

ANNA JULIA PIETROBON

**Imunomodulação da resposta antiviral de macrófagos
de recém-natos por adjuvantes de interferon tipo I**

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

São Paulo

2018

ANNA JULIA PIETROBON

**Imunomodulação da resposta antiviral de macrófagos
de recém-natos por adjuvantes de interferon tipo I**

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

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof^aDr^a Maria Notomi Sato

Versão original.

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pietrobon, Anna Julia

Imunomodulação da resposta antiviral de macrófagos
de recém-natos por adjuvantes de interferon tipo I
/ Anna Julia Pietrobon; orientadora Maria Notomi
Sato. -- São Paulo, 2018.

98 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Recém-natos. 2. Macrófagos. 3. Adjuvantes de
IFN-I. 4. HIV. I. Sato, Maria Notomi, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Anna Julia Pietrobon

Título da Dissertação/Tese: Imunomodulação da resposta antiviral de macrófagos de recém-natos por adjuvantes de interferon tipo I

Orientador: Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**() **Reprovado(a)**

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

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

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

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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 09 de junho de 2016.

PARECER 1299/CEPSH

CAAE nº 54988216.5.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Imunomodulação de sensores citosólicos de DNA por adjuvantes de interferon tipo I em macrófagos de recém-natos infectados in vitro por HSV-1 e HIV-1**" da pesquisadora Profa. Dra. **Maria Notomi Sato** e da aluna **Anna Júlia Pietrobon**.

Cabe às pesquisadoras elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **09/06/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico esta dissertação à minha família,
meu bem mais precioso!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e guiar meus passos até aqui.

À Maria, agradeço de todo coração por me receber em seu grupo de pesquisa, pela importante contribuição em minha formação científica, pela paciência e confiança nesses anos. Obrigada por me fazer crescer tanto profissional quanto pessoalmente.

À minha família por sempre me incentivar a ir em busca dos meus sonhos. Obrigada por todo o apoio e amor incondicional, por entenderem a minha ausência e, acima de tudo, por fazerem parte de cada momento da minha vida.

Ao Emilio que mais do que nunca foi meu companheiro, meu porto seguro e minha família em São Paulo. Obrigada pelo amor, apoio e compreensão.

A todos os meus colegas da Experimental: Nilson, Luanda, Fabinho, Nat, Luana, Kelly, Marina, Fran, Anna C, Iara, Alexia, Augusto, Dani e Gabriel. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido, por todos os ensinamentos, pela motivação nos momentos de frustração e pela parceria dentro e fora do Lab. Vocês muitas vezes foram a minha família em São Paulo e esse trabalho só foi possível com a ajuda de vocês.

Aos meus amigos de São Paulo, em especial à Paola e a Elaine (Relayne), por estarem sempre dispostas a discutir sobre o meu trabalho. Obrigada por ouvirem meus dilemas pessoais e vibrarem com as minhas conquistas. Vocês são muito especiais.

A todos os familiares e amigos que mesmo de longe sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos meus colegas da comissão organizadora do Curso de Férias em Imunologia pela amizade e os momentos que compartilhamos dentro e fora do curso.

À Prof.^a Bruna Alencar e suas alunas Tais e Letícia pelas discussões e ajuda na produção do vírus. Vocês foram fundamentais.

Aos professores e alunos do departamento de Imunologia do ICB pelas disciplinas e discussões que contribuíram com a minha formação.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Ana Paula Lepique, Dr. Sandro Rogério de Almeida e Dra. Juliana Terzi Maricato pelas críticas e sugestões.

Aos funcionários e professores do LIM56 por garantirem um ótimo ambiente de trabalho.

À Eni, pela ajuda em incontáveis momentos ao longo de todo meu mestrado.

À Manuela por ter aberto as portas da sua casa e permitir que eu fizesse dela a minha casa também.

Ao Prof.º Alberto Duarte pelo apoio institucional.

As equipes do Centro Obstétrico do HU e do setor de aférese da Fundação Pró-sangue do Hemocentro de São Paulo por toda a ajuda. Estendo meus agradecimentos ainda à todo os doadores que concordaram em participar da pesquisa.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação e com a realização desse projeto.

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo: 2016/01269-1

"Nada grandioso no mundo foi realizado sem paixão."

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

RESUMO

PIETROBON, AJ. **Imunomodulação da resposta antiviral de macrófagos de recém-natos por adjuvantes de interferon tipo I**. 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Recém-natos (RNs) são mais susceptíveis a infecções devido à relativa imaturidade das respostas imunes inata e adaptativa. Nesse cenário, a modulação imunológica tem sido investigada como uma estratégia para aumentar a proteção contra infecções. Os macrófagos atuam tanto na imunidade inata quanto adaptativa, sendo potenciais alvos para estimular a resposta imune neonatal. Na infecção pelo HIV, os macrófagos atuam como reservatórios virais contribuindo com a replicação viral por longos períodos de tempo. Agonistas de receptores do tipo *Toll* podem controlar a replicação do HIV-1 em macrófagos de adultos *in vitro*, mas o impacto de tais moléculas em macrófagos de RNs ainda não foi verificado. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador e antiviral de adjuvantes indutores de interferon tipo I em macrófagos de neonatos e adultos. Para isso, macrófagos foram gerados a partir de monócitos isolados de sangue de cordão umbilical e sangue periférico de adultos. Foi observado que os macrófagos de RNs possuem um perfil anti-inflamatório e de produção de IL-10. Os achados mostram ainda que os macrófagos neonatais são semelhantes aos macrófagos de adultos quanto à expressão gênica de componentes da imunidade inata. No entanto, as células neonatais mostram maior replicação viral quando infectadas com HIV-1 *in vitro*. Também verificou-se que o tratamento com os agonistas de TLR7/TLR8 (CL097), STING (cGAMP) e TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) induz a expressão de IFN- β e do fator antiviral MxA em macrófagos de RNs e adultos, mas CL097 é mais eficaz em promover a expressão de sensores citosólicos, em especial RIG-I e cGAS, além de inibir a expressão de TREX-1. Esse agonista também promove a indução de citocinas inflamatórias e β -quimiocinas, bem como, da citocina reguladora IL-10. Os resultados indicam ainda que CL097 inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos de RNs e adultos, e esse efeito não parece ser dependente da ativação de NF- κ B. Portanto, o agonista CL097 mostra um potencial terapêutico relevante como adjuvante da resposta neonatal, sendo capaz de induzir fatores antivirais que inibem a replicação do HIV-1.

Palavras-chave: Recém-natos. Macrófagos. Adjuvantes de IFN-I. HIV.

ABSTRACT

PIETROBON, AJ. **Immunomodulation of the antiviral response of macrophages of newborns by type I interferon adjuvants**. 2018. 98 p. Dissertation (Masters thesis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Newborns (NBs) are more susceptible to infections due to the relative immaturity of innate and adaptive immune responses. In this scenario, immunological modulation has been investigated as a strategy to increase protection against infections. Macrophages play a role on both innate and adaptive immunity, being potential targets for stimulating the neonatal immune response. In HIV infection, macrophages act as viral reservoirs contributing to viral replication for long periods of time. Toll-like receptor agonists can control HIV-1 replication in adult macrophages *in vitro* but the impact of such molecules on macrophages of NBs has not yet been verified. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunomodulatory and antiviral effects of type I interferon adjuvants on macrophages of neonates and adults. For this, macrophages were generated from monocytes isolated from umbilical cord blood and peripheral blood from adults. It was observed that the macrophages of NBs have an anti-inflammatory profile with IL-10 production. The findings also show that neonatal macrophages are similar to adult macrophages regarding the gene expression of innate immunity components. However, neonatal cells show increased viral replication when infected with HIV-1 *in vitro*. It has also been found that the treatment with TLR7/TLR8 (CL097), STING (cGAMP) and TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) agonists induces the expression of IFN- β and the antiviral factor MxA in macrophages of NBs and adults, however CL097 is more effective in promoting the expression of cytosolic sensors, especially RIG-I and cGAS, in addition to inhibit the expression of TREX-1. This agonist also promotes the induction of inflammatory cytokines and β -chemokines, as well as the regulatory cytokine IL-10. The results further indicate that CL097 inhibits HIV-1 replication in macrophages of NBs and adults, and this effect does not seem to be dependent on NF- κ B activation. Therefore, CL097 shows a relevant therapeutic potential as adjuvant of the neonatal response, being able to induce antiviral factors that inhibit HIV-1 replication.

Keywords: Newborns. Macrophages. IFN-I Adjuvants. HIV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo replicativo do HIV-1	23
Figura 2. Receptores de reconhecimento de padrão e suas vias de sinalização	27
Figura 3. Efeito de TREX-1 no reconhecimento e resposta imune ao HIV-1.....	28
Figura 4. Ativação do estado antiviral pela sinalização por IFN-I	32
Figura 5. Expressão de marcadores de subpopulações de macrófagos	46
Figura 6. Perfil de expressão gênica constitutiva de sensores citosólicos em macrófagos de adultos e RNs	48
Figura 7. Perfil de expressão gênica constitutiva de componentes da resposta de IFN-I em macrófagos de adultos e RNs	50
Figura 8. Perfil de expressão gênica constitutiva de componentes da cascata do inflamassoma em macrófagos de adultos e RNs	51
Figura 9. Viabilidade celular dos macrófagos após estímulo com adjuvantes de IFN-I	52
Figura 10. Expressão gênica de sensores citosólicos de DNA e RNA de macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I.....	54
Figura 11. Expressão gênica de componentes da resposta de IFN-I de macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I.....	56
Figura 12. Expressão gênica de componentes da cascata do inflamassoma de macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I	58
Figura 13. Produção de citocinas inflamatórias por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I.....	59
Figura 14. Produção das quimiocinas CCL5 e CCL3 por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I	60
Figura 15. Produção da citocina reguladora IL-10 por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I	61
Figura 16. Cinética de replicação viral do HIV-1 em macrófagos de adultos e RNs.	62
Figura 17. Inibição da replicação viral do HIV-1 em macrófagos de adultos e RNs .	63
Figura 18. Efeito do agonista de TLR7/TLR8 em diferentes estágios do ciclo viral ..	64
Figura 19. Inibição da resposta inflamatória mediada por CL097 em macrófagos de adultos e RNs.....	65
Figura 20. Inibição da produção de quimiocinas mediada por CL097 em macrófagos de adultos e RNs.....	65

Figura 21. Bloqueio das vias de sinalização do NF- κ B e inflamassoma não afeta o potencial antiviral de CL09766

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados demográficos de indivíduos adultos e RNs utilizados no estudo..... 37
- Tabela 2** - Anticorpos utilizados para a análise de moléculas de superfície de macrófagos. 39
- Tabela 3** - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qPCR em macrófagos..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids - Síndrome da imunodeficiência adquirida
AIM-2 - Ausente no melanoma 2
APC - Célula apresentadora de antígeno
APOBEC - Apolipoproteína B editora de RNA
ASC - Proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase
AZT - Zidovudina
CCL - Quimiocina da família CC
CCR - Receptor de quimiocina da família CC
CD - *Cluster of differentiation*
cDNA - DNA complementar
cGAMP - GMP-AMP cíclico
cGAS - Sintase de GMP-AMP cíclico
CMN - Célula mononucleare
CpG - Citosina-fosfato-guanina
CXCR - Receptor de quimiocina da família CXC
DC - Célula dendrítica
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dsDNA - DNA dupla fita
dsRNA - RNA dupla fita
ELISA - Ensaio de imunoadsorção enzimática
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
HSV - Vírus herpes simples
IFI16 - Proteína 16 induzida por interferon gama
IFN - Interferon
IFNRA - Receptor de IFN-I
IKK2 - Proteína quinase de IKB
IL - Interleucina
IRF - Fator regulador de interferon
ISG - Genes estimulados por interferon
ISGF3 - Fator gênico 3 estimulado por interferon
LDH - Lactato desidrogenase
LTR - Regiões de repetição longa
M1 - Macrófago do tipo M1
M2 - Macrófago do tipo M2
MAVS - Proteína mitocondrial de sinalização antiviral
MDA5 - Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma
MDM - Macrófago derivado de monócito
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MOI - Multiplicidade de infecção
Mx - Proteína de resistência ao mixovírus
MyD88 - Fator 88 de diferenciação mielóide
NF-κB - Fator nuclear kappa B
NK - Célula *Natural Killer*
NLR - Receptor tipo NOD
NLRP - Receptor do tipo NOD contendo o domínio pirina

PAMP - Padrão molecular associado à patógenos
PBMC - Célula mononuclear de sangue periférico
PCR - Reação em cadeia da polymerase
pDC - Célula dendrítica plasmocitóide
PRR - Receptores de reconhecimento de padrão
qPCR - PCR em tempo real
RIG-I - Gene I induzido por ácido retinóico
RLR - Receptores tipo RIG
RN - Recém-nato
RNA - Ácido ribonucleico
SAMHD-1 - SAM- e HD-domínio contendo proteína 1
ssDNA - DNA simples fita
ssRNA - RNA simples fita
STAT - Transdutor de sinal e ativador da transcrição
STING - Estimulador de genes de interferon
TARV - Terapia antirretroviral combinada
TBK-1 - Quinase 1 ligadora de TANK
TLR - Receptor do tipo *Toll*
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TREX-1 - Exonuclease 1 de reparo 3-prime
TRIF - Proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN- β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Resposta imune neonatal	19
1.2 Imunopatologia da infecção pelo HIV	22
1.3 Reconhecimento viral	25
1.4 Resposta imune inata contra infecções virais	30
2 OBJETIVO	35
2.1 Objetivos Secundários.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Casuística	37
3.2 Coleta das amostras	38
3.3 Obtenção de macrófagos derivados de monócitos	38
3.4 Imunofenotipagem	38
3.5 Culturas com macrófagos	39
3.6 Expressão gênica dos alvos de interesse por PCR em tempo real	40
3.7 Dosagem de citocinas e quimiocinas	41
3.8 Produção do vírus HIV-1 NL(AD8)	42
3.9 Infecção de macrófagos por HIV-1	43
3.10 Ensaio de viabilidade celular	43
3.11 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Avaliação de marcadores fenotípicos de macrófagos.....	45
4.2 Análise da expressão gênica em macrófagos de adultos e RNs	46
4.3 Efeito imunomodulador de adjuvantes de IFN-I na expressão gênica	52
4.4 Produção de citocinas e quimiocinas induzida por agonistas	59
4.5 Replicação do HIV-1 em macrófagos de adultos e neonatos.....	62
4.6 Inibição da replicação viral por adjuvantes de IFN-I	62
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS*	79

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta imune neonatal

As doenças infecciosas e complicações neonatais, como prematuridade e desnutrição, são responsáveis pela grande maioria das mortes em indivíduos menores de cinco anos em todo o mundo. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde e do Grupo de Estudo de Epidemiologia Materna e Infantil (Unicef, 2015), das 5,9 milhões de mortes em crianças menores de cinco anos ocorridas em 2015, cerca de metade foram causadas por doenças infecciosas como pneumonia, diarreia, malária, meningite, tétano, HIV e sarampo. Estima-se ainda que 45% das mortes em crianças menores de 5 anos ocorrem nos primeiros 28 dias de vida (período neonatal) e estão fortemente associadas a desnutrição, prematuridade, pneumonia, complicações durante o parto, diarreia, sepse e malária.

A maior suscetibilidade a infecções no início da vida está associada a relativa imaturidade das respostas imune inata e especialmente adaptativa (Holt e Jones, 2000). As respostas imunes fetal e do recém-nato (RN) são reconhecidas pelas diferenças qualitativas e quantitativas com adultos em quase todos os aspectos da imunidade. Os monócitos, células dendríticas (DC) e macrófagos de neonatos secretam quantidades menores de TNF- α , IL-12p70 e IFN- α (IFN-I), e expressam menos CD80, CD86 e moléculas de MHC de classe II após ativação via receptores do tipo *Toll* (TLR) (Kollmann *et al.*, 2009; Renneson *et al.*, 2009; Winterberg *et al.*, 2015). Há também uma menor secreção de IL-18 por DCs, que atua em conjunto com IL-12 e IFN-I ativando células *natural killer* (NK) (La Pine *et al.*, 2003). No entanto, a secreção de IL-1 β , IL-6, IL-23 e IL-10 é semelhante ou até maior do que os níveis de adultos (Kollmann *et al.*, 2009), sugerindo que as DC neonatais têm a capacidade de secretar citocinas, mas que sua resposta frente a um estímulo difere dos adultos.

As células de RNs também são caracterizadas por uma menor produção de IFN-I quando comparadas com células de adulto sob estímulo viral ou com agonistas de TLR (Sullender *et al.*, 1987; De Wit *et al.*, 2004; Renneson *et al.*, 2009), possivelmente devido à menor interação do fator de transcrição IRF3 com o co-ativador CREB e o DNA (Aksoy *et al.*, 2007). A menor produção de IFN- α e IFN- β também está associada à reduzida translocação do fator IRF7 para o núcleo em DCs plasmocitoides (pDCs) (Danis *et al.*, 2008). Macrófagos derivados de monócitos

(MDMs) de sangue de cordão umbilical mostram menor produção de IL-6 e TNF- α quando expostos ao vírus sincicial respiratório, sugerindo que macrófagos neonatais podem ser menos eficientes na indução de citocinas inflamatórias (Matsuda *et al.*, 1996). Os MDMs de neonatos também são hiporrespondedores à ativação por IFN- γ , devido à menor fosforilação da quinase associada ao receptor, STAT1 (Maródi *et al.*, 2001). Essas células ainda produzem níveis mais elevados da citocina supressora IL-27 que regulam a expressão de IDO, a qual promove tolerância imunológica através da supressão de respostas de células T (Jung *et al.*, 2016).

Vários fatores contribuem ainda para a imaturidade da resposta adaptativa neonatal, como a ausência de um microambiente anatômico apropriado para a interação de células T e B nos tecidos linfóides, a menor capacidade das células T em regular a expressão de CD40L e ainda, a baixa expressão de receptores de moléculas de adesão como LFA-1, LFA-3 e CD2, e moléculas de MHC (Adkins *et al.*, 2004). As DCs foliculares de neonatos também são mais lentas para formação de centros germinativos nos órgãos linfóides secundários e para promover a ativação e proliferação dos linfócitos B (Pihlgren *et al.*, 2003). Tais características acarretam em uma produção tardia de anticorpos aos antígenos T dependentes, com menor afinidade e de curta duração comparado com adultos (Adkins *et al.*, 2004). A maior suscetibilidade às infecções também pode ser decorrente da deficiente resposta aos antígenos T independentes, como polissacarídeos bacterianos, que ocorre devido à provável redução da expressão de TACI nos linfócitos B de neonatos (Kanswal *et al.*, 2008). Outra peculiaridade dos neonatos é a predisposição em desenvolver respostas predominantemente Th2 a imunizações com vírus vivos ou atenuados (Bot *et al.*, 1997), em função da diminuída secreção de citocinas Th1, como o IFN- γ e IL-12 e configurações epigenéticas que favorecem a produção de IL-4 e IL-13 (Rose *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2007).

Fatores solúveis, como as proteínas do sistema complemento, também estão diminuídos em RNs além de mostrarem reduzida capacidade lítica e opsonizante (Mcgreal *et al.*, 2012). No entanto, as concentrações de adenosina estão elevadas no plasma de neonatos, podendo exercer funções supressoras nas células imunes através da indução de cAMP (Levy *et al.*, 2006), que inibe a transcrição de citocinas do perfil Th1 e induz IL-10 e citocinas Th17 (IL-6 e IL-23) (Haskó *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2006; Kollmann *et al.*, 2012).

Apesar da imaturidade imunológica dos neonatos, as respostas nesses indivíduos podem ser capazes de estabelecer níveis similares a de adultos quando estimulados com adjuvantes da resposta imune (Adkins *et al.*, 2004). Nesse contexto, a modulação imunológica tem sido investigada como estratégia para ampliar a proteção contra infecções e doenças nesse período da vida. Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) são componentes da imunidade inata essenciais para o desenvolvimento de resposta imune contra diversos patógenos e têm sido explorados como alvos imunoterapêuticos no combate a infecções. Dentre as terapias com adjuvantes estudadas, os agonistas de TLRs parecem ser uma abordagem promissora no combate a doenças infecciosas, uma vez que a ativação desses receptores induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN-I, quimiocinas e peptídeos microbianos (Akira *et al.*, 2006; Reppe *et al.*, 2009; Campbell e Spector, 2012). Tais agonistas têm se mostrado eficientes na potencialização da resposta inata, diminuição da bacteremia e aumento da sobrevivência no quadro de sepse neonatal em modelo experimental murino (Wynn *et al.*, 2008). Esses agonistas também contribuem com a ativação de leucócitos de sangue de cordão umbilical humano *in vitro*, promovendo a polarização da resposta para um perfil Th1 que pode fortalecer as defesas neonatais (Krumbiegel *et al.*, 2007).

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostram o papel adjuvante do agonista de TLR7/TLR8 (CL097) na produção de IFN- α em células mononucleares de mães infectadas pelo HIV-1 e RNs expostos ao vírus (Cardoso *et al.*, 2013). Outros estudos também sugerem que agonistas de TLRs podem estimular citotoxicidade das células NK e a produção de IFN-I (Fujieda *et al.*, 2000). O oligodeoxinucleotídeo sintético contendo CpG (CpG-ODN), agonista de TLR9, mimetiza o DNA bacteriano e é capaz de ativar células apresentadoras de antígeno (APCs), induzindo a produção de IFN- α , a atividade microbicida e a expressão de moléculas co-estimuladoras (Stacey *et al.*, 1996). Estudos em camundongos neonatos infectados com arenavírus mostram ainda que o uso de inibidores de TNF- α em conjunto com os agonistas da imunidade inata, aumenta a sobrevivência dos animais (Pedras-Vasconcelos *et al.*, 2006). Além dos agonistas de TLRs intracelulares, os ativadores de STING, como c-di-AMP, são candidatos para potencializar a resposta IFN-I, como também exercer atividade adjuvante de mucosa e imunoestimuladora em DCs e macrófagos em modelos pré-clínicos (Libanova *et al.*, 2010; Škrnjug *et al.*, 2014).

Para que o desenvolvimento e implementação de intervenções imunomoduladoras seja possível, o sistema imune neonatal precisa ser melhor compreendido no contexto celular e molecular. Os macrófagos, APCs profissionais que desempenham um importante papel na resposta imune inata e contribuem com o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, podem ser alvos estratégicos para potencializar a resposta neonatal via ativação de receptores de imunidade inata.

1.2 Imunopatologia da infecção pelo HIV

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) constitui um grande problema de saúde pública, sendo que em 2016 1 milhão de pessoas morreram de doenças relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) causada pelo vírus (Unaid, 2018). Atualmente, cerca de 36,7 milhões de pessoas no mundo vivem com o HIV, sendo que desse total, 2,1 milhões são crianças. No Brasil, cerca de 830.000 pessoas viviam com o HIV em 2016 e foram registradas 48.000 novas infecções no mesmo ano (Unaid, 2017).

