

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE
SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO
DA DOENÇA**

Cláudia Mendonça Rodrigues

Uberlândia-MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE
SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO
DA DOENÇA**

Tese apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Cláudia Mendonça Rodrigues

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696i
2017 Rodrigues, Cláudia Mendonça, 1985
Influência da infecção pelo HIV-1 no eixo de sinalização
FPRs/AnxA1 e impactos na progressão da doença / Cláudia Mendonça
Rodrigues. - 2017.
73 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. AIDS (Doença) - Teses. 3. HIV (Vírus) -
Teses. 4. Infecções por HIV - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo,
1962. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Cláudia Mendonça Rodrigues

“INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NO EIXO DE SINALIZAÇÃO FPRs/AnxA1 E IMPACTOS NA PROGRESSÃO DA DOENÇA”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de janeiro de 2017.

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

UFPA

Prof. Dr. Ricardo Ishak

UFPA

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

ICBIM/UFU

Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

ICBIM/UFU

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – orientador
INGEB/UFU

DEDICATÓRIA

A toda minha família que sempre me apoiou durante toda esta jornada, em especial ao meu esposo Cícero e nosso pequeno Theo.

“O amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar, proteger e fortalecer durante toda esta jornada.

Ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, meu orientador, por ter me oferecido esta grande oportunidade, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos diários e principalmente por ter me deixado crescer, aprender e amadurecer por meio das minhas próprias decisões, fracassos e conquistas.

Aos meus pais, por acreditarem em meus objetivos e me apoiarem durante a mudança para Uberlândia e durante toda a minha caminhada. À minha mãe em especial, obrigada por abrir mão da sua rotina, por ficar fora de casa por tantos dias para me ajudar durante a finalização da tese. Vocês são meu porto seguro!

Ao meu esposo Cícero, pela compreensão, paciência, companheirismo e o amor imensurável. Com você aprendi a ter garra e a viver um dia de cada vez.

Ao meu anjinho Theo que veio durante a finalização desta tese e me ajudou a passar por tudo com mais calma, paciência e força de vontade.

À minha “maninha” Bruna que me incentivou e foi a responsável pela minha vinda para Uberlândia. Obrigada pelo carinho, pelas longas conversas de apoio, pela troca de conhecimento e pela amizade maravilhosa que contraímos.

Às amigas Jéssica Regina, Izabella Cristina, Larissa Prado, Juliana Franco e Léa Duarte, importantes companheiras de bancada, obrigada pela colaboração, apoio e amizade.

À amiga e professora Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, pelo apoio e a importante colaboração na elaboração e correção deste trabalho.

À amiga Angela, pela colaboração, troca de conhecimentos e importante apoio na realização deste estudo.

Ao professor Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, pela troca de experiências e apoio durante minha formação como futura docente.

A todos os companheiros do laboratório de Nanobiotecnologia, pelas constantes trocas de conhecimentos, pela amizade e excelente convívio.

Ao Setor de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e ao Dr. Aécio Sebastião Borges, pelo acesso aos pacientes e ajuda na obtenção das amostras.

Aos profissionais do setor de coleta do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda na aquisição das amostras.

À banca examinadora, por aceitarem o convite para avaliar esta tese e pelas importantes contribuições que, com certeza, irão enriquecer bastante o nosso estudo.

A todos do programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas agradeço todo o apoio prestado durante a realização deste doutorado.

Aos voluntários que participaram deste estudo, meus sinceros agradecimentos e respeito.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros destinados à realização desta pesquisa.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem
não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso.”*

John Ruskin

RESUMO

Durante a infecção pelo HIV-1, a imunoativação sistêmica desencadeada por diversos fatores, tem sido uma das principais causas de depleção de células T CD4+ e consequente progressão para AIDS. O HIV-1 é capaz de utilizar os receptores de peptídeos formilados (FPRs) como co-receptores não usuais para a infecção. Os FPRs são reguladores importantes da resposta imune e são elementos-chave em muitas condições inflamatórias, mas têm sido marginalmente investigados na infecção pelo HIV-1. Entre os seus ligantes, a Anexina A1 (AnxA1) demonstrou um papel anti-inflamatório significativo em certas condições patológicas, mas funções contraditórias no sangue periférico. Diante disto, por meio da caracterização da expressão gênica e proteica de FPR1, FPR2/ALX, FPR3 e AnxA1 em leucócitos de sangue periféricos, dosagem de AnxA1 em amostras de plasma e estímulo com peptídeo funcional da AnxA1 (Ac2-26), de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD), não detectável (CVND) e doadores saudáveis (controle), foram investigados os efeitos sistêmicos do HIV-1 sobre a expressão e função dos FPRs, assim como sobre os níveis plasmáticos de AnxA1 e sua translocação. Com isso buscou-se a avaliação da relação existente entre a infecção pelo HIV-1 e o eixo de sinalização FPRs/AnxA1 e quais as consequências para a evolução da doença. O HIV-1 foi capaz de modular os níveis de transcrição e expressão proteica dos FPRs de modo célula específica com aumento da expressão de FPR3 e diminuição de FPR2. A translocação de AnxA1 também foi afetada em todas as populações celulares. AnxA1 foi significativamente detectada em amostras de plasma de pacientes do grupo CVD, o que pode funcionar como um importante marcador prognóstico dos pacientes quanto à eficácia do tratamento. Os estímulos de PBMCs com Ac2-26 induziram uma forte resposta inflamatória em grupos infectados com HIV-1, que foi parcialmente bloqueada pelo seu antagonista BOC-2, sugerindo a sua ação através de FPR1. Este foi o primeiro estudo sobre os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre os FPRs e como a carga viral afeta sua modulação e a translocação da AnxA1. Isto sugere um papel crucial do eixo de sinalização FPRs/ANXA1 na ativação imunológica, inflamação e progressão da doença.

