas por célula (Figura 28B). Não houve diferença significativa entre amostras do dia 21 p.i. e amostras de animais não infectados, sugerindo que os monócitos recuperaram sua capacidade de fagocitar eficientemente após a infecção aguda.

Figura 28. Monócitos na fase aguda por infecção pelo SIV apresentam fagocitose alterada. A) Porcentagem de monócitos positivos para pHrodo™ em diferentes dias de amostragem. Barras representam medianas, e valores p foram calculados pelo teste t de Mann-Whitney. B) Histogramas demonstram a intensidade de fluorescência de pHrodo™ em monócitos totais de macacos não infectados (cinza) e infectados (preto) em diferentes dias de amostragem pós-inoculação. Representativo de 4 experimentos.

A manutenção de PBMCs em meio de cultura a 37°C durante o experimento levou a um aumento da expressão de superfície do CD16 em monócitos clássicos, mesmo na ausência de pHrodo™, provavelmente como parte de sua programação para se diferenciar em macrófagos (Merino et al.). Distinção entre monócitos clássicos e intermediários ficou mais difícil de se estabelecer, mas ficou claro que em todos os dias de amostragem p.i. só células CCR2⁺ dentre as CD14⁺⁺ eram positivas para pHrodo™ (Figura 29). Expressão de CCR2 de superfície, como esperávamos, não é essencial para uma fagocitose eficiente, uma vez que 50% dos monócitos não clássicos CD14^{dim}CD16⁺, que não expressam CCR2, também foram positivos para pHrodo™. Estes dados indicam que os monócitos em geral apresentam uma fase transitória de fagocitose alterada, logo após a infecção por SIV, e que monócitos ACC são especificamente afetados por esta disfunção.

Figura 29. Monócitos ACC apresentam fagocitose reduzida. Monócitos totais de amostras do dia 14 p.i. são apresentados em dois painéis (CD14 vs CD16 e pHrodo vs CCR2) mostrando que a grande maioria de células CCR2-expressando pHrodo⁺ são monócitos não clássicos (em azul). Resultados semelhantes foram observados em amostras dos dias 7 e 21 p.i. Figura representa 4 experimentos.

Analizamos também a capacidade de monócitos aos 14 dias p.i. em responder a sinalização por CCL2 utilizando um ensaio de migração *transwell*. PBMCs de macacos não infectados ou provenientes de amostras coletadas aos 14 dias p.i. foram depositadas em pequenas caçambas plásticas (cujo fundo é formado por uma membrana contendo poros de 10 µm), e transferidos para poços contendo meio de cultura R10 com 100 ng/ml de CCL2, CCL3 ou CCL7 (Eugenin et al., 2006). Após 24 horas, as células foram coletadas dos poços inferiores e marcadas para análise citométrica.

Em amostras de macacos infectados, as células começaram a transmigrar para as câmaras inferiores quatro horas após o plaqueamento. Embora tenhamos observado células transmigradas mesmo em meios não contendo nenhuma quimiocina, apenas poços com CCL2 e CCL7 apresentam monócitos CD14⁺ (Figura 30). Os níveis de expressão de CCR2 de superfície pareceram menores do que os que normalmente observamos em PBMCs frescas, sugerindo que monócitos modulam a expressão de CCR2 durante ou depois da transmigração, provavelmente devido à exposição ao ligante, como previamente relatado (Sozzani et al., 1997). Nas câmaras inferiores de PBMCs do dia 14 p.i. observamos uma redução significativa nas células transmigradas, independente da quimiocina. Especificamente, observou-se uma ausência de leucócitos CD14⁺CCR2⁺, corroborando a observação anterior de que os monócitos em geral apresentam disfunção quimiotática durante a infecção aguda, e que monócitos ACC não respondem a sinalização por quimiocinas neste ensaio.

Figura 30. Monócitos ACC apresentam quimiotaxia alterada. Gráficos apresentam células coletadas nos poços inferiores de um sistema de transmigração contendo meio de cultura sem (controle) e com 100 ng/ml de CCL2 e CCL7. Células foram selecionadas por tamanho e viabilidade (fileira superior) e depois analisadas pela expressão de CD14 e CCR2 (fileira inferior). Poços de amostras não infectadas apresentam monócitos CD14⁺CCR2^{low} (setas) para as duas condições experimentais, mas apenas algumas células são vistas nas amostras provenientes de 14 dias p.i. Figura é representativa de 4 experimentos.

6. Monócitos ACC abrigam menos cópias de DNA genômico do SIV

Monócitos são alvos da infecção pelo HIV e SIV e podem sustentar replicação ativa *in vivo* (Bergamaschi and Pancino). Alguns grupos têm identificado o subgrupo CD14⁺CD16⁺ como o mais suscetível ao SIV e à infecção pelo HIV (Crowe et al., 2003; Kim et al., no prelo). Para investigar quais subpopulações de monócitos abrigam DNA viral no nosso modelo aos 14 dias p.i., amostras de DNA genômico isoladas de monócitos clássicos, não clássicos, intermediários e ACC selecionados por citometria foram analisados por qPCR utilizando-se pares de *primers* e sondas específicas para sequências

de SIV *gag* e 2LTR. Amostras de DNA genômico de PBMCs fixos foram utilizadas como controle positivo.

Figura 31. Monócitos ACC abrigam menos cópias de DNA genômico do SIV. DNA foi isolado de monócitos selecionados por citometria e SIV *gag* foi quantificado por qPCR e normalizado por 10.000 células. ACC: Monócitos ACC; MC: Monócitos clássicos; MI: Monócitos intermediários; MNC: Monócitos não-clássicos; PBMC: Células mononucleares do sangue periférico.

Não houve diferença significativa entre o número de cópias de SIV *gag* detectadas em monócitos clássicos e intermediários ($p=0,58$), ao passo que ambos os subgrupos apresentaram níveis mais elevados do que os em monócitos não clássicos ($p=0,03$ para ambos) (Figura 31). Níveis de DNA de SIV *gag* em monócitos ACC foram em média 9,3 vezes menores do que os em monócitos clássicos ($p=0,03$), três vezes menores do que em monócitos intermediários ($p=0,03$), e 1,8 vezes menor do que em monócitos não clássicos ($p=0,09$). Não houve diferenças nos níveis de *gag* DNA entre PBMCs e monócitos clássicos ou intermediários ($p=0,43$ e $p=0,68$, respectivamente). No entanto, observou-se o dobro de cópias de SIV *gag* em PBMCs do que em monócitos totais (17,3 vs 9,4, respectivamente) quando consideramos a média

de todos os valores juntos, corrigida pela proporção de cada subgrupo. DNAs circulares 2LTR de SIV não foram detectados em nenhuma subpopulação de monócitos, embora pudessem ser quantificados em PBMCs (mediana de 2,45 cópias/10.000 células), sugerindo que monócitos podem ser infectados, mas não sustentam replicação viral significativa. Estes resultados, juntamente com os dados de transcriptoma indicando que monócitos ACC apresentam menos transcritos de CD4 e CCR5, sugerem que este novo subgrupo parece ser menos suscetível à infecção pelo SIV.

7. Fator plaquetário 4 (PF4 ou CXCL4) leva à diminuição da expressão de CCR2 de superfície em monócitos e pode estar relacionado à expansão do subgrupo ACC

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que o CCR2 de superfície pode ter sua expressão diminuída em monócitos quando estes são expostos a diversas citocinas, incluindo TNF α , IFN γ , CXCL4, e a seu próprio ligante CCL2 (Penton-Rol et al., 1998; Schwartzkopff et al.; Sica et al., 1997; Weber et al., 1999). Uma vez que a população de monócitos ACC parece expandir-se logo após a “tempestade de citocinas” normalmente observada no sangue de humanos recém-infectados pelo HIV (Stacey et al., 2009), analisamos a expressão de diversas citocinas no sangue de macacos infectados por ELISA durante a fase aguda da infecção pelo SIV e examinamos se houvesse possível correlação entre elas e a população de monócitos ACC.

Dados de ELISAs para TNF α e IFN γ foram inconclusivos, talvez pelo fato de usarmos reagentes desenvolvidos para a espécie humana (dados não mostrados). Níveis de CCL2 plasmáticos apresentaram-se aumentados nos 7 primeiros dias de infecção, mas retornaram a níveis normais rapidamente (Figura 32), seguindo um padrão longitudinal similar em todos os animais estudados.

Figura 32. Níveis de CCL2 plasmático (em ng/ml) em 20 macacos infectados pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Para análise dos níveis de CXCL4, o protocolo de aquisição de plasma foi modificado, uma vez que a técnica rotineiramente utilizada no laboratório (coleta de sangue por seringa não Vacutainer) pareceu ativar as plaquetas e interferir com os resultados. Dessa maneira, apenas dois grupos de animais (10 macacos) foram usados para os cálculos a serem apresentados. Níveis plasmáticos de CXCL4, ao contrário dos de CCL2, apresentaram em média um aumento paulatino após a infecção pelo SIV, estabilizando-se após o dia 21 p.i. (Figura 33).

Figura 33. Níveis de CXCL4 plasmático (em µg/ml) em 10 macacos infectados pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada linha pontilhada representa um animal, e a linha vermelha representa a mediana para cada dia de amostragem.

Análises de covariância entre tais citocinas e monócitos ACC apresentaram uma pequena correlação, porém significativa ($r=0.18$, $p<0.05$ para CCL2 e $r=0.30$, $p<0.05$ para CXCL4; Figura 34).

Figura 34. Covariância entre número absoluto de monócitos ACC e níveis plasmáticos de CCL2 e CXCL4 durante a fase aguda da infecção pelo SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Cada ponto representa um dia de amostragem (0, 7, 10, 14, 21 e 28 dias p.i.) para cada um dos 20 macacos (apenas 10 macacos para CXCL4 – vide texto). Covariância foi calculada por correlação não paramétrica de Spearman.

Experimentos *in vitro*, entretanto, parecem confirmar a importância de CXCL4, e não CCL2, na modulação de CCR2. PBMCs expostos a diferentes citocinas por 18 horas demonstraram que CCL7 e CXCL4, mas não CCL2, CXCL9 ou CXCL11, modificaram o padrão de expressão de CCR2 em monócitos (Figura 35). LPS foi utilizado como controle positivo. Tais resultados sugerem que mudanças fenotípicas em monócitos são possivelmente controladas por sinalização por citocinas no sangue ou mesmo órgãos linfáticos, já que leucócitos estão constantemente trafegando através do baço e linfonodos.

Figura 35. CCL7 e CXCL4 levam à diminuição de expressão de CCR2 de superfície em monócitos *in vitro*. PBMCs de macacos não infectados foram cultivadas em R10 contendo CCL2 (100 ng/ml), CCL7 (100 ng/ml), CXCL4 (1 µg/ml), CXCL9 (1 µg/ml), CXCL11 (1 µg/ml) ou LPS (1 ng/ml) por 18 horas. Células foram então coletadas e marcadas para citometria. Linhas cinzas representam amostra controle. Gráficos são representativos de 4 experimentos.

8. HAART reverte subpopulações de monócitos aos níveis de pré-infecção em macacos infectados com SIV

Uma vez que a subpopulação $CD14^+CD16^-CCR2^-$ expandiu-se rapidamente em resposta à infecção pelo SIV, postulamos que o processo inverso aconteceria quando os animais iniciassem o tratamento com HAART. Seis macacos infectados com o SIV foram tratados com um regime antirretroviral potente de quatro medicamentos a partir dos 12 dias p.i., um período que se encontra dentro da fase de expansão observada para todos os subgrupos de monócitos. Análise fenotípica dos monócitos clássicos

demonstraram que, aos 14 dias p.i., o subgrupo negativo para CCR2 foi significativamente reduzido quando comparado aos animais não tratados (Figura 36).

Figura 36. Terapia antirretroviral controla a expansão de monócitos ACC em macacos infectados com SIV/DeltaB670 e SIV/17E-Fr. Número absoluto de monócitos ACC (primeiro gráfico) e clássicos (segundo gráfico) em 20 macacos infectados com SIV mas não tratados com HAART (azul) e 6 macacos infectados e tratados (vermelho). Cada linha pontilhada representa um animal. Linhas contínuas denotam a mediana por dia de amostragem. (*): $p < 0.05$ por teste pareado de Wilcoxon para os dias 14 e 28 p.i. Seta marca o início de tratamento no dia 12 p.i.

Ao contrário, o subgrupo clássico $CCR2^+$ continuou a se expandir depois do tratamento, e aos 21 dias p.i., a proporção entre monócitos clássicos e ACC retornou a níveis encontrados em macacos não infectados (Figura 37).

Figura 37. Proporção entre monócitos clássicos CCR2⁺ e monócitos ACC CCR2⁻ em macacos infectados pelo SIV e tratados com HAART a partir do dia 12 p.i. Seta marca o início do tratamento.

Considerando que a mediana (IQR) de cópias de RNA viral por mililitro de plasma é de 0,75 (0,12-1,8) $\times 10^6$ nos 3 a 9 dias após o tratamento (14 e 21 dias p.i.), estes dados sugerem que a retração da população de monócitos ACC não está diretamente relacionada à presença de partículas virais circulantes, mas provavelmente à nova replicação viral, que é bloqueada pelo regime terapêutico. Esta hipótese foi corroborada pela análise de outro conjunto de três macacos infectados com o SIV, mas tratados com três medicamentos antirretrovirais iniciando-se aos 42 dias p.i. (Figura 38). Macacos com redução da carga viral contínua após HAART demonstraram declínio na população de monócitos ACC, enquanto que um terceiro animal apresentou uma expansão neste subgrupo que precedeu ligeiramente a sua falha no controle da replicação viral.

Figura 38. Replicação viral está correlacionada a aumento da população de monócitos ACC em macacos tratados com HAART. Carga viral (linhas pontilhadas) e número absoluto de monócitos ACC (linhas contínuas) representando três macacos infectados pelo SIV que iniciaram o tratamento HAART aos 42 dias p.i. (seta), demonstrando que a falha no controle da replicação viral é concomitante à expansão deste novo subgrupo no animal representado em roxo.

9. Monócitos ACC também são detectados em pacientes infectados pelo HIV e diminuem em número após tratamento com HAART

Para investigar se seres humanos infectados pelo HIV também apresentam um aumento de monócitos clássicos sem expressão de CCR2 de superfície, analisamos amostras de uma coorte de pacientes infectados recentemente pelo HIV (Kallas et al., 2004), e os comparamos com PBMCs coletados de indivíduos controles negativos.

A classificação dos monócitos foi feita de maneira semelhante à que utilizamos para macacos, com frequências similares para as subpopulações (Figura 39). Uma diferença observada entre as duas espécies foi uma

diminuição da expressão de CD14 em monócitos CD16⁺ em humanos infectados, fato esse também visto em amostras de macacos, mas não tão pronunciadamente.

Figura 39. Subpopulações de monócitos em humanos infectados ou não pelo HIV. Baseando-se nos níveis de CD14 e CD16 são observadas os subgrupos clássico (vermelho), intermediário (verde) e não clássico (azul).