O HIV é um retrovírus cujo genoma é formado por duas cópias de RNA simples fita (ssRNA) com 9,8 Kb, composto de nove genes: três estruturais (env, pol e gag), dois regulatórios (tat e rev) e quatro genes acessórios (nef, vif, vpr e vpu/vpx). O material genético viral é revestido por um nucleocapsídeo formado pela proteína p24 que, por sua vez, é envolto por um envelope proveniente da célula hospedeira e apresenta em sua superfície as glicoproteínas virais gp41 (transmembrana) e gp120 (glicoproteína de superfície). A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre pela ligação das proteínas gp41 e gp120 ao receptor CD4 e receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (Figura 1), sendo os linfócitos T CD4+ o principal alvo na infecção. Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o genoma é liberado no citoplasma, convertido em DNA dupla fita (dsDNA) pela ação da transcriptase reversa viral e se integra no genoma do hospedeiro pela integrase viral. O genoma viral pode então ser transcrito em células ativadas, dando origem às proteínas virais que se associam formando novas partículas do vírus.

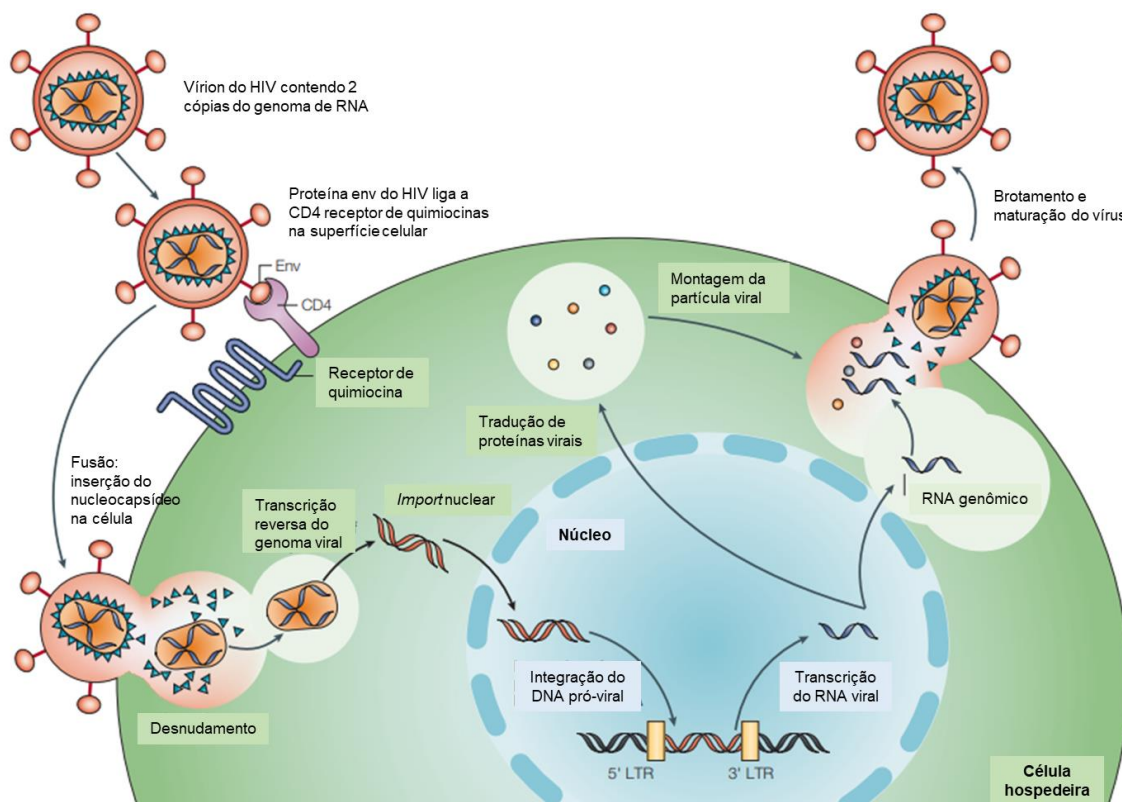


Figura 1. Ciclo replicativo do HIV-1. O primeiro passo no ciclo de replicação do HIV-1 é a ligação da glicoproteína viral Env com os receptores de superfície celular CD4 e co-receptores (CCR5 ou CXCR4). A fusão da membrana do envelope viral com a membrana celular permite a entrada do capsídeo na célula. O genoma viral de RNA é retrotranscrito em DNA de fita dupla, que é integrado no genoma do hospedeiro. Após a integração ocorre a transcrição dos genes virais que são traduzidos em proteínas, as quais formam a partícula viral juntamente com o genoma de RNA. Partículas virais imaturas brotam da célula e amadurecem posteriormente através do processamento proteolítico de proteínas que resulta em partículas virais maduras. Modificado de: Rambaut *et al.*, 2004.

Os mecanismos de entrada do HIV são diversos. Cerca de 80% dos adultos são infectados pelo vírus por meio de exposições da mucosa, sendo que os demais casos estão relacionados a inoculações percutâneas e intravenosas (Cohen *et al.*, 2011). Em crianças, a forma mais comum de transmissão do HIV é a transmissão vertical, na qual mães portadoras transferem o vírus para o feto, sendo responsável por 9% das novas infecções em todo o mundo (Who, 2017). A transmissão vertical ocorre durante a gravidez, trabalho de parto ou parto, ou pela amamentação (Schwartz *et al.*, 1995; Zijenah *et al.*, 2004; Lehman *et al.*, 2008). Sem tratamento, aproximadamente 15% a 30% dos bebês nascidos de mulheres HIV positivas são infectados durante a gestação e o parto, com mais 5-15% sendo infectados pela amamentação (Who, 2017). A administração da zidovudina (AZT) durante a gestação, no momento do parto e no RN, reduz a taxa de transmissão vertical para 8,3% (Saúde,

2007), enquanto a terapia antirretroviral combinada (TARV) pode reduzir o risco de transmissão para aproximadamente 1-2% (Siegfried *et al.*, 2011). Apesar da distribuição da TARV, em 2016 ainda foram registradas mundialmente 160.000 novas infecções pelo HIV decorrentes da transmissão vertical (Unaid, 2018).

Embora os linfócitos T CD4+ sejam o principal alvo da infecção, macrófagos e DCs também expressam os receptores CD4 e CCR5 e podem ser infectados pelo HIV (Lee *et al.*, 1999; Bergamini *et al.*, 2002). Os macrófagos são mais resistentes ao efeito citopático do vírus (Gendelman *et al.*, 1988; Raposo *et al.*, 2002) e são menos susceptíveis à ação de células T CD8+ antígeno específicos (Vojnov *et al.*, 2012; Clayton *et al.*, 2018), permitindo a replicação por longos períodos de tempo (Bergamaschi e Pancino, 2010). Os macrófagos infectados presentes nos tecidos podem disseminar o vírus para diferentes locais anatômicos, estabelecendo a formação de santuários virais, em especial nas mucosas e no sistema nervoso. Macacos tratados com TARV mostram que os macrófagos cerebrais são capazes de replicar vírus mesmo após 2 anos de tratamento, evidenciando seu potencial como reservatórios (Avalos *et al.*, 2017). Além disto, os macrófagos podem liberar o vírus em exossomos e microvesículas, facilitando ainda mais a disseminação do HIV (Kadiu *et al.*, 2012).

Durante os estágios iniciais da infecção, as células T CD4+ efectoras, que possuem alta expressão de CCR5, são drasticamente depletadas, a carga viral plasmática é alta e há o aumento de linfócitos T CD8+ e anticorpos específicos contra o vírus, caracterizando a fase aguda da infecção (Okoye e Picker, 2013). Esse estágio é seguido da fase crônica da infecção, definida pela estabilização da viremia, persistente ativação imunológica e pelo escape viral. Com a progressão da doença, os níveis de T CD4+ caem para valores inferiores a 200 células/ μ L e os portadores do vírus atingem o estágio de aids onde se tornam mais susceptíveis a infecções oportunistas e desenvolvimento de câncer (Lloyd, 1996; Carmichael, 1997). Os infectados crônicos pelo HIV-1, que possuem a habilidade de manter a contagem de T CD4+ normal por um período maior que 10 anos, são denominados de não-progressores de longo prazo. Uma pequena parcela dos não-progressores, denominados controladores de elite, permanecem com viremia indetectável (<50 cópias RNA/ml) por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de TARV (Deeks e Walker, 2007).

Com os avanços no desenvolvimento de TARVs a sobrevivência dos indivíduos infectados se elevou em função da supressão viral e restauração dos níveis das células T CD4+ (Cihlar e Fordyce, 2016). No entanto, o tratamento não elimina completamente o vírus e os pacientes tratados acabam sofrendo de outras morbidades como a imunossupressão crônica (Deeks *et al.*, 2013). Nesse contexto, os macrófagos exercem um papel importante na manutenção da cronicidade da infecção, considerando que alguns inibidores virais são menos eficientes em macrófagos infectados do que em linfócitos T (Perno *et al.*, 1998). Essas células podem ainda adquirir o vírus pela fagocitose de células infectadas (Baxter *et al.*, 2014) e favorecer a infecção de linfócitos T CD4+ via transinfecção mediada por receptores de lectina (CD169) (Sewald *et al.*, 2015), evidenciando o papel dos macrófagos na patogênese da doença.

Apesar da grande maioria das crianças de mães infectadas por HIV-1 não se infectarem mesmo na ausência de TARV (Who, 2017), as que se infectam desenvolvem uma maior viremia quando comparadas a adultos e uma rápida progressão para aids nos primeiros meses de vida, sendo que aproximadamente 10-15% morrem antes de completar um ano (Tovo *et al.*, 1992; Mawhinney *et al.*, 1993; Newell *et al.*, 2004). Uma característica dos RNs é que o número de linfócitos T CD4+ sistêmicos é maior do que em adultos, mas a maior parte apresenta um fenótipo *naive* e poucos expressam CCR5 (D'arena *et al.*, 1998; Bunders *et al.*, 2012), sugerindo que os macrófagos podem ter um papel importante durante a infecção pelo HIV nesse estágio da vida. Embora a patologia da aids pediátrica ainda não seja completamente esclarecida, acredita-se que a imaturidade imunológica possa contribuir com a rápida progressão da doença.

1.3 Reconhecimento viral

Os vírus, assim como outros microrganismos invasores, são inicialmente reconhecidos por componentes da imunidade inata, considerada a primeira linha de defesa contra infecções. Esse reconhecimento inicial é feito por PRRs do hospedeiro localizados tanto na superfície celular quanto no interior das células. Os PRRs reconhecem domínios conservados denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que podem ser estruturas de superfície, material genético viral, produtos de replicação, capsídeo, entre outros. Cada PRR ativa uma via específica

de sinalização para induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFN-I, o qual tem um importante papel na imunidade inata antiviral (Samuel, 2001; Theofilopoulos *et al.*, 2005).

Partículas virais localizadas no meio extracelular podem ser reconhecidas por receptores presentes na membrana celular, como os TLRs, que se ligam a estruturas presentes na superfície viral, em especial, glicoproteínas (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Boehme *et al.*, 2006; Leoni *et al.*, 2012). Intracelularmente, os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, encontrados nos endossomas, promovem o reconhecimento de material genético viral endocitado ou presente em autofagossomos. O TLR3 reconhece RNA dupla fita (dsRNA) e sua deficiência está associada à maior permissividade do HSV-2 ao sistema nervoso central em camundongos (Reinert *et al.*, 2012). Em humanos, deleções no TLR3 estão relacionadas a menor produção de IFN- β , IFN- γ e IL-6 durante a infecção pelo HSV e ao maior risco de encefalite em crianças (Zhang *et al.*, 2007). Já os TLR7 e TLR8 reconhecem ssRNA, incluindo HIV-1, influenza A e o vírus da dengue 2 (Wang *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2007), e são altamente expressos em pDCs. Por fim, TLR9 reconhece porções ricas em CpG não metilado no genoma de vírus de DNA, como o HSV e outros herpes vírus (Lund *et al.*, 2003; Fiola *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Todos os TLRs podem promover a sinalização via NF- κ B e MAPK, culminando na transcrição de citocinas e quimiocinas inflamatórias, mas os TLRs endossomais ativavam vias adicionais que favorecem a fosforilação dos fatores de transcrição IRF1, 3 e 7, que induzem a expressão de IFN- α e IFN- β (Honda *et al.*, 2005; Onoguchi *et al.*, 2007).

Como a maior parte dos vírus ocupa o citosol durante a replicação viral, esse compartimento celular acomoda uma série de PRRs que respondem à presença de vírus. A família dos receptores tipo RIG (RLR) é composta pelas proteínas citosólicas RIG-I, MDA5 e LGP2, que apresentam um domínio helicase ligante de RNA (Yoneyama *et al.*, 2004). RIG-I reconhece principalmente ssRNA mas também pode reconhecer pequenos fragmentos de dsRNA, enquanto MDA5 reconhece preferencialmente fragmentos longos de dsRNA (Yoneyama *et al.*, 2004; Pichlmair *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2008). Tanto RIG-I quanto MDA5 apresentam domínios de recrutamento de caspase (CARD) que interagem com a proteína adaptadora MAVS (também denominada IPS-1, CARDIF e VISA) presente na membrana mitocondrial, levando à ativação de TBK-1 e posterior fosforilação dos fatores de transcrição IRF7 e IRF3 (Fitzgerald *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005). Na infecção pelo

HIV-1, o material genético do vírus ativa RIG-I e foi verificado que a protease viral promove a degradação desse sensor como mecanismo de evadir a resposta antiviral (Solis *et al.*, 2011).

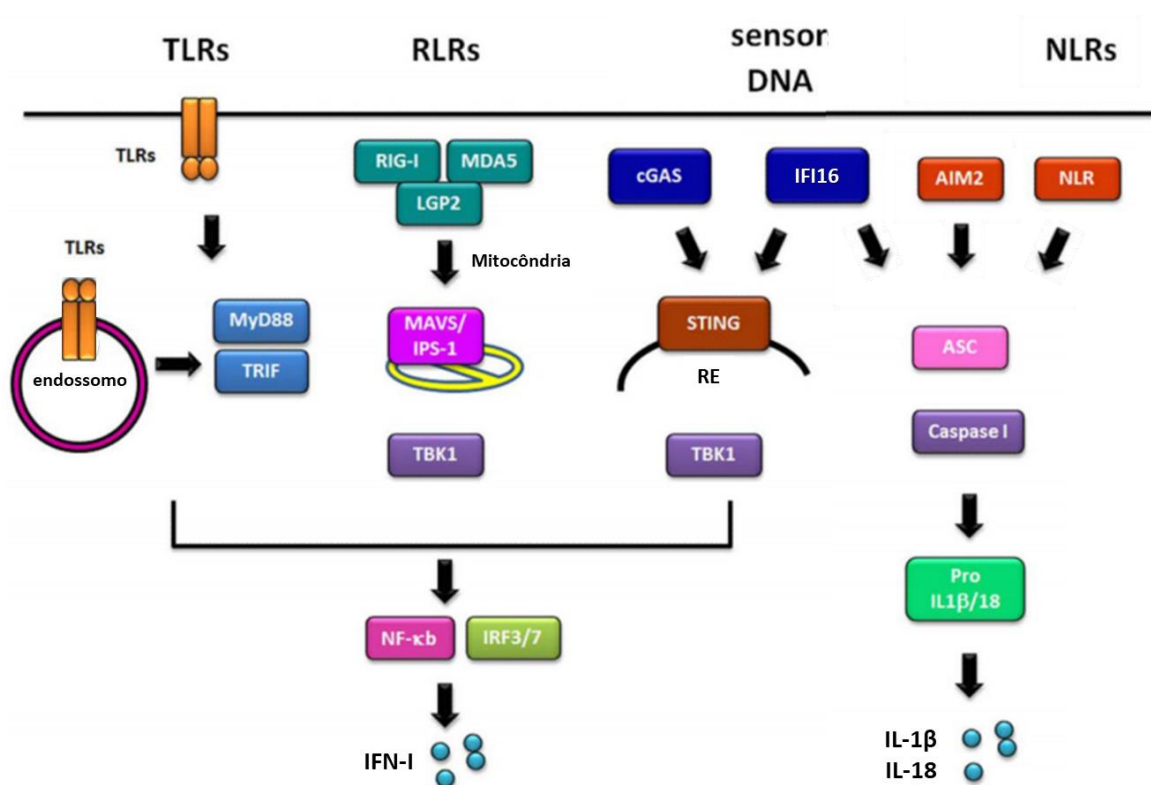


Figura 2. Receptores de reconhecimento de padrão e suas vias de sinalização. Os TLRs sinalizam via proteína MYD88 ou TRIF, que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou IFN-I. A família dos RLRs reconhece RNA e sinalizam através da proteína adaptadora MAVS localizada na mitocôndria, desencadeando a produção de IFN-I e citocinas. Os NLRs interagem com a proteína adaptadora ASC e caspase-1, formando o complexo do inflamassoma que resulta na produção de IL-1 β e IL-18. Os sensores citosólicos de DNA podem ativar IRF3/IRF7 e NF- κ B via STING e TBK1 ou promover ativação da via do inflamassoma, dependendo do receptor. Adaptado de: Ma e Damania, 2016.

Além de proteínas reconhecedoras de RNA, o citosol também abriga sensores especializados no reconhecimento de DNA viral. As proteínas IFI16 e cGAS reconhecem moléculas de DNA e sinalizam via a proteína adaptadora STING, localizada na membrana do retículo endoplasmático. Quando DNA se liga à cGAS há a catalisação de GMP-AMP cíclico (cGAMP), que atua como um segundo mensageiro se ligando a STING (Sun *et al.*, 2013). Após ativação de STING, TBK1 é recrutada levando à fosforilação da proteína adaptadora e do fator de transcrição IRF3, e consequente produção de IFN-I (Tanaka e Chen, 2012; Liu *et al.*, 2015). A via cGAS-STING-IFN parece ser importante no reconhecimento de muitos vírus de DNA, como

HSV, CMV e KSHV (Wu *et al.*, 2015; Paijo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Em camundongos geneticamente deficientes de cGAS e STING é observada alta carga viral e reduzida produção de IFN-I na infecção por HSV-1 (Li *et al.*, 2013). Além disso, cGAS também está envolvido no reconhecimento de material genético de HIV-1 e HIV-2 produzido após a transcrição reversa (Gao *et al.*, 2013; Lahaye *et al.*, 2013).

Na infecção pelo HIV, a indução de IFN-I via a cascata STING-TBK1-IRF3 pode ser potencializada através do bloqueio da expressão da proteína TREX-1. A TREX-1 é uma exonuclease que possui alta afinidade por DNA, principalmente ssDNA, que reconhece e degrada material genético de retrovírus endógenos, prevenindo seu acúmulo no citoplasma (Stetson *et al.*, 2008). Mutações nessa exonuclease estão associadas com o desenvolvimento de doenças autoimunes, dentre elas a síndrome de Aicardi-Goutières, uma encefalopatia subaguda hereditária, e lúpus eritematoso sistêmico (Crow *et al.*, 2006). Devido à similaridade estrutural com os retrovírus endógenos, TREX-1 também reconhece ácidos nucleicos provenientes da replicação do HIV, impedindo seu acúmulo no citoplasma e desfavorecendo o reconhecimento e resposta mediada por sensores citosólicos (Figura 3) (Yan *et al.*, 2010).

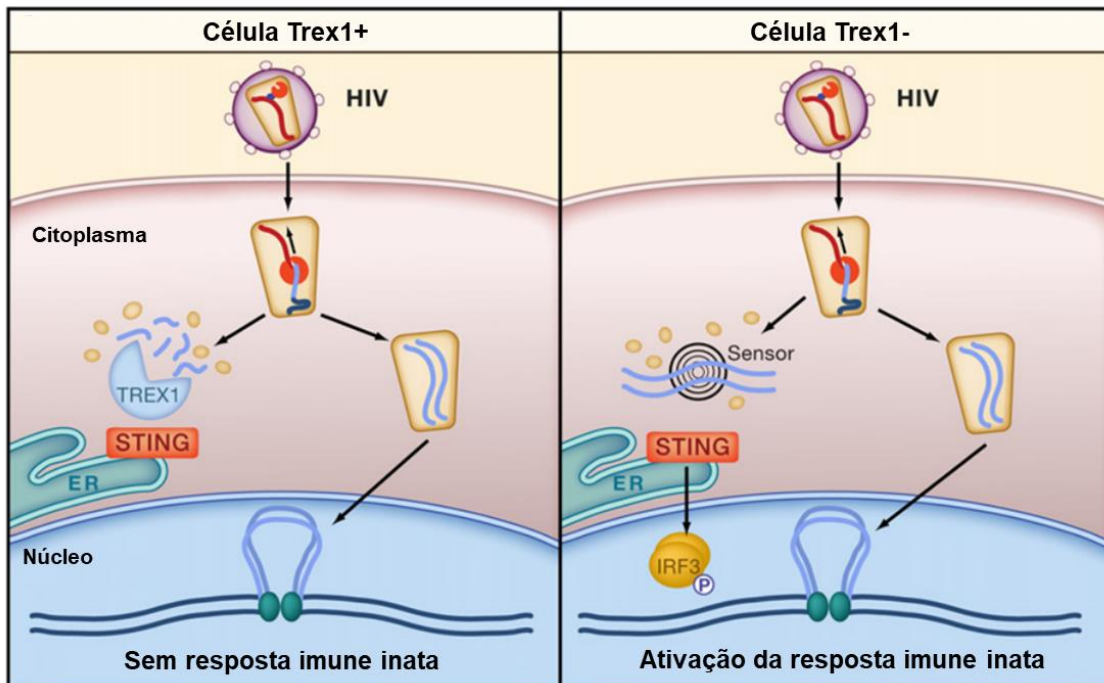


Figura 3. Efeito de TREX-1 no reconhecimento e resposta imune ao HIV-1. Esquerda: Células que expressam TREX-1 degradam parte do DNA retrotranscrito enquanto a fração de DNA que escapa desse processo se integra no genoma do hospedeiro sem ativar sensores inatos. Direita: Em células deficientes de TREX-1 o DNA viral se acumula no citoplasma levando à ativação da via de STING e produção de IFN-I. Modificado de: Manel e Littman, 2011.

O sensor IFI16 está localizado tanto no citosol quanto no núcleo e pode reconhecer ssDNA e dsDNA, induzindo a produção de IFN-I via STING (Unterholzner *et al.*, 2010). Em macrófagos infectados com HSV-1 e CMV, IFI16 co-localiza com DNA viral no citoplasma e sua ausência está associada ao aumento da replicação desses vírus (Conrady *et al.*, 2012; Gariano *et al.*, 2012; Horan *et al.*, 2013). IFI16 também participa do reconhecimento de resíduos de DNA provenientes da infecção pelo HIV-1 uma vez que seu silenciamento aumenta a produção de partículas virais em macrófagos (Jakobsen *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual esse sensor promove a ativação de STING e induz a resposta de IFN-I não está completamente esclarecido, mas foi verificado que IFI16 pode potencializar a síntese de cGAMP dependente de cGAS, além de contribuir com o recrutamento de TBK-1 para o complexo de STING em macrófagos humanos, levando a produção de IFN-I (Jønsson *et al.*, 2017).

Além de induzir a resposta de IFN-I, também tem sido demonstrado que IFI16 pode interagir com a proteína adaptadora ASC durante a infecção pelo herpes vírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), levando à ativação de caspase-1 pela via do inflamassoma e secreção de IL-1 β e IL-18 (Kerur *et al.*, 2011). Na infecção pelo HIV, a ativação dessa via de sinalização por IFI16 parece ter um papel importante na progressão para aids, uma vez que esse sensor está envolvido no reconhecimento de transcritos de DNA incompletos provenientes de infecções abortivas em células T CD4+ quiescentes, resultando em piroptose, um tipo de morte celular programada dependente de caspase-1 (Monroe *et al.*, 2014). Contraditoriamente foi demonstrado que IFI16 pode desempenhar um papel anti-inflamatório por inibir a ativação da cascata do inflamassoma por outros receptores citoplasmáticos (Veeranki *et al.*, 2011), sugerindo que alguns aspectos funcionais do IFI16 ainda precisam ser melhor compreendidos.