Palavras-chave: AIDS, HIV-1, Imunoativação, FPRs, AnxA1, Inflamação

ABSTRACT

During HIV-1 infection, a systemic immunoactivation triggered by several factors has been a major cause of CD4+ T cell depletion and consequent progression to AIDS. HIV-1 is able to use formylated peptide receptors (FPRs) as co-receptors not usual for infection. FPRs are important regulators of immune response and are key elements in many inflammatory conditions, but have been marginally investigated in HIV-1 infection. Among its ligands, Annexin A1 (AnxA1) has demonstrated a significant anti-inflammatory role in certain pathological conditions, but contradictory function in the peripheral blood. Through the characterization of the gene and protein expression of FPR1, FPR2/ALX, FPR3 and AnxA1 in peripheral blood leukocytes, quantification of AnxA1 in plasma samples and stimulation with functional peptide of AnxA1 (Ac2-26) of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1 positive patients with detectable viral load (DVL), non-detectable (NDVL) and healthy donors (control), we investigated the systemic effects of HIV-1 on the expression and function of FPRs, as well as on plasma levels of AnxA1 and its translocation. The aim of this study was to evaluate the relationship between HIV-1 infection and the FPRs/AnxA1 signaling axis and the consequences for the course of the disease. HIV-1 was able to modulate the levels of transcription and protein expression of FPRs in a cell-specific manner with upregulation of FPR3 and downregulation of FPR2. Translocation of AnxA1 was also affected in all cell populations. AnxA1 was significantly detected in plasma samples from patients of CVD group, which may act as an important prognostic marker of patients regarding the efficacy of the treatment. Stimulation of PBMCs with Ac2-26 induced a strong inflammatory response in HIV-1 infected groups, which was partially blocked by their BOC-2 antagonist, suggesting their action via FPR1. This was the first study about the effects of HIV-1 infection on FPRs and how the viral load affects its modulation and the AnxA1 translocation. This suggests a crucial role for the FPRs/AnxA1 signaling axis in immune activation, inflammation and disease progression.

Key words: AIDS, HIV-1, Immunoactivation, FPRs, AnxA1, Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV-1.	18
Figura 2: Representação esquemática da proteína Anexina A1.	23
Figura 3: Translocação da Anexina A1 após ativação celular.	24
Figura 4: Expressão relativa de RNAm de ANXA1 e FPRs em sangue total	36
Figura 5: Níveis de AnxA1 detectados no plasma	37
Figura 6: Citometria de fluxo exibindo o percentual e/ou a mediana da intensidade de fluorescência de células T CD4+ e CD8+ expressando AnxA1 e FPRs.	40
Figura 7: Análises de citometria de fluxo de subpopulações de monócitos e de células dendríticas.	42
Figura 8: Análise de Citometria de Fluxo exibindo o percentual e/ou mediana da intensidade de fluorescência de granulócitos expressando AnxA1 e FPRs.	44
Figura 9: Perfil de citocinas determinado por Cytometry Bead Array (CBA) frente aos estímulos com agonistas e antagonistas de FPRs	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos mecanismos que suportam a ativação imunológica sistêmica crônica no contexto da infecção pelo HIV-1.	19
Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).	34
Tabela 3. Histórico de doenças oportunistas e contagem de CD4 de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).	35
Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman, Pearson e seus valores de p entre os dados laboratoriais: carga viral (CV), linfócitos T CD4 +, doenças oportunistas (DO), expressão transcricional de ANXA1, FPR3 e níveis plasmáticos de AnxA1.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Transportadores Cassete de ligação a ATP
AF647	Alexa Fluor 647
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALX	Receptor da lipoxina A4
ANXA1	Proteína Anexina A1
ATP	Trifosfato de Adenosina
BOC-2	<i>t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe</i> , antagonista de FPR1 e FPR2/ALX
BSA	Albumina de Soro Bovino
BV-2	Linhagem de Células Microgliais
Ca	Cálcio
CBA	<i>Cytometry Bead Array</i>
CCR	Receptor de Quimiocinas
CD	Cluster de Diferenciação
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de Confiança
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos
CV	Carga Viral
CVD	Carga Viral Detectável
CVND	Carga Viral Não Detectável
CXCR	Receptor de Quimiocinas
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

DO	Doenças Oportunistas
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
ENV	Glicoproteína de Envelope Viral
FcεRI ⁺	Receptor de IgE de Alta Afinidade
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fmlp	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i> , agonista de FPRs
FPR	Receptor de Peptídeos Formilados
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
gp41	Glicoproteína 41
h	Horas
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana – 1
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HRP	Enzima Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
LPS	Lipolissacarídeo
MALT	Tecido Linfoide Associado à Mucosa
MIF	Mediana da Intensidade de Fluorescência
min	Minutos
mL	Mililitros
n	Tamanho Amostral
nm	Nanômetros
OGD/R	Privação de Oxigênio-Glicose e Reoxigenação

p	Probabilidade de significância
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PE/CY	Ficoeritrina Cianina
PerCP/Cy5.5	Complexo Peridina - Clorofila – Proteína/ Cianina 5.5
pg	Picograma
PKC	Proteína Quinase C
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
r	Coefficiente de correlação
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa
SIV	Vírus da Imunodeficiência Simiana
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TCR	Receptor de células T
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta
WKYMVm	Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH ₂ , peptídeo agonista de FPRs

WRW4 Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-NH₂, peptídeo antagonista de
FPR2/ALX e FPR3

% Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O paradoxo da resposta imune contra a infecção pelo HIV-1	16
1.2 Receptores de peptídeos formilados (FPRs): co-receptores alternativos para o HIV-1 e moduladores da resposta imune	20
1.3 Anexina A1: ligante de FPRs e moduladora da inflamação	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção de amostras biológicas	28
4.2 Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3	29
4.3 ELISA <i>in-house</i> para detecção Anexina A1 humana	29
4.4 Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico	30
4.5 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico.....	31
4.6 <i>Cytometry Bead Array (CBA)</i> para detecção de citocinas em culturas de PBMCs.....	32
4.7 Análises Estatísticas	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1	33
5.2. Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX, FPR3	35
5.3 ELISA <i>in-house</i> para detecção Anexina A1 humana	36
5.4 Análise de correlação entre expressão transcricional de FPR3, ANXA1, níveis plasmáticos de AnxA1, contagens de CD4, carga viral e histórico de doenças oportunistas	37
5.5 Análise de Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico	38
5.6 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	54
8. PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	66
ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

Embora o advento da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART), a AIDS continuam sendo uma das maiores preocupações de saúde pública em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, desde o início da epidemia que ocorreu por volta de 1980, cerca de 70 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), sendo que 35 milhões de pessoas morreram devido à infecção. Os dados demonstraram ainda que, globalmente, cerca de 36,7 milhões de pessoas viviam com o HIV até o final de 2015 (WHO, 2015). Ainda que esforços continuem sendo lançados em busca da melhor compreensão e cura da doença, diversas lacunas ainda existem no esclarecimento da patogênese da infecção pelo HIV, sobretudo no que diz respeito ao paradoxo da infecção que é caracterizado pela imunodeficiência linfocitária contextualizada à imunoativação sistêmica, fatores extremamente envolvidos na progressão da doença (APPAY; SAUCE, 2008; HAZENBERG et al., 2003).