Figura 40. Subpopulações de monócitos clássicos em humanos infectados ou não pelo HIV. Retângulos azuis demarcam a população negativa para CCR2, baseada em FMO (*fluorescence minus one*).

Indivíduos não infectados apresentaram uma mediana de 12,9% de monócitos ACC, com exceção de duas amostras, onde os níveis eram tão elevados quanto os de alguns pacientes infectados (Figura 41). Atribuímos estes resultados a uma combinação de variabilidade genética e da falta de informações sobre o estado geral de saúde desses indivíduos. É possível que este novo subgrupo celular não seja exclusivo para infecção por SIV ou HIV, e possivelmente também se expanda durante outras moléstias.

Figura 41. Monócitos ACC podem ser observados em humanos e expandem-se após infecção pelo HIV. Comparação entre a porcentagem de monócitos clássicos negativos para CCR2 de superfície em indivíduos não infectados (controle) e infectados pelo HIV. Denominamos basal o dia de amostragem onde o primeiro diagnóstico HIV⁺ foi feito. Os outros dois grupos representam períodos após este episódio inicial. Barras representam medianas e valores p foram calculados por teste t de Mann-Whitney.

A diferença entre indivíduos infectados pelo HIV e o grupo controle, no entanto, foi evidente, com aumento de 12,9% para 39,1% em amostras

adquiridas quando um diagnóstico positivo foi relatado pela primeira vez ($p < 0,05$). Amostras colhidas dos mesmos pacientes em duas coletas posteriores não demonstraram nenhuma mudança significativa na frequência desse subgrupo ($p = 0,67$ para três meses, e $p = 0,27$ para mais de 6 meses após a primeira visita). No entanto, como observado em nosso modelo de macaco, os pacientes tratados com HAART também apresentaram uma diminuição na porcentagem de células negativas para CCR2 entre os monócitos clássicos (Figura 42), de uma mediana de 39,9% para 13,25%, níveis semelhantes aos de indivíduos não infectados, o que sugere que mecanismos semelhantes ocorrem na modulação do fenótipo durante a infecção pelo HIV.

Figura 42. Frequência de monócitos ACC diminui após tratamento com HAART em pacientes HIV⁺. Gráfico mostra porcentagem de monócitos clássicos negativos para CCR2 de superfície em seis pacientes durante duas amostragens: 1-2 meses antes e 1-2 após o tratamento por HAART. Valor p foi calculado pelo teste pareado de Wilcoxon.

10. Monócitos ACC interferem com a proliferação de linfócitos T CD8⁺

Uma vez que monócitos ACC apresentaram expressão reduzida para HLA-DR, investigamos a possibilidade deste subgrupo apresentar função antiproliferativa, semelhante a de monócitos CD14⁺HLA-DR^{low/neg} descritos em pacientes com câncer de próstata e linfoma de células B não-Hodgkin (Lin et al.; Vuk-Pavlovic et al.) Para comprovarmos nossa hipótese, linfócitos frescos de macacos saudáveis foram marcados com um corante de membrana (Vybrant Dil, detectado no mesmo canal de PE) e cocultivados em R10 (contendo fitohemaglutinina e IL2) com monócitos CD14⁺CCR2⁻ selecionados de amostras de animais infectados pelo SIV. Como controle experimental, cocultivamos os mesmos linfócitos marcados com monócitos CD14⁺CCR2⁺ provenientes de animais não infectados. Após 48 horas, linfócitos T CD8⁺ cocultivados com monócitos ACC apresentaram proliferação reduzida comparados aos expostos a monócitos clássicos não infectados (figura 43). As populações de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B CD20⁺ não apresentaram variações significativas entre as duas condições experimentais (dados não mostrados).

Figura 43. Monócitos ACC interferem com a proliferação de linfócitos T CD8⁺. Histogramas representam as intensidades de fluorescência de membrana em linfócitos T CD8⁺ expostos a monócitos não infectados (linhas cinza) comparadas a de linfócitos cocultivados com monócitos ACC (linhas vermelhas). As linhas cinzas representam um dos três experimentos controles, e cada linha vermelha representa um animal infectado.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Leucócitos circulantes estão em constante mudança durante condições patológicas, e monócitos, em particular, muitas vezes apresentam variações funcionais, fenotípicas ou numéricas durante processos infecciosos. Recentemente, novas subpopulações de células do sistema hematológico têm sido identificadas, refletindo a plasticidade do sistema imune, um traço essencial para a manutenção bem sucedida da homeostase do corpo.

Monócitos e macrófagos têm recebido uma atenção especial nos últimos anos devido à descoberta de novas funções biológicas a eles atribuídas. Além do clássico papel como fagócitos na detecção e eliminação de patógenos, eles também estão envolvidos no direcionamento da resposta imune a órgãos infectados, na ativação de linfócitos, na remodelagem de tecidos durante embriogênese, na regeneração de músculos, na angiogênese em neoplasias, no reabastecimento de precursores endoteliais e células dendríticas, na aterosclerose e no equilíbrio osmótico do sangue e linfa (Elsheikh et al., 2005; Rees, no prelo; van de Veerdonk and Netea, no prelo). Com o avanço de novas e melhores técnicas para identificação e isolamento de populações, novos fenótipos têm sido descritos, associados ou não a moléstias específicas.

Durante a caracterização de subpopulações de monócitos em um modelo animal acelerado para AIDS e desordens cognitivas associadas ao HIV, observou-se uma profunda mudança na expressão de CCR2 em monócitos clássicos ($CD14^{high}CD16^{-}$), iniciando-se logo após a inoculação e permanecendo durante todo o processo infeccioso. A existência de monócitos circulantes clássicos $CCR2^{-}$ não é, por si só, um achado extraordinário, mas a expansão considerável e persistência desse grupo durante as infecções pelo SIV e HIV não haviam sido ainda identificadas. Estudos anteriores demonstraram a importância do CCR2 como um marcador de superfície na distinção entre as subpopulações de monócitos em várias espécies (Ancuta et al., 2009; Gordon and Taylor, 2005; Serbina et al., 2008). Surpreendentemente,

não há nenhuma referência na literatura de monócitos inflamatórios não expressando CCR2.

Alterações fenotípicas em monócitos circulantes durante a infecção por SIV têm sido descritas por vários grupos em diferentes espécies de macaco, mas nenhum estudo longitudinal relatou alterações na expressão de CCR2 de superfície (Bissel et al., 2006; Burdo et al.; Clay et al., 2007; Kim et al., no prelo; Otani et al., 1998). Em nosso modelo, corroborando algumas das conclusões de outros grupos, observou-se uma variação reprodutível no número absoluto de monócitos durante a infecção aguda, fenômeno este associado a eventos relacionados à replicação viral, tais como alterações na rotatividade (*turnover*) de monócitos, morte de células progenitoras da medula óssea infectadas e migração a órgãos apresentando células ativadas expressando CCL2 (Zink et al., 2001). Nossos resultados comprovam que estas mudanças populacionais de monócitos no sangue estão diretamente relacionadas a variações observadas na subpopulação clássica, que é a mais abundante e normalmente expressa altos níveis de CCR2 de superfície.

Aos 7 dias p.i. observamos um aumento no número de monócitos clássicos negativos para a expressão de CCR2. Inicialmente, essa mudança parecia ser inversamente proporcional aos monócitos clássicos CCR2⁺ reduzidos na circulação, mas uma análise mais profunda mostrou que esse novo subgrupo CCR2⁻ também aumentou em números absolutos e foi mantido em circulação durante a infecção. Dessa maneira, demos a estas células a denominação de monócitos clássicos atípicos CCR2⁻ (ACC – *atypical CCR2-classical monocytes*), sugerindo que tenham sido provavelmente originados a partir de monócitos clássicos passando por uma mudança fenotípica.

Esta hipótese foi confirmada após uma análise comparativa dos transcriptomas dos dois subgrupos clássicos (CCR2⁺ e CCR2⁻) coletados aos 14 dias p.i. Apesar de ter sido impossível diferenciá-los baseando-se unicamente em seus níveis de expressão de CD14 e CD16 por citometria de fluxo, ficou evidente que representavam duas populações distintas uma vez classificados pelos seus níveis de CCR2 na superfície celular.

Comparados com monócitos clássicos autênticos, o subgrupo CCR2⁺ apresentou níveis significativamente mais baixos de mRNA para a maioria dos genes inflamatórios (IL6, IFN γ , TNF α , IL12b, IL1B, IL7) e diversas quimiocinas (CCL3, CXCL3, CXCL10, CXCL9, XCL1). Entretanto, não ficou claro se estas células constituem uma população anti-inflamatória, uma vez que elas expressam níveis mais baixos de IL10 (normalmente associada a resposta anti-inflamatória) e níveis mais altos de CCL20 e CCL13, que estão envolvidos no recrutamento de leucócitos, incluindo outros monócitos, linfócitos T e células dendríticas (Garcia-Zepeda et al., 1996; Hieshima et al., 1997). Estas células também expressam IL11, uma citocina ainda não caracterizada completamente, mas que está envolvida na estimulação e maturação de megacariócitos, sendo detectada durante a inflamação induzida por vírus (Paul et al., 1990; Putoczki and Ernst, no prelo). Curiosamente, monócitos ACC expressam altos níveis de STAT3, um fator de transcrição cuja fosforilação está relacionada à maturação e a respostas anti-inflamatórias em macrófagos (Heinrich et al., 1998). Esta última observação, juntamente com o fato de que essas células também apresentaram níveis mais elevados de IL22R α 2 (um receptor que heterodimeriza com IL10R), levou-nos a analisar a capacidade fagocítica desse novo subgrupo, já que há relatos de que macrófagos derivados de monócitos provenientes de pacientes infectados pelo HIV apresentam atividade anti-parasitária prejudicada, e que os monócitos desses pacientes foram capazes de bloquear a autofagia em células provenientes de humanos saudáveis, através de sinalização via IL10/STAT3 (Van Grol et al., no prelo).

Monócitos clássicos expressam altos níveis de receptores para o reconhecimento de procariontes (CD14, TLR4 e TLR2) e são, portanto, muito eficientes na resposta à infecção bacteriana (Cros et al., no prelo). Observamos que, embora em níveis menores do que os clássicos, monócitos ACC também expressam tais receptores, o que deveria torná-los sensíveis na resposta a elementos bacterianos. Entretanto, nossos resultados demonstraram que esta nova subpopulação apresenta fagocitose alterada, e que monócitos em geral coletados nos dias 7 e 14 p.i. respondem fracamente a partículas de *E.coli*.

Além disso, eles também respondem mais fracamente a sinais quimiotáticos, confirmando observações anteriores de que a infecção pelo SIV/HIV pode interferir com a funcionalidade de monócitos, e prejudicar a sua capacidade de reconhecer, capturar e destruir micróbios nocivos. Há relatos na literatura de monócitos em linfomas de células B não-Hodgkin e câncer de próstata cujo fenótipo CD14⁺ HLA-DR^{low/neg} parece estar associado à supressão da proliferação de linfócitos e à interferência no processo de *recall* (Lin et al., no prelo; Vuk-Pavlovic et al., no prelo). Da mesma maneira, diminuição da expressão de moléculas do MHC-II em monócitos durante sepsis, inflamações sistêmicas e insuficiência hepática tem sido associada a severidade das doenças (Antoniades et al., 2006; Fumeaux and Pugin, 2006; Haveman et al., 2006). Monócitos ACC também expressam baixos níveis de HLA-DR e apresentam função antiproliferativa, reforçando a hipótese de que eles representam uma população hipo- ou anti-inflamatória, expandindo-se durante um período de intensa e nociva hiper-ativação e contínua replicação viral. O fato de que também detectamos esta subpopulação em pacientes humanos infectados pelo HIV, em conjunto com a observação de que elas retornam a níveis de pré-infecção após o início de terapia HAART, indica que a expansão de tais células é um fenômeno comum às infecções de ambos lentivírus, e que a supressão da replicação viral leva a um retorno dessas células a níveis normais.

O papel dos monócitos na infecção pelo HIV permanece controverso. Ambos monócitos e macrófagos apresentam inúmeros fatores de restrição que podem dificultar a replicação viral, incluindo a diminuição de expressão de receptores de superfície, expressão de proteínas do sistema imunológico intrínseco e microRNAs (Bergamaschi and Pancino, no prelo). Menos de 0,1% dos monócitos de pacientes contêm o DNA do HIV (Lewin et al., 1998), o que está de acordo com os resultados apresentados neste estudo. Por outro lado, vírus de replicação competente podem ser recuperados a partir de monócitos do sangue, mesmo de pacientes submetidos a HAART (Mikovits et al., 1992), o que torna essas células componentes cruciais para o desenvolvimento de

terapias de erradicação viral. Um subgrupo específico de monócitos $CD14^+CD16^{++}$ expande-se durante a AIDS em humanos e macacos (Bissel et al., 2006; Kim et al., no prelo; Pulliam et al., 1997; Strauss-Ayali et al., 2007). Esta subpopulação intermediária, situada fenotipicamente entre a clássica e a não-clássica, expressa altos níveis de CCR5 e CD4, e pode ser preferencialmente mais suscetível à infecção pelo HIV e SIV do que os outros subgrupos. Não houve diferenças significativas nos níveis de DNA do SIV entre monócitos $CD14^{dim}CD16^{++}$ e $CD14^+CD16^-CCR2^+$, embora tenha sido observada uma grande diferença entre esses dois subgrupos e monócitos ACC. Como a maioria dos estudos considera todos monócitos $CD14^+CD16^-$ como uma população monolítica, é possível que o grande número de células $CCR2^-$ durante a infecção esteja mascarando a prevalência real de SIV em monócitos clássicos autênticos.

As razões para o aumento desta nova subpopulação $CCR2^-$ e quais outros papéis que ela pode desempenhar durante a infecção pelo SIV ou HIV não são claras. Embora não existam relatos de que SIVmac ou HIV utilizem CCR2 como um co-receptor para a entrada nas células, este marcador de superfície pode ter um importante papel na patogênese da AIDS, mais do que se pensava. CCR2 é 71% homólogo ao CCR5 em humanos e macacos, e pode funcionar como um eficiente co-receptor para pelo menos uma cepa do SIV que infecta mangabeus de cabeça vermelha (*Cercocebus torquatus torquatus*) (Bissel et al., 2006; Gautam et al., 2009; Samson et al., 1997). Além disso, CCR2 pode ser utilizado na formação de sincícios mediada por cepas de HIV de duplo tropismo (Doranz et al., 1996), o que pode explicar o fato de que pacientes portadores de uma mutação no domínio transmembrana do CCR2 (CCR2-V64I) infectados pelo HIV progridem para AIDS de 2 a 4 anos mais tarde do que indivíduos homozigotos para o alelo comum (Smith et al., 1997). Algumas cepas de HIV podem até mesmo regular a expressão do CCR2, aumentando a disseminação do vírus aos órgãos através da intensificação do tráfego de monócitos para os tecidos em resposta à sinalização de CCL2 (Eugenin et al., 2006).