Um receptor citosólico estruturalmente semelhante à IFI16 é AIM2. AIM2 também está envolvido no reconhecimento de DNA em infecções bacterianas e virais, levando à ativação do inflamassoma (Hornung *et al.*, 2009; Unterholzner *et al.*, 2010). Em contraste com IFI16, AIM2 parece ser dispensável para a produção de IFN-I (Gray *et al.*, 2016), embora alguns trabalhos sugeriram que sua estimulação promova a ativação de IRF3 (Stein e Falck-Pedersen, 2012). Em modelo experimental de infecção por citomegalovírus foi demonstrado que AIM2 desempenha um importante

papel na produção de IFN- γ por células NK através do estímulo com IL-18, além de induzir piroptose de células infectadas (Rathinam *et al.*, 2010).

A cascata do inflamassoma também pode ser ativada por receptores do tipo NOD (NLRs) presentes no citoplasma, sendo NLRP3 o mais estudado. NLRP3 pode ser ativado em diversas infecções virais, como influenza e vírus Sendai, levando à produção de IL-1 β e IL-18 que contribuem com o recrutamento de células efetoras que auxiliam no combate à infecção e reparo tecidual (Ichinohe *et al.*, 2009; Rider *et al.*, 2011; Chen e Ichinohe, 2015). NLRP3 também parece ser importante no reconhecimento e resposta ao HIV-1, visto que polimorfismos no gene desse receptor estão associados a maior susceptibilidade a infecção (Pontillo *et al.*, 2012). O receptor NLRP1 também ativa a via da inflamassoma e foi observado que a ativação de NLRP1a pelo vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV) induz piroptose (Masters *et al.*, 2012). Além dos sensores de DNA e NLRs, receptores de RNA como RIG-I também promovem a ativação do inflamassoma em resposta a infecções virais (Poeck *et al.*, 2010), sugerindo que essa via pode ter um papel importante para o desenvolvimento da resposta antiviral e resolução da infecção. Entretanto, tem sido mostrado que a ativação de caspase-1 via inflamassoma leva à degradação da proteína adaptadora TRIF e diminuição da fosforilação de IRF3, atenuando a resposta de IFN-I (Jabir *et al.*, 2014; Banerjee *et al.*, 2017). Além disso, a ativação do inflamassoma também está associada à degradação de cGAS, interferindo no reconhecimento e resposta contra vírus de DNA (Wang, Y. *et al.*, 2017). Esses resultados mostram que o papel da via do inflamassoma em infecções virais e sua regulação da resposta IFN-I ainda precisa ser melhor compreendido.

Em RNs, as células mononucleares do cordão umbilical (CBMN), possuem reduzida expressão de TLR3 e dos sensores citosólicos cGAS e STING, o que favorece infecções virais (Slavica *et al.*, 2013; Wang, Z. S. *et al.*, 2017). Assim, a maior susceptibilidade de RNs está relacionada não apenas a relativa imaturidade da resposta imune adaptativa e menor capacidade de produção de citocinas da imunidade inata, mas também à falha no reconhecimento viral.

1.4 Resposta imune inata contra infecções virais

O reconhecimento viral estimula vias de sinalização intracelulares que resultam na ativação de fatores de transcrição, iniciando uma resposta inata antiviral. Várias

citocinas são induzidas durante infecções, incluindo IL-6, IL-12 e TNF- α decorrentes da ativação de diversos fatores de transcrição, em especial NF- κ B. No entanto, as principais citocinas que orquestram a resposta antiviral são os IFN-I, que incluem principalmente 13 subtipos de IFN- α (14 em camundongos) e IFN- β (Pestka *et al.*, 2004). Diferente do IFN tipo II, que é produzido por linfócitos T e células NK, o IFN-I pode ser produzido por todas as células nucleadas em resposta a infecções virais.

Os fatores de transcrição que regulam a produção de IFN-I são principalmente IRF3 e IRF7, que ao serem ativado translocam para o núcleo e se ligam às regiões promotoras dos genes de IFN- α e IFN- β (Taniguchi *et al.*, 2001). Esses fatores de transcrição também regulam a produção de IFN tipo III (IFN- λ) durante infecções por influenza, HSV e sarampo, desempenhando funções biológicas semelhantes ao IFN-I (Coccia *et al.*, 2004; Berghäll *et al.*, 2006; Melchjorsen *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que o IFN- λ inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos e dos vírus hepatite B e C em hepatócitos por promover a indução de IRFs e diversos fatores antivirais (Robek *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). No entanto, sua atividade antiviral é mais restrita aos sítios de entrada virais como mucosas e pele, considerando que seu receptor é mais expresso em células epiteliais e queratinócitos (Brand *et al.*, 2005; Lasfar *et al.*, 2006).

Ao serem produzidos, os IFN-I são secretados e se ligam ao seu receptor IFNAR presente na membrana celular de células vizinhas ou mesmo da própria célula que o produziu. A ativação desse receptor promove a oligomerização de STAT1 e STAT2 que se ligam a IRF9 formando o complexo ISGF3, o qual induz a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs) responsáveis pela ativação do estado antiviral da célula (Figura 4). Animais e humanos deficientes de STAT1 mostram reduzida produção de IFN-I e maior susceptibilidade à diversas infecções virais (Durbin *et al.*, 1996; Dupuis *et al.*, 2003). Em pacientes infectados pelo HIV há uma menor expressão de pSTAT1 e análises *in vitro* demonstraram que a proteína viral Vif promove a ubiquitinação e degradação proteossomal desse fator de transcrição, o que ajuda a explicar porque terapias com IFN- α não são eficientes no controle da infecção pelo HIV (Gargan *et al.*, 2018).

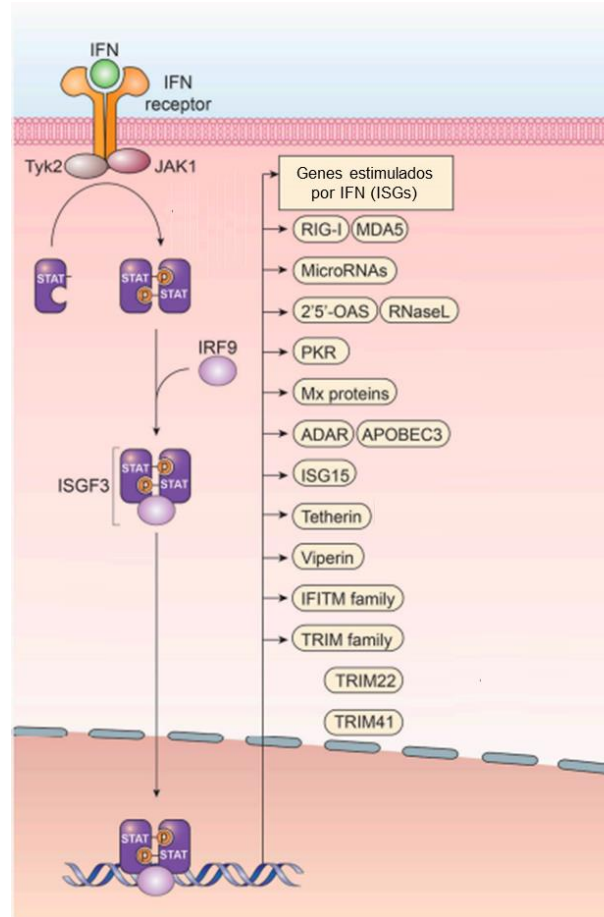


Figura 4. Ativação do estado antiviral pela sinalização por IFN-I. O IFN-I produzido após o reconhecimento viral se liga ao seu receptor na membrana plasmática da célula infectada e de células vizinhas, levando à ativação de STAT1 e STAT2 que se associam à IRF9 formando o complexo ISGF3. ISGF3, por sua vez, induz a expressão de diversos ISGs que estão envolvidos na amplificação e regulação da resposta de IFN-I e inibição do ciclo viral. Modificado de: Ortega-Prieto e Dorner, 2017.

Os ISGs abrangem diversas proteínas que de alguma maneira contribuem com a eliminação viral. Muitos sensores citosólicos, como RIG-I, MDA-5 e cGAS, são produzidos após a ativação por IFN-I e atuam potencializando o reconhecimento e a resposta antiviral, favorecendo a eliminação do patógeno (Schneider *et al.*, 2014). Outros ISGs controlam a infecção viral por atuar diretamente em vias e mecanismos necessários durante o ciclo replicativo, impedindo que ele se complete corretamente. Pelo papel que desempenham, tais ISGs são denominados fatores de restrição viral.

As proteínas da família Mx, MxA e MxB, atuam logo após a entrada viral, promovendo a degradação de estruturas do nucleocapsídeo de vários vírus de RNA, além de bloquear o transporte do nucleocapsídeo para o núcleo, a transcrição de genes e a montagem da partícula viral (Gordien *et al.*, 2001; Turan *et al.*, 2004; Haller e Kochs, 2011). Na infecção pelo HIV MxB impede o transporte do genoma viral para

o núcleo, evitando a integração no DNA da célula hospedeira, além de ser necessário para potencializar a resposta de IFN- α (Goujon *et al.*, 2013; Kane *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Além disso, em PBMCs e pDCs de pacientes infectados com HIV-1 há uma maior expressão de MxA, sugerindo a participação desse fator na resposta antiviral (Badolato *et al.*, 2008; Lehman *et al.*, 2008).

Outros fatores antivirais são as proteínas da família APOBEC, comumente presentes no citoplasma. As proteínas APOBEC estão envolvidas na resposta a diversos vírus de DNA, como HSV-1, EBV, HPV e HBV, e vírus de RNA, promovendo hipermutações de sequências de ácidos nucleicos virais (Turelli *et al.*, 2004; Vartanian *et al.*, 2008; Suspène *et al.*, 2011; Fehrholz *et al.*, 2012). Na infecção pelo HIV-1, APOBEC3G induz a troca de G por A no cDNA viral sintetizado durante a transcrição reversa, impossibilitando a integração do pró-vírus com o genoma do hospedeiro (Mangeat *et al.*, 2003). Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi evidenciado o aumento da expressão de APOBEC3G, assim como MxA e outros fatores antivirais, em células mononucleares de RNs expostos ao HIV, que pode estar associado a proteção contra o vírus e a baixa taxa de infecção vertical (Pereira *et al.*, 2013).

Ainda no contexto da infecção pelo HIV um fator de restrição viral bastante relevante é SAMHD-1, expresso principalmente em células mielóides como macrófagos e DCs, e linfócitos TCD4⁺ em repouso. Este fator impede a retrotranscrição do HIV-1 por sequestrar e promover a degradação de nucleotídeos trifosfatos (dNTPs) necessários para a síntese de DNA viral (Hrecka *et al.*, 2011; Laguette *et al.*, 2011; Lahouassa *et al.*, 2012). Embora o papel de SAMHD-1 seja bastante explorado na infecção pelo HIV, esse fator de restrição também pode atuar no controle da replicação de vírus de DNA como o HSV-1 (Kim *et al.*, 2013).

Dada a importância de um reconhecimento e resposta eficazes no combate a infecções virais, a nossa **hipótese** é que em recém-natos os macrófagos, células cruciais no desenvolvimento da resposta inata e adaptativa, possuem uma menor expressão de receptores de reconhecimento e suas vias de sinalização, justificando a maior susceptibilidade a infecções nesses indivíduos. Ainda, visto que agonistas da imunidade inata têm sido explorados como estratégias imunoterapêuticas, nós hipotetizamos que o tratamento com adjuvantes de IFN-I pode promover ativação celular e aumento de moléculas de reconhecimento, dificultando o estabelecimento de infecções virais.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito imunomodulador e antiviral de adjuvantes indutores de interferon tipo I em macrófagos derivados de monócitos de neonatos e adultos.

2.1 Objetivos Secundários

- Verificar as diferenças fenotípicas e funcionais entre macrófagos de recém-natos e adultos;
- Avaliar o potencial imunomodulador de agonistas de TLR7/TLR8, STING e TLR3/RIG/MDA5 quanto à expressão gênica de componentes da resposta imune inata e a produção de citocinas e quimiocinas em macrófagos de recém-natos e adultos;
- Avaliar o efeito dos agonistas na replicação do HIV-1 *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras de sangue de cordão umbilical foram obtidas de parturientes maiores de 18 anos clinicamente sadias, com sorologia negativa para sífilis, hepatite B e C, toxoplasmose, HIV-1 e outras doenças, com idade gestacional entre 37 e 42 semanas, atendidas na Maternidade do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Como critérios de exclusão foram adotadas intercorrências clínicas ou obstétricas associadas ao aumento de complicações pós-operatórias (diabetes, hipertensão arterial, descolamento prematuro de placenta, placenta prévia, doenças do colágeno, etc) e pacientes que apresentaram sinais ou sintomas compatíveis com quadro infeccioso vigente de qualquer etiologia e localização. Foram utilizadas apenas amostras de parto tipo normal.

As amostras de sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis, de ambos os sexos, acima de 18 anos, foram provenientes de doadores de plaquetas da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo.

Para obtenção das amostras, tanto gestantes quanto doadores de plaquetas foram informados do conteúdo da pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo nº 54988216.5.0000.5467.

Os dados demográficos dos indivíduos avaliados neste trabalho estão indicados na tabela abaixo.

Tabela 1 - Dados demográficos de indivíduos adultos e RNs utilizados no estudo.

	Adulto N = 25	RN N = 14
Sexo	Feminino = 5 Masculino = 20	Feminino = 4 Masculino = 10
Idade / IG	41 ± 12 anos	39 ^{1/7} ± 1 ^{1/7} semanas
Peso	-	3,268 ± 0,413 kg

Dados expressos em média ± desvio padrão. RN= Recém-nato. IG= Idade Gestacional.

3.2 Coleta das amostras

Sangue de cordão umbilical: Aproximadamente 50 mL de sangue foram coletados em tubos heparinizados, logo após a dequitação da placenta com auxílio de agulha e seringa descartáveis.

Sangue periférico de adulto: Sangue periférico de adultos saudáveis foi obtido a partir de dispositivos descartáveis (kits) provenientes do procedimento de aférese.

3.3 Obtenção de macrófagos derivados de monócitos

As amostras de sangue periférico de indivíduos adultos foram diluídas em solução fisiológica, volume à volume em tubos cônicos de 50 mL. As suspensões das células mononucleares (CMNs) foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 1400 g através de gradiente de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). As amostras de sangue de cordão umbilical foram diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco, Montana, USA) na proporção 1:3 e separadas em duas centrifugações sequenciais com gradiente de Ficoll. CMNs de adultos e RNs foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular observada com auxílio do corante Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

A purificação de monócitos foi realizada por aderência de CMNs à superfície plástica de placas de cultura. Para isso, $2,5 \times 10^6$ células/mL foram cultivadas em placas de 6, 12 ou 24 poços (Jet Bio-Fil, Guangzhou, China) em meio RPMI por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a adesão, as células não aderentes foram retiradas e os monócitos aderidos foram mantidos em cultura por 7 dias em meio RPMI suplementado com 20% de soro AB humano inativado (Sigma-Aldrich), 4 mM de L-glutamina (Gibco), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco) e 50 ng/mL de fator estimulador de macrófagos (M-CSF) (PeproTech, New Jersey, EUA).

3.4 Imunofenotipagem

A caracterização de moléculas de superfície de macrófagos foi feita por citometria de fluxo. Os macrófagos foram descolados das placas de cultura pela incubação em solução de EDTA 0,5 mM por 20 minutos a 37°C. As células foram centrifugadas a 250 g por 10 minutos e ressuspensas em tampão fosfato-salino

0,2% de albumina do soro bovino (Sigma-Aldrich) com o marcador de viabilidade LIVE/DEAD (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, em proteção da luz. Os receptores celulares para cadeia Fc foram bloqueados com Fc Block por 10 minutos, seguidos de fixação com o reagente Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) por 20 minutos à 4°C. As células foram lavadas com a solução Perm/Wash e incubadas com o coquetel de anticorpos (Tabela 2) por 20 minutos à 4°C. Após as etapas de marcação, as células foram ressuspensas em solução isotônica (FACS Flow) (BD Biosciences) e 100.000 eventos foram adquiridos no equipamento LSR Fortessa™ (BD Biosciences). Para avaliação dos dados foi utilizado o programa FlowJo (v10 para Windows, LLC). O controle da fluorescência (FMO - *Fluorescence Minus One*) foi realizado para todos os anticorpos do painel, para avaliar a compensação e definir os eventos positivos.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para a análise de moléculas de superfície de macrófagos.

Anticorpo	Função	Fluorescência	Diluição	Marca
CD3	Co-receptor de célula T	APC	1:50	BD Biosciences
CD19	Receptor de antígeno de linfócito B	APC	1:200	EXBIO
CD14	Co-receptor de LPS	V450	1:200	BD Biosciences
CD68	Glicoproteína lisossomal	PE-Cy7	1:200	BD Biosciences
CD80	Co-estimulador de APC	APC-R700	1:50	BD Biosciences
CD206	Receptor de manose	BB515	1:50	BD Biosciences
CD163	Receptor <i>Scavenger</i>	PerCP-Cy5.5	1:50	BD Biosciences

3.5 Culturas com macrófagos

Para os ensaios de imunomodulação, macrófagos de adultos e RNs foram incubados em meio RPMI suplementado com 10% de soro AB humano e estimulados com o agonista de TLR7/TLR8, CL097 (5 µg/mL), o agonista de TLR3, RIG e MDA5, Poly-I:C HMW (1 µg/mL) e o ligante de STING, cGAMP (10 µg/mL), provenientes da Invivogen (nível de endotoxina <0.001 EU/µg) (San Diego, CA, EUA). A avaliação da expressão gênica foi realizada após 3h de estímulo e a produção de citocinas e quimiocinas no sobrenadante das culturas foi avaliada após 24h. Para os ensaios de infecção com o vírus HIV-1, as células foram incubadas com os compostos por 24h

previamente à infecção. Como controle positivo de inibição da replicação viral foi utilizado o inibidor da transcriptase reversa, zidovudina (AZT) a 25 μ M (NIH AIDS Reagent Program).

Inibidores farmacológicos foram utilizados para verificar o mecanismo de ação do agonista de TLR7/TLR8, CL097, na inibição da replicação viral. Para isso, macrófagos foram tratados com o inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M; Sigma-Aldrich) e inibidor geral de caspase (Z-VAD-FMK, 10 μ M; BD Biosciences) 2 horas antes da adição de CL097.

3.6 Expressão gênica dos alvos de interesse por PCR em tempo real

A avaliação dos transcritos de sensores citosólicos de DNA e RNA (IFI16, AIM2, cGAS, STING, MDA-5 e RIG-I), bem como, da exonuclease TREX-1, de componentes da resposta antiviral (TBK-1, IRF3, IRF7, IFN- β , APOBEC3G, SAMHD1 e MxA) e da cascata do inflamassoma (NLRP3, NLRP1, ASC, Caspase-1, IL-1 β e IL-18), foi realizada por PCR em tempo real. A extração de RNA total de macrófagos estimulados ou não por agonistas de TLRs e STING foi obtida com o kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizado o kit iScriptTM (Biorad) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de amplificação em tempo real foi feita utilizando, para cada amostra, 5 μ L de cDNA, 7 μ L da solução SYBR[®] Green (Applied Biosystem) e 2 μ L (1 μ M ou 0,5 μ M) dos *primers* sense e anti-sense para os genes alvos e controle interno GAPDH, todos sintetizados pela Invitrogen. A amplificação foi realizada no aparelho 7500 (Applied Biosystem) e a análise dos resultados foi realizada no programa 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems) utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, como já descrito por (Livak e Schmittgen, 2001). As sequências dos *primers* utilizados estão listadas na tabela 3.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qPCR em macrófagos.

Alvo	Sequências
AIM-2	F: CACCAAAAGTCTCTCCTCATGTT R: AAACCCTTCTCTGATAGATTCCTG
APOBEC3G	F: GGCTCCACATAAACACGGTTTC R: AAGGGAATCACGTCCAGGAA
ASC	F: AAGCCAGGCCTGCACTTTAT R: CTGGTACTGCTCATCCGTCA
Caspase-1	F: TTACAGACAAGGGTGCTGAACAA R: TGAGGAGCTGGAAAGGAAGAAAG
cGAS	F: GGGAGCCCTGCTGTAACACTT R: CCTTTGCATGCTTGGGTACAA
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC
IFI16	F: AACCACGTTGAAACCAAGACT R: TGC GTTCAGCACCATCACTT
IFN- β	F: CATTACCTGAAGGCCAAGGA R: CAATTGTCCAGTCCCAGAGG
IRF3	F: AGAGGCTCGTGATGGTCAAGGTT R: AGAGTGGGTGGCTGTTGGAAATG
IRF7	F: TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA R: GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG
MDA-5	F: GCCATTGCAGATGCAACCAG R: TTGCGATTTCTTTTGCAG
MxA	F: AAGCTGATCCGCCTCCACTT R: TGCAATGCACCCCTGTATACC
NLRP1	F: AAGACCAGCTGTTCTCGGAGTT R: AGGCATGAGATCTCCTGGTTTC
NLRP3	F: TGGAGTGTCCGAGAAGAG R: TGCTGTCATTGTCCTGGTGT
Pró-IL-1 β	F: TCCCCAGCCCTTTTGTGTA R: TTAGAACCAAATGTGGCCGTG
Pró-IL-18	F: GACGCATGCCCTCAATCC R: CTAGAGCGCAATGGTGCAATC
RIG-1	F: CTGGACCCTACCTACATCCTG R: GGCATCCAAAAAGCCACGG
SAMHD-1	F: GGATTACTAAAAACCAGGTTTCACA R: GCTCTGCAAATTTCTCTGGCAG
STING	F: ATATCTGCGGCTGATCCTGC R: GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT
TBK-1	F: GCAGTTTGTCTCTGTATGGC R: AATGTTACCCCAATGCTCCA
TREX-1	F: GCCAAGACCATCTGCTGTAC R: CAGGGTCCTTCACTGGAGGAA

F= Sense (*forward*). R= Anti-sense (*reverse*).

3.7 Dosagem de citocinas e quimiocinas

A determinação de IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, CCL5 e CCL3 nos sobrenadantes das culturas foi feita por citometria de fluxo utilizando os kits de *Cytometric bead array*

(CBA) FLEX (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). Os limites mínimos de detecção dos ensaios foram: IL-6 1,6 pg/mL, TNF- α 1,2 pg/mL, IL-1 β 2,3 pg/mL, IL-10 0,13 pg/mL, CCL5 0,002 pg/mL e CCL3 0,2 pg/mL.

Para validação do bloqueio de NF- κ B e caspases, a produção de TNF- α e IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas após a incubação com os inibidores dessas vias por ELISA, utilizando os kits DuoSet (R&D Systems), conforme as instruções do fabricante. Os limites mínimos de detecção dos ensaios foram: IL-1 β 3,90 pg/mL e TNF- α 15,6 pg/mL.