1.1 O paradoxo da resposta imunológica contra a infecção pelo HIV-1

A resposta imunológica à infecção pelo HIV-1 compreende diversos componentes e mediadores associados tanto à imunidade inata quanto adaptativa. O HIV-1 é capaz de infectar preferencialmente as células T CD4+, embora monócitos/macrófagos e células dendríticas possam também ser alvos. A depleção de células T CD4+ é o evento principal associado à patogênese do HIV-1, sendo que as células presentes nos tecidos linfoides como linfonodos e aqueles associados à mucosa, como o trato gastrointestinal, são as mais acometidas (BRENCHLEY et al., 2004; MACALLAN, 2013).

A fase inicial ou aguda da infecção é marcada principalmente pela ação direta do HIV-1, que induz intensa depleção de células T CD4+ CCR5+ de memória residentes em tecidos linfoides associados à mucosa (MALT) (BRENCHLEY et al., 2004; MEHANDRU et al., 2004) (Figura 1). Nesta fase, o paciente infectado geralmente apresenta apenas sintomas inespecíficos como febre, dor de garganta ou dores no corpo. Cerca de apenas 2 a 3 semanas após a infecção, a replicação do HIV-1 já estabelecida nestas células ocasiona a perda massiva das células T CD4+ CCR5+ de memória. As células T CD4+ residentes nos MALT são integrantes de suma importância na defesa imunológica, funcionando como barreira contra patógenos invasores. Desta forma, a depleção massiva destas células acarreta perda

importante do bom funcionamento da barreira, levando o paciente a uma maior propensão à aquisição de infecções oportunistas, o que induz, como consequência, a um estado de ativação imunológica sistêmica crônica (DERDEYN; SILVESTRI, 2005).

Os eventos que marcam a transição entre fase aguda e crônica ainda são muito pouco compreendidos. No entanto, acredita-se que esta etapa seja marcada pela montagem de respostas efectoras de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos contra o HIV-1, assim como respostas humorais, ambas atuando no controle da replicação viral (DERDEYN; SILVESTRI, 2005). Contudo, embora a atuação de CTLs seja de grande relevância no controle da replicação viral e progressão da doença, o HIV-1 sofre mutações importantes que funcionam como mecanismo de escape ao reconhecimento por CTLs. O mais importante é que estas mutações geram variantes que podem ser transmitidas para outros indivíduos infectados, o que torna o cenário da resposta imune anti-HIV ainda mais crítico (DERDEYN; SILVESTRI, 2005; JONES et al., 2004).

Como se não bastasse, o HIV-1 ainda é capaz de escapar da ação da resposta imune humoral, tornando a atuação dos anticorpos neutralizantes ineficientes. A glicoproteína de envelope viral (ENV), por exemplo, é extremamente variável principalmente nas regiões que compõem a superfície viral, o que dificulta o reconhecimento por anticorpos neutralizantes (DERDEYN; SILVESTRI, 2005; GASCHEN et al., 2002). Sendo assim, acredita-se que esta falha no combate à infecção proporcione um ambiente marcado por intensa imunoativação sistêmica devido à replicação viral crônica.

Durante a fase crônica, também chamada de latência clínica, o paciente pode não apresentar nenhum sintoma, no entanto, é capaz de transmitir facilmente a infecção para outro indivíduo. Mesmo sem HAART o paciente pode passar anos nesta fase de latência até a progressão para AIDS. A fase crônica é marcada por uma batalha na qual o sistema imune tenta combater a infecção, enquanto o HIV-1 continua lançando mão de mecanismos de escape para burlar a ação do sistema imunológico e prosseguir com sua replicação. Sendo assim, nesta fase a replicação viral continua, porém em menores níveis, enquanto a contagem de células T CD4⁺ no sangue periférico segue em declínio, embora de modo mais lento (DERDEYN; SILVESTRI, 2005) (Figura 1).

Com o passar dos anos, a perda gradual crônica de células T CD4⁺ e o ciclo contínuo de infecção pelo vírus fazem com que o sistema imunológico se torne severamente comprometido. Com isso os pacientes tornam-se predispostos à aquisição de doenças oportunistas mediadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus, como por exemplo, *Toxoplasma*, *Mycobacterium avium*, *Pneumocystis* e Citomegalovírus, respectivamente. Estes

eventos caracterizam a fase de AIDS e é marcada também pela contagem de células T CD4⁺ menor que 200 células/ μ L. Com o estabelecimento da AIDS ocorre ainda a síndrome de perda de peso e cânceres relacionados ao HIV, como por exemplo, Sarcoma de Kaposi, Carcinoma cervical e alguns tipos de linfomas (BOULOUGOURA; SERETI, 2016; SCHNEIDER et al., 2008) (Figura 1).