Diversos estímulos podem levar à diminuição da expressão de CCR2 em monócitos, incluindo $\text{IFN}\gamma$, CXCL4, $\text{TNF}\alpha$ e LPS (Penton-Rol et al., 1998; Schwartzkopff et al.; Sica et al., 1997; Weber et al., 1999). Em relatos prévios, observamos um aumento rápido em várias citocinas pró-inflamatórias no cérebro de macacos infectados por SIV durante a infecção aguda, seguida de uma regulação coordenada aos 14 dias p.i. (Witwer et al., 2009). Da mesma maneira, os níveis de citocinas no sangue também seguem um padrão de regulação semelhante em pacientes recém infectados pelo HIV, onde uma intensa e transiente expressão de proteínas inflamatórias, denominada "tempestade de citocinas", pode ser observada nos primeiros 10 dias de infecção (Stacey et al., 2009). A expansão de monócitos ACC em nosso modelo parece comprovar estas observações, o que nos leva a postular que a regulação do CCR2 neste novo subgrupo pode ser parte de uma reação anti-inflamatória em resposta ao vigoroso processo inflamatório durante a infecção aguda pelo SIV e HIV. Além disso, a liberação de monócitos da medula óssea é dependente da via CCL2/CCR2, corroborando a hipótese de que os monócitos ACC CCR2⁻ originaram-se a partir de monócitos clássicos circulantes que sofreram alterações fenotípicas em resposta a alguma sinalização específica, provavelmente exposição a citocinas como CXCL4 e CCL7. A observação de que os monócitos ACC constituem mais que 50% de todos as células CD14⁺CD16⁻ no 14 dia p.i., mas apresenta 10 vezes menos cópias de DNA do SIV do que o subgrupo expressando CCR2, sugere que monócitos clássicos que apresentam o genoma integrado do SIV têm uma menor chance de diferenciar-se neste novo fenótipo do que os não infectados. No entanto, uma vez diferenciados e com menor expressão de CCR2 de superfície, eles parecem tornar-se menos suscetíveis à infecção, e também incapazes de trafegar para tecidos via sinalização por CCL2. Não está claro se esse estado hipo-inflamatório observado em todos os monócitos no 14 dias p.i. é causado pela maior abundância de monócitos ACC, ou se este subgrupo é parte de um plano fisiológico mais amplo para conter a extrema cascata inflamatória desencadeada pelo SIV e HIV. Como a AIDS é fundamentalmente um

desequilíbrio entre imunoativação e imunossupressão, e porque monócitos apresentam plasticidade, é plausível que os monócitos ACC não representam um subgrupo monolítico, mas uma população heterogênea e mutável, que varia ao longo do processo infeccioso, ou mesmo apresentar diferentes perfis de expressão, dependendo da cepa viral envolvida. Sua habilidade em suprimir a proliferação de linfócitos – mesmo antes da formação de uma resposta imune adaptativa robusta – realça a importância destas células como possíveis alvos para intervenção terapêutica durante a infecção pelo HIV.

Aqui nós demonstramos a expansão de uma nova subpopulação de monócitos no sangue durante a fase inicial da infecção por SIV em macacos rabo-de-porco. Esse novo subgrupo compreende monócitos clássicos $CD14^+CD16^-$ com um fenótipo atípico $CCR2^-$. Além de apresentarem um transcriptoma distinto, essas células parecem representar uma subpopulação antiproliferativa refratária à infecção pelo SIV, com fagocitose e quimiotaxia alteradas, e por isso as denominamos *monócitos clássicos atípicos $CCR2^-$* (ACC monocytes). Análise em pacientes infectados pelo HIV comprovam que essa população em expansão também é encontrada em seres humanos, e que tratamento antirretroviral é capaz de fazê-la retornar a níveis semelhantes a de indivíduos não infectados.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. A fase aguda da infecção pelo SIV apresenta uma mudança na população de monócitos caracterizada por três fases: Depleção, expansão e retorno a níveis de pré-infecção. Essas mudanças são basicamente lideradas por alterações na população de monócitos $CD14^+CD16^-$.

2. Já nos primeiros dias de infecção é possível observar um aumento no número de monócitos clássicos $CCR2^-$, chegando a representar mais de 50% do número total de monócitos no dia 14 p.i. Essas células, por nós denominadas *monócitos clássicos atípicos $CCR2^-$* (ACC), apresentam transcriptoma distinto das demais $CD14^+CD16^-$. Elas também demonstram fagocitose e quimiotaxia prejudicadas, interferindo na proliferação de linfócitos T $CD8^+$, além de abrigar menos cópias do DNA do SIV quando comparadas a monócitos clássicos e intermediários.

3. Essa população é encontrada expandida em seres humanos infectados pelo HIV. Assim como em macacos, ela se retrai após tratamento antirretroviral.

4. A expansão da população ocorre paralelamente à “tempestade de citocinas”, sugerindo que ela seja uma parte de uma resposta anti-inflamatória na tentativa de diminuir a hiperativação causada pela infecção pelo SIV e HIV.

ANEXOS

ANEXOS

1. Email do *Journal of Immunology* comprovando recebimento do manuscrito

Lucio Gama <luciogama@gmail.com>

11-00581-FL Approved MS Receive

1 message

infoji@aai.org <infoji@aai.org>
To: lucio@jhmi.edu

Thu, Feb 24, 2011 at 6:50 PM

CC: Mr. Gama

Dear Mr. Gama:

This e-mail is to notify you that you are listed as a co-author on a manuscript, titled "Novel classical monocytes with an atypical CCR2- phenotype arise in early SIV and HIV infection," submitted by Mr. Gama for consideration for publication in The Journal of Immunology. The manuscript has been assigned the manuscript identification number 11-00581-FL.

Regards,

Journal Staff
The Journal of Immunology

2. Manuscrito submetido ao Journal of Immunology, ainda sob revisão

Novel classical monocytes with an atypical CCR2⁻ phenotype arise in early SIV and HIV infection

Lucio Gama^{1,2,†}, Erin Shirk¹, Julia N. Russell¹, Ming Li¹, Karina I. Carvalho², Suzanne E. Queen¹, Jorge Kalil², M. Christine Zink¹, Janice E. Clements¹, and Esper G. Kallas²

¹ Dept. of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, United States of America

² Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

[†] Corresponding author

Department of Molecular and Comparative Pathobiology
Johns Hopkins University School of Medicine,
BRB 831 –Baltimore – MD - United States of America

Phone: (410) 955.9770

Fax: (410) 955.9823

E-mail: lucio@jhmi.edu

Key words: monocytes, macrophages, SIV, HIV, HIV-1, AIDS, CCR2

Running title: CCR2- classical monocytes in SIV/HIV infection

This study was supported by National Institute of Health Grants (MH070306, NS055648 and MH085554). This study was partially supported with funding from the Brazilian Program for STD and AIDS, Ministry of Health (914/BRA/3014-UNESCO/Kallas), the São Paulo City Health Department (2004-0.168.922-7/Kallas), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (04/15856-9/Kallas). KIC's scholarship is

supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian Ministry of Education.

The authors have no conflicts of interest to declare. This work has not been presented or submitted elsewhere.

ABSTRACT

Monocytes have been categorized in three main subpopulations based on CD14 and CD16 surface expression. Classical monocytes are the most abundant subset in the blood. They express a CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ phenotype, which confers on them the ability to migrate to inflammatory sites by quickly responding to CC chemokine ligand 2 (CCL2) signaling. Here we identified and characterized the surge and expansion of a novel monocyte subset during SIV and HIV infection. They were undistinguishable from classical monocytes regarding CD14 and CD16 expression, but did not express surface CCR2. Transcriptome analysis of sorted cells confirmed that they represent a distinct subpopulation that expresses lower levels of inflammatory cytokines and activation markers than their CCR2⁺ counterparts. They exhibited impaired phagocytosis and deficient chemotaxis in response to CCL2 and CCL7. In addition, these monocytes are refractory to SIV infection and suppress CD8⁺ T cell proliferation *in vitro*. We named these cells atypical CCR2⁻ classical (ACC) monocytes, and postulate that they play an important role in AIDS pathogenesis, reflecting a suppressive response against the extreme immune activation observed during SIV and HIV infection. Antiretroviral therapy caused this population to decline in both macaque and human subjects, suggesting that this atypical phenotype may be induced by viral replication.

INTRODUCTION

CD4⁺ T lymphocyte depletion, one of the first immune events described in the AIDS, is the primary disease progression prognostic marker and a key parameter for antiretroviral therapy initiation (Hammer et al., 2008). Therefore, much emphasis has been placed in the analysis of lymphocytes in HIV disease; however, other blood cell populations, such as neutrophils, NKT cells, NK cells, and platelets, also tend to decline or lose functionality, contributing to the dramatic immune dysregulation observed in HIV and SIV infections in susceptible hosts (Brunetta et al.; Pitrak, 1997; Snyder-Cappione et al., 2009; Wachtman et al., 2006; Ward et al., 2009).

In stark contrast with the CD4⁺ T cells and other PBMCs, the monocyte population has been observed to expand during HIV and SIV infections, facilitating viral spread by trafficking into tissues harboring infectious virus (Crowe et al., 2003; Heinzinger et al., 1995; Zhu, 2002). Also, a high monocyte turnover correlates with AIDS progression in SIV-infected macaques, and the expansion of specific subsets has been associated with the development of HIV-associated neurological disorders (HAND) and tuberculosis (Burdo et al.; Pulliam et al., 1997; Vanham et al., 1996).

Monocytes have often been described as transitional cells whose main function is to replenish the phagocyte population in tissues through differentiation into macrophages and other specialized cells, such as microglia, osteoclasts, and dendritic cells. However, during their short life in the blood, monocytes are far from bystanders; they are constantly patrolling the vasculature, detecting pathogens and unwanted cells, and clearing them from the circulation (Cros et al.). They also quickly respond to chemokine signals by trafficking to tissues upon stimulation, as well as mediating important functions in immune responses by producing copious amounts of cytokines (Strauss-Ayali et al., 2007; Weber et al., 2000).

With the advent of multicolor flow cytometry and improved antibodies, monocytes were not only more easily distinguished from other circulating leukocytes, but also separated into different subpopulations with distinct surface markers and biological functions (Gordon and Taylor, 2005). Based on levels of CD14 (LPS

receptor) and CD16 (FcγRIII) expression, three well-defined monocyte subpopulations have been identified in humans and non-human primates: CD14⁺CD16⁻, referred to as *classical* or *inflammatory*; CD14^{low}CD16^{high} (or CD14^{dim}CD16⁺) referred to as *nonclassical*, *resident* or *pro-inflammatory*; and a transitional subpopulation of CD14^{high}CD16⁺, referred to as *intermediate*. Similar functional subpopulations are found in mice and rats, although other surface markers (Ly6C, 7/4) are used for such classification (Geissmann et al., 2003; Kim et al.; Sunderkotter et al., 2004).

The origin of each one of these subsets remains controversial. It is the general consensus that the classical subset, comprising >80% of the total circulating monocytes, originates from bone marrow progenitor cells with a transcriptome profile similar to the myeloid precursor (Ancuta et al., 2009). These cells express C-C chemokine receptor 2 (CCR2) and migrate into the circulation and toward inflammatory sites mainly through a CCR2/CCL2-dependent signaling. Once reaching the tissues, they differentiate into macrophages or, in some sites, dendritic cells (Cheong et al.; Yona and Jung). Conversely, nonclassical monocytes appear to represent a more advanced stage of differentiation, closer to resident macrophages. It is still unclear whether they originate directly from progenitor cells in the bone marrow or from classical monocytes through an intermediate phase, or both. Despite their origin, nonclassical monocytes are the main subpopulation supplying resident macrophages and dendritic cells to healthy tissues (Geissmann et al., 2008). They migrate into tissues in response to macrophage inflammatory protein 1α (MIP-1α or CCL3), C-C chemokine ligand 5 (CCL5 or RANTES), and chemokine (C-X3-C) ligand 1 (CX3CL1 or fractalkine in humans), but not C-C chemokine ligand 2 (CCL2 or MCP-1), since they lack CCR2 on their surface (Gordon and Taylor, 2005; Sunderkotter et al., 2004). Nonclassical monocytes are also involved in mouse wound repair and tissue remodeling after myocardial infarction (Cochain et al.). In humans, this CD14^{dim}CD16⁺ subset patrols the endothelium of blood vessels and responds to viruses via toll-like receptors (TLR) 7 and 8, in contrast to classical and intermediate monocytes, which respond to bacteria-associated signals (Cros et al.).

Several novel blood monocyte phenotypes have recently been described, indicating that their heterogeneity is not restricted to the three classical subtypes. Some

monocytes express the angiopoietin receptor Tie-2 and, therefore, exhibit marked proangiogenic activity, accounting for 35%-75% of the nonclassical subset in the blood of human cancer patients (Venneri et al., 2007). CD16^{high}CCR2⁻ monocytes producing high levels of heme oxygenase (HO)-1 may play an anti-inflammatory role during Kawasaki disease and influenza virus infection (Mizuno et al., 2005; Yachie et al., 2003). A subset of CD14^{low}CD16⁺ cells also expressing the Fcγ receptor I CD64 in conjunction with high levels of HLA-DR, CD11c, and CD86, possibly represents an intermediate phenotype between monocytes and dendritic cells (Grage-Griebenow et al., 2001).

In this study, the analysis of monocyte subpopulations during acute SIV infection using our consistent, accelerated animal model for HAND and highly active antiretroviral therapy (HAART) led to the discovery of a novel CD14⁺CD16⁻ monocyte subset that lacks surface CCR2, rendering them unresponsive to CCL2. They present a unique transcriptome, impaired phagocytosis and chemotaxis, and interfere with the proliferation of CD8⁺ T cells *in vitro*. They are refractory to viral infection, and possibly display an immune suppressive role during SIV and HIV infection. We also show that HIV-infected human subjects have this monocyte subset, and that efficacious antiretroviral treatment, both in macaques as in humans, is able to revert the frequency of this population back to pre-infection levels.

MATERIAL AND METHODS

Animals. 45 juvenile pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*) were inoculated intravenously with SIV/DeltaB670 and SIV/17E-Fr, as previously described (Zink et al., 1999). Beginning on day 12 post inoculation (p.i.), six animals were treated with a combination of four antiretroviral drugs (PMPA, saquinavir, atazanavir, and the integrase inhibitor L-870812), and were euthanized after 160 to 186 days p.i., as described elsewhere (Dinoso et al., 2009). Groups of SIV-infected untreated animal (six each) were euthanized after 7, 14, and 21 days p.i. Another group of three SIV-infected animals were treated with a combination of three drugs (PMPA, atazanavir, and L-870812) beginning at 42 days p.i., and euthanized after 160 days p.i. All other animals

were euthanized between 50 to 90 days p.i. Two macaques were mock-inoculated and used as procedure controls. Before euthanasia, animals were perfused with sterile phosphate-buffered saline, and tissues were harvested for fixing and freezing. All procedures were done in accordance with federal and institutional policies.

Patients. Samples were selected from a cohort designed to recruit recently HIV-infected people in 2002 in São Paulo, Brazil (Bassichetto et al., 2008; Kallas et al., 2004). Recent HIV infection was determined by the Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS). Subjects were included in the study when they had a negative desensitized ELISA HIV-test. Antiretroviral treatment was initiated when CD4⁺ T cell count <300 cells/ μ l or upon identification of any AIDS-defining condition. We randomly selected 12 subjects to evaluate the early infection monocyte subpopulations at baseline, three months, and post-six months. Another group of 6 subjects was evaluated before and after initiation of antiretroviral therapy.