3.8 Produção do vírus HIV-1 NL(AD8)

Para os ensaios de infecção com vírus HIV-1 foi utilizada a cepa modificada NL(AD8) com tropismo para macrófagos (R5). Para a produção do vírus foi utilizado o plasmídeo pNL(AD8), gentilmente cedido pela Prof. Bruna Alencar do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os plasmídeos foram expandidos em bactérias *Escherichia coli* da cepa Stbl3 em meio LB (USB Corporation) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e purificados com o kit Plasmid Mega (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. Para a produção das partículas virais, células HEK 293T foram transfectadas com pNL(AD8) utilizando o reagente de transfecção polietilenimina - PEI (PolyScience, Warrington, PA, EUA) conforme indicações do fabricante. Após 48h-72h o sobrenadante de cultura foi centrifugado a 1300 g por 5 minutos e filtrado com filtro Millex[®] GP de 0,22 μ m (Millipore). Em seguida, a suspensão contendo o vírus foi cuidadosamente adicionada a tubos tipo eppendorf de 1,5 mL contendo 300 μ L de solução de sacarose 20% e centrifugada a 10.000 g 4°C por 2h. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em meio RPMI e armazenadas a -80°C.

O número de partículas virais infectivas foi estimado pela infecção em células GHOST (3) CXCR4+CCR5+ (Repositório NIH, EUA), portadoras da construção HIV-2 LRT-GFP que permite a expressão de GFP quando infectadas com o vírus. Células GHOST foram cultivadas em placas de 6 poços contendo 100.000 células com crescentes volumes do estoque viral. Após 18h as células infectadas foram descoladas da placa de cultura com 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco), fixadas e

adquiridas em citômetro de fluxo. O cálculo do número de unidades infectivas foi feito como descrito por (Janas e Wu, 2009).

3.9 Infecção de macrófagos por HIV-1

Para a infecção com HIV-1 os macrófagos foram expostos ao vírus por 18h com MOI (*multiplicity of infection*) de 1. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com meio RPMI para remoção de partículas virais livres e foram mantidas em cultura com meio suplementado com soro AB 10% por até 15 dias.

A replicação viral foi mensurada através da quantificação da proteína viral p24 nos sobrenadantes de cultura por ELISA com o kit *Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) p24* (Sino Biological, Wayne, PA, USA), segundo instruções do fabricante.

3.10 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular após a exposição aos adjuvantes de IFN-I foi verificada através do ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) empregando o kit comercial *CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, EUA) conforme as instruções do fabricante. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em função da liberação de LDH por células tratadas com solução de lise e corrigida pela liberação constitutiva de LDH por células não tratadas.

3.11 Análise estatística

A comparação entre os dados de adultos e RNs foi feita com o teste estatístico de Mann-Whitney, enquanto que a comparação entre os estímulos utilizados e as células não estimuladas foi feita com o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon. Os ensaios de cinética de replicação viral foram analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para as múltiplas comparações. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. Todas as representações gráficas foram executadas com auxílio do software GraphPad Prisma versão 6 (GraphPad Software).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de marcadores fenotípicos de macrófagos

Macrófagos podem apresentar diferentes fenótipos de acordo com o microambiente (Stout *et al.*, 2005). Tradicionalmente essas células são divididas em macrófagos classicamente ativados (M1), de perfil pró-inflamatório, e macrófagos alternativamente ativados (M2), de caráter anti-inflamatório e regulador. Para verificar o perfil fenotípico das células de RNs, a expressão de marcadores associados a macrófagos M1 (CD80) e M2 (CD206 e CD163) foi avaliada por citometria de fluxo.

Na figura 5 é possível observar que não há diferença nos níveis de expressão desses marcadores entre os MDMs de adultos e RNs, indicando a semelhança fenotípica entre os grupos. Nota-se ainda a prevalência da expressão do receptor de manose (CD206) nessa população, sugerindo que nessas condições de cultura as células mostram um perfil anti-inflamatório.

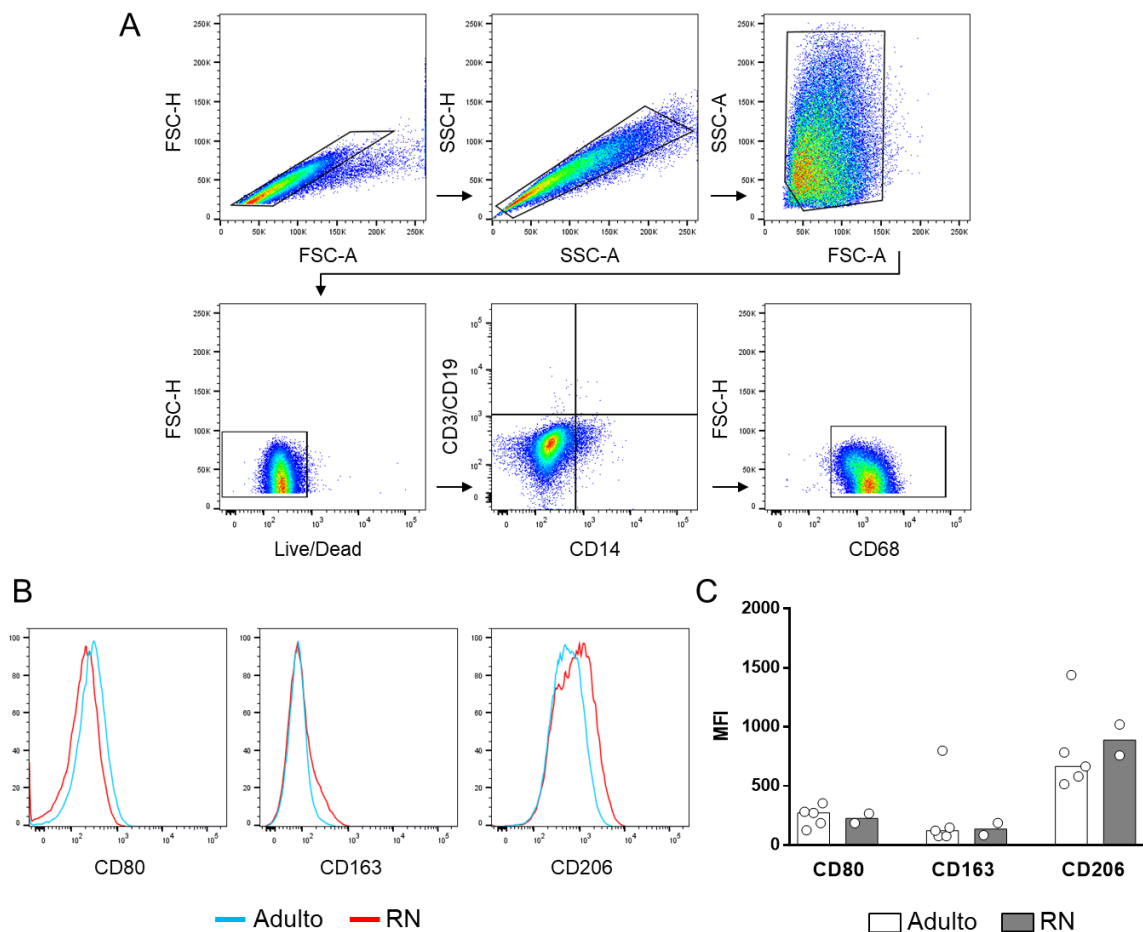


Figura 5. Expressão de marcadores de subpopulações de macrófagos. A expressão de CD80, CD163 e CD206 em MDMs de adultos e RNs foi analisada nas células com baixa expressão de CD14 e positivas para CD68. **(A)** Estratégia de *gate* indicando a viabilidade celular e a ausência de células positivas para CD3 e CD19. **(B)** Histogramas indicando a intensidade da fluorescência. **(C)** Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores de subpopulações de macrófagos em células de adulto e RNs. N=2-5 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

4.2 Análise da expressão gênica em macrófagos de adultos e RNs

A maior susceptibilidade de neonatos a infecções pode estar associada a reduzida expressão de receptores da imunidade inata (Slavica *et al.*, 2013; Wang, Z. S. *et al.*, 2017). Essas evidências nos levaram a investigar se macrófagos de RNs poderiam expressar menores níveis de moléculas de reconhecimento, como sensores citosólicos de DNA e RNA, o que tornaria o reconhecimento e, portanto, a resposta, menos eficiente a uma infecção. Contrariamente ao que era esperado, a avaliação da expressão gênica mostra que os macrófagos de RNs possuem níveis de expressão semelhante aos macrófagos de adultos para todos os alvos avaliados (Figura 6).

Também foi avaliada a expressão da exonuclease TREX-1 para apurar se

adultos e RNs poderiam variar quanto a capacidade de degradação de material genético exógeno presente no citoplasma durante uma infecção viral. Da mesma forma que para os alvos anteriores, não verificamos diferença significativa nos níveis de expressão. Esses achados evidenciam a imunocompetência desta população celular quanto a expressão sensores virais no período neonatal.

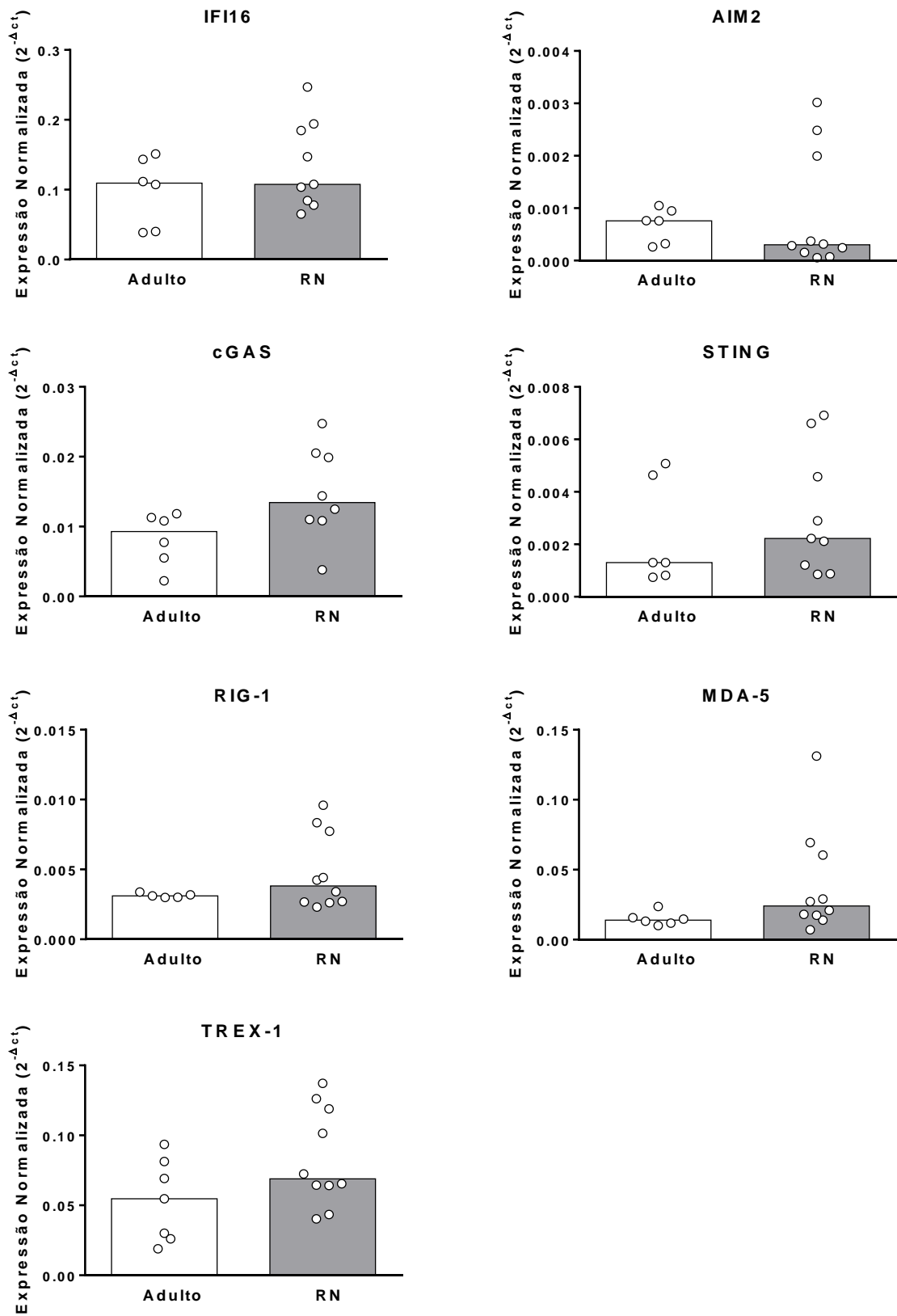


Figura 6. Perfil de expressão gênica constitutiva de sensores citosólicos em macrófagos de adultos e RNs. Comparação da expressão gênica constitutiva de sensores citosólicos de RNA e DNA entre MDMs de adultos e RNs por qPCR. N=7-8 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

Além dos sensores citosólicos, foi avaliada a expressão de proteínas das vias de sinalização que são ativadas após o reconhecimento pelos mesmos, como a via do IFN-I. A figura 7 mostra que os níveis de expressão dos componentes da cascata de IFN-I são semelhantes entre macrófagos de adultos e RNs.

Também foi avaliada a expressão de APOBEC3G, SAMHD-1 e MxA, fatores de restrição viral induzidos por IFN-I envolvidos na resposta ao HIV. Interessantemente foi observada uma menor expressão de MxA em células de RNs.

Esses dados evidenciam que embora os RNs sejam imunocompetentes quanto a expressão de moléculas de reconhecimento e da cascata de IFN-I, há uma menor expressão de componentes antivirais efetores.

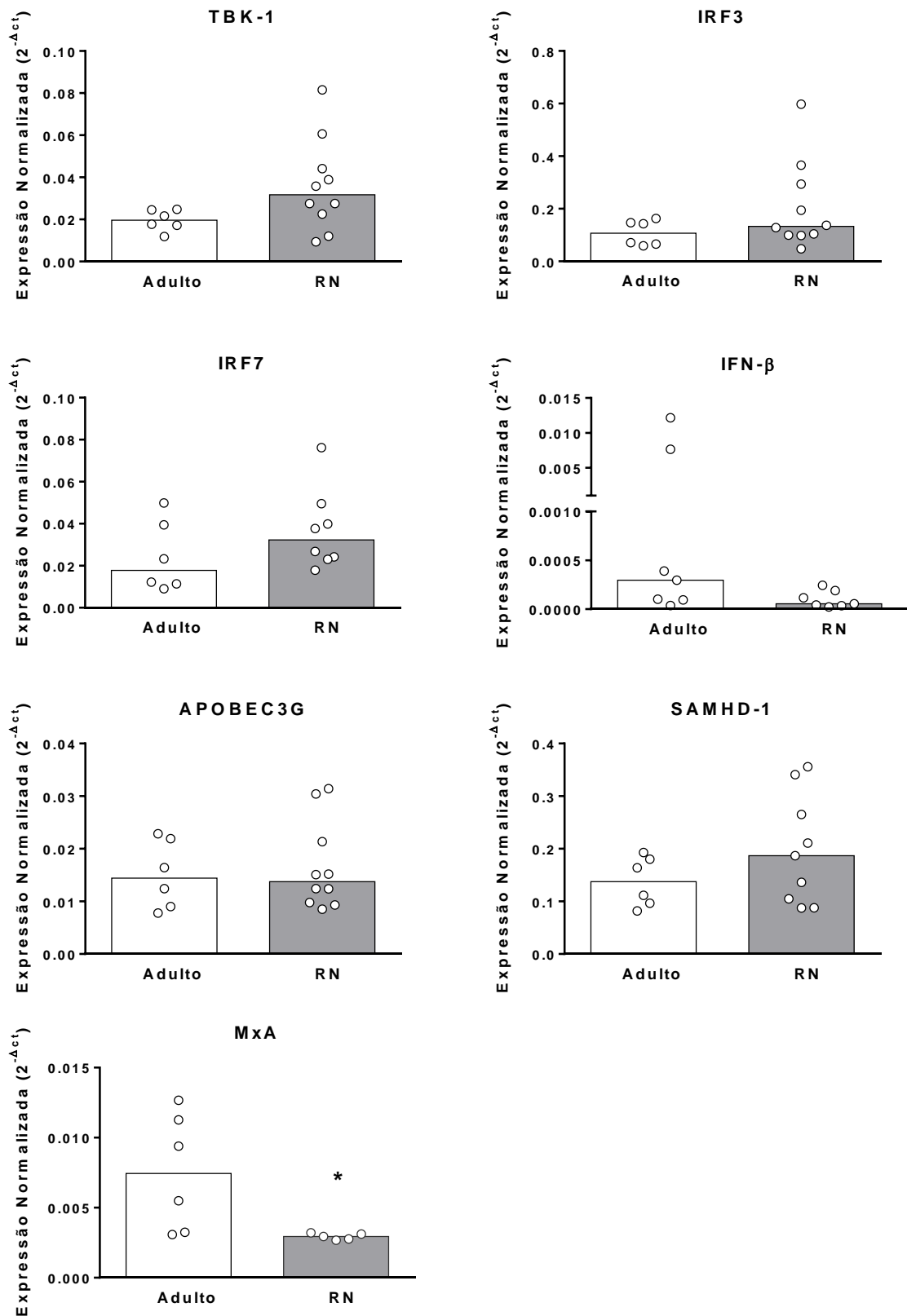


Figura 7. Perfil de expressão gênica constitutiva de componentes da resposta de IFN-I em macrófagos de adultos e RNs. Comparação da expressão gênica constitutiva de proteínas da cascata de sinalização de IFN-I e fatores antivirais entre MDMs de adultos e RNs por qPCR. N=5-10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste de Mann-Whitney: * p <0,05.

Além de promover a ativação da cascata de IFN-I, o reconhecimento via sensores citosólicos pode levar a ativação da cascata do inflamassoma. Assim, a expressão dos receptores NLRP3 e NLRP1, da proteína adaptadora ASC, da enzima caspase-1 e das citocinas inflamatórias pró-IL-1 β e pró-IL-18 foi comparada entre células de adultos e RNs. Nossos dados indicam níveis de expressão semelhantes desses alvos em adultos e neonatos.

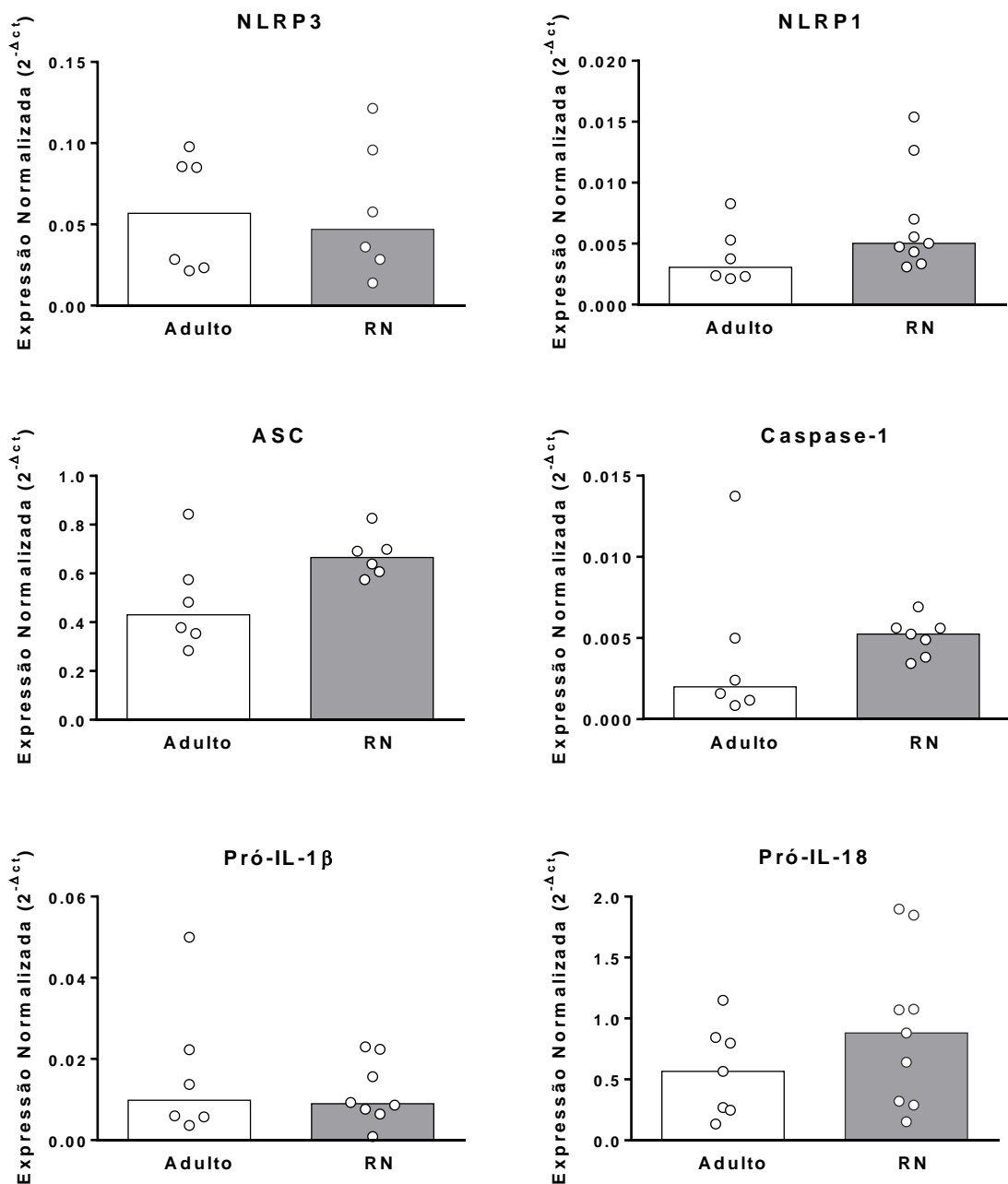


Figura 8. Perfil de expressão gênica constitutiva de componentes da cascata do inflamassoma em macrófagos de adultos e RNs. Comparação da expressão gênica

constitutiva de componentes da cascata do inflamassoma entre MDMs de adultos e RNs por qPCR. N=6-9 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

4.3 Efeito imunomodulador de adjuvantes de IFN-I na expressão gênica

Sabendo que agonistas de receptores de imunidade inata têm sido considerados como uma estratégia para potencializar a resposta imune, nós investigamos o efeito imunomodulador de três agonistas de PRRs que podem ser ativados durante a infecções pelo HIV-1: agonista de TLR7/TLR8 (CL097), STING (3'3'-cGAMP) e TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C). Esses agonistas ativam vias de sinalização para produção de IFN-I e vários trabalhos relatam a capacidade desses imunomoduladores em inibir a replicação viral (Zhou *et al.*, 2010; Campbell e Spector, 2012; Schlaepfer *et al.*, 2014; Surpris *et al.*, 2016).

Inicialmente foi verificada a citotoxicidade dos compostos testados em cultura através do ensaio de viabilidade celular pelo método de LDH. A figura 9 mostra que o tratamento com os agonistas durante 24h não induz morte celular dos macrófagos de adultos e RNs.