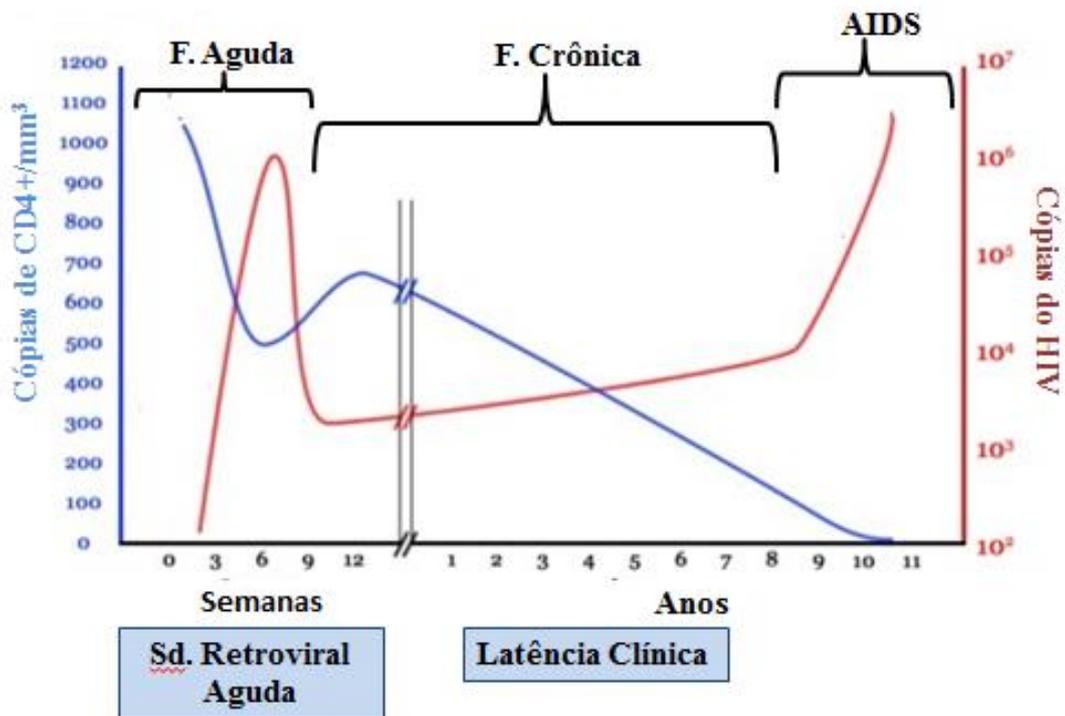


Figura 1: Evolução clínica da infecção pelo HIV-1. A intensa replicação viral determina o curso clínico da doença por meio da massiva depleção de células CD4⁺ e consequente colapso do sistema imunológico. O processo de infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda (Síndrome Retroviral Aguda) marcada por intensa depleção de células CD4⁺ e forte replicação viral que duram algumas semanas, uma fase crônica (Latência Clínica) que pode durar anos e é caracterizada pela manutenção da replicação viral e depleção de células CD4⁺, porém de modo mais lento. Com a progressão da infecção, instala-se a fase de AIDS propriamente dita, definida por depleção de células CD4⁺ abaixo de 200 células /mm³, altos níveis de carga viral e descontrole do sistema imunológico. Fonte: adaptado (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Com a evolução do processo de infecção, a ativação imunológica sistêmica crônica é instalada, sendo apontada como a principal causa da depleção de células T CD4⁺. Desta forma, a constante perda de células T CD4⁺ determina a imunodeficiência linfocitária e marca o paradoxo da resposta imune anti-HIV. Neste contexto, a ativação imunológica sistêmica crônica pode ser dirigida por diversos mecanismos como descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Descrição dos mecanismos que suportam a ativação imunológica sistêmica crônica no contexto da infecção pelo HIV-1.

Mecanismos	Descrições	Ref.
Replicação do HIV-1 e Resposta Imune Antiviral	<ul style="list-style-type: none"> A interação direta do HIV-1 com o receptor CD4 e seus coreceptores durante o processo de infecção induz a ativação de células alvos. O HIV-1 é capaz de ativar células pela ligação a TLR7, 8 e 9. Excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias estimula a expressão de moléculas pro apoptóticas e induz disfunção de células Tregs aumentando a ativação celular. A infecção causa intenso <i>turnover</i> de células T, caracterizando-se pela presença de células T CD4+ e CD8+ intensamente diferenciadas que se tornam disfuncionais na produção de citocinas, na diversidade de repertório de receptores de células T e maior suscetibilidade a morte induzida pela ativação. Com isso a defesa torna-se prejudicada, há maior suscetibilidade a aquisição de doenças oportunista, acelerando o processo de ativação imune crônica. 	(APPAY et al., 2007; BIRX et al., 1990; COOPER et al., 2013; HERBEUVAL et al., 2005; HO et al., 1995; MEIER et al., 2007; PAIARDINI; MULLER-TRUTWIN, 2013; WEISS et al., 1989)
Reconhecimento de proteínas virais	<ul style="list-style-type: none"> Proteína codificada pelo gene Nef do HIV-1 contribui diretamente para a ativação imune tornando as células T CD4+ infectadas sensíveis à nova estimulação por meio do receptor de células T (TCR). 	(MUNCH et al., 2007; SCHINDLER et al., 2006)
Resposta imune a infecções reativas	<ul style="list-style-type: none"> Indivíduos que já apresentavam infecções latentes crônicas por outros tipos virais como Citomegalovírus, Epstein-Baar vírus, dentre outros, podem apresentar reativação da infecção e assim maior ativação imunológica. 	(BOULOUGO URA; SERETI, 2016; DOISNE et al., 2004)
Perda de células Th17	<ul style="list-style-type: none"> A depleção preferencial de células do perfil Th17 corrobora com a perda da integridade da barreira de mucosa, que é acompanhada da detecção de produtos microbianos na circulação e indução de imunoativação sistêmica. 	(CECCHINATO et al., 2008; PRENDERGAST et al., 2010)
Disfunção e depleção de células Tregs	<ul style="list-style-type: none"> A infecção marca a intensa disfunção e depleção de células Tregs, o que induz o aumento da ativação de células T CD4+ e CD8+ e de marcadores plasmáticos de translocação bacteriana. 	(CHASE et al., 2007; EGGENA et al., 2005; EPPLE et al., 2006)
Translocação de produtos bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> A depleção severa de células T CD4+ CCR5+ no trato gastrointestinal durante a fase aguda da doença, compromete a integridade da barreira de mucosa intestinal, favorecendo a translocação bacteriana. Produtos bacterianos como LPS, flagelina, dentre outros, são detectados na circulação sistêmica e desencadeia ativação imunológica com alta produção de citocinas pró-inflamatórias. 	(BRECHLEY et al., 2006; BRECHLEY et al., 2004; VEAZEY et al., 1998)
Produção de mediadores pró-inflamatórios	<ul style="list-style-type: none"> Mediadores inflamatórios tais como interferons (IFN) do tipo I, IL-6, IL-1β e TNF-α, são produzidos por células da imunidade inata após o reconhecimento viral por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), o que contribui para ativação imune crônica. 	(BIRX et al., 1990; MOLINA et al., 1989; WEISS et al., 1989)

Como descrito, durante este processo de ativação imunológica crônica é possível detectar o aumento de biomarcadores solúveis de inflamação (citocinas e mediadores) produzidos pelas células ativadas, principalmente por macrófagos. Muitos biomarcadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e IFN- α , aumentam durante a infecção aguda, refletindo a ativação do sistema imune inato e coincidindo com o pico de viremia, e diminuem na infecção crônica, mas ainda permanecendo em níveis elevados (SANDLER; SERETI, 2014; STACEY et al., 2009). A detecção destes marcadores inflamatórios tem sido identificada como preditora independente de progressão da doença e eventos clínicos (SANDLER; SERETI, 2014; TENORIO et al., 2014).