Samples. Macaque blood samples were collected at multiple time points before and after inoculation. Whole blood was used for cytometry analysis. For some experiments, PBMCs previously collected at different time points were rapidly thawed in RPMI containing 25% of FBS and kept on ice to maintain monocyte viability. After a cold wash with 10% FBS RPMI, viable cells were enriched using the Annexin V MicroBead kit (Miltenyi) and aliquoted for FACS analysis and functional assays, as described below. For human samples, PBMCs were thawed, checked for viability, and used for the flow cytometry assay, also described below.

Flow cytometry. Macaque blood samples were stained with FITC-conjugated anti-CD14, PE-conjugated anti-CCR2, and PE.Cy5-conjugated anti-CD16 antibodies (Supplemental information Table 1) for 20 minutes at room temperature. Cells were fixed for 10 minutes with Lyse/Fix buffer (BD), and for intracellular staining, cells were permeabilized using Cytofix/Cytoperm (BD). Analyses were performed on a FACSCalibur™ flow cytometer using CellQuest software. PBMCs from frozen samples were stained with different antibody combinations for 30 minutes on ice. Panels with

information for all antibodies can be found in the supplement section (Supplemental information Table 1). After fixation, samples were analyzed on a BD LSRFortessa™ cell analyzer using DIVA software. Human PBMCs were processed similarly and evaluated on a BD FACSCanto or LSRFortessa flow cytometers using DIVA software. All data acquired were analyzed using Flowjo software.

Quantification of SIV virions. Viral RNA was isolated from plasma using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen), and analyzed by qPCR as previously described (Barber et al., 2004).

Quantification of CCL2. Levels of plasma CCL2 were measured using the Quantikine Human for MCP-1 ELISA kit (R&D), following the manufacturer's protocol.

Sorting. Macaque PBMCs were thawed as described above and stained with anti-CD3 and anti-CD20 (FITC), anti-CD14 (PerCP-Cy5.5), anti-CD16 (PE), and anti-CCR2 (APC) antibodies (Supplemental information Table 1). After 30 minutes on ice, cells were fixed with 4% formaldehyde and sorted on a BD Aria SO cytometer.

Nucleic Acid extraction. Genomic DNA and total RNA were isolated from sorted cells using Allprep DNA RNA FFPe kit (Qiagen) with modifications. Briefly, cells were pelleted and resuspended in PKD buffer with 10µl proteinase K. Samples were incubated for 15 minutes at 55⁰C, and then for 5 minutes on ice. Lysates were centrifuged at 10,000 x g for 15 minutes. Pellets were resuspended in ATL buffer and DNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Supernatants containing the RNA were incubated for 15 minutes at 80⁰C, and then mixed with two volumes of 100% ethanol and 1 µg of carrier RNA (Qiagen). After 30 minutes at -20⁰C, RNA was pelleted by centrifugation and resuspended in 6 µl of RNase-free water.

mRNA quantification. CodeSets for 92 macaque genes were designed according to Nanostring specifications, based on rhesus macaque (*Macaca mulata*) published

sequences. RNA samples were hybridized for 16 hours with the CodeSet, and genes were quantitated using the nCounter Digital Analyzer (Geiss et al., 2008). Data were initially normalized by the average of the values from spiked positive standards, and then by the geometric mean of four housekeeping genes. Raw data with values lower than the background controls were considered negative. Results were deposited at the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession number GSE27559 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Viral DNA quantification. DNA samples were analyzed for SIV *gag* by quantitative PCR (qPCR) as previously described (Clements et al., 2002). SIV 2-LTR was quantitated in the same reaction tubes using the following set of primers and probe: 2LTRF-GAAGACCCTGGTCTGTTAGGACC; 2LTRR-CTTGCACTGTAATAAATCCCTTCCA; 2LTRHEX-TTTGGGAAACCGAAGCAGGAAAATCC. Copy numbers were determined by extrapolation from standard curves generated by serial dilution of plasmids containing the specific DNA sequences for each amplicon. Results were normalized to copy numbers of a single-copy cellular gene (IFN β).

Phagocytosis Assay. Macaque PBMCs were thawed as described above. 2×10^5 cells were resuspended in 10% FBS RPMI and placed in Hydrocell™ low adherence plates (Nunc) mixed with 20 μ l of *E. coli* particles covered with pHrodo™ (Life), a non-fluorescent dye that gains fluorescence in acidic milieu such as lysosomes. After 30 minutes at 37°C, cells were placed on ice and stained with conjugated antibodies for FACS analysis. Besides plating cells without pHrodo™ for viability control, cells were also plated with pHrodo™, but kept on ice to prevent phagocytosis and were used as negative control.

Chemotaxis assay. BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers were used for chemotaxis experiments, following the manufacturer's instructions. This transwell system contains a top insert containing a 10 μ M pore membrane covered with a gelatinous matrix that prevents transmigration of non-invasive cells. Top inserts holding 500 μ l containing 2×10^5 thawed PBMCs were transferred to a Hydrocell™ low

adherence 24-well plate with 100 ng/ml of CCL2, CCL3, or CCL7 (ProsPec) in 500 μ l of 10% FBS RPMI. Wells containing media-only were used as background control for each sample. After 24 hours of incubation at 37⁰C, cells that migrated to the bottom wells were split in two groups: 30% were counted in a hemocytometer and 70% were stained for FACS analysis.

Lymphoproliferation assay. Lymphocytes and other non-monocytic cells were isolated from PBMCs from two uninfected macaques using anti-CD14 magnetic beads, and labeled with a tracer dye (Vybrant DiI – Life) for 10 minutes. After two washes, cells were cultivated in RPMI with 10% macaque serum, 25 μ g/ml of PHA (Sigma) and 2 U/ml of IL2 (ProsPec). Concomitantly, monocytes CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ were isolated from viable PBMCs collected from three SIV-infected animals euthanized at 14 days p.i. using the Monocyte Isolation kit II (Miltenyi) in combination with biotinylated anti-CCR2 (R&D). Once purified, CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ monocytes were added to labeled cells (10,000 monocytes for 100,000 non-monocytic cells) in proliferation media. As control, monocytes CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ were similarly isolated from PBMCs from three uninfected macaques using the same protocol minus the anti-CCR2 antibody, and cocultivated with the labeled cells. After 72 hours cells were collected and stained for FACS. Proliferation levels were analyzed by Flowjo.

Statistical analysis. Differences in absolute numbers of cells, and in CCR2⁺/CCR2⁻ classical monocyte ratios at different time points were analyzed by Wilcoxon paired rank test. Nanostring data were analyzed by paired t-test, and corrected by Bonferroni's method for multiple comparisons. Bivariate analyses were done using Spearman's rank correlation test. All other results were analyzed using Mann-Whitney t-test. Calculations were performed using Prism software (GraphPad Software).

RESULTS

Changes in peripheral blood monocyte subpopulations during acute SIV infection

In the consistent, accelerated SIV model for HIV/AIDS and CNS disease, pigtailed macaques are inoculated with the immunosuppressive swarm SIV/DeltaB670 and the neurotropic molecular clone SIV/17E-Fr, leading to the onset of AIDS and encephalitis within three months (Clements et al., 2002). Viral mRNA in the brain can be detected as early as four days p.i., and macrophages derived from monocytes that recently migrated from the peripheral blood represent the main source of viral replication (Witwer et al., 2009). To investigate the contribution of circulating monocytes in the early events observed in the brain, blood samples from 18 SIV infected macaques were collected before virus inoculation, and at 7, 10, 14, 21 and 28 days p.i., and analyzed by flow cytometry. Monocytes were initially distinguished from other leukocytes by FSC and SSC, and then assessed according to their levels of CD14 and CD16 expression (Figure 1A). As proposed by the Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies, classical monocytes were defined as CD14⁺CD16⁻, intermediate monocytes as CD14^{high}CD16⁺, and nonclassical monocytes as CD14^{dim}CD16⁺ (Ziegler-Heitbrock et al.). Cells expressing low levels of CD14 and no CD16 have been previously identified as a heterogeneous population of non-monocytic leukocytes and were not considered in our analyses (Kim et al.).

A significant change in the total number of circulating monocytes was observed in the first 28 days p.i., and was characterized by three distinct phases: an initial period of decline, followed by expansion, and a return to pre-inoculation levels (Figure 1B). Although all individual subsets presented similar trends (Figures 1C), their contribution to the overall population in each of the three phases were noticeably different. At 7 days p.i., the absolute number of classical and intermediate monocytes was significantly reduced ($p < 0.05$ for both), indicating they were the main subsets driving the initial depletion observed in the total population. Both subsets were CD14^{high}, whereas no significant change was observed in the CD14^{dim}CD16⁺ nonclassical subgroup ($p=0.31$). After this transient decrease, all subpopulations expanded significantly (Figure 1B), leading to a pronounced, albeit temporary, monocytosis at 14 days p.i. In the third phase, the total monocyte decline appeared to be the result of classical monocyte fluctuations ($p=0.03$), since no significant variation was detected in subpopulations expressing CD16 ($p=0.12$ for intermediate, and $p=0.65$ for nonclassical monocytes,

Figure 1C). These results suggest that CD14⁺CD16⁻ cells were the main driver of monocyte changes during acute infection.

CCR2 is down-regulated specifically in classical monocytes during SIV acute infection

It is well established that CD14⁺CD16⁻ monocytes express high levels of chemokine CCR2 on their surface (Weber et al., 2000). Interestingly, as we were characterizing changes in the monocyte population during the course of acute infection, we observed a dramatic down-regulation of CCR2 expression specifically in the CD14⁺CD16⁻ subset as early as 7 days p.i. (Figure 2A). In contrast, intermediate CD14^{high}CD16⁺ monocytes, which constitute a heterogeneous population regarding the expression of several surface proteins, manifested no significant change in CCR2 expression when compared to steady state levels.

After 10 days p.i., approximately half of the classical monocytes appeared to regain CCR2 expression, although a pronounced CCR2⁻ subpopulation remained (Figure 2B, Supplemental Figure S1). This CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ subgroup expanded considerably at 14 days p.i. (64.2% of the classical monocytes, Figure 2B), but was reduced at day 21 p.i., remaining higher than pre-infected levels throughout infection (Figure 2C). Classical monocytes that still expressed CCR2 also expanded from 7-14 days p.i., but slowly declined to pre-infected levels after 21 days p.i., with a distinct longitudinal profile when compared to the CCR2⁻ subset (Figure 2C).

In uninfected macaques, CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ cells constituted from 5%-20% of classical monocytes, being outnumbered by the CCR2⁺ subgroup by 4- to 19-fold (Figure 2B, first panel, and Figure 2D). During acute SIV infection, the proportion between these two subsets changed dramatically and by day 7 p.i. >50% of circulating classical monocytes were CCR2⁻. Even with the increase of CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ cells after day 10 p.i., the ratios between CCR2⁺ and CCR2⁻ classical monocytes were not restored to pre-infected levels, and remained significantly lower throughout infection (Figure 2D).

Permeabilization of the samples during FACS staining increased the signal for CCR2 threefold (Figure 2E), indicating that changes in the levels of surface CCR2

expression can be explained, at least in part, by retention of the protein in the cytoplasm or receptor internalization after ligand binding. We have previously shown that levels of CCL2 in the plasma peak at day 7 p.i. but rapidly return to uninfected levels by day 21 p.i. (Zink et al., 2001). Bivariate analysis showed a small but significant correlation ($r=0.18$, $p<0.05$) between levels of plasma CCL2, measured by ELISA, and the absolute number of $CD14^+CD16^-CCR2^-$ cells (Supplemental Figure S2A). Other biological parameters frequently measured during SIV/HIV infection, such as viral load and levels of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells did not correlate with the variations in the frequency of this new CCR2⁻ subset (Supplemental Figure S2 B-D).

The loss of surface CCR2 could impact cell trafficking to tissues and efficient responses during infection and inflammation. We postulated that this dramatic down-regulation of CCR2 expression in classical monocytes observed during SIV acute infection might not be an isolated characteristic, and that $CD14^+CD16^-CCR2^-$ monocytes would present other phenotypic and functional changes when compared to their $CCR2^+$ counterparts. Since blood samples acquired longitudinally were limited in volume, for the next sets of experiments we used viably frozen PBMCs collected during necropsy from macaques euthanized at 14 days p.i. (and also 7 and 21 days p.i., when necessary), or uninfected animals. For clarity, we will henceforth use the term *classical monocytes* only for the $CD14^+CD16^-CCR2^+$ subset, and refer to $CD14^+CD16^-CCR2^-$ cells as *atypical CCR2⁻ classical (ACC) monocytes*.

ACC monocytes display a transcriptome distinct from bona fide classical monocytes

To investigate whether $CCR2^+$ classical and ACC monocytes had a similar mRNA expression profile, monocytes from six SIV-infected macaques were FACS sorted according to their surface marker phenotype (Supplemental Figure S3). To obtain sufficient mRNA, we collected 3×10^7 PBMCs from animals euthanized at 14 days p.i., which was the time point that displayed the largest monocyte population. Each subset's transcriptome was analyzed by Nanostring, using a panel of 90 probes especially designed for the detection and quantitation of macaque genes associated with inflammatory and immunoregulatory processes. The specificity of the probe set was

previously confirmed using spleen and brain tissue from uninfected and SIV-infected pigtailed macaques (data not shown). Results were normalized by the geometric mean of four housekeeping genes (*actin*, *GAPDH*, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* and *porphobilinogen deaminase*).

Based on 78 genes that were expressed in at least one subset, it was evident that ACC monocytes presented a unique phenotype. Levels of expression of 46 genes were distinct between classical and ACC monocytes with p -values <0.05 , and 16 of these genes remained significant after p -values were corrected for multiple comparisons using Bonferroni's adjustment (Figure 3A and 3B). For clarity, we will present the results based only on uncorrected t-test significance, since the conservatism of Bonferroni's method assumes independence of measurements, and might increase the probability of false negatives by ignoring the possibilities of co-regulation.

Among the 46 transcripts with differential expression between the two subsets, 34 (38% of all genes in the array) were expressed at lower levels in ACC monocytes, including the typical inflammatory cytokines TNF α , IL6, IL7, IL12A, IL12b, IL1b, IL27, CCL3, CCL4, CCL19, CXCL3, CXCL9, CXCL10, XCL1, IFN γ , and IFN α 2. Accordingly, they also expressed lower levels of IRF1, IRF7, STAT2, STAT5a, and interferon-stimulated genes, including OAS2, MxA, and ZBP1.

The down-regulation of surface CCR2 in this novel subset was also accompanied by lower levels of several other surface markers' mRNAs, including CCR4, CCR7, CXCR3, and CCR1. ACC monocytes also presented a dramatic reduction in the levels of CD4, which is known to be expressed in monocytes in certain circumstances (Kazazi et al., 1989). In fact, this down-regulation of CD4, in conjunction with a higher expression of CD16 transcript, suggests that this subset might represent a more mature population, with a transcriptome profile closer to macrophages than the typical classical monocyte subgroup. Surprisingly, there was no correlation between the expression of CD16 mRNA, which was higher in ACC monocytes, and CD16 surface protein, which was not detectable by FACS in either subgroup.