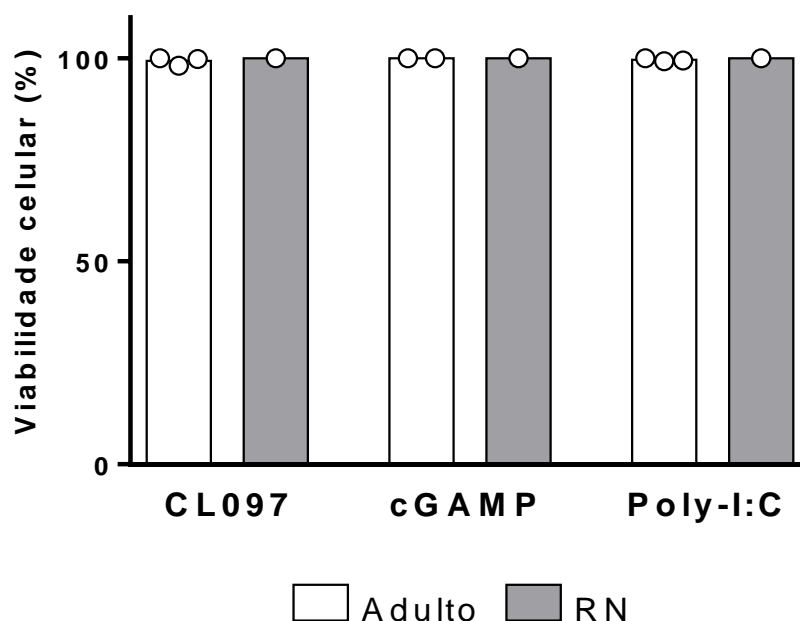


Figura 9. Viabilidade celular dos macrófagos após estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos foram incubados com os adjuvantes de IFN-I e a viabilidade celular foi determinada pela atividade de LDH nos sobrenadantes de cultura após 24h. N=1-3 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

Considerando a alta integridade celular, foi investigado se o tratamento com esses agonistas poderia modular a expressão gênica de sensores citosólicos, fatores antivirais e inflamassomas, considerando o potencial desses adjuvantes em induzir ativação celular e a resposta mediada por IFN-I. Para isso, macrófagos de adultos e RNs foram incubados com os compostos durante 3h e em seguida a expressão gênica foi avaliada por qPCR.

Na figura 10 pode-se observar que o agonista CL097 induz a expressão dos sensores cGAS e RIG-1 em ambos, adultos e RNs. Esse agonista também induz a expressão do sensor de RNA MDA-5 e promove a inibição de IFI16 em células de adultos. Curiosamente, CL097 também foi capaz de inibir a expressão da exonuclease TREX-1 em adultos e RNs.

Nossos dados ainda apontam que o agonista Poly-I:C, induz a expressão dos sensores IFI16 e MDA-5 apenas em células de RNs. Em contrapartida, o ligante de STING, cGAMP, não exerceu nenhum efeito na modulação da expressão desses sensores, exceto por promover aumento na expressão de RIG-1 em RNs. A expressão de AIM2 e STING não foi alterada na presença de nenhum dos adjuvantes.

Esses dados mostram que o composto CL097 é um potencial imunomodulador de componentes de reconhecimento viral.

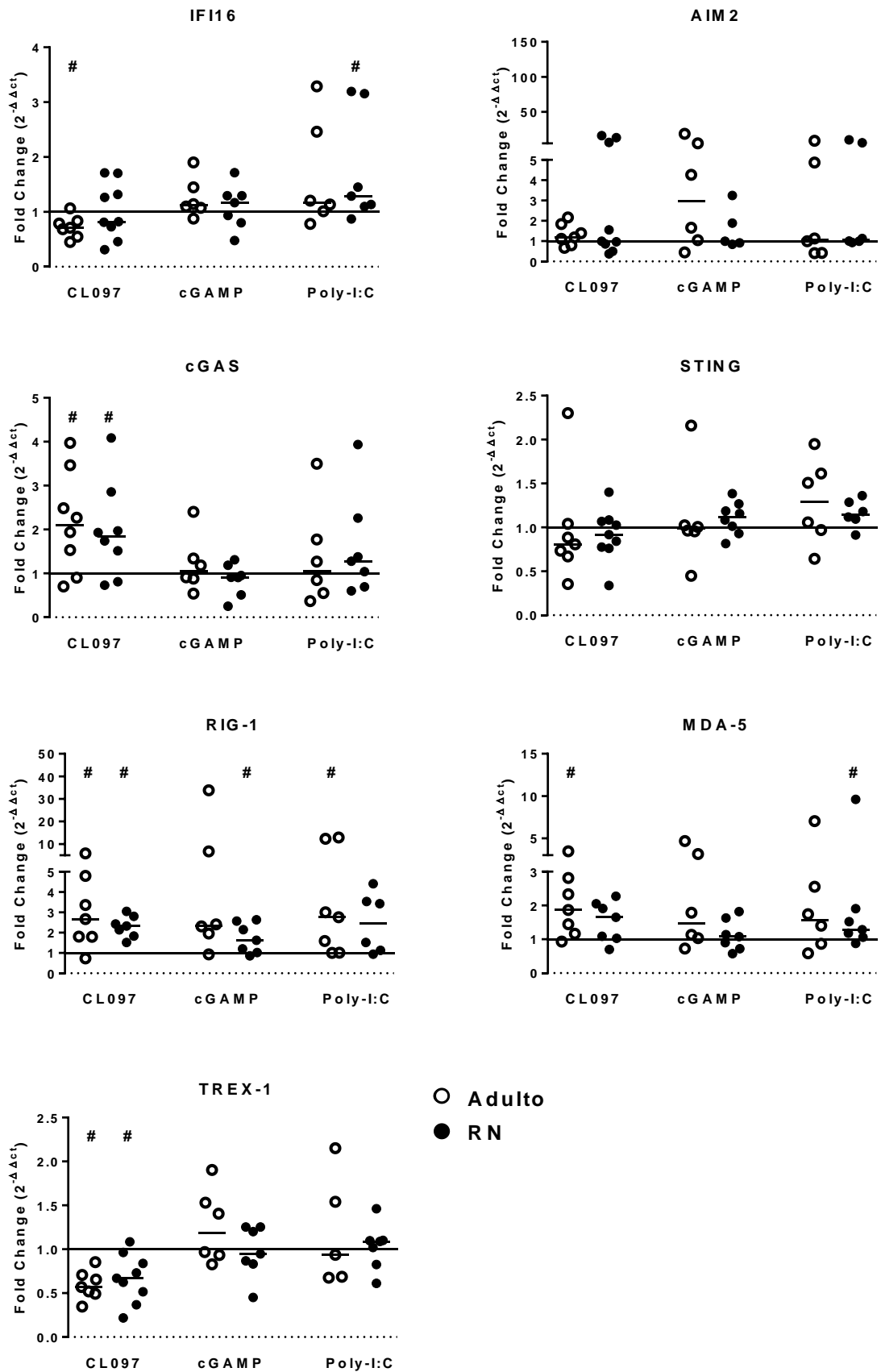


Figura 10. Expressão gênica de sensores citosólicos de DNA e RNA em macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs

foram estimulados com o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 3h e a expressão gênica foi avaliada por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH, em comparação à situação não estimulada. N=5-8 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: #p<0,05 (Estimulado vs. Não estimulado).

Os agonistas também se mostraram capazes de modular a expressão de genes da resposta antiviral. Como esperado, todos os compostos foram eficientes indutores da expressão de IFN- β em adultos e RNs (Figura 11). É possível ainda observar a indução da expressão do fator de restrição viral MxA frente aos estímulos, evidenciando a ativação do estado antiviral em resposta à produção de IFN- β . Curiosamente a expressão do fator de transcrição IRF7 foi induzida apenas em resposta ao estímulo com CL097 e cGAMP em adultos e Poly-I:C em RNs.

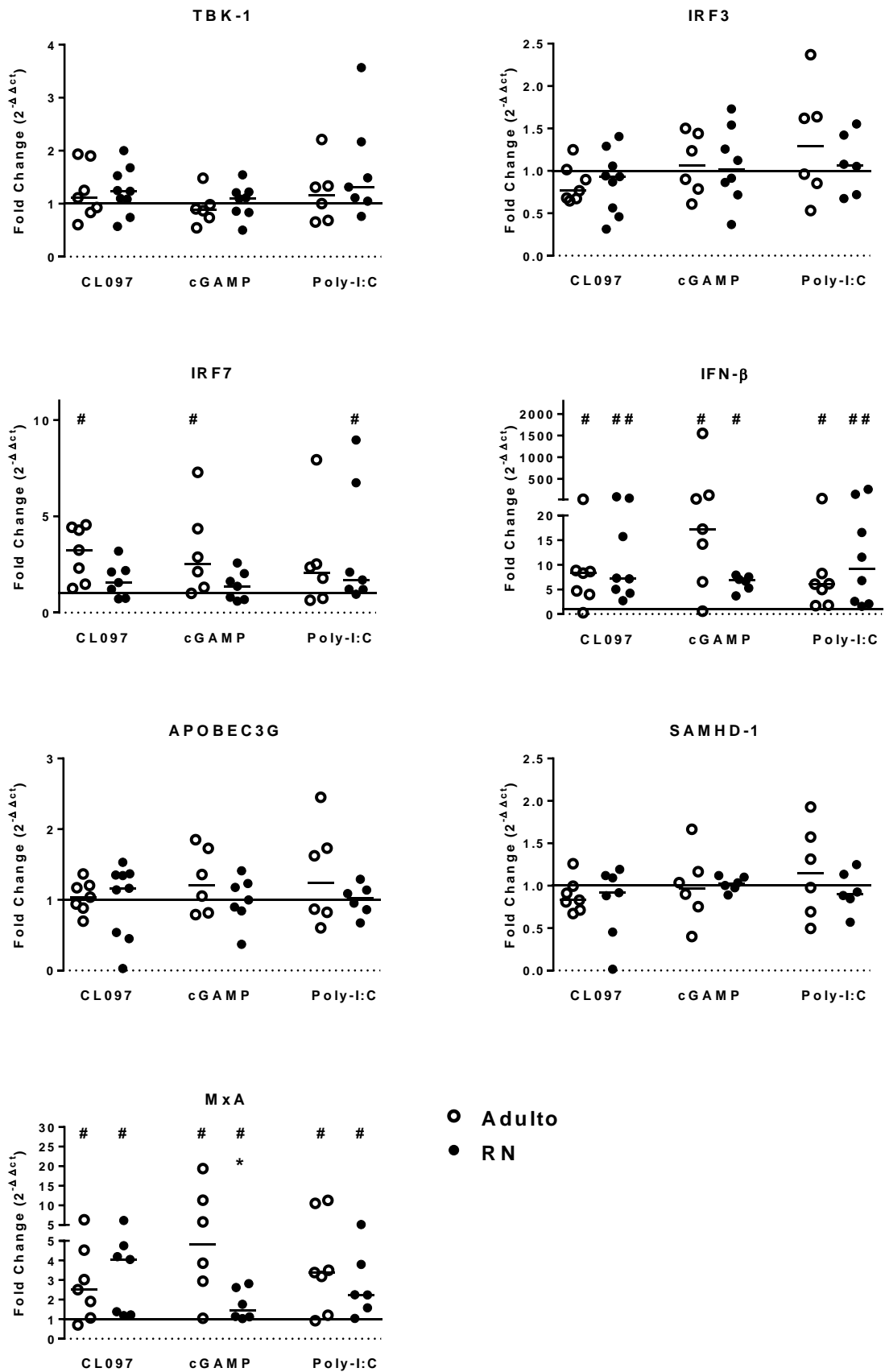


Figura 11. Expressão gênica de componentes da resposta de IFN-I em macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs

foram estimulados com o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 3h e a expressão gênica foi avaliada por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH, e em comparação à situação não estimulada. N=5-9 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (Estimulado vs. Não estimulado). Teste não pareado de Mann Whitney: * $p < 0,05$ (Adulto vs. RN).

Quanto a expressão dos componentes da cascata do inflamassoma, nossos resultados indicam que o CL097 induz a expressão de pró-IL-1 β e pró-IL-18 e do sensor NLRP3 em células de adultos e RNs (Figura 12). Ainda, Poly-I:C também estimula a expressão de pró-IL-1 β em RNs com menor intensidade, enquanto cGAMP não exerceu nenhum efeito na expressão dos alvos envolvidos nessa via.

Esses dados sugerem que CL097 é capaz de fornecer o primeiro sinal para ativação do inflamassoma por promover a indução da expressão de pró-IL-1 β e pró-IL-18.

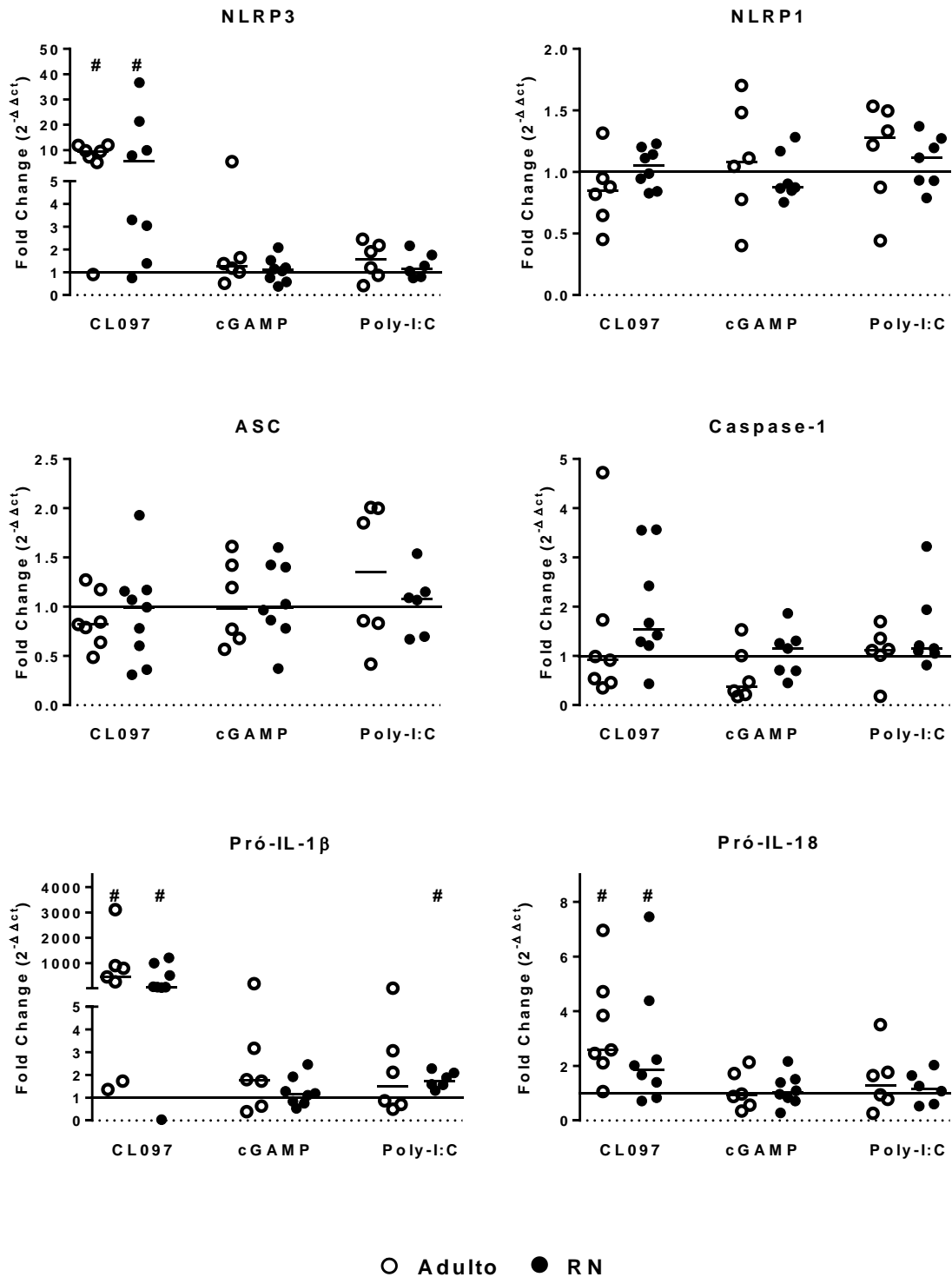


Figura 12. Expressão gênica de componentes da cascata do inflamassoma em macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs foram estimulados com o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 3h e a expressão gênica foi avaliada por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH, e em comparação à situação não estimulada. N=6-7 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: # $p < 0,05$ (Estimulado vs. Não estimulado).

4.4 Produção de citocinas e quimiocinas induzida por agonistas

Para melhor compreender o efeito imunomodulador dos agonistas quanto à ativação celular, a produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante de cultura de macrófagos tratados durante 24h. Foram analisadas as citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β .

A figura 13 mostra que o estímulo com CL097 induz a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β em células de adultos e RNs de maneira bastante eficaz, enquanto Poly-I:C promove apenas uma discreta secreção de TNF- α em células de adulto. Nota-se também que o CL097 induz uma maior produção de IL-1 β em macrófagos de RNs do que em células de adultos. Esses dados mostram que macrófagos de RNs podem desenvolver uma resposta inflamatória mais exacerbada quando estimulados com o agonista CL097.

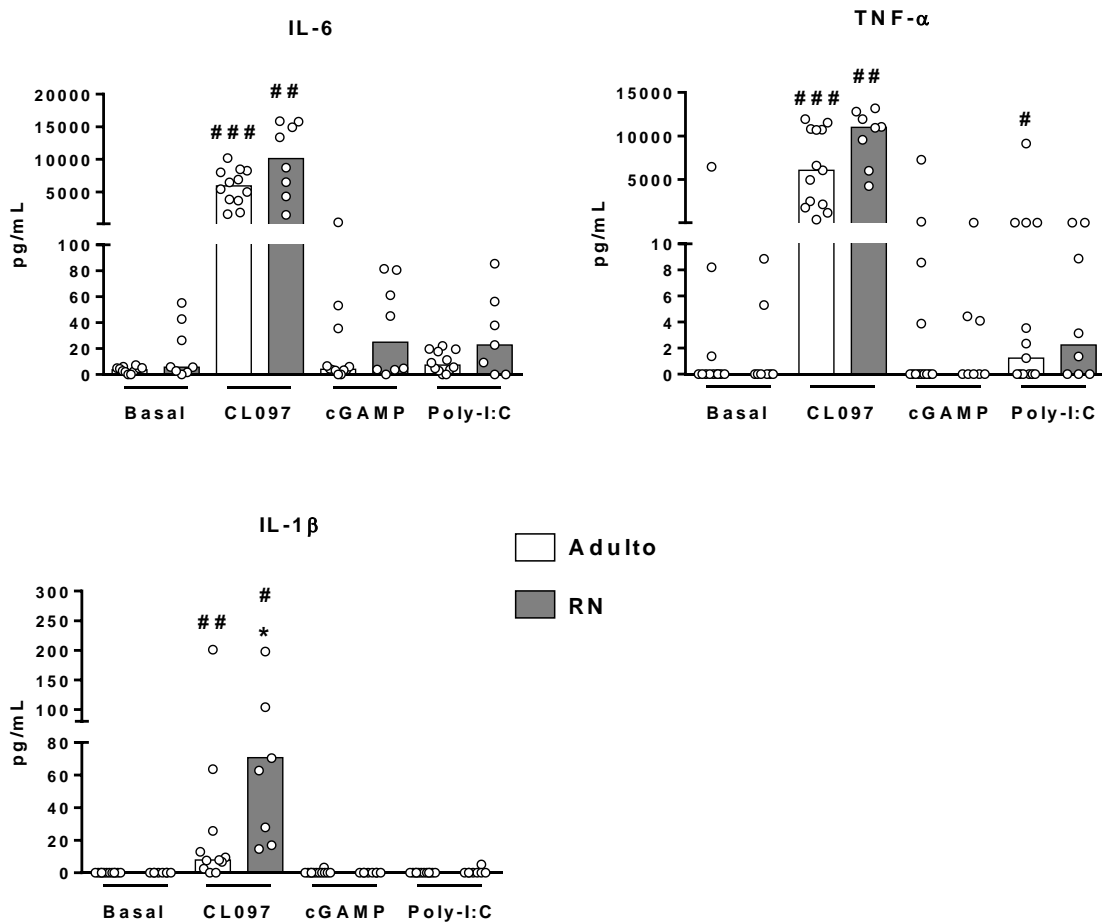


Figura 13. Produção de citocinas inflamatórias por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs foram estimulados com

o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 24h e a produção das citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β foi avaliada no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. N=7-13 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 (Estimulado vs. Não estimulado). Teste não pareado de Mann Whitney: *p<0,05 (Adulto vs. RN).

Além de induzir a produção de citocinas inflamatórias, a ativação via TLR pode promover a produção de β -quimiocinas, como CCL3, CCL4 e CCL5 (Mitchell e Olive, 2010). Tais quimiocinas podem desempenhar um importante papel antiviral na infecção pelo HIV por competir com o co-receptor de entrada, CCR5. Para avaliar o efeito dos adjuvantes de IFN-I na produção dessas quimiocinas, realizamos a quantificação de CCL5 e CCL3 no sobrenadantes das culturas de macrófagos. Na figura 14 é possível observar que CL097 induz a produção de CCL5 e CCL3 em macrófagos de adultos e RNs, enquanto Poly-I:C estimula a produção de CCL3 apenas em RNs mas em menor proporção. Também foi possível verificar que macrófagos de RNs produzem mais CCL5 após o estímulo via TLR7/TLR8 quando comparado com células de adultos.

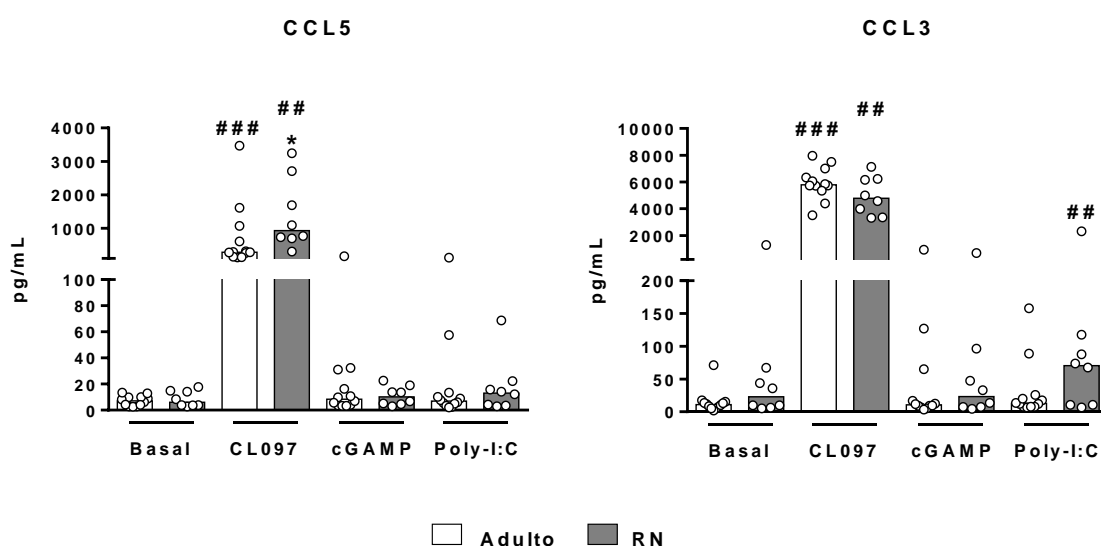


Figura 14. Produção das quimiocinas CCL5 e CCL3 por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs foram estimulados com o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 24h e a produção de CCL5 e CCL3 foi avaliada no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. N=8-12 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: ##p<0,01; ###p<0,001 (Estimulado vs. Não estimulado). Teste não pareado de Mann Whitney: *p<0,05 (Adulto vs. RN).