Sendo assim, a ativação do sistema imunológico frente à infecção pelo HIV-1 deveria ser encarada como um processo comum e positivo, assim como se observa quando o organismo entra em contato com outros patógenos. No entanto, observa-se que esta defesa do organismo funciona contraditoriamente, podendo tanto atuar na limitação da replicação viral e progressão da doença, como estimular ainda mais a depleção de células T CD4+, instalando o caos na resposta imune anti-HIV e conduzindo à imunodeficiência severa e progressão para AIDS. Desta forma, este paradoxo da resposta imune anti-HIV parece envolver diversas vias de sinalizações e mediadores ainda desconhecidos que precisam ser elucidados.

1.2 Receptores de peptídeos formilados (FPRs): co-receptores alternativos para o HIV-1 e moduladores da resposta imune

Os receptores de peptídeos formilados (FPRs) apresentam sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G e foram identificados em 1976 como um sítio de ligação de alta afinidade para o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) na superfície de neutrófilos (LE; MURPHY; WANG, 2002; MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006). Três membros desta família já foram identificados em humanos, os quais são codificados por diferentes genes e denominados de FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (LE et al., 2002; MURPHY et al., 1992). Estes receptores estão amplamente distribuídos em diferentes tipos de células, incluindo células da resposta imunológica, como monócitos, neutrófilos e linfócitos, e também em células endoteliais ou epiteliais. Os neutrófilos humanos expressam FPR1 e FPR2 / ALX, mas não FPR3 (DORWARD et al., 2015; MOCSAI; WALZOG; LOWELL, 2015), monócitos apresentam todos os três receptores (CROUSER et al., 2009; LE; OPPENHEIM; WANG, 2001), e linfócitos expressam apenas FPR1 e FPR2 / ALX, porém em níveis mais baixos em comparação aos neutrófilos e monócitos (MIGEOTTE

et al., 2006). O FPR2/ALX é o receptor de baixa afinidade para fMLP, sendo que sua ativação *in vitro* é realizada a partir de altas concentrações de fMLP. O FPR3 não responde a peptídeos formilados, mas se liga a alguns peptídeos não formilados que se associam ao FPR2/ALX (LE et al., 2002).

Os FPRs são ainda vulgarmente conhecidos como receptores promíscuos, justamente devido à existência de uma variedade de diferentes classes de ligantes que são capazes de ativá-los induzindo distintas consequências funcionais (MIGEOTTE et al., 2006). Estes receptores foram descritos como moduladores importantes da resposta imunológica, atuando de modo eficiente na defesa do hospedeiro, podendo ligar-se a diferentes agonistas, incluindo peptídeos N-formilados e não-N-formilados (VANCOMPERNOLLE et al., 2003; YANG, D. et al., 2002). Existem evidências de que ligantes de FPRs, agindo como agonistas ou antagonistas, podem servir como agentes terapêuticos úteis na defesa do hospedeiro, e como imunomoduladores seletivos para aumentar as respostas imunitárias inatas, de modo a reduzir os efeitos adversos associados à inflamação, doenças infecciosas e câncer (SCHEPETKIN et al., 2014).

Embora já esteja bem descrito os receptores e co-receptores comuns que estão envolvidos na invasão das células pelo HIV-1, sob determinadas condições, o vírus pode associar-se a outros co-receptores não usuais para o processo de infecção (CALADO et al., 2010). O FPR2/ALX foi descrito como um co-receptor alternativo e eficiente para o HIV-1, desvendando uma nova via de entrada em células T CD4+ (COETZER et al., 2011; NEDELLEC et al., 2009; SHIMIZU et al., 2008). Além disso, a ativação de FPR2/ALX pelo seu agonista WKYMVm é capaz de induzir a dessensibilização heteróloga de CCR5 e CXCR4, o que prejudicaria a infecção pelo HIV-1 (LI et al., 2001).

Além disso, existem relatos de que durante a infecção pelo HIV-1, peptídeos como T20/DP 178, T21/DP 107 derivados da proteína gp41 do HIV-1 podem atuar como agonistas de FPR1 e FPR2/ALX (SU; GAO; et al., 1999; SU; GONG; et al., 1999), assim como outros domínios antigênicos das proteínas do envelope viral da gp120 do HIV-1 também já foram relatados como potentes estimuladores quimiotáticos desses receptores (DENG et al., 1999).

Ao mesmo tempo, outro estudo onde se considerou os efeitos de vários peptídeos também derivados de gp41 sobre a quimiotaxia de basófilos e a liberação de histaminas e citocinas, foi possível perceber que os peptídeos sintéticos 2019 e 2021 promoveram a migração de células FcεRI⁺ (receptor de IgE de alta afinidade) e foram capazes de inibir a síntese de IL-13 através da interação com FPRs (DE PAULIS et al., 2002).

Além de considerado um novo e competente co-receptor para infecção pelo HIV-1, o FPR2/ALX pode ainda atuar como um fator bifuncional na infecção pelo HIV-1, promovendo ou prevenindo a infecção frente a determinadas condições. Um fator interessante é que o FPR2/ALX encontra-se geneticamente próximo aos receptores de quimiocinas (CKRs) e apresenta certa similaridade estrutural a estes, contendo dois resíduos de tirosinas e ácidos glutâmicos em sua região N-terminal (SHIMIZU et al., 2008).

Como já descrito, a atuação dos FPRs como co-receptores não usuais para a infecção pelo HIV-1 tem sido intensamente explorada, no entanto, não existem relatos dos efeitos da infecção sobre a expressão dos FPRs nos vários subtipos celulares envolvidos na resposta imune e quais as consequências desta modulação dos receptores na inflamação, imunoativação sistêmica e progressão da doença.

1.3 Anexina A1: ligante de FPRs e moduladora da inflamação

A AnxA1 é uma proteína descrita como ligante e agonista de FPRs e por meio destes desempenha funções relevantes em diversos processos patológicos e fisiológicos. É uma proteína de 37 KDa anteriormente denominada como macrocortina, renocortina, lipomodulina ou lipocortina-1. Foi descrita no final dos anos 70 como uma proteína induzida por glicocorticoide, com potente atividade inibidora de fosfolipase (BLACKWELL et al., 1980; LIM; PERVAIZ, 2007; ROTHHUT et al., 1983) e, portanto, com potencial ação anti-inflamatória. (D'ACUNTO et al., 2014).