Monocytes from healthy human subjects express very low levels of TLR3 and TLR9, but high levels of TLR2 and TLR4 (Jarrossay et al., 2001). We observed low but detectable expression of TLR3 and TLR9 in CCR2⁺ classical monocytes at 14 days p.i.,

which suggests that these receptors might be up-regulated upon SIV infection (Supplemental Figure S4A). Interestingly, ACC monocytes presented higher levels of TLR3 and TLR5 and lower levels of TLR6, TLR4, and TLR7 when compared to their CCR2⁺ counterpart, besides presenting undetectable levels of TLR9. In addition to TLR3 and TLR5, ACC monocytes presented higher levels of transcripts for three interferon-related receptors (IL22R α 2, IL28R, IFNR1) and some less characterized cytokines (CCL20, CCL13, IL11). Whether these genes are also expressed as protein remains to be investigated.

Thirty-three of the analyzed mRNAs demonstrated no change between the two populations (Figure 3C), although, in some cases, Bonferroni-adjusted *p*-values were >0.05 due to a single outlier, defined as two standard deviations above median. Removal of the outlier made CCR5 and IL12A significantly higher in classical monocytes (from *p*=0.11 and *p*=0.26, respectively, to *p*<0.05). There was no significant differential expression in typical monocyte surface markers, including CD14, CX3CR1, CD68 or TLR2. Lower levels of CCR2 mRNA in ACC monocytes were observed only in three of the six animals (Supplemental Figure S4B), confirming that the changes in surface protein expression we observe do not happen only at the transcriptional level. Also, we observed no relative change in the expression of IL4, IL10, IL18bp, CCL2, CCL8, CCL5, CCL24, CXCL2, or CXCL11. Some cytokines were undetectable for both subsets in all samples, including IL9, IL13, IL17, IL25, IL28A/B, IL29, CCL1, and CCL7.

These results support that ACC monocytes represent a novel subset. Accordingly, FACS analysis of two genes not included in our mRNA array, HLA-DR and *mannose receptor*, demonstrated that the surface expressions of these activation markers were also down-regulated on ACC monocytes (Figure 3D). These observed changes do not represent a widespread down-regulation, since we also reported up-regulation of various specific genes. These findings indicate a potential surge of a hypo-inflammatory or anti-inflammatory subpopulation of monocytes during acute SIV infection. Since several of these variations could interfere with functions normally ascribed to monocytes, we investigated whether ACC monocytes were able to properly phagocytize and respond to chemo-attractants.

ACC monocytes present impaired phagocytosis and chemotaxis

To investigate whether ACC monocytes presented unchanged phagocytic abilities when compared to cells from healthy subjects, PBMCs from uninfected and SIV-infected macaques euthanized at 7, 14, and 21 days p.i. were exposed to *E. coli* covered in pHrodo™, a dye that is not fluorescent at neutral pH, but fluoresces when located in acidic milieu such as phagosomes and lysosomes.

More than 80% of monocytes from uninfected macaques were positive for pHrodo™ fluorescence, in contrast to 58% and 51% of monocytes from 7 and 14-day p.i. samples, respectively (Figure 4A). Control monocytes presented higher mean fluorescence, which indicates a larger intake of particles per cell (Figure 4B). There was no significant difference between uninfected and 21 days p.i. samples, suggesting that monocytes regained their ability to efficiently phagocytize after acute infection.

The maintenance of PBMCs in culture at 37°C for the duration of this experiment was enough to increase the surface expression of CD16 in classical monocytes even in the absence of pHrodo™, likely as part of their programming to differentiate into macrophages (Merino et al.). Distinction between classical and intermediate monocytes were harder to established, but it was noticeable that at all time points only CCR2⁺ cells among the two CD14⁺⁺ subtypes were also positive for pHrodo™ (Figure 4C). Expression of CCR2, as we expected, was not essential for efficient phagocytosis, since 50% of nonclassical monocytes CD14^{dim}CD16⁺, which do not express CCR2, were also pHrodo™ positive. These data indicate that monocytes in general present a transitory phase of impaired phagocytosis after SIV infection, and that the ACC monocytes are specifically affected by this dysfunction in all time points examined.

We also analyzed the ability of monocytes at 14 days p.i. to respond to CCL2 signaling using a transwell migration assay. PBMCs from uninfected or infected macaques at 14 days p.i. were placed on top inserts, and transferred to wells containing medium with 100 ng/ml of CCL2, CCL3, or CCL7 (Eugenin et al., 2006). After 24 hours, cells were collected from the bottom wells and stained for FACS analyses.

In samples from uninfected monkeys, cells started transmigrating to the lower chambers as early as 4 hours after plating. Although we observed transmigrated cells even in media containing no chemo-attractant, only wells with CCL2 and CCL7 contained CD14⁺ monocytes (figure 4D). Levels of CCR2 appeared lower than what we normally observed in fresh PBMCs, suggesting that monocytes down-regulated surface expression during or after transmigration, probably due to exposure to the ligand, as has been previously reported (Sozzani et al., 1997). In the lower chambers using day 14 p.i. PBMCs, we observed a significant reduction in transmigrated cells independent of the chemo-attractant. Specifically, we observed almost no CD14⁺CCR2⁺ leukocytes, paralleling the previous observation that monocytes in general have impaired function during acute infection, and that ACC monocytes do not respond to chemokine signaling in this assay.

ACC monocytes impair *in vitro* proliferation of CD8⁺ but not CD4⁺ T cells, and harbor fewer copies of SIV DNA genome

A population of CD14⁺HLA-DR^{low/neg} cells with a suppressive phenotype has been identified in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma (Lin et al.). To assess the role of ACC monocytes in lymphoproliferation, we exposed proliferating lymphocytes from uninfected macaques to monocytes isolated from other uninfected animals, or from SIV infected macaques at 14 days p.i. (Figure 5A). After 72 hours we observed a significant decrease in the proliferation of CD8⁺ T cells exposed to ACC monocytes ($p < 0.05$), although no significant change was observed in CD4⁺ T cells (Figure 5B). This suggests that the presence of this unique monocyte subpopulation may interfere with the development of adaptive immune responses early during infection.

Monocytes are also targets of SIV and HIV infection and may support active replication *in vivo* (Bergamaschi and Pancino). Some groups have identified the CD14⁺⁺CD16⁺ subset as more susceptible to both SIV and HIV infection (Crowe et al., 2003; Kim et al.). To investigate which monocyte subsets harbor viral DNA in our model at 14 days p.i., genomic DNA samples isolated from classical, nonclassical, intermediate, and ACC monocytes sorted by cytometry were analyzed by Q-PCR using

sets of primers and probes specific for SIV *gag* and 2-LTR sequences. Genomic DNA samples from fixed PBMCs were used as positive control.

There was no significant difference between the number of SIV *gag* DNA copies detected in intermediate and classical monocytes ($p=0.58$), whereas both subsets had higher levels than nonclassical monocytes ($p=0.03$ for both) (Figure 5C). Levels of SIV *gag* DNA in ACC monocytes were a median of 9.3-times lower than classical monocytes ($p=0.03$), 2.9-times lower than intermediate monocytes ($p=0.03$), and 1.8-times lower than nonclassical monocytes ($p=0.09$). We observed no difference in levels of *gag* DNA between PBMCs and classical or intermediate monocytes ($p=0.43$ and $p=0.68$, respectively). However, there were twice as many copies of SIV *gag* DNA in PBMCs than in total monocytes (17.3 vs 9.4, respectively), when considering the median of all values together, corrected by the proportion of each subset (data not shown). No SIV 2-LTR circular DNA was detected in any monocyte subpopulation, although they could be quantitated in PBMCs (median of 2.45 copies/10,000 cells), suggesting that monocytes were infected but not sustaining notable viral replication. These results, together with the transcriptome data indicating that ACC monocytes express less CD4 and CCR5, suggest that this novel subset may be less susceptible to SIV infection.

HAART reverts monocytes subpopulations to uninfected levels in SIV infected macaques

Given that the CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ subpopulation rapidly expanded in response to SIV infection, we postulated that a reverse process would follow as animals initiated treatment with HAART. Six SIV-infected macaques were treated with a potent four antiretroviral regimen starting at 12 days p.i., which falls within the expansion phase we observed for all monocyte subsets. Phenotypic analysis of classical monocytes demonstrated that, at 14 days p.i., the CCR2⁻ subset was significantly reduced when compared to untreated animals (Figure 6A). Conversely, the CCR2⁺ subgroup continued to expand after treatment, and by 21 days p.i., the ratio between classical and ACC monocytes returned to steady state levels found in uninfected macaques (Figure 6B).

Considering that, the median (IQR) SIV RNA copy equivalent per milliliter of plasma was 0.75 (0.12 – 1.8) $\times 10^6$ from 3-9 days post treatment (14 and 21 days p.i.),

these data suggest that the retraction of the ACC monocyte population was not directly related to the presence of circulating viral particles, but probably to *de novo* replication, which is blocked by the drug regimen. This hypothesis was corroborated by analyses of another set of three SIV-infected macaques, treated with three antiretroviral drugs beginning at 42 days p.i. (Figure 6C). Macaques with continual reducing viral load after HAART demonstrated concomitant decrease in ACC monocytes, whereas the third animal presented an expansion in the CCR2⁻ subset that slightly preceded its failure in controlling viral replication.

ACC monocytes are also detected in HIV infected patients and decrease in numbers after HAART therapy

To investigate whether humans infected by HIV also presented an increase of classical monocytes lacking CCR2 surface expression, we analyzed samples from a cohort of recently HIV-infected patients (Kallas et al., 2004) and compared them to PBMCs collected from negative control individuals. Uninfected subjects presented a median of 12.9% of ACC monocytes, with the exception of two samples where levels were as high as in some infected patients (Figure 7A). We attributed these results to a combination of genetic variability and the lack of information about the general health status of these individuals. It is possible that this novel subset is not unique to SIV/HIV infection, and may also increase during other pathological conditions.

The difference between uninfected and HIV-infected individuals, however, was evident, increasing from 12.9% to 39.1% in samples acquired when a positive diagnosis was first reported ($p<0.05$). Samples collected from the same patients on two subsequent occasions demonstrated no significant change in the frequency of this subset ($p=0.67$ for 3 months, and $p=0.27$ for more than 6 months after baseline). However, as observed in our macaque model, patients treated with HAART also presented a decrease in the percentage of circulating CCR2⁻ cells among classical monocytes (Figure 7B), from a median of 39.9% to levels similar to uninfected individuals (13.25%, $p=0.03$), which suggests that similar mechanisms occur in the modulation of this phenotype during HIV infection. We were unable to establish an association between ACC monocytes and changes in other circulating leukocyte populations, including CD4⁺ and CD8⁺ T cells

(data not shown), which is another important similarity between the results from our SIV model and the human cohort.

DISCUSSION

Leukocytes are in constant change during pathological conditions, and monocytes, in particular, often present functional, phenotypic, or numerical variations during infection. Novel blood cell subpopulations have been identified recently, reflecting the plasticity of the immune system, an essential trait for successful maintenance of the body's homeostasis. While characterizing monocyte subpopulations in our accelerated SIV model for AIDS and HIV-associated neurocognitive disorder, we observed a profound change in the expression of CCR2 in classical CD14⁺CD16⁻ monocytes, starting early after inoculation and lasting throughout infection. The existence of a small number of circulating CCR2⁻ classical monocytes is not in itself a novel finding, but the sizable expansion and persistence of this subset during SIV and HIV infections had not been previously identified. Previous studies have demonstrated the importance of CCR2 as a surface marker that can help the distinction between monocyte subpopulations in various species (Ancuta et al., 2009; Gordon and Taylor, 2005; Serbina et al., 2008). Surprisingly, there is no reference in the literature of inflammatory monocytes not expressing CCR2.

Phenotypic changes in blood monocytes during SIV infection have been described by several groups in different macaque models, but no study reported longitudinal alterations in CCR2 surface expression (Bissel et al., 2006; Burdo et al.; Clay et al., 2007; Kim et al.; Otani et al., 1998). In our model, supporting some of the findings from other groups, we observed a reproducible variation in the absolute number of circulating monocytes during acute infection, which were probably associated to events related to viral replication, including change in monocyte turnover, death of infected progenitor cells in the bone marrow, and cell migration toward organs harboring CCL2-expressing activated cells (Zink et al., 2001). These population changes were predominantly driven by CD14⁺CD16⁻ cells, which are the most abundant monocyte subset in the blood, and normally express high levels of surface CCR2. As early as 7 days p.i., however, we observed an increase in CCR2⁻ classical monocytes.

Initially it appeared that the change was only proportional to CCR2⁺ cells, which were depleted from circulation, but further analysis showed that this novel subgroup was also increasing in absolute numbers and were maintained in circulation throughout infection. Thus, we named these cells *atypical CCR2⁻ classical* (ACC) monocyte, suggesting that they were probably originated from classical monocytes undergoing a phenotypic change.

This hypothesis was supported by the comparative analysis of transcriptomes of the two subgroups at 14 days p.i. Although it was impossible to differentiate between these two subsets based solely on their levels of CD14 and CD16 expression by flow cytometry, it was evident they represented two distinct populations once they were categorized by their levels of surface CCR2. Compared to bona fide classical monocytes, the CCR2⁻ subset presented significantly lower mRNA levels for most inflammatory genes (IL6, IFN γ , TNF α , IL12b, IL1b, IL7), and several chemokines (CCL3, CXCL3, CXCL10, CXCL9, XCL1). Based on the levels of cytokines, however, it was unclear whether they constitute an anti-inflammatory population, since they expressed lower levels of the anti-inflammatory cytokine IL10, and higher levels of CCL20 and CCL13, which are involved in the recruitment of leukocytes, including other monocytes, T lymphocytes, and dendritic cells (Garcia-Zepeda et al., 1996; Hieshima et al., 1997). They also expressed IL11, a lesser-characterized cytokine involved in the stimulation of megakaryocyte maturation and detectable during viral-induced inflammation (Paul et al., 1990; Putoczki and Ernst).