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que além de induzir a produção de citocinas inflamatórias, CL097 estimula também a produção da citocina reguladora IL-10 em células mononucleares de adultos e RNs (Cardoso *et al.*, 2013). Contudo, o efeito do CL097 na secreção de IL-10 em macrófagos ainda não foi explorado. Dessa forma, investigamos o potencial dos agonistas em induzir essa citocina envolvida na regulação da resposta imune.

A figura 15 mostra que na ausência de estímulo, macrófagos de RNs naturalmente secretam mais IL-10 quando comparados as células de adultos. Ainda, observamos que o tratamento com CL097 e cGAMP promove a secreção de IL-10 em macrófagos de adultos e RNs, enquanto Poly-I:C não teve efeito na produção dessa citocina. Juntos esses dados sugerem que macrófagos de RNs mostram produção constitutiva elevada de IL-10, além de produzirem mais IL-10 em resposta aos agonistas indutores de IFN-I.

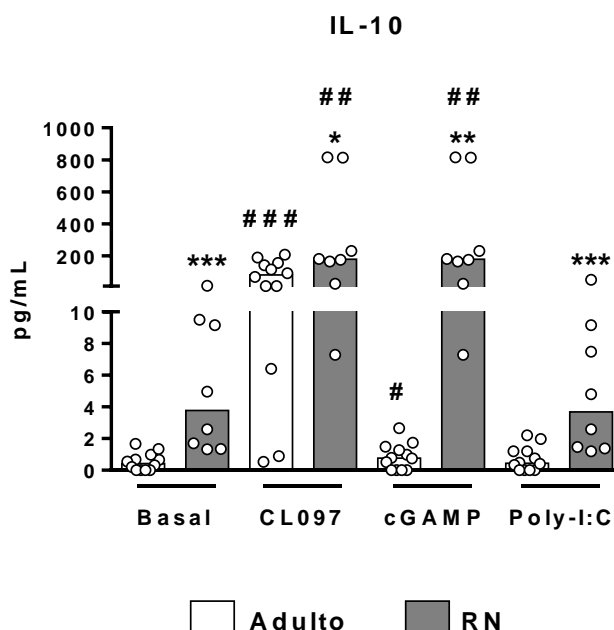


Figura 15. Produção da citocina reguladora IL-10 por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com adjuvantes de IFN-I. Macrófagos de adultos e RNs foram estimulados com o agonista de TLR7/TLR8 (CL097), o ligante de STING (3'3'-cGAMP) e o agonista de TLR3/RIG-I/MDA-5 (Poly-I:C) por 24h e a produção de IL-10 foi avaliada no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. N=8-12 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana. Teste pareado de Wilcoxon: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 (Estimulado vs. Não estimulado). Teste não pareado de Mann Whitney: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (Adulto vs. RN).

4.5 Replicação do HIV-1 em macrófagos de adultos e neonatos

Macrófagos são células alvo do HIV-1 e são resistentes ao efeito citopático do vírus, o que permite sua replicação por longos períodos de tempo (Bergamaschi e Pancino, 2010). Para avaliar a resposta de adultos e neonatos frente a infecção em nosso modelo, foi realizada uma cinética de replicação através da quantificação da proteína p24 no sobrenadante das culturas 5, 10 e 15 dias após a infecção (Figura 16). Nossos dados mostram que o HIV-1 é capaz de se replicar em macrófagos de adultos e RNs, mas há uma maior produção viral em RNs.

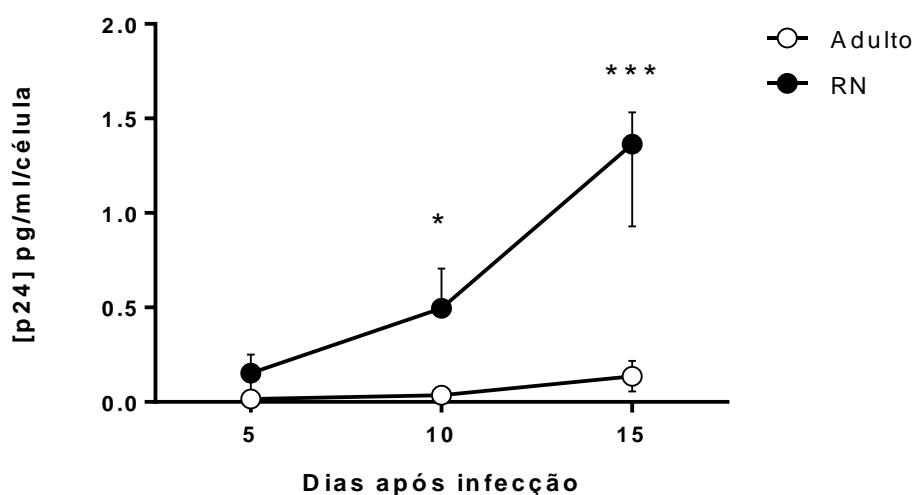


Figura 16. Cinética de replicação viral do HIV-1 em macrófagos de adultos e RNs. Macrófagos de adultos e RNs foram infectados com o vírus HIV-1 NL(AD8) MOI1 e a replicação viral foi avaliada no sobrenadante das culturas pela presença da proteína p24 por ELISA 5, 10 e 15 dias após a infecção. N=2-3 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana com amplitude da concentração de p24 pelo número de células. Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni para as múltiplas comparações: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.6 Inibição da replicação viral por adjuvantes de IFN-I

Efeitos inibitórios na replicação do HIV-1 em macrófagos de adultos têm sido demonstrados a partir da ativação com agonistas de TLRs, como CL097 e Poly-I:C (Zhou *et al.*, 2010; Campbell e Spector, 2012; Schlaepfer *et al.*, 2014). Entretanto, o potencial inibidor dessas moléculas em células de neonatos ainda é desconhecido. Para verificar se as alterações observadas na expressão gênica e produção de citocinas desempenham, de fato, um efeito na replicação viral, os macrófagos de adultos e RNs foram tratados com os agonistas 24h antes de serem infectados com o

HIV-1.

A figura 17 mostra que CL097 reduz eficientemente a carga viral em macrófagos de adultos e RNs. Além disso, o agonista Poly-I:C também parece exercer um efeito inibitório na replicação viral, porém, de maneira mais discreta que CL097, enquanto cGAMP não altera a replicação viral.

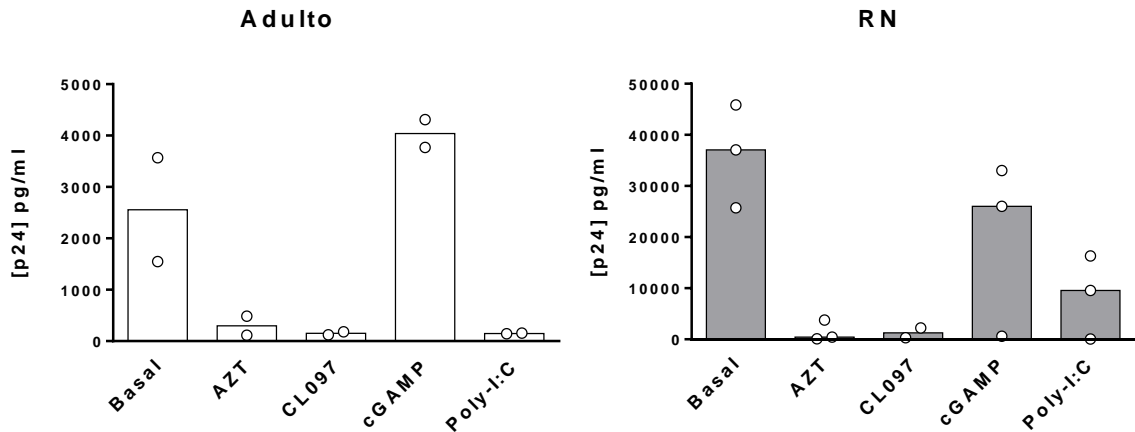


Figura 17. Inibição da replicação viral do HIV-1 em macrófagos de adultos e RNs. Macrófagos de adultos e RNs foram tratados com os adjuvantes de IFN-I por 24h e em seguida infectados com o vírus HIV-1 MOI1. A inibição da replicação viral foi avaliada no sobrenadante das culturas pela produção da proteína p24 por ELISA 10 dias após a infecção. AZT= zidovudina, inibidor da transcriptase reversa. N=2-3 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

Considerando que CL097 foi o agonista mais eficiente em inibir a replicação viral em macrófagos de RNs, nós concentramos esforços em tentar esclarecer os mecanismos pelos quais esse agonista desempenha seu efeito antiviral. Para compreender em qual momento do ciclo viral CL097 estaria atuando, os macrófagos foram tratados com o agonista 24h antes da infecção, no momento da infecção ou imediatamente após o período de incubação com o HIV-1. Os resultados, ainda preliminares, sugerem que o efeito antiviral de CL097 se mantém quando os macrófagos são tratados durante ou após a infecção. No entanto, capacidade de inibição parece ser mais eficaz quando as células são tratadas anteriormente ou no momento da infecção, sugerindo que CL097 estaria atuando nos momentos iniciais do ciclo viral.

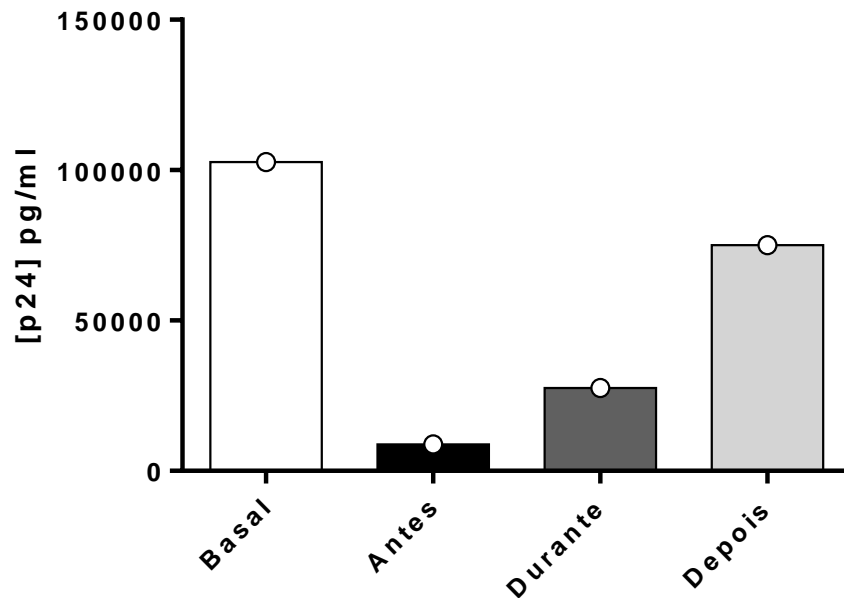


Figura 18. Efeito do agonista de TLR7/TLR8 em diferentes estágios do ciclo viral. Macrófagos de adultos foram tratados com CL097 24h antes da infecção, durante a infecção ou após a incubação com o HIV-1 MO11. A inibição da replicação viral foi avaliada no sobrenadante das culturas pela produção da proteína p24 por ELISA 10 dias após a infecção. Dados de experimento único.

Uma vez que os três agonistas induziram a expressão de IFN- β e do fator antiviral MxA de maneira semelhante, nós atribuímos o efeito inibidor de CL097 à ativação de vias independentes de IFN-I, como a resposta pró-inflamatória e a produção de quimiocinas que impedem a entrada viral, que não foram observadas no tratamento com os outros dois agonistas. Para melhor compreender o mecanismo que possa justificar os dados obtidos até o momento, nós utilizamos inibidores da via do NF- κ B e do inflamassoma nas culturas de macrófagos previamente ao tratamento com CL097. Na figura abaixo podemos observar que a inibição de NF- κ B com TPCA-1 anulou a produção de TNF- α e IL-1 β após o estímulo com CL097. Em contrapartida, o tratamento com o inibidor de caspase, Z-VAD-FMK, reduziu parcialmente a produção de IL-1 β em macrófagos.

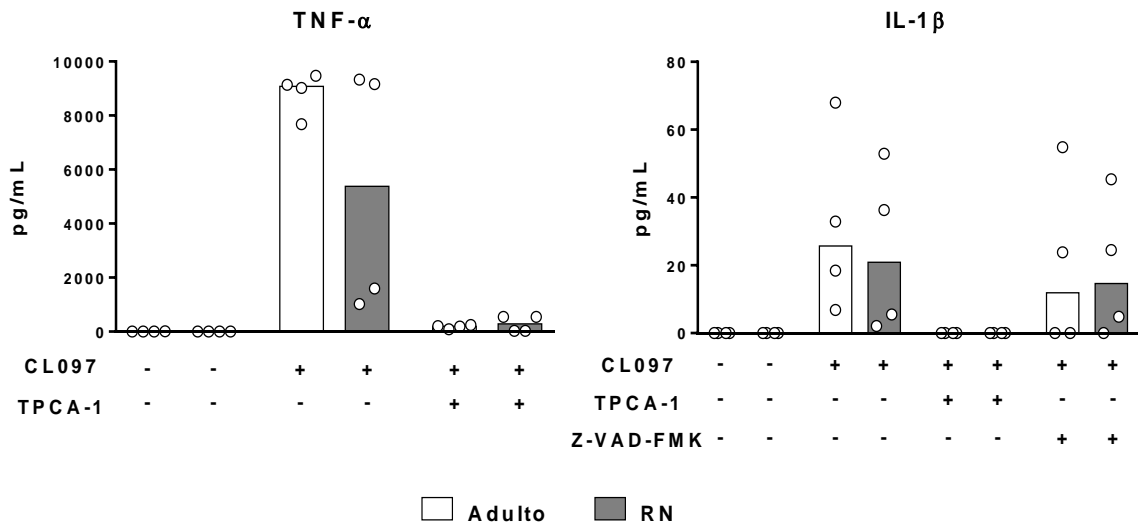


Figura 19. Inibição da resposta inflamatória mediada por CL097 em macrófagos de adultos e RNs. Macrófagos de adultos e RNs foram tratados com o inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M) e inibidor de pan-caspase (Z-VAD-FMK, 10 μ M) duas horas antes da adição de CL097 e produção de TNF- α e IL-1 β foi avaliada no sobrenadante de cultura após 24h por ELISA. N=4 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

Verificamos também se o bloqueio de NF- κ B poderia alterar a produção de quimiocinas que bloqueiam a entrada do HIV-1. Na figura 20 pode-se observar que o tratamento com TPCA-1 previamente ao estímulo com CL097 inibe a produção de CCL5 e CCL3.

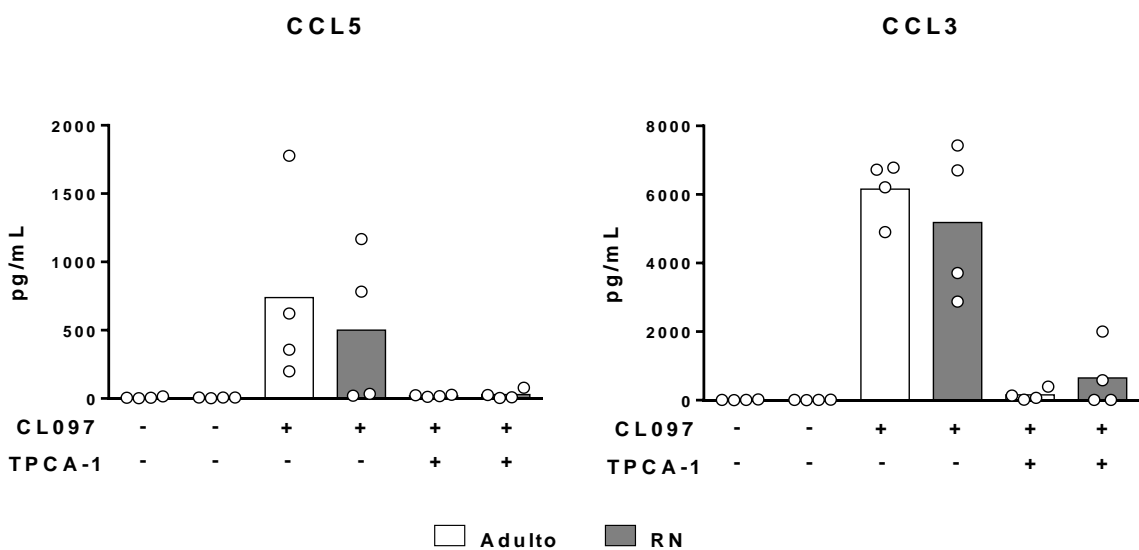


Figura 20. Inibição da produção de quimiocinas mediada por CL097 em macrófagos de adultos e RNs. Macrófagos de adultos e RNs foram tratados com o inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M) duas horas antes da adição de CL097 e produção de CCL5 e CCL3 foi avaliada no

sobrenadante de cultura após 24h por citometria de fluxo. N=4 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

Considerando o efeito inibidor de TPCA-1 na produção de citocinas e quimiocinas e o efeito parcial de Z-VAD-FMK na produção de IL-1 β , avaliamos se o tratamento com esses compostos poderia influenciar no controle da replicação viral em macrófagos tratados com CL097. Verificamos que mesmo na presença de ambos os anti-inflamatórios, CL097 parece continuar exercendo seu potencial inibitório (Figura 21), sugerindo que seu efeito antiviral é decorrente de outra via de ação.

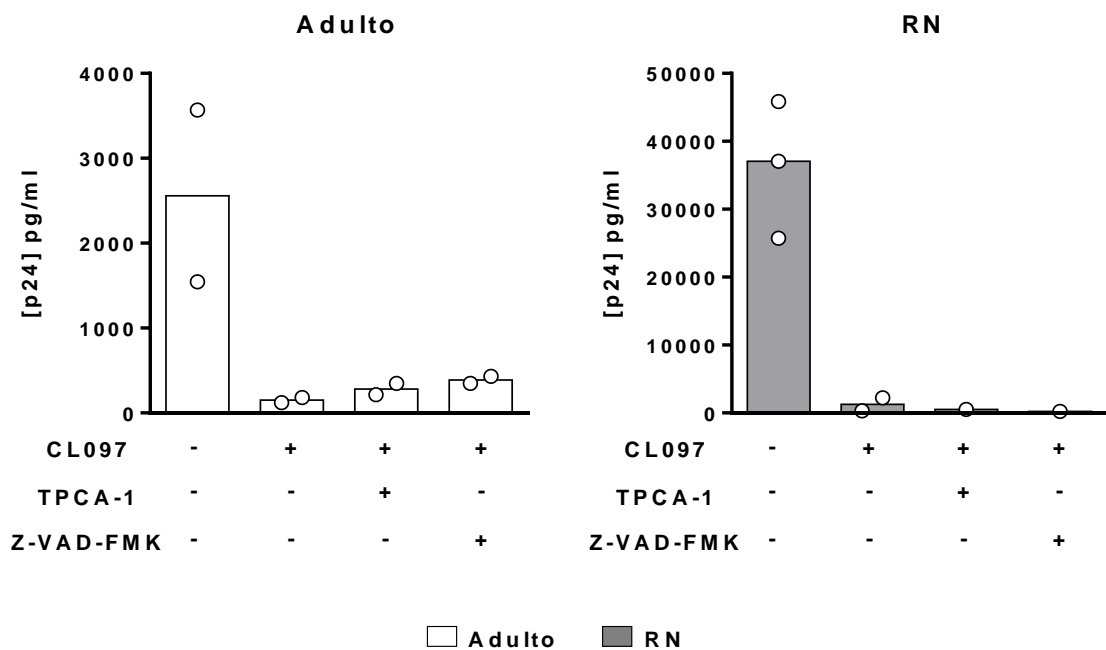


Figura 21. Bloqueio das vias de sinalização do NF- κ B e inflamassoma não afeta o potencial antiviral de CL097. Macrófagos de adultos e RNs foram infectados com o vírus HIV-1 MOI1 após o tratamento com CL097 na presença do inibidor de NF- κ B (TPCA-1, 1 μ M) ou do inibidor de pan-caspase (Z-VAD-FMK, 10 μ M). A replicação viral foi avaliada pela dosagem da proteína p24 no sobrenadante das culturas por ELISA 10 dias após a infecção. N=1-3 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O período neonatal é caracterizado pela maior susceptibilidade a infecções, possivelmente devido à relativa imaturidade imunológica de RNs. Nesse trabalho verificou-se que os macrófagos de RNs, células protagonistas no reconhecimento e defesa inatos, apresentam um perfil fenotípico e, alguns parâmetros funcionais, similares às células de adulto, com potencial de resposta à adjuvantes de IFN-I. No entanto, apesar de responderem de maneira semelhante aos macrófagos de adultos ao estímulo com agonistas de imunidade inata, as células de RNs mostraram maior replicação viral quando infectadas pelo HIV-1, enfatizando que muitos aspectos da imunidade neonatal ainda precisam ser melhor compreendidos.

Em humanos, o perfil fenotípico de macrófagos neonatais ainda é pouco explorado, dada a dificuldade de obtenção dessas células que residem nos tecidos. Entretanto, estudos em camundongos mostraram que macrófagos pulmonares de RNs possuem um perfil mais anti-inflamatório quando comparado a adultos (Eldredge *et al.*, 2016). Para melhor compreender as características desse tipo celular no início da vida, nós utilizamos uma abordagem *in vitro*, trabalhando com macrófagos gerados a partir de monócitos isolados de sangue de cordão umbilical. Inicialmente nós comparamos a expressão de marcadores de macrófagos M1 e M2 em adultos e neonatos e verificamos um perfil fenotípico bastante semelhante entre os grupos, caracterizado pela predominância do marcador anti-inflamatório CD206 (Stein *et al.*, 1992; Mosser e Edwards, 2008). Esses achados sugerem que não há diferença fenotípica quanto aos marcadores de subpopulações de macrófagos em células de adultos e neonatos avaliadas *in vitro*, e que nesse modelo ambos os grupos de estudo apresentam um perfil mais anti-inflamatório.

Embora os marcadores de superfície estejam igualmente distribuídos entre os macrófagos de adultos e RNs humanos, possíveis diferenças entre esses grupos podem ocorrer à nível funcional. Foi observada uma maior produção constitutiva da citocina reguladora IL-10 em macrófagos de RNs, sugerindo a predominância de um perfil anti-inflamatório. De fato, tem sido relatado que a secreção de IL-10 pode ser maior em células de RNs do que em adultos (Kollmann *et al.*, 2009). Uma hipótese para explicar esse fenômeno é que macrófagos de RNs podem estar contribuindo com a manutenção de um ambiente supressor necessário para promover a tolerância aos aloantígenos do feto na gestação.

Na infecção *in vitro* pelo HIV-1, foi verificado que macrófagos com perfil M2 são mais infectados do que os macrófagos M1 quando expostos ao vírus *in vitro* (Robinson *et al.*, 2017), sugerindo que o fenótipo dessas células pode exercer um impacto significativo no curso da infecção (Cassol *et al.*, 2013; Schlaepfer *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que macrófagos M1 tem menor expressão de CD4 e maior produção das quimiocinas ligantes de CCR5 (CCL3, CCL4 e CCL5), o que contribui com a inibição dos estágios iniciais da infecção (Cassol *et al.*, 2009). Em contrapartida, IL-10, citocina associada a macrófagos M2, induz a expressão de CD4 e CCR5 nesse tipo celular (Porcheray *et al.*, 2006). Esses achados, associados à maior produção de IL-10 por macrófagos neonatais, ajudam a justificar a maior replicação do HIV-1 observada em RNs (Figura 16).