Estruturalmente as anexinas apresentam um domínio principal (C-terminal) altamente conservado contendo quatro dobras repetidas de uma sequência de 70 aminoácidos, responsável pela ligação Ca^{2+} -dependente aos fosfolipídios e uma região N-terminal responsável pelas propriedades específicas de cada anexina (ROSENGARTH; GERKE; LUECKE, 2001) (Figura 2).

A AnxA1 é encontrada em diversas células e tecidos, sendo que em células do sangue periférico é encontrada principalmente em grânulos de neutrófilos, eosinófilos e monócitos e em menores níveis em linfócitos (GOULDING et al., 1998; MORAND et al., 1995; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

Esta proteína tem sido descrita como bioativa em diversos mecanismos celulares e sistêmicos, fazendo interações com uma variedade de moléculas, o que permite que a mesma auxilie em diversos processos patológicos (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). A AnxA1 pode atuar, por exemplo, na maquinaria de proliferação celular, na modulação do processo

inflamatório, na regulação da sinalização de morte celular, na fagocitose de células apoptóticas e no processo de carcinogênese (LIM; PERVAIZ, 2007).

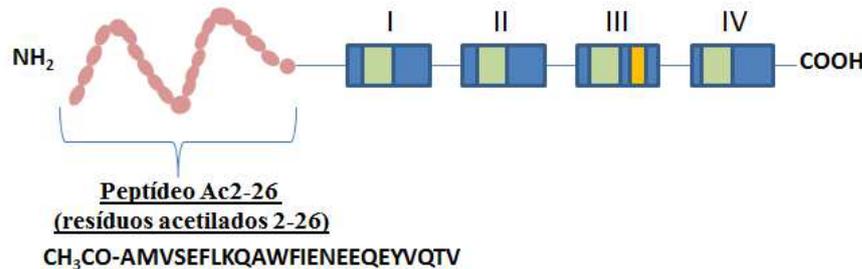


Figura 2: Representação esquemática da proteína Anexina A1. Representação esquemática da proteína Anexina A1 com destaque para seu sítio ativo com possíveis ações anti-inflamatórias (peptídeo Ac2-26).

A AnxA1 é uma proteína solúvel que em repouso é predominantemente encontrada no citoplasma, porém pode ser translocada para o núcleo ou para fora da célula, sendo que este processo de translocação parece depender da sinalização via tirosinas-quinases (D'ACUNTO et al., 2014). A partir da ativação celular e especialmente em condições inflamatórias, a AnxA1 é translocada para a membrana celular, e assim secretada para o meio extracelular, apresentando funções autócrinas, parácrinas e justácrinas (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Esta proteína pode ser translocada via transportador ABC-ligante de ATP (WEIN et al., 2004), via serino-fosforilação da região terminal (SOLITO et al., 2006) ou pela externalização através de vesículas derivadas da membrana plasmática (LEONI et al., 2015) (Figura 3).

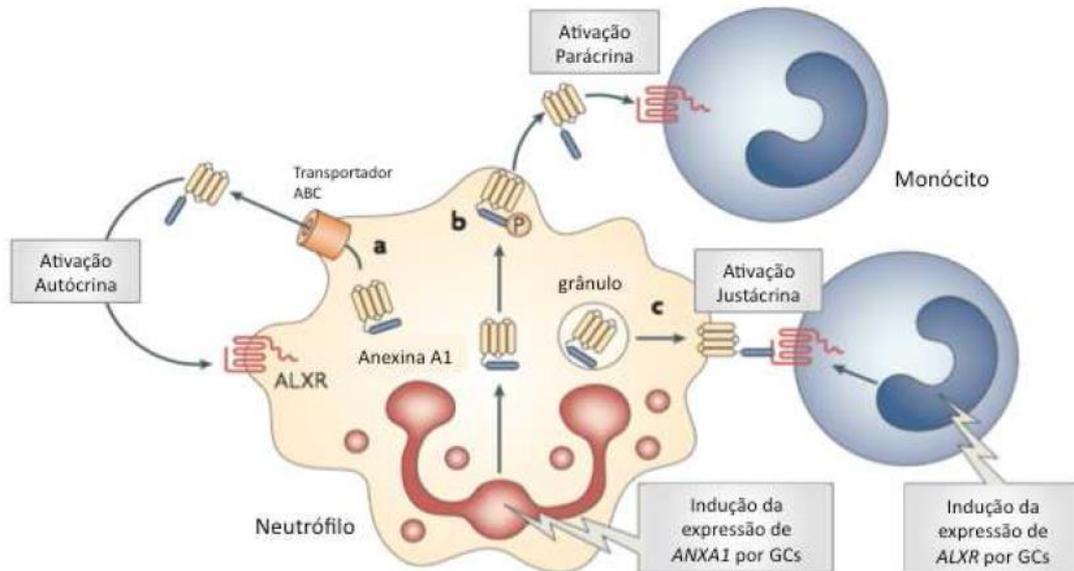


Figura 3: Translocação da Anexina A1 após ativação celular. A partir da ativação celular desencadeada por diversos fatores, a anexina A1 intracelular pode ser translocada para a membrana plasmática, podendo ser secretada por meio de três principais mecanismos: via transportador ABC-ligante de ATP (a), via serino-fosforilação da região terminal (b) ou pela externalização através de grânulos contendo a proteína ou vesículas derivadas da membrana plasmática (c). Uma vez externalizada, a anexina A1 é capaz de agir de forma autócrina, parácrina ou justácrina ativando seu receptor ALXR (FPR2/ALX). Os glicocorticoides (GCs) são os principais indutores da produção da anexina A1, assim como da expressão de FPR2/ALX. Fonte: adaptado (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009).