Interestingly, the CCR2⁻ subset expressed higher levels of STAT3, a transcription factor whose phosphorylation has been related to cell maturation and anti-inflammatory responses in macrophages (Heinrich et al., 1998). The latter, together with the observation that these cells also expressed higher levels of IL22R α 2 (a receptor that heterodimerizes with IL10R), prompted us to analyze their ability to perform efficient phagocytosis. It has been reported that monocyte-derived macrophages from HIV-1-infected patients exhibited defective induction of anti-parasite activity, and that monocytes from similar patients were able to block autophagy in bystander cells through an IL10/STAT3 signaling (Van Grol et al.). Classical monocytes express high levels of CD14, TLR4 and TLR2, and are therefore very efficient at responding to bacterial

infection (Cros et al.). We observed that, although in lower levels than classical monocytes, these CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ cells also expressed LPS sensing receptors, which should render them responsive to bacterial elements. However, our results demonstrated that ACC monocytes specifically presented impaired phagocytosis, and that all monocytes at 7 and 14 days p.i. responded weakly to *E. coli* products. They were also defective in chemotaxis, confirming the above observations that infection by SIV/HIV can interfere with monocyte functionality, and thwart their ability to react to, capture, and destroy harmful microbes. Monocytes presenting a similar immunosuppressive CD14⁺HLA-DR^{low/neg} phenotype have been previously reported to suppress recall responses and lymphocyte proliferation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and prostate cancer (Lin et al.; Vuk-Pavlovic et al.). Accordingly, down-regulation of this MHC-II molecule in monocytes during sepsis, systemic inflammation, and liver failure has been associated with disease severity (Antoniades et al., 2006; Fumeaux and Pugin, 2006; Haveman et al., 2006). ACC monocytes also express low levels of HLA-DR and are able to interfere with the proliferation of CD8⁺ T cells *in vitro*, reinforcing the concept that they might represent a suppressive population expanding during a period of damaging hyper-activation and ongoing viral replication. The fact that we were able to detect this unusual subpopulation in HIV infected patients, in conjunction with observing a return to uninfected levels upon HAART therapy, indicates that these cells arise in both lentivirus infections, and that suppression of viral replication can return their levels to normal.

The role of monocytes in HIV infection remains controversial. Both monocytes and macrophages present innumerable restriction factors that can hinder viral replication, including down-regulation of surface receptors, and expression of intrinsic immune proteins and microRNAs (Bergamaschi and Pancino). Less than 0.1% of monocytes from patients contain HIV DNA (Lewin et al., 1998), which is in accordance with the results presented in this study. On the other hand, replication competent virus can be recovered from blood monocytes, even from patients undergoing HAART (Mikovits et al., 1992), which makes these cells pivotal components for the development of eradication therapies. A specific monocyte subset, CD14⁺CD16⁺⁺, has been reported to expand during AIDS in humans and macaques (Bissel et al., 2006; Kim et al.; Pulliam

et al., 1997; Strauss-Ayali et al., 2007). This intermediate subpopulation, phenotypically located between classical and nonclassical subsets, expresses higher levels of CCR5 and CD4, and may be preferentially more susceptible to HIV and SIV infection than the other subgroups. We observed no significant difference in the levels of SIV DNA between CD14^{dim}CD16⁺⁺ and CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ monocytes, although there was a dramatic difference between both subsets and ACC monocytes. Since most studies consider CD14⁺CD16⁻ as one monolithic population, it is possible that the large number of the CCR2⁻ cells during infection is masking the actual prevalence of SIV DNA in authentic classical monocytes.

The reasons for the surge of this CCR2⁻ novel population and what roles it may play during SIV/HIV infection are unclear. Although there are no reports that SIVmac or HIV utilizes CCR2 as a co-receptor for cell entry, this surface marker may have a more important role in AIDS pathogenesis than previously thought. CCR2 is 71% homologous to CCR5 in humans and macaques, and it can function as an efficient co-receptor for at least one strain of SIV that infects red-capped mangabeys (*Cercocebus torquatus torquatus*) (Bissel et al., 2006; Gautam et al., 2009; Samson et al., 1997). Also, CCR2 supports syncytia formation mediated by a dual-tropic HIV-1 isolate (Doranz et al., 1996), which can partly explain why HIV-infected patients carrying a mutation within the CCR2 transmembrane domain (CCR2-64I) progresses to AIDS 2-4 years later than individuals homozygous for the common allele (Smith et al., 1997). Some strains of HIV can even up-regulate CCR2 expression, increasing viral spread to organs by potentiating monocyte trafficking to tissues in response to CCL2 signaling (Eugenin et al., 2006; Penton-Rol et al., 1998; Schwartzkopff et al.; Sica et al., 1997; Weber et al., 1999).

Several stimuli can lead to CCR2 down-regulation in monocytes, including IFN γ , CXCL4, TNF α , and LPS (Penton-Rol et al., 1998; Schwartzkopff et al.; Sica et al., 1997; Weber et al., 1999). We have previously reported a rapid increase in several proinflammatory cytokines in the brain of SIV-infected macaques during acute infection, followed by a coordinated down-regulation by 14 days p.i. (Witwer et al., 2009). Accordingly, levels of cytokines in the blood are also subjected to a similar regulation pattern in HIV patients, where an intense but transient expression of high

levels of inflammatory molecules, called a “cytokine storm”, can be observed in the first 10 days of infection (Stacey et al., 2009). The surge of ACC monocytes in our model appears to substantiate these observations, leading us to postulate that the down-regulation of CCR2 in this novel subset may be part of an anti-inflammatory reaction in response to the vigorous inflammatory process caused during SIV and HIV acute infection. Furthermore, the release of monocytes from the bone marrow is dependent on the CCL2/CCR2 expression, corroborating the hypothesis that CCR2⁻ ACC monocytes might be originated from circulating classical monocytes undergoing phenotypic changes in response to some specific signaling. The intriguing observation that ACC monocytes constitute >50% of all CD14⁺CD16⁻ cells at day 14 p.i., but presented 10-times fewer SIV DNA copies than their CCR2⁺ counterpart suggests that classical monocytes carrying an SIV genome have a lower chance of losing CCR2 expression and differentiating into this novel phenotype than an uninfected one. However, once these changes take place, they become less susceptible to infection, and also unable to traffic into tissues by CCL2 signaling. It is unclear whether this suppressive state observed in all monocytes at day 14 p.i. is caused by the increased abundance of ACC monocytes, or whether this subset is a manifestation of a general attempt to curb the extreme inflammatory cascade triggered by SIV/HIV infection.

Because AIDS is fundamentally an imbalance between immune activation and immune suppression, and because monocytes exhibit plasticity, it is plausible that ACC monocytes do not represent a monolithic subgroup, but a heterogeneous and mutable population that varies throughout the infectious process, or even present different expression profiles depending on the viral strain involved. Nonetheless, their ability to suppress lymphocyte proliferation - even before strong adaptive responses are formed - emphasizes the importance of these cells as suitable targets for pharmaceutical intervention during HIV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brandon B. Bullock for technical assistance as well as the rest of the Retrovirus Laboratory for helpful discussion. We also thank Dr. Siamon Gordon for his valuable suggestions. Special thanks to Jasmeet Sethi and the Microarray Core at the Johns Hopkins School of Medicine for help with Nanostring data acquisition, and Ada Tam for assistance with cytometry sorting. Medical editor Michael E. Linde made substantial contributions to the editing of the manuscript.

REFERENCES

1. Hammer, S.M., et al., *Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel*. JAMA, 2008. **300**(5): p. 555-70.
2. Snyder-Cappione, J.E., et al., *Lower cytokine secretion ex vivo by natural killer T cells in HIV-infected individuals is associated with higher CD161 expression*. AIDS, 2009. **23**(15): p. 1965-70.
3. Brunetta, E., K.L. Hudspeth, and D. Mavilio, *Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes*. J Leukoc Biol. **88**(6): p. 1119-30.
4. Pitrak, D.L., *Apoptosis and Its Role in Neutrophil Dysfunction in AIDS*. Oncologist, 1997. **2**(2): p. 121-124.
5. Wachtman, L.M., et al., *Platelet decline: an early predictive hematologic marker of simian immunodeficiency virus central nervous system disease*. J Neurovirol, 2006. **12**(1): p. 25-33.
6. Ward, J., et al., *HIV-1 Vpr triggers natural killer cell-mediated lysis of infected cells through activation of the ATR-mediated DNA damage response*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000613.
7. Heinzinger, N., et al., *Efficient synthesis of viral nucleic acids following monocyte infection by HIV-1*. Virology, 1995. **206**(1): p. 731-5.
8. Zhu, T., *HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(3): p. 309-11.

9. Crowe, S., T. Zhu, and W.A. Muller, *The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 635-41.
10. Burdo, T.H., et al., *Increased monocyte turnover from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD163 levels in plasma*. PLoS Pathog. **6**(4): p. e1000842.
11. Vanham, G., et al., *Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection*. Clin Exp Immunol, 1996. **103**(1): p. 30-4.
12. Pulliam, L., et al., *Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia*. Lancet, 1997. **349**(9053): p. 692-5.
13. Cros, J., et al., *Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors*. Immunity. **33**(3): p. 375-86.
14. Weber, C., et al., *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 699-704.
15. Strauss-Ayali, D., S.M. Conrad, and D.M. Mosser, *Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 244-52.
16. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
17. Kim, W.K., et al., *Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage*. J Leukoc Biol. **87**(4): p. 557-67.
18. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
19. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
20. Ancuta, P., et al., *Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 403.

21. Cheong, C., et al., *Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas*. Cell. **143**(3): p. 416-29.
22. Yona, S. and S. Jung, *Monocytes: subsets, origins, fates and functions*. Curr Opin Hematol. **17**(1): p. 53-9.
23. Geissmann, F., et al., *Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 398-408.
24. Cochain, C., et al., *Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization*. Cardiovasc Res. **88**(1): p. 186-95.
25. Venneri, M.A., et al., *Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5276-85.
26. Yachie, A., et al., *Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(5): p. 550-6.
27. Mizuno, K., et al., *Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 461-70.
28. Grage-Griebenow, E., et al., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 48-56.
29. Zink, M.C., et al., *High viral load in the cerebrospinal fluid and brain correlates with severity of simian immunodeficiency virus encephalitis*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10480-8.
30. Dinoso, J.B., et al., *A simian immunodeficiency virus-infected macaque model to study viral reservoirs that persist during highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9247-57.
31. Bassichetto, K.C., et al., *Elevated risk for HIV-1 infection in adolescents and young adults in Sao Paulo, Brazil*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1423.

32. Kallas, E.G., et al., *Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil*. Braz J Infect Dis, 2004. **8**(6): p. 399-406.
33. Barber, S.A., et al., *Innate immune responses and control of acute simian immunodeficiency virus replication in the central nervous system*. J Neurovirol, 2004. **10 Suppl 1**: p. 15-20.
34. Geiss, G.K., et al., *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(3): p. 317-25.
35. Clements, J.E., et al., *The central nervous system as a reservoir for simian immunodeficiency virus (SIV): steady-state levels of SIV DNA in brain from acute through asymptomatic infection*. J Infect Dis, 2002. **186**(7): p. 905-13.
36. Witwer, K.W., et al., *Coordinated regulation of SIV replication and immune responses in the CNS*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8129.
37. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood. **116**(16): p. e74-80.
38. Zink, M.C., et al., *Increased macrophage chemoattractant protein-1 in cerebrospinal fluid precedes and predicts simian immunodeficiency virus encephalitis*. J Infect Dis, 2001. **184**(8): p. 1015-21.
39. Kazazi, F., et al., *Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus*. J Gen Virol, 1989. **70 (Pt 10)**: p. 2661-72.
40. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
41. Merino, A., et al., *Senescent CD14+CD16+ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity*. J Immunol. **186**(3): p. 1809-15.
42. Eugenin, E.A., et al., *CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS*. J Neurosci, 2006. **26**(4): p. 1098-106.

43. Sozzani, S., et al., *MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(1): p. 30-3.
44. Lin, Y., et al., *Immunosuppressive CD14+HLA-DR^{low}/ monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood. **117**(3): p. 872-81.
45. Bergamaschi, A. and G. Pancino, *Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages*. Retrovirology. **7**: p. 31.
46. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 421-52.
47. Bissel, S.J., et al., *Longitudinal analysis of activation markers on monocyte subsets during the development of simian immunodeficiency virus encephalitis*. J Neuroimmunol, 2006. **177**(1-2): p. 85-98.
48. Clay, C.C., et al., *Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 12040-8.
49. Otani, I., et al., *Phenotypic changes in peripheral blood monocytes of cynomolgus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(13): p. 1181-6.
50. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5613-26.
51. Hieshima, K., et al., *Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5846-53.
52. Paul, S.R., et al., *Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7512-6.
53. Putoczki, T. and M. Ernst, *More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer*. J Leukoc Biol. **88**(6): p. 1109-17.

54. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 297-314.
55. Van Grol, J., et al., *HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3*. PLoS One. **5(7)**: p. e11733.
56. Vuk-Pavlovic, S., et al., *Immunosuppressive CD14+HLA-DR^{low}/- monocytes in prostate cancer*. Prostate. **70(4)**: p. 443-55.
57. Antoniadis, C.G., et al., *Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure*. Hepatology, 2006. **44(1)**: p. 34-43.
58. Fumeaux, T. and J. Pugin, *Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis?* Intensive Care Med, 2006. **32(8)**: p. 1106-8.
59. Haveman, J.W., et al., *HLA-DR expression on monocytes and systemic inflammation in patients with ruptured abdominal aortic aneurysms*. Crit Care, 2006. **10(4)**: p. R119.
60. Lewin, S.R., et al., *HIV-1 DNA and mRNA concentrations are similar in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in HIV-1-infected individuals*. AIDS, 1998. **12(7)**: p. 719-27.
61. Mikovits, J.A., et al., *Activation of infectious virus from latent human immunodeficiency virus infection of monocytes in vivo*. J Clin Invest, 1992. **90(4)**: p. 1486-91.
62. Samson, M., et al., *The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity*. J Biol Chem, 1997. **272(40)**: p. 24934-41.
63. Gautam, R., et al., *Simian immunodeficiency virus SIV_{rcm}, a unique CCR2-tropic virus, selectively depletes memory CD4⁺ T cells in pigtailed macaques through expanded coreceptor usage in vivo*. J Virol, 2009. **83(16)**: p. 7894-908.
64. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. **85(7)**: p. 1149-58.

65. Smith, M.W., et al., *CCR2 chemokine receptor and AIDS progression*. Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1052-3.
66. Penton-Rol, G., et al., *Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3869-73.
67. Schwartzkopff, F., et al., *CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes*. Innate Immun.
68. Sica, A., et al., *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 969-74.
69. Weber, C., et al., *Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 115-23.
70. Stacey, A.R., et al., *Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3719-33.

AUTHORSHIP

LG, JEC, and EGK conceived and designed the experiments. LG, ENS, JNR, ML, KIC, and SEQ performed the experiments. LG, ENS, KIC, JK, MCZ, JEC, and EGK analyzed the data. LG, JEC, and EGK wrote the paper.

FIGURES AND TABLES

Figure 1. Changes in monocyte subpopulations during SIV acute infection. A) Gating strategy used to discriminate the three monocyte subsets. Inflammatory monocytes are color-coded in red, intermediate monocytes in green, and resident monocytes in blue. B) Absolute number of total circulating monocytes. Solid line represents the median of 18 SIV infected macaques. C) Absolute number of each monocyte subset. Solid lines represent the median of all animals. For B and C, asterisks denote Wilcoxon paired rank test p values between absolute number of cells at different time points: uninfected vs. 7 day p.i. (*), 7 day vs. 14 day p.i. (**), and 14 day with 21 day p.i. (***).