Além da análise fenotípica dos macrófagos de RNs nós avaliamos o perfil dessa população celular quanto à expressão de moléculas envolvidas na resposta imune inata. A análise constitutiva da expressão gênica de sensores citosólicos de DNA e RNA, mostrou que os macrófagos de RNs são similares as células de adultos para os alvos avaliados. De fato, em trabalhos anteriores foi evidenciado que em células mononucleares de cordão umbilical a expressão de sensores citosólicos e componentes das via de IFN-I são semelhantes a de células mononucleares de adultos (Wang, Z. S. *et al.*, 2017). No entanto, esse mesmo estudo verificou uma menor expressão de cGAS e STING em células de neonatos, que pode ser associada à maior susceptibilidade desses indivíduos a infecções virais. Em nosso trabalho, evidenciamos que a imaturidade imunológica do RN depende da população de estudo, considerando que os macrófagos mostraram níveis semelhantes de expressão de moléculas citosólicas de reconhecimento em adultos e RNs. Assim, à nível transcricional, os macrófagos são imunocompetentes durante esse período da vida, diferente do que esperávamos inicialmente.

Quando avaliada a expressão dos componentes da via de IFN-I, verificamos que os níveis de transcrito das moléculas de sinalização também são expressos de maneira semelhante entre os grupos, corroborando com dados da literatura em células mononucleares de RNs (Wang, Z. S. *et al.*, 2017). No entanto, observamos uma menor expressão do fator antiviral MxA em macrófagos neonatais (Figura 7). É possível que a reduzida expressão de MxA possa ter um impacto direto na elevada susceptibilidade dos neonatos à diversas infecções virais e na maior taxa de replicação viral que observamos quando são infectados *in vitro* com HIV-1 (Figura 16).

Uma maior replicação do HIV em células neonatais já foi relatada anteriormente na literatura (Ho *et al.*, 1992; Sundaravaradan *et al.*, 2006). De acordo com Sundaravaradan e colaboradores (2006), esse evento não está associado à expressão diferenciada de receptores de entrada (CD4, CXCR4 e CCR5) ou diferentes quantidades de material genômico retrotranscrito no citoplasma, mas sim à uma maior expressão gênica das proteínas virais. Posteriormente foi verificado que em macrófagos e linfócitos T CD4⁺ de RNs a integração do material genético viral ocorre em regiões do genoma transcricionalmente mais ativas, justificando a maior taxa de replicação do vírus. Outro fator contribuinte pode ser a maior expressão de NF- κ B e STAT3, moléculas que auxiliam na regulação da replicação do HIV-1, em células mononucleares de cordão umbilical (Sundaravaradan *et al.*, 2010). Apesar desses relatos, nossos dados evidenciam que a maior replicação do HIV-1 em macrófagos de RNs pode também ser consequência de uma menor expressão de componentes chaves para o desenvolvimento da resposta antiviral, como MxA. Além disto, é possível que o perfil anti-inflamatório dos macrófagos dos RNs, evidenciado pela secreção de IL-10, promova uma maior ativação de STAT3 e favoreça a transcrição de genes do HIV-1 pela ligação desse fator de transcrição à região LTR do genoma viral integrado (Kohler *et al.*, 2003; Koscsó *et al.*, 2013).

A imunomodulação com agonistas inatos pode ser uma alternativa para potencializar a resposta de RNs, mas que ainda não foi explorada em macrófagos. Para tal, selecionamos três adjuvantes de IFN-I: CL097 (TLR7/TLR8), cGAMP (STING) e Poly-I:C (TLR3/RIG/MDA5). A indução de IFN- β e de MxA pelos três agonistas em ambos os grupos sugere que macrófagos de RNs são capazes de desenvolver uma resposta antiviral eficaz e comparável à de células de adultos. Adicionalmente, o aumento de IRF7 indica que a produção de IFN- β possivelmente se deve à maior disponibilidade desse fator de transcrição (Honda *et al.*, 2005; Ning *et al.*, 2011).

Embora os três agonistas sejam capazes de induzir uma resposta de IFN-I, CL097 modulou a expressão de um maior número de alvos quando comparado a cGAMP e Poly-I:C. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que o estímulo com CL097 promove a produção de IFN- α em PBMCs de adultos, mas esse mesmo efeito não é observado com o agonista de TLR7 (Imiquimod) ou Poly-I:C, sugerindo que a ativação simultânea de TLR7 e TLR8 pode potencializar o desenvolvimento de resposta antiviral (Domingues *et al.*, 2015).

A indução da expressão dos sensores RIG-1 e cGAS em adultos e RNs indica que CL097 tem um papel importante na indução de ISGs, como esses receptores. Outros trabalhos já evidenciaram que RIG-I desempenha um papel importante no reconhecimento de material genético do HIV-1 e indução da resposta antiviral (Solis *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016). Além disso, cGAS também é crítico para o desenvolvimento de resposta imune contra o HIV-1, uma vez que sua ausência diminui a expressão de ISGs após a infecção (Gao *et al.*, 2013). Esses resultados evidenciam que CL097 pode atuar potencializando o reconhecimento viral.

No entanto, chama a atenção o fato de CL097 inibir a expressão de IFI16 em macrófagos de adultos (Figura 10). Assim como cGAS, esse sensor parece promover o reconhecimento de material genético retrotranscrito após a infecção pelo HIV-1 (Jakobsen *et al.*, 2013; Jønsson *et al.*, 2017). Contudo, apesar da inibição de IFI16, o tratamento com CL097 previamente à infecção pelo HIV-1 reduz a replicação viral tanto em adultos quanto em RNs (Figura 17), sugerindo a indução da expressão de cGAS e RIG-I pode compensar a inibição de IFI16 em macrófagos de adultos.

Associado a esses dados, soma-se o efeito do CL097 em inibir a expressão da exonuclease TREX-1 em ambos os grupos. Curiosamente esses resultados confrontam trabalhos já publicados que afirmam que o tratamento com agonistas de TLRs induz aumento na expressão de TREX-1 via produção de IFN-I e ativação do receptor IFNRA em DCs de camundongos (Xu *et al.*, 2014). Dessa forma, nossos dados apontam que a regulação da expressão dessa exonuclease ainda precisa ser melhor esclarecida. Juntos esses resultados sugerem que CL097 atua favorecendo o reconhecimento viral em macrófagos não apenas por induzir moléculas de reconhecimento, mas também por prevenir a degradação do material genético exógeno a ser reconhecido.

Além da resposta antiviral mediada por IFN-I, outras vias de sinalização da resposta imune inata contribuem no combate a infecções virais. Os inflamassomas são complexos proteicos multiméricos que orquestram mecanismos de defesa contra agente infecciosos, incluindo vírus. Nossos resultados indicam que CL097 foi o único agonista a induzir a expressão de componentes do inflamassoma, levando à expressão de NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18, tanto em adultos quanto em RNs. A transcrição desses genes é dependente da sinalização de NF- κ B e caracteriza o primeiro sinal para a ativação do complexo do inflamassoma (Bauernfeind *et al.*, 2009; Lamkanfi e Dixit, 2014). O reconhecimento de PAMPs por PRRs, tanto de superfície

quanto citosólico, aciona vias de sinalização que culminam na ativação de NF- κ B (Kawai e Akira, 2007). No caso dos receptores TLR7/TLR8 essa ativação ocorre por meio da proteína adaptadora MyD88 (Deguine e Barton, 2014; Kawasaki e Kawai, 2014). Esses achados parecem ser um indicativo de que, nas concentrações utilizadas nesse trabalho, cGAMP e Poly-I:C não ativam NF- κ B, embora promovam a transcrição de IFN- β (Figura 11) (Doyle *et al.*, 2002; Seth *et al.*, 2005; Tanaka e Chen, 2012).

A secreção de IL-1 β por macrófagos de adultos e RNs após o estímulo com CL097 reforça a ideia de que esse agonista esteja promovendo a ativação do complexo do inflamassoma em macrófagos humanos. Muitos estudos mostram que a liberação de IL-1 β em macrófagos é dependente da ativação dessa via (Wewers e Herzyk, 1989; Herzyk *et al.*, 1992; Netea *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrado que os agonistas de TLR7, imiquimode e CL097, são capazes de promover o segundo sinal para ativação da cascata do inflamassoma NLRP3 pela produção de espécies reativas de oxigênio em DCs (Groß *et al.*, 2016). Nossos dados sugerem, portanto, que CL097 promove o primeiro sinal de ativação do inflamassoma, induzindo a expressão de NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Figura 12) e, concomitantemente, fornece um segundo sinal para a ativação de caspase-1 via NLRP3 em ambos, adultos e RNs.

O inflamassoma NLRP3 parece exercer um papel importante na infecção pelo HIV-1, uma vez que polimorfismos nesse gene estão associadas à maior susceptibilidade à infecção (Pontillo *et al.*, 2010). A ativação do inflamassoma em modelos experimentais de infecção por CMV contribui com a resposta de células NK e secreção de IFN- γ através da ativação por IL-18 (Rathinam *et al.*, 2010). Portanto, nossos resultados sugerem que CL097 pode desempenhar um papel crucial na infecção pelo HIV-1 *in vivo*, por promover a ativação da cascata do inflamassoma.

Ainda, a ativação de caspase-1 pela via do inflamassoma e consequente indução da piroptose tem sido associada à depleção de linfócitos T CD4⁺ quiescentes e progressão para aids em indivíduos infectados pelo HIV (Doitsh *et al.*, 2014; Monroe *et al.*, 2014). No caso dos macrófagos, a morte celular por piroptose poderia contribuir com a eliminação de reservatórios virais. Entretanto, nossos dados mostram que embora CL097 promova a secreção de IL-1 β , o tratamento com esse agonista não altera a viabilidade celular (Figura 9), sugerindo que a piroptose não está sendo induzida.

CL097 foi também eficaz em promover a produção de outras citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- κ B em macrófagos de adultos e RNs, como IL-6 e TNF- α (Figura 13), enfatizando o potencial inflamatório desse agonista. Nós verificamos uma produção similar de IL-6 e TNF- α em adultos e RNs na presença de CL097, enquanto macrófagos neonatais produziram mais IL-1 β . Esses achados corroboram com trabalhos anteriores que apontam que monócitos, DC convencionais e pDC de RNs, possuem uma produção equivalente ou até mesmo maior de IL-1 β , IL-6, IL-23 e IL-10 em resposta a agonistas de TLR quando comparadas com células de adultos (Kollmann *et al.*, 2009). Adicionalmente, em DCs de sangue periférico de mães infectadas por HIV e RNs expostos ao vírus, CL097 foi capaz de estimular a produção de TNF- α de maneira semelhante (Cardoso *et al.*, 2013). Ainda, o estímulo com o agonista de TLR7/TLR8, R-848, é capaz de promover a produção de TNF- α em monócitos de RNs com a mesma intensidade e eficiência que monócitos de adultos, mas esse mesmo efeito não é observado para outros agonistas de TLR (Levy *et al.*, 2004; Philbin *et al.*, 2012). Portanto, CL097 ativa células de RNs de maneira semelhante ou, no caso de IL-1 β , até mais intensa do que células de adultos, sugerindo que macrófagos neonatais podem exibir um perfil mais pró-inflamatório quando estimulados *in vitro*.

Embora tenha sido relatado que TNF- α e IL-6 ativam a replicação viral em células infectadas pelo HIV-1 pela indução de NF- κ B (Duh *et al.*, 1989; Osborn *et al.*, 1989; Poli *et al.*, 1990; Zaitseva *et al.*, 2000), TNF- α parece ter um efeito oposto em células que estão tendo contato com o vírus pela primeira vez. TNF- α inibe a replicação do HIV-1 em monócitos de sangue periférico e macrófagos por diminuir a expressão de CCR5 e induzir a expressão de CCL5 (Herbein *et al.*, 1996; Di Marzio *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento de macrófagos com TNF- α retarda a detecção de regiões de repetição longa (LTRs) do DNA do HIV-1, reforçando o papel dessa citocina na inibição da entrada viral (Herbein *et al.*, 1996).

Adicionalmente, observamos que CL097 também promove a produção de CCL3 e CCL5, sendo esta última com produção mais elevada em células de RNs. Essas quimiocinas bloqueiam a entrada do HIV-1 nas células alvo por competir com o co-receptor de entrada do vírus (Berger *et al.*, 1999; Cassol *et al.*, 2009; Mitchell e Olive, 2010). Esses achados tornam o CL097 um agonista ainda mais promissor no combate à infecção pelo HIV-1, pois além de potencializar o sistema de reconhecimento e combate à infecção, ele pode atuar impedindo a entrada viral.

Além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, o CL097 estimulou a secreção da citocina reguladora IL-10, provavelmente como mecanismo de controle da ativação celular. Em trabalhos prévios do nosso grupo, observamos esse mesmo efeito do CL097 em células mononucleares de adultos e RNs (Cardoso *et al.*, 2013). Dessa forma, apesar da hiperresponsividade dos macrófagos de RNs ao CL097 quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias, há consequente indução da regulação imune, indicando que o CL097 seja um adjuvante em potencial para o uso de terapias que requerem a ativação da resposta imune sem promover efeitos inflamatórios exacerbados.

A capacidade de agonistas de TLRs em prevenir a replicação do HIV-1 já foi demonstrada em outros trabalhos, mas o efeito antiviral desses agonistas em células neonatais ainda não foi verificado (Schlaepfer *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, a avaliação do potencial antiviral dos adjuvantes de IFN-I na infecção pelo HIV-1 mostra que o tratamento com CL097 previamente à infecção reduz de maneira eficaz a carga viral em macrófagos de adultos e RNs, corroborando com estudos anteriores (Campbell e Spector, 2012). Esse fenômeno também foi observado quando as células foram tratadas durante ou após a infecção, porém, em menor escala, sugerindo que CL097 atua bloqueando principalmente os estágios iniciais do ciclo viral. Curiosamente, o efeito antiviral de Poly-I:C, descrito em diversos trabalhos (Trapp *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013), foi parcialmente observado em macrófagos de RNs. Como os três agonistas foram capazes de induzir a expressão de genes da resposta antiviral (Figura 11), a ausência de efeito após o tratamento com cGAMP e a resposta parcial de Poly-I:C em RNs, mostram que a ativação de IFN-I por si só não é suficiente para o controle da infecção pelo HIV-1 em macrófagos.

Considerando que o CL097 foi o agonista mais eficaz em prevenir a entrada e/ou a replicação do HIV-1 em macrófagos, passamos a investigar se seu efeito antiviral poderia ser decorrente de vias de sinalização independente de IFN-I.

A adição do inibidor de pan-capase, Z-VAD-FMK, às culturas bloqueia a ativação das vias canônica e não-canônica do inflamassoma. Apesar da redução parcial da liberação de IL-1 β mediada por CL097 na presença de Z-VAD-FMK, o bloqueio dessa via não parece ter influenciado na replicação do HIV-1 (Figura 21).

Já o bloqueio de NF- κ B nas células tratadas com CL097 pelo inibidor de IKK2, TPCA-1, foi capaz de diminuir a produção de IL-1 β e TNF- α , sugerindo a inibição da resposta inflamatória, incluindo o inflamassoma, em células de adultos e RNs. Esse

mesmo inibidor bloqueou também a produção de CCL5 e CCL3 induzidas por CL097. Entretanto, a condição de bloqueio de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas não alterou a replicação viral, indicando que a ação antiviral do CL097 não se deve ao bloqueio dos receptores de entrada pelas quimiocinas ou ao estado inflamatório das células.

Um achado curioso que pode estar associado ao mecanismo de ação antiviral de CL097 e que ainda precisa ser melhor compreendido nesse trabalho é a inibição de TREX-1 após o tratamento com o agonista. Na infecção pelo HIV-1, TREX-1 reconhece o DNA viral formado após a transcrição reversa e promove sua degradação, prejudicando o reconhecimento por sensores presentes no citosol e a resposta antiviral (Yan *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que o silenciamento de TREX-1 induz a produção de IFN-I e diminui a infecção pelo HIV-1 em explantes cervicovaginais humanos e em camundongos humanizados (Wheeler *et al.*, 2016). Além disso, células depletadas de TREX-1 controlam a infecção pelo vírus da estomatite vesicular, influenza, vírus Sendai e vírus do oeste do Nilo, devido à maior expressão de diversos ISGs, dentre eles, IFIT1, IFIT3, ISG15 e USP18 (Hasan *et al.*, 2013). Essa ativação do estado antiviral parece ser dependente da via STING-TBK1-IRF3/IRF7 mas independe de IFN-I. A ausência de TREX-1 também está relacionada à biogênese de compartimentos lisossomais, mas não de autolisossomos, embora haja redução da atividade de mTORC1 em células que não expressam TREX-1 (Hasan *et al.*, 2013). Nesse contexto, a modulação negativa de TREX-1 pela ativação por CL097 pode favorecer o desenvolvimento da resposta contra o HIV-1, podendo ser o potencial mecanismo pelo qual CL097 esteja desempenhando sua atividade antiviral.

Além disso, tem sido demonstrado que o reconhecimento do HIV-1 via TLR8 ativa a via da autofagia em macrófagos, a qual promove a degradação de componentes virais no autofagolisossomo e diminui a replicação viral (Campbell *et al.*, 2015). No entanto, o HIV desenvolveu mecanismos para bloquear a degradação autofágica pela ligação da proteína Nef à BECN1, indicando um importante papel dessa via no controle da replicação viral (Kyei *et al.*, 2009). A utilização de indutores de autofagia, contudo, pode sobrepor esse bloqueio e promover a inibição viral (Campbell e Spector, 2011; 2012). Em outros trabalhos, o tratamento de macrófagos de adultos com agonistas de TLR8, como CL097 e ssRNA40, foi capaz de inibir a replicação do HIV-1 pela ativação da autofagia por um mecanismo dependente de

vitamina D (Campbell e Spector, 2012). Dessa forma, o tratamento com CL097 previamente à infecção pode estar induzindo a ativação da via da autofagia em macrófagos de adultos e RNs, o que justificaria a redução da replicação viral.

Apesar do mecanismo de ação pelo qual CL097 desempenha seu efeito antiviral não ter sido elucidado, nosso trabalho mostra que esse agonista modula a resposta de macrófagos de adultos e RNs em diversos aspectos, devendo ser considerado como um potencial agente terapêutico para potencializar a resposta imune neonatal. No entanto, uma desvantagem de estimular a resposta imune através da ativação via TLRs é a geração de resposta inflamatória exacerbada, podendo causar dano tecidual ou autoimunidade. Assim, esse processo de ativação imune deve ser precisamente regulado para evitar efeitos indesejados. Em nosso trabalho, vimos que além de um eficaz modulador imune e indutor da resposta antiviral, CL097 também promove uma regulação da ativação celular pela produção de IL-10.

Ainda nesse contexto, estratégias para auxiliar na entrega de antígenos e agonistas inatos para APCs têm sido estudadas afim de potencializar a resposta vacinal de RNs. O uso de nanopartículas carreadoras de agonistas de TLRs se mostrou eficaz em potencializar a resposta de DCs neonatais e reduzir efeitos inflamatórios sistêmicos desses compostos por promover a ativação de células alvo específicas (Dowling *et al.*, 2017). Tal abordagem pode ser futuramente explorada para potencializar a resposta de macrófagos neonatais pelo estímulo com CL097.

Adicionalmente, considerando a emergente necessidade de eliminação de reservatórios virais para a cura da infecção pelo HIV-1, se faz necessária a busca de estratégias indutoras de resposta antiviral do hospedeiro. Dessa forma, nosso trabalho sugere que o agonista CL097 é um antiviral promissor no combate a infecção pelo HIV-1 em reservatórios virais não apenas de adultos, mas também de RNs.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ❖ Macrófagos de RNs mostram um perfil fenotípico anti-inflamatório e de secreção de IL-10, e são semelhantes aos macrófagos de adultos quanto à expressão de componentes da imunidade inata. No entanto, os macrófagos neonatais mostram maior capacidade replicativa do HIV-1 quando infectados *in vitro*;
- ❖ O tratamento com o agonista de TLR7/TLR8, CL097, induz a resposta de IFN-I, além de promover a produção de β -quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, bem como, da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos de adultos e RNs;
- ❖ CL097 inibe a replicação do HIV-1 em macrófagos e seu efeito antiviral parece não depender da ativação de NF- κ B, mas sim da modulação da expressão de fatores inatos;
- ❖ CL097 mostra um potencial terapêutico relevante como adjuvante da resposta neonatal.

REFERÊNCIAS*

ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 553-64, 07 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229474> >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

AKSOY, E. et al. Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2887-93, Apr 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17138826> >.

AVALOS, C. R. et al. Brain Macrophages in Simian Immunodeficiency Virus-Infected, Antiretroviral-Suppressed Macaques: a Functional Latent Reservoir. **MBio**, v. 8, n. 4, 08 2017. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811349> >.

BADOLATO, R. et al. Type I interferon-dependent gene MxA in perinatal HIV-infected patients under antiretroviral therapy as marker for therapy failure and blood plasmacytoid dendritic cells depletion. **J Transl Med**, v. 6, p. 49, Sep 2008. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782441> >.

BANERJEE, I. et al. Control of type I interferon responses by the AIM2 inflammasome. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1 Supplement, 2017.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 787-91, Jul 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570822> >.

BAXTER, A. E. et al. Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 6, p. 711-21, Dec 2014. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467409> >.

BERGAMASCHI, A.; PANCINO, G. Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. **Retrovirology**, v. 7, p. 31, Apr 2010. ISSN 1742-4690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374633> >.

BERGAMINI, A. et al. Increased CD4 and CCR5 expression and human immunodeficiency virus type 1 entry in CD40 ligand-stimulated macrophages. **J Infect Dis**, v. 185, n. 11, p. 1567-77, Jun 2002. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023762> >.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358771> >.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BERGHÄLL, H. et al. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2138-44, Jul 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782388> >.

BOEHME, K. W.; GUERRERO, M.; COMPTON, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7094-102, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082626> >.

BOT, A. et al. Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. **Int Immunol**, v. 9, n. 11, p. 1641-50, Nov 1997. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9418125> >.

BRAND, S. et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289, n. 5, p. G960-8, Nov 2005. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051921> >.

BUNDERS, M. J. et al. Memory CD4(+)CCR5(+) T cells are abundantly present in the gut of newborn infants to facilitate mother-to-child transmission of HIV-1. **Blood**, v. 120, n. 22, p. 4383-90, Nov 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033270> >.

CAMPBELL, G. R. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1005018, Jun 2015. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26115100> >.

CAMPBELL, G. R.; SPECTOR, S. A. Hormonally active vitamin D3 (1alpha,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. **J Biol Chem**, v. 286, n. 21, p. 18890-902, May 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454634> >.

_____. Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 11, p. e1003017, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166493> >.

CARDOSO, E. C. et al. TLR7/TLR8 Activation Restores Defective Cytokine Secretion by Myeloid Dendritic Cells but Not by Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-Infected Pregnant Women and Newborns. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67036, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826189> >.