Estudos demonstram que a atividade anti-inflamatória da AnxA1 é desempenhada pela sua região N-terminal e seu processo de sinalização externa realizado a partir da sua associação a receptores específicos (LIM; PERVAIZ, 2007). Os FPRs foram descritos como receptores sensíveis à ligação da AnxA1, sendo que esta apresenta maior afinidade ao FPR1 e FPR2/ALX. Entretanto, experimentos *in vitro* demonstraram que um peptídeo mimético da proteína AnxA1 derivado da sua região N-terminal, Ac1-25, pode ativar todos os três FPRs em concentrações similares e dessensibilizá-los, modulando, assim, a migração de leucócitos (ERNST et al., 2004). Além disso, o peptídeo Ac2-26 (Figura 2) tem sido descrito como o principal responsável pelas ações anti-inflamatórias da AnxA1, podendo atuar tanto via FPR1, quanto FPR2/ALX (GAVINS et al., 2003; PERRETTI, 1998).

Embora seja extremamente descrita a ação anti-inflamatória da AnxA1 em diversos processos patológicos, o seu real papel funcional é dependente da sua localização, tipo celular e microambiente em que esta inserida. Em células da imunidade inata, principalmente em

fagócitos, a AnxA1 está associada à inibição do recrutamento destas células e resolução do processo inflamatório (DALLI et al., 2012). Já em células da imunidade adaptativa, como linfócitos, sua atividade parece oposta. Estudos demonstraram que esta proteína foi capaz de induzir ativação e proliferação de linfócitos pré-ativados, porém não daqueles em repouso (D'ACQUISTO; PASCHALIDIS; et al., 2007). Isto sugere uma atuação pró-inflamatória da AnxA1 especialmente via FPR2/ALX . As ações pró-inflamatórias da AnxA1 também já foram descritas em outros tipos celulares. Tagoe e colaboradores (2008), demonstraram que a AnxA1 é capaz de mediar a secreção de metaloproteinase – 1 a partir de fibroblastos sinoviais de artrite reumatoide, frente a ativação via TNF- α (TAGOE et al., 2008). Por outro lado, após ser fosforilada por PKC e translocada para o núcleo de células microgliciais BV-2 que sofreram lesão de OGD/R (privação de oxigênio-glucose e reoxigenação), a AnxA1 é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHAO et al., 2016)

O papel da AnxA1 tem sido retratado em diversos processos patológicos, no entanto, é escassamente explorada durante a infecção pelo HIV-1. Um estudo detectou o aumento da expressão transcricional da ANXA1 sistêmica em macacos sob infecção crônica por SIV (vírus da imunodeficiência símia), porém não detalhou sua importância funcional (GEORGE et al., 2005). Nosso grupo também avaliou a expressão da ANXA1 em macacos frente à infecção pelo SIV e observou que a sinalização da AnxA1 é disfuncional na infecção por SIV e pode contribuir para a inflamação crônica na periferia e disfunção imune na mucosa intestinal (SENA et al., 2016). Sendo assim, frente aos interessantes relatos da participação da AnxA1 na modulação da inflamação em diversos processos patológicos, é de suma importância uma avaliação mais apurada de sua expressão e função durante a infecção pelo HIV-1. Acredita-se que esta proteína possa ter um papel significativo na patogênese do HIV-1, principalmente no que diz respeito ao paradoxo da resposta imune neste contexto infeccioso.

2. JUSTIFICATIVA

Embora o advento da HAART, a AIDS continua apresentando um forte impacto na saúde, merecendo atenção de toda a comunidade científica. Sendo assim, nossa investigação baseou-se especialmente no importante paradoxo da infecção pelo HIV-1, já descrito anteriormente, o qual determina a progressão da doença. Além disso, frente aos papéis já descritos da via de sinalização dos FPRs e as importantes funções da AnxA1, consideramos que seja de suma importância avaliar quais os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre o eixo de sinalização FPRs/AnxA1, e quais os impactos sobre a progressão da doença.

Portanto, acreditamos que o eixo de sinalização FPRs/AnxA1 possa se eleger como potencial candidato a participar dos mecanismos de modulação da ativação imune sistêmica e inflamação que persistem na infecção pelo HIV-1. Assim, o estudo dessas moléculas pode abrir caminhos promissores para o potencial uso terapêutico das mesmas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da infecção pelo HIV-1 sobre o eixo de sinalização FPRs/Anexina A1 e quais os impactos sobre a progressão da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Caracterizar a expressão proteica de FPR1, FPR2/ALX, FPR3 e AnxA1 em linfócitos, monócitos, células dendríticas e granulócitos de sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Quantificar os níveis da proteína AnxA1 em amostras de plasma de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos.
- Avaliar o perfil de citocinas produzidos por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos HIV-1 positivos com carga viral detectável, não detectável e controles HIV-1 negativos, estimulados com peptídeo funcional da AnxA1 (Ac 2-26) e bloqueadores de FPRs (BOC2, WRW4).
- Correlacionar os resultados laboratoriais obtidos com dados clínicos presentes nos prontuários (contagem de CD4, relação CD4/CD8, carga viral, doenças oportunistas).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de amostras biológicas

Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (CEP N. 198,897) (Anexo A) e um consentimento informado (Apêndice B) foi obtido de todos os participantes. As amostras de sangue periférico foram obtidas a partir de 56 pacientes HIV-1-positivos com carga viral não detectável (CVND), 23 pacientes HIV-1-positivos com carga viral detectável (CVD) e 32 doadores de sangue saudáveis (controle). Deste total amostral coletado, utilizou-se aleatoriamente amostras de alguns pacientes e controles para executar a citometria de fluxo, o estímulo em cultura e a quantificação de AnxA1 no plasma, tal como descrito abaixo.

Para integrar o grupo controle, foram incluídos doadores de sangue de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que apresentavam resultados negativos para o HIV-1, sífilis, vírus T-linfotrópicos humano (HTLV), hepatites B/C e doença de Chagas. Foram excluídos do grupo doadores em uso de corticosteroides, ou que apresentavam qualquer tipo de câncer ou doenças autoimunes. O grupo CVD incluiu pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável, que nunca realizaram a HAART ou que estavam sem tratamento (por abandono ou dificuldades na adaptação aos efeitos colaterais) a pelo menos 2 anos e que não estavam sob o uso de corticosteroide. O grupo CVND consistiu de pacientes infectados pelo HIV-1 em HAART regular por pelo menos seis meses, com carga viral não detectável e sem uso de corticosteroide. Foram excluídos dos grupos HIV-1 positivos indivíduos que haviam realizado transfusão de sangue recente e que apresentavam outras doenças não relacionadas ao HIV-1. As mulheres grávidas foram excluídas de todos os grupos.