Figure 2. CCR2 is down-regulated in inflammatory monocytes during acute infection. A) Histograms demonstrate the specific down-regulation of CCR2 expression on CD14⁺CD16⁻ monocytes at 7 days p.i. Uninfected samples are represented by gray lines, and 7 days p.i., by colored lines. Each row represents one macaque. B) Expression of CD14 and CCR2 on classical monocytes during acute SIV infection, graphed as contour plots. Blue boxes and numbers represent the percentage of CCR2⁻ cells defined by FMO (fluorescence minus one). C) Absolute number of CCR2⁻ and CCR2⁺ classical monocytes in 18 SIV-infected macaques until 70 days p.i. Solid lines represent median. D) Ratio between CCR2⁺ and CCR2⁻ classical monocytes for each time point. Median differences between uninfected and each time point were analyzed by Wilcoxon paired rank test. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$. E) CCR2 expression on CD14⁺CD16⁻ monocytes at 14 days p.i. in permeabilized samples (black line) compared to surface staining (gray line). Representative of six macaques.

Figure 3. Relative mRNA expression between sorted CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ and CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ monocytes from six SIV-infected macaques at 14 days p.i. Graphics illustrate genes with higher relative expression in CCR2⁺ (A) or CCR2⁻ (B) classical monocytes. Genes with significant differential expression by paired t-test ($p < 0.05$) are ranked by p-value. Asterisks denote significance ($p < 0.05$) following correction for multiple comparisons (Bonferroni's method) C) Genes with no significant differential expression between CCR2⁻ (left) and CCR2⁺ (right) monocytes (paired t-test $p > 0.05$). D) Expression of CCR2, HLA-DR, and Mannose Receptor (MMR) on CD14⁺CD16⁻ monocytes from uninfected and 14-day p.i. macaques.

Figure 4. CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ monocytes present impaired phagocytosis and chemotaxis. A) Percentage of monocytes positive for pHrodo™ fluorescence at different time points. Bars represent medians, and *p*-values were calculated by Mann-Whitney t-test. B) Histograms demonstrate the intensity of pHrodo red fluorescence in total monocytes from uninfected (gray line) and infected macaques (black line) at different time points. Graphics are representative of four experiments for each of the time points. C) Total monocytes from a 14 day p.i. macaque, depicting the expression of CD14 vs. CD16, and pHrodo vs. CCR2. Classical and intermediate monocytes are displayed in red and nonclassical in blue, demonstrating that the vast majority of CCR2⁻ cells expressing the phagocytosis red fluorescent marker are nonclassical monocytes. Similar results were observed at 7 and 21 days p.i. Graphics are representative of four experiments. D) Graphs depict cells collected from the bottom of a transwell system containing control media, or media with CCL2 or CCL7, and stained for FACS analysis. After gating on viable cells (LIVE/DEAD® Near-IR dye) with the approximate size for monocytes (top panels), populations were analyzed for CD14 and CCR2 expression (bottom wells). Bottom wells from uninfected samples presented CD14⁺CCR2^{low} monocytes (blue arrows) for both experimental conditions, whereas few cells from 14 day p.i. transmigrated. Figure is representative of 4 experiments.

Figure 5. CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ monocytes impair the proliferation of CD8⁺ T cells and harbor fewer copies of SIV genomic DNA. A) Histograms showing the percentage of proliferated lymphocytes exposed to monocytes from uninfected or 14 day p.i. macaques for 72 hours under proliferative conditions. Representative of 6 experiments. B) Lymphocytes CD8⁺, but not CD4⁺, cocultivated with ACC monocytes (R2⁻) presented significantly fewer cells with low expression of the tracer dye than when cocultivated with classical monocytes from uninfected macaques (R2⁺). Bars represent medians, and *p*-values were calculated by Mann-Whitney t-test. C) DNA was isolated from sorted monocytes, and SIV *gag* was quantitated by QPCR and normalized by 10,000 cells (see material and methods). Acronyms stand for: ACC- Atypical CCR2⁻ classical monocytes; CM- Classical monocytes; IM- Intermediate monocytes; NCM- Nonclassical monocytes; PBMC- Peripheral blood mononuclear cells. Bars represent medians and *p*-values were calculated by Wilcoxon paired rank test. Each point represents an average of two isolations from each animal.

A

B

C

Figure 6. Antiretroviral therapy controls the expansion of CCR2⁻ classical monocytes in SIV infected macaques. A) Absolute number of CCR2⁻ and CCR2⁺ classical monocytes in 18 untreated (red) and 6 HAART-treated (blue) SIV infected macaques. Solid lines represent median. Asterisks denote significant difference (Wilcoxon paired rank test $p < 0.05$) between treated and untreated animals at 14 and 28 days p.i. (B) Ratio between CCR2⁺ and CCR2⁻ classical monocytes in treated macaques for each time point. C) Viral load (dotted lines) and absolute number of CD14⁺CD16⁻ CCR2⁻ monocytes (solid lines) from three SIV-infected macaques treated with three antiretroviral drugs beginning at 42 days p.i., demonstrating that the failure in controlling viral replication is concomitant to the expansion of this novel subset. Arrows mark the beginning of treatment at 12 days p.i. (A and B) or 42 days p.i. (C).

Figure 7. ACC monocytes are observed in humans and expand after HIV infection.

A) Comparison between the percentage of CCR2⁺ cells among classical monocytes in uninfected and HIV-infected patients, where Baseline designates the time when a first HIV⁺ diagnostic was made, and the other two groups represent the period elapsed after baseline. Bars represent medians, and *p*-values were calculated by Mann-Whitney t-test.

B) Frequency of ACC monocytes declines after HAART treatment. Graphic depicts the percentage of CCR2⁺ cells among classical monocytes in six patients 1-2 months before and 1-2 months after starting treatment, and *p*-value was calculated by Wilcoxon paired rank test.

Supplemental Figures

Table 1. List of antibodies used for FACS cytometry and sorting

Antibody	Dye	Clone	Company
CD14	FITC	M5E2	BD
CD14	Qdot 655	TUK4	Invitrogen
CD14	PerCP Cy5.5	M5E2	BD
CCR2	PE	48607	R&D
CCR2	APC	48607	R&D
CD16	PE.Cy5	3G8	BD
CD16	PE	3G8	BD
CD16	Alexa Fluor 700	3G8	BD
CD3	V500	SP34-2	BD
CD3	Pacific Blue	SP34-2	BD
CD3	FITC	SP34-2	BD
CD4	FITC	M-T477	BD
CD8	Pacific Blue	RPA-T8	BD
CD8	Qdot 565	3B5	Invitrogen
CD20	eFluor® 450	2H7	eBiosciences
CD20	FITC	2H7	BD
HLADR	Qdot 605	TÜ36	Invitrogen
MMR	APC Cy 7	15-2	Biolegend
LIVE/DEAD *	Aqua (AmCyan)		Invitrogen
LIVE/DEAD *	Near IR (APC Cy7)		Invitrogen

* Fixable Dead Cell Stain

Figure S1. CD14 and CCR2 expression on classical monocytes during acute SIV infection, graphed as contour plots for all 20 infected macaques and two mock-inoculated animals. Blue boxes and numbers represent the percentage of CCR2⁺ cells defined by FMO (fluorescence minus one). Six of the uninfected samples (marked with asterisks) were analyzed using thawed PBMCs instead of fresh blood, which might explain the different expression pattern.

Figure S2. Bivariate analysis of ACC monocytes and biological markers during SIV acute infection. Absolute number of ACC monocytes was analyzed against (A) levels of plasma CCL2, (B) SIV viral load (C) absolute number of CD4⁺ T cells, and (D) absolute number of CD8⁺ T cells. Each point represents one time point (0, 7, 10, 14, 21 days p.i.) for each of the 18 animals. Correlations were calculated using Spearman's rank correlation test.

Figure S3. Gating strategy for sorting of monocyte subsets. Monocytes were initially selected from other leukocytes by side and forward scatter, then by separating $CD14^{high}/CD14^{low}$ from $CD3^{+}$ cells. Classical monocytes were isolated from other subsets according to their levels of CD14 and CD16. Once identified, two subsets were sorted according to their CCR2 expression. Blue box represents $CCR2^{-}$ cells defined by FMO (fluorescence minus one). In order to obtain purer populations (elliptical purple gates), cells located too close to the negative threshold were avoided.

Figure S4. Absolute number of mRNA for each Toll-like receptor (A) and for CCR2 (B) analyzed by Nanostring and normalized by the geometric mean of four housekeeping genes (GHG). A) For TLRs, difference between CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ (red) and CD14⁺CD16⁻CCR2⁻ (blue) was analyzed by paired t-test, and corrected by Bonferroni's adjustment. Asterisk indicates high significance ($p < 0.05$ with Bonferroni's correction), while double asterisk represents $p < 0.05$ measured only by paired t-test. B) Paired comparison of CCR2 mRNA expression between classical (R2⁺) and ACC (R2⁻) monocytes for all six macaques.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ancuta, P., Liu, K.Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., and Gabuzda, D. (2009). Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* 10, 403.
- Anthony, I.C., Ramage, S.N., Carnie, F.W., Simmonds, P., and Bell, J.E. (2005). Influence of HAART on HIV-related CNS disease and neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 529-536.
- Antoniades, C.G., Berry, P.A., Davies, E.T., Hussain, M., Bernal, W., Vergani, D., and Wendon, J. (2006). Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology* 44, 34-43.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M.C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 26, 3025-3037.
- Babas, T., Munoz, D., Mankowski, J.L., Tarwater, P.M., Clements, J.E., and Zink, M.C. (2003). Role of microglial cells in selective replication of simian immunodeficiency virus genotypes in the brain. *J Virol* 77, 208-216.
- Babas, T., Vieler, E., Hauer, D.A., Adams, R.J., Tarwater, P.M., Fox, K., Clements, J.E., and Zink, M.C. (2001). Pathogenesis of SIV pneumonia: selective replication of viral genotypes in the lung. *Virology* 287, 371-381.
- Barber, S.A., Gama, L., Li, M., Voelker, T., Anderson, J.E., Zink, M.C., Tarwater, P.M., Carruth, L.M., and Clements, J.E. (2006). Longitudinal analysis of simian immunodeficiency virus (SIV) replication in the lungs: compartmentalized regulation of SIV. *J Infect Dis* 194, 931-938.
- Barber, S.A., Herbst, D.S., Bullock, B.T., Gama, L., and Clements, J.E. (2004). Innate immune responses and control of acute simian immunodeficiency virus replication in the central nervous system. *J Neurovirol* 10 Suppl 1, 15-20.

- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Baskin, G.B., Martin, L.N., Rangan, S.R., Gormus, B.J., Murphey-Corb, M., Wolf, R.H., and Soike, K.F. (1986). Transmissible lymphoma and simian acquired immunodeficiency syndrome in rhesus monkeys. *J Natl Cancer Inst* 77, 127-139.
- Bassichetto, K.C., Bergamaschi, D.P., Oliveira, S.M., Deienno, M.C., Bortolato, R., de Rezende, H.V., Arthur, T., Tomiyama, H., Watkins, C., Mesquita, F., *et al.* (2008). Elevated risk for HIV-1 infection in adolescents and young adults in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 3, e1423.
- Benveniste, R.E., Morton, W.R., Clark, E.A., Tsai, C.C., Ochs, H.D., Ward, J.M., Kuller, L., Knott, W.B., Hill, R.W., Gale, M.J., *et al.* (1988). Inoculation of baboons and macaques with simian immunodeficiency virus/Mne, a primate lentivirus closely related to human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 62, 2091-2101.
- Bergamaschi, A., and Pancino, G. Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Retrovirology* 7, 31.
- Bissel, S.J., Wang, G., Trichel, A.M., Murphey-Corb, M., and Wiley, C.A. (2006). Longitudinal analysis of activation markers on monocyte subsets during the development of simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Neuroimmunol* 177, 85-98.
- Bour, S., and Strebel, K. (2003). The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* 5, 1029-1039.
- Brunetta, E., Hudspeth, K.L., and Mavilio, D. Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J Leukoc Biol* 88, 1119-1130.
- Burdo, T.H., Soulas, C., Orzechowski, K., Button, J., Krishnan, A., Sugimoto, C., Alvarez, X., Kuroda, M.J., and Williams, K.C. Increased monocyte turnover

- from bone marrow correlates with severity of SIV encephalitis and CD163 levels in plasma. *PLoS Pathog* 6, e1000842.
- Carter, D.L., Shieh, T.M., Blosser, R.L., Chadwick, K.R., Margolick, J.B., Hildreth, J.E., Clements, J.E., and Zink, M.C. (1999). CD56 identifies monocytes and not natural killer cells in rhesus macaques. *Cytometry* 37, 41-50.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Chase, A.J., Sedaghat, A.R., German, J.R., Gama, L., Zink, M.C., Clements, J.E., and Siliciano, R.F. (2007). Severe depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 81, 12748-12757.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416-429.
- Clapham, P.R., and McKnight, A. (2001). HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* 58, 43-59.
- Clapham, P.R., and McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* 83, 1809-1829.
- Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L., and Alizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324, 691-695.
- Clay, C.C., Rodrigues, D.S., Ho, Y.S., Fallert, B.A., Janatpour, K., Reinhart, T.A., and Esser, U. (2007). Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 81, 12040-12048.
- Clements, J.E., Babas, T., Mankowski, J.L., Suryanarayana, K., Piatak, M., Jr., Tarwater, P.M., Lifson, J.D., and Zink, M.C. (2002). The central nervous system as a reservoir for simian immunodeficiency virus (SIV): steady-state levels of SIV DNA in brain from acute through asymptomatic infection. *J Infect Dis* 186, 905-913.

- Clements, J.E., Li, M., Gama, L., Bullock, B., Carruth, L.M., Mankowski, J.L., and Zink, M.C. (2005). The central nervous system is a viral reservoir in simian immunodeficiency virus--infected macaques on combined antiretroviral therapy: a model for human immunodeficiency virus patients on highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 11, 180-189.
- Clements, J.E., Mankowski, J.L., Gama, L., and Zink, M.C. (2008). The accelerated simian immunodeficiency virus macaque model of human immunodeficiency virus-associated neurological disease: from mechanism to treatment. *J Neurovirol* 14, 309-317.
- Cochain, C., Rodero, M.P., Vilar, J., Recalde, A., Richart, A.L., Loinard, C., Zouggar, Y., Guerin, C., Duriez, M., Combadiere, B., *et al.* Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res* 88, 186-195.
- Coffin, J.M. (1996). *Retroviridae: The viruses and their replication*, 3 ed. (Philadelphia, Lippincott-Raven).
- Connor, R.I., and Ho, D.D. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 68, 4400-4408.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., *et al.* Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386.
- Crowe, S., Zhu, T., and Muller, W.A. (2003). The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol* 74, 635-641.
- Dagleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.
- De Cock, K.M. (2001). Epidemiology and the emergence of human immunodeficiency virus and acquired immune deficiency syndrome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 795-798.