CARMICHAEL, C. Prevention and treatment of common HIV-associated opportunistic complications. **Prim Care**, v. 24, n. 3, p. 561-74, Sep 1997. ISSN 0095-4543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271692> >.

CASSOL, E. et al. M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. **J Immunol**, v. 182, n. 10, p. 6237-46, May 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414777> >.

_____. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin mediates HIV-1 infection of and transmission by M2a-polarized macrophages in vitro. **AIDS**, v. 27, n. 5, p. 707-16, Mar 2013. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211775> >.

CHEN, I. Y.; ICHINOHE, T. Response of host inflammasomes to viral infection. **Trends Microbiol**, v. 23, n. 1, p. 55-63, Jan 2015. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456015> >.

CIHLAR, T.; FORDYCE, M. Current status and prospects of HIV treatment. **Curr Opin Virol**, v. 18, p. 50-6, 06 2016. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27023283> >.

CLAYTON, K. L. et al. Resistance of HIV-infected macrophages to CD8. **Nat Immunol**, v. 19, n. 5, p. 475-486, May 2018. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670239> >.

COCCIA, E. M. et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 3, p. 796-805, Mar 2004. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991609> >.

COHEN, M. S. et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 493-505, Aug 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767103> >.

CONRADY, C. D. et al. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 2, p. 173-83, Mar 2012. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236996> >.

CROW, Y. J. et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. **Nat Genet**, v. 38, n. 8, p. 917-20, Aug 2006. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845398> >.

D'ARENA, G. et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. **Haematologica**, v. 83, n. 3, p. 197-203, Mar 1998. ISSN 0390-6078. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573672> >.

DANIS, B. et al. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 2, p. 507-17, Feb 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200500> >.

DE WIT, D. et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 1030-2, Feb 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504106> >.

DEEKS, S. G.; LEWIN, S. R.; HAVLIR, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. **Lancet**, v. 382, n. 9903, p. 1525-33, Nov 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152939> >.

DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 406-16, Sep 2007. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17892849> >.

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 97, 2014. ISSN 2051-7599. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25580251> >.

DI MARZIO, P.; TSE, J.; LANDAU, N. R. Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 14, n. 2, p. 129-38, Jan 1998. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462923> >.

DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509-14, Jan 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356306> >.

DOMINGUES, R. et al. The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus. **Br J Dermatol**, v. 172, n. 1, p. 48-55, Jan 2015. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976336> >.

DOWLING, D. J. et al. Toll-like receptor 8 agonist nanoparticles mimic immunomodulating effects of the live BCG vaccine and enhance neonatal innate and adaptive immune responses. **J Allergy Clin Immunol**, v. 140, n. 5, p. 1339-1350, Nov 2017. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343701> >.

DOYLE, S. et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. **Immunity**, v. 17, n. 3, p. 251-63, Sep 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354379> >.

DUH, E. J. et al. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 15, p. 5974-8, Aug 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762307> >.

DUPUIS, S. et al. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 388-91, Mar 2003. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590259> >.

DURBIN, J. E. et al. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 443-50, Feb 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608598> >.

ELDREDGE, L. C. et al. CD11b(+) Mononuclear Cells Mitigate Hyperoxia-Induced Lung Injury in Neonatal Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 54, n. 2, p. 273-83, Feb 2016. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26192732> >.

FEHRHOLZ, M. et al. The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 3, p. 565-76, Mar 2012. ISSN 1465-2099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170635> >.

FIOLA, S. et al. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3620-31, Sep 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713890> >.

FITZGERALD, K. A. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **J Exp Med**, v. 198, n. 7, p. 1043-55, Oct 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517278> >.

FUJIEDA, S. et al. Synthetic oligodeoxynucleotides inhibit IgE induction in human lymphocytes. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, n. 1, p. 232-9, Jul 2000. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903247> >.

GAO, D. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. **Science**, v. 341, n. 6148, p. 903-6, Aug 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929945> >.

GARGAN, S. et al. HIV-1 Promotes the Degradation of Components of the Type 1 IFN JAK/STAT Pathway and Blocks Anti-viral ISG Induction. **EBioMedicine**, v. 30, p. 203-216, Apr 2018. ISSN 2352-3964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29580840> >.

GARIANO, G. R. et al. The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 1, p. e1002498, Jan 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291595> >.

GENDELMAN, H. E. et al. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. **J Exp Med**, v. 167, n. 4, p. 1428-41, Apr 1988. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258626> >.

GORDIEN, E. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. **J Virol**, v. 75, n. 6, p. 2684-91, Mar 2001. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222692> >.

GOUJON, C. et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 559-62, Oct 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048477> >.

GRAY, E. E. et al. The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 255-66, 08 2016. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27496731> >.

GROß, C. J. et al. K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 761-773, Oct 2016. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27692612> >.

HALLER, O.; KOCHS, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 1, p. 79-87, Jan 2011. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166595> >.

HASAN, M. et al. Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. **Nat Immunol**, v. 14, n. 1, p. 61-71, Jan 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160154> >.

HASKÓ, G. et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J**, v. 14, n. 13, p. 2065-74, Oct 2000. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023991> >.

HERBEIN, G.; MONTANER, L. J.; GORDON, S. Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. **J Virol**, v. 70, n. 11, p. 7388-97, Nov 1996. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892857> >.

HERZYK, D. J. et al. Macrophage and monocyte IL-1 beta regulation differs at multiple sites. Messenger RNA expression, translation, and post-translational processing. **J Immunol**, v. 149, n. 9, p. 3052-8, Nov 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401931> >.

HO, W. Z. et al. Infection of cord blood monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 66, n. 1, p. 573-9, Jan 1992. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727500> >.

HOLT, P. G.; JONES, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. **Allergy**, v. 55, n. 8, p. 688-97, Aug 2000. ISSN 0105-4538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955693> >.

HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 772-7, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800576> >.

HORAN, K. A. et al. Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2311-9, Mar 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345332> >.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-8, Mar 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158675> >.

HOU, W. et al. Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3834-42, Apr 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193806> >.

HRECKA, K. et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 658-61, Jun 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720370> >.

ICHINOHE, T. et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 79-87, Jan 2009. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139171> >.

JABIR, M. S. et al. Caspase-1 cleavage of the TLR adaptor TRIF inhibits autophagy and β -interferon production during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 2, p. 214-27, Feb 2014. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24528867> >.

JAKOBSEN, M. R. et al. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 48, p. E4571-80, Nov 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24154727> >.

JANAS, A. M.; WU, L. HIV-1 interactions with cells: from viral binding to cell-cell transmission. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 26, p. Unit 26.5, Jun 2009. ISSN 1934-2616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499507> >.

JUNG, J. Y. et al. Elevated interleukin-27 levels in human neonatal macrophages regulate indoleamine dioxygenase in a STAT-1 and STAT-3-dependent manner. **Immunology**, v. 149, n. 1, p. 35-47, Sep 2016. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27238498> >.

JØNSSON, K. L. et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. **Nat Commun**, v. 8, p. 14391, Feb 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28186168> >.

KADIU, I. et al. Biochemical and biologic characterization of exosomes and microvesicles as facilitators of HIV-1 infection in macrophages. **J Immunol**, v. 189, n.

2, p. 744-54, Jul 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711894> >.

KANE, M. et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 563-6, Oct 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121441> >.

KANSWAL, S. et al. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 976-90, Jul 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606649> >.

KATO, H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **J Exp Med**, v. 205, n. 7, p. 1601-10, Jul 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591409> >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 11, p. 460-9, Nov 2007. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029230> >.

KAWAI, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. **Nat Immunol**, v. 6, n. 10, p. 981-8, Oct 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127453> >.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, v. 5, p. 461, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309543> >.

KERUR, N. et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 5, p. 363-75, May 2011. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575908> >.

KIM, E. T. et al. SAMHD1 restricts herpes simplex virus 1 in macrophages by limiting DNA replication. **J Virol**, v. 87, n. 23, p. 12949-56, Dec 2013. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067963> >.

KOHLER, J. J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces activation of multiple STATs in CD4+ cells of lymphocyte or monocyte/macrophage lineages. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 3, p. 407-16, Mar 2003. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629155> >.

KOLLMANN, T. R. et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7150-60, Dec 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917677> >.

_____. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 771-83, Nov 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159225> >.

KOSCSÓ, B. et al. Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 6, p. 1309-15, Dec 2013. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922379> >.

KRUMBIEGEL, D.; ZEPP, F.; MEYER, C. U. Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells. **Hum Immunol**, v. 68, n. 10, p. 813-22, Oct 2007. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961769> >.

KURT-JONES, E. A. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nat Immunol**, v. 1, n. 5, p. 398-401, Nov 2000. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062499> >.

KYEI, G. B. et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. **J Cell Biol**, v. 186, n. 2, p. 255-68, Jul 2009. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635843> >.

LA PINE, T. R. et al. Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 interferon gamma response to group B Streptococci. **Pediatr Res**, v. 54, n. 2, p. 276-81, Aug 2003. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736393> >.

LAGUETTE, N. et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 654-7, May 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613998> >.

LAHAYE, X. et al. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1132-42, Dec 2013. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269171> >.

LAHOUASSA, H. et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. **Nat Immunol**, v. 13, n. 3, p. 223-8, Mar 2012. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327569> >.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 2014. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855941> >.

LANE, B. R. et al. TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3653-61, Oct 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490959> >.

LASFAR, A. et al. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. **Cancer Res**, v. 66, n.

8, p. 4468-77, Apr 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618774> >.

LEE, B. et al. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 5215-20, Apr 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10220446> >.

LEHMAN, D. A. et al. HIV-1 persists in breast milk cells despite antiretroviral treatment to prevent mother-to-child transmission. **AIDS**, v. 22, n. 12, p. 1475-85, Jul 2008. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614871> >.

LEONI, V. et al. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF- κ B. **J Virol**, v. 86, n. 12, p. 6555-62, Jun 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496225> >.

LEVY, O. et al. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1956-66, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849509> >.

_____. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. **J Immunol**, v. 173, n. 7, p. 4627-34, Oct 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383597> >.

LI, X. D. et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1390-4, Sep 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23989956> >.

LIBANOVA, R. et al. The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3', 5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant. **Vaccine**, v. 28, n. 10, p. 2249-58, Mar 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060510> >.

LIU, S. et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. **Science**, v. 347, n. 6227, p. aaa2630, Mar 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636800> >.

LIU, Z. et al. The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 4, p. 398-410, Oct 2013. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055605> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LLOYD, A. HIV infection and AIDS. **P N G Med J**, v. 39, n. 3, p. 174-80, Sep 1996. ISSN 0031-1480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795558> >.

LUND, J. et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med**, v. 198, n. 3, p. 513-20, Aug 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900525> >.

MA, Z.; DAMANIA, B. The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 2, p. 150-8, Feb 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867174> >.

MANEL, N.; LITTMAN, D. R. Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 271-4, Oct 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000008> >.

MANGEAT, B. et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. **Nature**, v. 424, n. 6944, p. 99-103, Jul 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808466> >.

MARÓDI, L. et al. Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma. **Clin Exp Immunol**, v. 126, n. 3, p. 456-60, Dec 2001. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737062> >.

MASTERS, S. L. et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1009-23, Dec 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219391> >.

MATSUDA, K. et al. Characteristics of IL-6 and TNF-alpha production by respiratory syncytial virus-infected macrophages in the neonate. **J Med Virol**, v. 48, n. 2, p. 199-203, Feb 1996. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8835355> >.

MAWHINNEY, S.; PAGANO, M.; THOMAS, P. Age at AIDS diagnosis for children with perinatally acquired HIV. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 6, n. 10, p. 1139-44, Oct 1993. ISSN 0894-9255. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410670> >.

MCGREAL, E. P.; HEARNE, K.; SPILLER, O. B. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 176-86, Feb 2012. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868122> >.

MEIER, A. et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. **J Virol**, v. 81, n. 15, p. 8180-91, Aug 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507480> >.

MELCHJORSEN, J. et al. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus

replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 5, p. 1099-108, May 2006. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603509> >.

MITCHELL, D.; OLIVE, C. Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. **Mol Immunol**, v. 47, n. 11-12, p. 2065-73, Jul 2010. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451253> >.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428-32, Jan 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356113> >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029990> >.

NETEA, M. G. et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2324-35, Mar 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104081> >.

NEWELL, M. L. et al. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. **Lancet**, v. 364, n. 9441, p. 1236-43, 2004 Oct 2-8 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464184> >.

NING, S.; PAGANO, J. S.; BARBER, G. N. IRF7: activation, regulation, modification and function. **Genes Immun**, v. 12, n. 6, p. 399-414, Sep 2011. ISSN 1476-5470. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490621> >.

OKOYE, A. A.; PICKER, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. **Immunol Rev**, v. 254, n. 1, p. 54-64, Jul 2013. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772614> >.

ONOGUCHI, K. et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. **J Biol Chem**, v. 282, n. 10, p. 7576-81, Mar 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204473> >.

ORTEGA-PRIETO, A. M.; DORNER, M. Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection. **Vaccines (Basel)**, v. 5, n. 3, Sep 2017. ISSN 2076-393X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28862649> >.

OSBORN, L.; KUNKEL, S.; NABEL, G. J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 7, p. 2336-40, Apr 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2494664> >.

PAIJO, J. et al. cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 4, p. e1005546,

Apr 2016. ISSN 1553-7374. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27058035> >.

PEDRAS-VASCONCELOS, J. A. et al. CpG oligodeoxynucleotides protect newborn mice from a lethal challenge with the neurotropic Tacaribe arenavirus. **J Immunol**, v. 176, n. 8, p. 4940-9, Apr 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585590> >.

PEREIRA, N. Z. et al. Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84917, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367701> >.

PERNO, C. F. et al. Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, v. 178, n. 2, p. 413-22, Aug 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697721> >.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol Rev**, v. 202, p. 8-32, Dec 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546383> >.

PHILBIN, V. J. et al. Imidazoquinoline Toll-like receptor 8 agonists activate human newborn monocytes and dendritic cells through adenosine-refractory and caspase-1-dependent pathways. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p. 195-204.e9, Jul 2012. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521247> >.

PICHLMAIR, A. et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 997-1001, Nov 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038589> >.

PIHLGREN, M. et al. CpG-motifs enhance initial and sustained primary tetanus-specific antibody secreting cell responses in spleen and bone marrow, but are more effective in adult than in neonatal mice. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2492-9, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12744883> >.

POECK, H. et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 63-9, Jan 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915568> >.

POLI, G. et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **J Exp Med**, v. 172, n. 1, p. 151-8, Jul 1990. ISSN 0022-1007. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2193094> >.

PONTILLO, A. et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 54, n. 3, p. 236-40, Jul 2010. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502346> >.

_____. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 59, n. 2, p. 121-5, Feb 2012. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227487> >.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. **Virology**, v. 349, n. 1, p. 112-20, May 2006. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564558> >.

RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 1, p. 52-61, Jan 2004. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708016> >.

RAPOSO, G. et al. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. **Traffic**, v. 3, n. 10, p. 718-29, Oct 2002. ISSN 1398-9219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230470> >.

RATHINAM, V. A. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 395-402, May 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351692> >.

REINERT, L. S. et al. TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1368-76, Apr 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426207> >.

RENNESON, J. et al. IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 10, p. 2789-99, Oct 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637227> >.

REPPE, K. et al. Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 474-81, Apr 2009. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931326> >.

RIDER, P. et al. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 9, p. 4835-43, Nov 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930960> >.

ROBEK, M. D.; BOYD, B. S.; CHISARI, F. V. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. **J Virol**, v. 79, n. 6, p. 3851-4, Mar 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731279> >.

ROBINSON, T. O. et al. CD4 regulatory T cells augment HIV-1 expression of polarized M1 and M2 monocyte derived macrophages. **Virology**, v. 504, p. 79-87, 04 2017. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28157548> >.

ROSE, S. et al. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2667-78, Mar 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312108> >.

SAMUEL, C. E. Antiviral actions of interferons. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 778-809, table of contents, Oct 2001. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585785> >.

SAÚDE, M. D. **Protocolo para a prevenção de transmissão vertical de HIV e sífilis**. 2007

SCHLAEPFER, E. et al. Triggering TLR2, -3, -4, -5, and -8 reinforces the restrictive nature of M1- and M2-polarized macrophages to HIV. **J Virol**, v. 88, n. 17, p. 9769-81, Sep 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942590> >.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 513-45, 2014. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555472> >.

SCHWARTZ, D. H. et al. Adherence of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes to fetal placental cells: a model of maternal --> fetal transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 4, p. 978-82, Feb 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7862677> >.

SETH, R. B. et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669-82, Sep 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125763> >.

SEWALD, X. et al. Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. **Science**, v. 350, n. 6260, p. 563-567, Oct 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26429886> >.

SIEGFRIED, N. et al. Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD003510, Jul 2011. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735394> >.

SLAVICA, L. et al. TLR3 impairment in human newborns. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 5, p. 1003-11, Nov 2013. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23901120> >.

SOLIS, M. et al. RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1224-36, Feb 2011. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084468> >.

STACEY, K. J.; SWEET, M. J.; HUME, D. A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. **J Immunol**, v. 157, n. 5, p. 2116-22, Sep 1996. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757335> >.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, v. 176, n. 1, p. 287-92, Jul 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462> >.

STEIN, S. C.; FALCK-PEDERSEN, E. Sensing adenovirus infection: activation of interferon regulatory factor 3 in RAW 264.7 cells. **J Virol**, v. 86, n. 8, p. 4527-37, Apr 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22345436> >.

STETSON, D. B. et al. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. **Cell**, v. 134, n. 4, p. 587-98, Aug 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724932> >.

STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 342-9, Jul 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972667> >.

SULLENDER, W. M. et al. Humoral and cell-mediated immunity in neonates with herpes simplex virus infection. **J Infect Dis**, v. 155, n. 1, p. 28-37, Jan 1987. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3025306> >.

SUN, L. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 786-91, Feb 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258413> >.

SUNDARAVARADAN, V. et al. Differential expression and interaction of host factors augment HIV-1 gene expression in neonatal mononuclear cells. **Virology**, v. 400, n. 1, p. 32-43, Apr 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138641> >.

_____. Differential HIV-1 replication in neonatal and adult blood mononuclear cells is influenced at the level of HIV-1 gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 31, p. 11701-6, Aug 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16868088> >.

SURPRIS, G. et al. Cutting Edge: Novel Tmem173 Allele Reveals Importance of STING N Terminus in Trafficking and Type I IFN Production. **J Immunol**, v. 196, n. 2, p. 547-52, Jan 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685207> >.

SUSPÈNE, R. et al. Genetic editing of herpes simplex virus 1 and Epstein-Barr herpesvirus genomes by human APOBEC3 cytidine deaminases in culture and in vivo.

J Virol, v. 85, n. 15, p. 7594-602, Aug 2011. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632763> >.

TANAKA, Y.; CHEN, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. **Sci Signal**, v. 5, n. 214, p. ra20, Mar 2012. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394562> >.

TANIGUCHI, T. et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 623-55, 2001. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244049> >.

THEOFILOPOULOS, A. N. et al. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 307-36, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771573> >.

TOVO, P. A. et al. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. **Lancet**, v. 339, n. 8804, p. 1249-53, May 1992. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349667> >.

TRAPP, S. et al. Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. **J Virol**, v. 83, n. 2, p. 884-95, Jan 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004943> >.

TURAN, K. et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 2, p. 643-52, 2004. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14752052> >.

TURELLI, P. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1829, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031497> >.

UNAIDS. **UNAIDS Data 2017**. 2017

_____. **Fact Sheet – World AIDS day 2017** 2018.

UNICEF. **Levels and trends in child mortality**. 2015

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nat Immunol**, v. 11, n. 11, p. 997-1004, Nov 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890285> >.

VARTANIAN, J. P. et al. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 230-3, Apr 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403710> >.

VEERANKI, S. et al. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e27040, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22046441> >.

VOJNOV, L. et al. The majority of freshly sorted simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD8(+) T cells cannot suppress viral replication in SIV-infected macrophages. **J Virol**, v. 86, n. 8, p. 4682-7, Apr 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318140> >.

WANG, J. P. et al. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7114-21, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082628> >.

WANG, M. et al. Combined blockade of the histamine H1 and H4 receptor suppresses peanut-induced intestinal anaphylaxis by regulating dendritic cell function. **Allergy**, v. 71, n. 11, p. 1561-1574, Nov 2016. ISSN 1398-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27059534> >.

WANG, Y. et al. Inflammasome Activation Triggers Caspase-1-Mediated Cleavage of cGAS to Regulate Responses to DNA Virus Infection. **Immunity**, v. 46, n. 3, p. 393-404, Mar 2017. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314590> >.

WANG, Z. S. et al. Intracellular DNA sensing pathway of cGAS-cGAMP is decreased in human newborns and young children. **Mol Immunol**, v. 87, p. 76-85, Apr 2017. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28412547> >.

WEBSTER, R. B. et al. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. **J Biol Chem**, v. 282, n. 1, p. 700-9, Jan 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090525> >.

WEWERS, M. D.; HERZYK, D. J. Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1 beta release. Quantitation by enzyme-linked immunoassay. **J Immunol**, v. 143, n. 5, p. 1635-41, Sep 1989. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2788190> >.

WHEELER, L. A. et al. TREX1 Knockdown Induces an Interferon Response to HIV that Delays Viral Infection in Humanized Mice. **Cell Rep**, v. 15, n. 8, p. 1715-27, 05 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184854> >.

WHO. **Global guidance on criteria and processes for validation: elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis** 2017.

WINTERBERG, T. et al. Distinct phenotypic features of neonatal murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 214-24, Jan 2015. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329762> >.

WU, J. J. et al. Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 3, p. 333-44, Sep 2015. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320998> >.

WYNN, J. L. et al. Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1750-8, Sep 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591384> >.

XU, J. et al. TLR ligands up-regulate Trex1 expression in murine conventional dendritic cells through type I Interferon and NF- κ B-dependent signaling pathways. **J Leukoc Biol**, v. 96, n. 1, p. 93-103, Jul 2014. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598055> >.

YAN, N. et al. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. **Nat Immunol**, v. 11, n. 11, p. 1005-13, Nov 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871604> >.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 7, p. 730-7, Jul 2004. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208624> >.

YU, H. R. et al. IFN- α production by human mononuclear cells infected with varicella-zoster virus through TLR9-dependent and -independent pathways. **Cell Mol Immunol**, v. 8, n. 2, p. 181-8, Mar 2011. ISSN 2042-0226. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21317915> >.

ZAITSEVA, M. et al. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility of macrophages to human immunodeficiency virus type 1 infection. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3109-17, Nov 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049991> >.

ZHANG, G. et al. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 8, p. E1034-43, Feb 2016. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26811480> >.

ZHANG, S. Y. et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1522-7, Sep 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872438> >.

ZHOU, Y. et al. TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. **Innate Immun**, v. 19, n. 2, p. 184-92, 2013. ISSN 1753-4267. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035017> >.

_____. A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. **Immunology**, v. 131, n. 1, p. 40-9, Sep 2010. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636339> >.

ZIJENAH, L. S. et al. Timing of mother-to-child transmission of HIV-1 and infant mortality in the first 6 months of life in Harare, Zimbabwe. **AIDS**, v. 18, n. 2, p. 273-80, Jan 2004. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075545> >.

ŠKRNJUG, I. et al. The mucosal adjuvant cyclic di-AMP exerts immune stimulatory effects on dendritic cells and macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95728, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755640> >.