- Dinoso, J.B., Rabi, S.A., Blankson, J.N., Gama, L., Mankowski, J.L., Siliciano, R.F., Zink, M.C., and Clements, J.E. (2009). A simian immunodeficiency virus-infected macaque model to study viral reservoirs that persist during highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 83, 9247-9257.
- Doan, C.A. (1926). The Type of Phagocytic Cell and Its Relative Proportions in Human Bone Marrow and Spleen, as Identified by the Supravital Technique, with Special Reference to Pernicious Anemia. *J Exp Med* 43, 289-296.
- Doan, C.A., and Sabin, F.R. (1926). Normal and Pathological Fragmentation of Red Blood Cells; the Phagocytosis of These Fragments by Desquamated Endothelial Cells of the Blood Stream; the Correlation of the Peroxidase Reaction with Phagocytosis in Mononuclear Cells. *J Exp Med* 43, 839-850.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., and Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149-1158.
- Elsheikh, E., Uzunel, M., He, Z., Holgersson, J., Nowak, G., and Sumitran-Holgersson, S. (2005). Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood* 106, 2347-2355.
- Eugenin, E.A., Osiecki, K., Lopez, L., Goldstein, H., Calderon, T.M., and Berman, J.W. (2006). CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci* 26, 1098-1106.
- Feinberg, M.B., Baltimore, D., and Frankel, A.D. (1991). The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4045-4049.
- Foster, J.L., and Garcia, J.V. (2008). HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5, 84.
- Fumeaux, T., and Pugin, J. (2006). Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med* 32, 1106-1108.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., *et al.*

- (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
- Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., and Sundquist, W.I. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18, 203-217.
- Garcia-Zepeda, E.A., Combadiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P.M., and Luster, A.D. (1996). Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 157, 5613-5626.
- Gardner, M.B., and Luciw, P.A. (1988). Simian immunodeficiency viruses and their relationship to the human immunodeficiency viruses. *AIDS 2 Suppl 1*, S3-10.
- Gautam, R., Gaufin, T., Butler, I., Gautam, A., Barnes, M., Mandell, D., Pattison, M., Tatum, C., Macfarland, J., Monjure, C., *et al.* (2009). Simian immunodeficiency virus SIVrcm, a unique CCR2-tropic virus, selectively depletes memory CD4+ T cells in pigtailed macaques through expanded coreceptor usage in vivo. *J Virol* 83, 7894-7908.
- Geeraert, L., Kraus, G., and Pomerantz, R.J. (2008). Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 59, 487-501.
- Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D.L., Fell, H.P., Ferree, S., George, R.D., Grogan, T., *et al.* (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 26, 317-325.
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E., and Lauvau, G. (2008). Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86, 398-408.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305, 1425-1431.
- Grage-Griebenow, E., Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., and Ernst, M. (2001). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* 31, 48-56.
- Graham, D.R., Gama, L., Queen, S.E., Li, M., Brice, A.K., Kelly, K.M., Mankowski, J.L., Clements, J.E., and Zink, M.C. Initiation of HAART during acute simian immunodeficiency virus infection rapidly controls virus replication in the CNS by enhancing immune activity and preserving protective immune responses. *J Neurovirol* 17, 120-130.
- Greene, W.C. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 324, 308-317.
- Hammer, S.M., Eron, J.J., Jr., Reiss, P., Schooley, R.T., Thompson, M.A., Walmsley, S., Cahn, P., Fischl, M.A., Gatell, J.M., Hirsch, M.S., *et al.* (2008). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 300, 555-570.
- Hauber, J., Malim, M.H., and Cullen, B.R. (1989). Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63, 1181-1187.
- Haveman, J.W., van den Berg, A.P., Verhoeven, E.L., Nijsten, M.W., van den Dungen, J.J., The, H.T., and Zwaveling, J.H. (2006). HLA-DR expression on monocytes and systemic inflammation in patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. *Crit Care* 10, R119.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314.
- Heinzinger, N., Baca-Regen, L., Stevenson, M., and Gendelman, H.E. (1995). Efficient synthesis of viral nucleic acids following monocyte infection by HIV-1. *Virology* 206, 731-735.

- Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., *et al.* (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272, 5846-5853.
- Hymes, K.B., Cheung, T., Greene, J.B., Prose, N.S., Marcus, A., Ballard, H., William, D.C., and Laubenstein, L.J. (1981). Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet* 2, 598-600.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.
- Kallas, E.G., Bassichetto, K.C., Oliveira, S.M., Goldenberg, I., Bortoloto, R., Moreno, D.M., Kanashiro, C., Chaves, M.M., Sucupira, M.C., Diniz, A., *et al.* (2004). Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 8, 399-406.
- Kazazi, F., Mathijs, J.M., Foley, P., and Cunningham, A.L. (1989). Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 70 (Pt 10), 2661-2672.
- Keele, B.F., Jones, J.H., Terio, K.A., Estes, J.D., Rudicell, R.S., Wilson, M.L., Li, Y., Learn, G.H., Beasley, T.M., Schumacher-Stankey, J., *et al.* (2009). Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* 460, 515-519.
- Kim, W.K., Sun, Y., Do, H., Autissier, P., Halpern, E.F., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Burdo, T.H., McGrath, M.S., and Williams, K. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol* 87, 557-567.

- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* *312*, 767-768.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 4686-4690.
- Lewin, S.R., Kirihara, J., Sonza, S., Irving, L., Mills, J., and Crowe, S.M. (1998). HIV-1 DNA and mRNA concentrations are similar in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in HIV-1-infected individuals. *AIDS* *12*, 719-727.
- Lin, Y., Gustafson, M.P., Bulur, P.A., Gastineau, D.A., Witzig, T.E., and Dietz, A.B. Immunosuppressive CD14+HLA-DR^{low}/ - monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* *117*, 872-881.
- Little, S.J., McLean, A.R., Spina, C.A., Richman, D.D., and Havlir, D.V. (1999). Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* *190*, 841-850.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* *10*, 11-23.
- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Manuelli, V., Jean-Pierre, P., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., Boden, D., *et al.* (2007). Mechanisms of gastrointestinal CD4⁺ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* *81*, 599-612.
- Merino, A., Buendia, P., Martin-Malo, A., Aljama, P., Ramirez, R., and Carracedo, J. Senescent CD14⁺CD16⁺ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity. *J Immunol* *186*, 1809-1815.
- Mikovits, J.A., Lohrey, N.C., Schulof, R., Courtless, J., and Ruscetti, F.W. (1992). Activation of infectious virus from latent human immunodeficiency virus infection of monocytes in vivo. *J Clin Invest* *90*, 1486-1491.
- Mizuno, K., Toma, T., Tsukiji, H., Okamoto, H., Yamazaki, H., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S., and Yachie, A. (2005). Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem

- oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* 142, 461-470.
- Moir, S., Malaspina, A., Pickeral, O.K., Donoghue, E.T., Vasquez, J., Miller, N.J., Krishnan, S.R., Planta, M.A., Turney, J.F., Justement, J.S., *et al.* (2004). Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* 200, 587-599.
- Murphey-Corb, M., Martin, L.N., Rangan, S.R., Baskin, G.B., Gormus, B.J., Wolf, R.H., Andes, W.A., West, M., and Montelaro, R.C. (1986). Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* 321, 435-437.
- Muthumani, K., Choo, A.Y., Zong, W.X., Madesh, M., Hwang, D.S., Premkumar, A., Thieu, K.P., Emmanuel, J., Kumar, S., Thompson, C.B., *et al.* (2006). The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol* 8, 170-179.
- Nowak, M.A., Anderson, R.M., Boerlijst, M.C., Bonhoeffer, S., May, R.M., and McMichael, A.J. (1996). HIV-1 evolution and disease progression. *Science* 274, 1008-1011.
- Otani, I., Akari, H., Nam, K.H., Mori, K., Suzuki, E., Shibata, H., Doi, K., Terao, K., and Yosikawa, Y. (1998). Phenotypic changes in peripheral blood monocytes of cynomolgus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 1181-1186.
- Paul, S.R., Bennett, F., Calvetti, J.A., Kelleher, K., Wood, C.R., O'Hara, R.M., Jr., Leary, A.C., Sibley, B., Clark, S.C., Williams, D.A., *et al.* (1990). Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7512-7516.
- Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1998). Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J Immunol* 160, 3869-3873.

- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J., and Deacon, N.J. (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 28, 663-668.
- Pitrak, D.L. (1997). Apoptosis and Its Role in Neutrophil Dysfunction in AIDS. *Oncologist* 2, 121-124.
- Power, C., and Johnson, R.T. (1995). HIV-1 associated dementia: clinical features and pathogenesis. *Can J Neurol Sci* 22, 92-100.
- Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D., and McGrath, M.S. (1997). Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet* 349, 692-695.
- Putoczki, T., and Ernst, M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol* 88, 1109-1117.
- Rees, A.J. Monocyte and macrophage biology: an overview. *Semin Nephrol* 30, 216-233.
- Sabin, F.R. (1921). Studies of Blood: The vitality stainable granules as a specific criterion for erythroblasts and the differentiation of the three strains of the white blood-cells as seen in the living chick's yolk-sac. *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 368, 314-316.
- Sabin, F.R. (1923). Studies of Living Human Blood-Cells. *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 391, 277-280.
- Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Painsdavoine, P., Detheux, M., Vassart, G., and Parmentier, M. (1997). The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* 272, 24934-24941.
- Schwartzkopff, F., Petersen, F., Grimm, T.A., and Brandt, E. CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate Immun.*
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.
- Shacklett, B.L., Cox, C.A., Quigley, M.F., Kreis, C., Stollman, N.H., Jacobson, M.A., Andersson, J., Sandberg, J.K., and Nixon, D.F. (2004). Abundant expression of

- granzyme A, but not perforin, in granules of CD8⁺ T cells in GALT: implications for immune control of HIV-1 infection. *J Immunol* 173, 641-648.
- Sharp, P.M., Shaw, G.M., and Hahn, B.H. (2005). Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* 79, 3891-3902.
- Sica, A., Saccani, A., Borsatti, A., Power, C.A., Wells, T.N., Luini, W., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1997). Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 185, 969-974.
- Smith, M.W., Carrington, M., Winkler, C., Lomb, D., Dean, M., Huttley, G., and O'Brien, S.J. (1997). CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 3, 1052-1053.
- Snyder-Cappione, J.E., Loo, C.P., Carvalho, K.I., Kuylenstierna, C., Deeks, S.G., Hecht, F.M., Rosenberg, M.G., Sandberg, J.K., Kallas, E.G., and Nixon, D.F. (2009). Lower cytokine secretion ex vivo by natural killer T cells in HIV-infected individuals is associated with higher CD161 expression. *AIDS* 23, 1965-1970.
- Sozzani, S., Introna, M., Bernasconi, S., Polentarutti, N., Cinque, P., Poli, G., Sica, A., and Mantovani, A. (1997). MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *J Leukoc Biol* 62, 30-33.
- Srivastava, S., Swanson, S.K., Manel, N., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2008). Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection. *PLoS Pathog* 4, e1000059.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., *et al.* (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 83, 3719-3733.
- Stevenson, M., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P., and Lamonica, C.A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 9, 1551-1560.

- Strauss-Ayali, D., Conrad, S.M., and Mosser, D.M. (2007). Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 82, 244-252.
- Strebel, K. (2003). Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS 17 Suppl 4*, S25-34.
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.
- UNAIDS (2009). [http://http://www.unaids.org/](http://www.unaids.org/).
- Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., and Littman, D.R. (1998). G protein-coupled receptors in HIV and SIV entry: new perspectives on lentivirus-host interactions and on the utility of animal models. *Semin Immunol* 10, 225-236.
- van de Veerdonk, F.L., and Netea, M.G. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity* 33, 289-291.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, 415-435.
- Van Grol, J., Subauste, C., Andrade, R.M., Fujinaga, K., Nelson, J., and Subauste, C.S. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One* 5, e11733.
- Vanham, G., Edmonds, K., Qing, L., Hom, D., Toossi, Z., Jones, B., Daley, C.L., Huebner, B., Kestens, L., Gigase, P., *et al.* (1996). Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 103, 30-34.
- Various (2008). HIV Sequence Compendium 2008 (Los Alamos, NM, Theoretical Biology and Biophysics).
- Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276-5285.
- Vuk-Pavlovic, S., Bulur, P.A., Lin, Y., Qin, R., Szumlanski, C.L., Zhao, X., and Dietz, A.B. Immunosuppressive CD14+HLA-DRIow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate* 70, 443-455.

- Wachtman, L.M., Tarwater, P.M., Queen, S.E., Adams, R.J., and Mankowski, J.L. (2006). Platelet decline: an early predictive hematologic marker of simian immunodeficiency virus central nervous system disease. *J Neurovirol* 12, 25-33.
- Ward, J., Davis, Z., DeHart, J., Zimmerman, E., Bosque, A., Brunetta, E., Mavilio, D., Planelles, V., and Barker, E. (2009). HIV-1 Vpr triggers natural killer cell-mediated lysis of infected cells through activation of the ATR-mediated DNA damage response. *PLoS Pathog* 5, e1000613.
- Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 67, 699-704.
- Weber, C., Draude, G., Weber, K.S., Wubert, J., Lorenz, R.L., and Weber, P.C. (1999). Downregulation by tumor necrosis factor- α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 145, 115-123.
- Witwer, K.W., Gama, L., Li, M., Bartizal, C.M., Queen, S.E., Varrone, J.J., Brice, A.K., Graham, D.R., Tarwater, P.M., Mankowski, J.L., *et al.* (2009). Coordinated regulation of SIV replication and immune responses in the CNS. *PLoS One* 4, e8129.
- Yachie, A., Toma, T., Mizuno, K., Okamoto, H., Shimura, S., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S. (2003). Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp Biol Med* (Maywood) 228, 550-556.
- Yona, S., and Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17, 53-59.
- Zack, J.A., Haislip, A.M., Krogstad, P., and Chen, I.S. (1992). Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent

- cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* 66, 1717-1725.
- Zazzi, M., Romano, L., Catucci, M., Venturi, G., De Milito, A., Almi, P., Gonnelli, A., Rubino, M., Occhini, U., and Valensin, P.E. (1997). Evaluation of the presence of 2-LTR HIV-1 unintegrated DNA as a simple molecular predictor of disease progression. *J Med Virol* 52, 20-25.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173-185.
- Zhu, T. (2002). HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source. *J Antimicrob Chemother* 50, 309-311.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.
- Zink, M.C., and Clements, J.E. (2002). A novel simian immunodeficiency virus model that provides insight into mechanisms of human immunodeficiency virus central nervous system disease. *J Neurovirol* 8 Suppl 2, 42-48.
- Zink, M.C., Coleman, G.D., Mankowski, J.L., Adams, R.J., Tarwater, P.M., Fox, K., and Clements, J.E. (2001). Increased macrophage chemoattractant protein-1 in cerebrospinal fluid precedes and predicts simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Infect Dis* 184, 1015-1021.
- Zink, M.C., Laast, V.A., Helke, K.L., Brice, A.K., Barber, S.A., Clements, J.E., and Mankowski, J.L. (2006). From mice to macaques--animal models of HIV nervous system disease. *Curr HIV Res* 4, 293-305.
- Zink, M.C., Suryanarayana, K., Mankowski, J.L., Shen, A., Piatak, M., Jr., Spelman, J.P., Carter, D.L., Adams, R.J., Lifson, J.D., and Clements, J.E. (1999). High viral load in the cerebrospinal fluid and brain correlates with severity of simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Virol* 73, 10480-10488.