Para a realização dos experimentos coletou-se 18 mL de sangue periférico utilizando tubos *BD Vacutainer*® contendo os anticoagulantes heparina ou EDTA de todos os indivíduos integrantes dos grupos acima citados.

As informações presentes nos prontuários e os exames laboratoriais também foram analisados para posterior correlação com os resultados experimentais. A descrição das características principais dos indivíduos HIV-1 positivos encontram-se na tabela 2 e 3.

4.2 Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3

Amostras de sangue total foram coletadas de 56 pacientes HIV-1 positivos do grupo CVND, 21 pacientes HIV-1 positivos do grupo CVD e 31 doadores saudáveis do grupo controle. O RNA total foi extraído utilizando o método *Trizol LS Reagent* (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro de alta sensibilidade Nanodrop ND-1000 3.5.2 (*NanoDrop Technologies*) a 260nm e 280nm. Analisou-se a qualidade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, submetido à voltagem de 100 volts por aproximadamente 50 minutos em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, pH 8,3 e EDTA1 mM). Após a resolução do gel, o perfil eletroforético foi visualizado em luz UV e documentado no sistema *Digimage System* (*Major Science*). O DNA complementar (cDNA) foi gerado por transcrição reversa (MMLV, Life Technologies, EUA), utilizando 0,5 µg de RNA, de acordo com o protocolo do fabricante. RT-qPCR foi realizada em um ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, EUA) utilizando TaqMan PCR Master Mix Universal para quantificar os níveis de RNAm de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3. O volume da reação foi de 12 µl, incluindo 6 µl de Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 5 µl de cDNA molde, 0,2 µl de sonda e 0,8 µl de água. Foram utilizadas as seguintes sondas: ANXA1: Hs00167549_m1, FPR1: Hs04235426_s1, FPR2/ALX: Hs02759175_s1, FPR3: Hs01574392_m1, e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH: Hs03929097_g1 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado como o controle endógeno. As condições de amplificação foram de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s e 60°C durante 1 min. Todas as reações foram realizadas em duplicata. A expressão dos transcritos dos genes alvo foi normalizada com o endógeno GAPDH, e a quantificação relativa realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando o grupo de controle como calibrador.

4.3 ELISA *in-house* para detecção Anexina A1 humana

Os níveis da proteína AnxA1 foram determinados em amostras de plasma de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 16 doadores do grupo controle, utilizando o ensaio ELISA quantitativo *in-house*. Resumidamente, o anticorpo de captura (anticorpo policlonal de coelho anti-Anexina A1, Nuvem-Clone Corp., Houston, TX, EUA) foi diluído para uma concentração final de 10 µg/mL em tampão de bicarbonato, pH 9,6 e incubado *overnight* a 4 °C. O bloqueio foi realizado utilizando uma solução de tampão fosfato salino

(PBS) a 2% de BSA durante 1 h a 37 °C. A proteína recombinante humana AnxA1 (Nuvem-Clone Corp) foi utilizada para produzir uma curva padrão entre 0 e 3200 pg/mL. Amostras de plasma e padrões foram analisadas em duplicata em placas de ELISA de 96 poços, e foram incubadas overnight a 4 °C. Anticorpo policlonal anti-AnxA1 conjugado à biotina (Nuvem-Clone Corp) foi utilizado para detecção (concentração final 2µg/mL em PBS/Tween-20, pH 7,4) com incubação durante 1 h a 37°C. Em seguida incubou-se a estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP 1: 500, GE Healthcare) durante 30 min. Por fim, a reação foi incubada com o substrato TMB (BD Bioscience) durante 15 min à temperatura ambiente, e as amostras foram quantificadas em um leitor de placas (Thermo Placa) no comprimento de onda de 450 nm.

4.4 Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico

Para realização do ensaio de Citometria de Fluxo realizou-se inicialmente a lise de hemácias presentes em alíquotas de 100µl de sangue total de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 7 controles saudáveis, utilizando a solução *BD Pharm Lyse* (*BD Biosciences*, EUA) de acordo com protocolo do fabricante.

Para os ensaios diretos, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAbs) identificadores de superfície celular específicos para leucócitos humanos: linfócitos [anti-CD3 (AF647), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (PE/CY7)], monócitos (anti-CD14 (PE ou PE/CY7), anti-CD16 (AF647)] e granulócitos [anti-CD66b (PerCP/Cy5.5)]. Para a identificação de células dendríticas circulantes totais [células dendríticas mielóides (CD11c⁺ CD123^{low}) e células dendríticas linfóides (CD11c⁻CD123^{hi})] foi utilizado o ensaio de 3 cores com base em descrições da *BD Bioscience*. Para isso, utilizou-se os seguintes marcadores: células dendríticas [coquetel anti-Lin1 FITC (contendo anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56)], anti-HLA (PE/CY7), anti-CD11c e anti-CD123 (AF647) (*BioLegend*, San Diego, CA, EUA).

Além da marcação de superfície para a identificação dos tipos celulares, realizou-se a marcação de FPR1 (anti-FPR1 FITC), FPR2/ALX (anti-FPR2/ALX PE), FPR3 (anti-FPR3 PE) e AnxA1 (anti-AnxA1 FITC) na superfície destas mesmas células. Para a identificação da AnxA1 utilizou-se o ensaio indireto onde as células foram marcadas nas mesmas condições com o anticorpo primário anti-AnxA1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e anticorpo

secundário conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para a identificação intracelular da AnxA1, as células foram permeabilizadas após marcação extracelular utilizando 200ul de BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EUA) durante 20 min, e realizado a marcação indireta como anteriormente descrito.

As células também foram marcadas com anticorpos *Isotype Control* adequados. Para cada tubo, 60.000 eventos correspondentes aos leucócitos viáveis foram adquiridos no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As análises das subpopulações celulares foram realizadas de acordo com a estratégia de *gating* distintas (Apêndice A) usando o software FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, EUA). Os dados foram apresentados como percentagem do valor absoluto de subpopulações de células e mediana da intensidade de fluorescência de marcadores específicos. A mediana da intensidade de fluorescência (MIF) determina a densidade de receptores e/ou a concentração da proteína encontradas nas células avaliadas.

4.5 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico

Amostras de sangue total foram coletadas com anticoagulante heparina para realizar a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 9 pacientes do grupo CVND, 8 pacientes do grupo CVD e 7 controles saudáveis. A separação de PBMC foi realizada utilizando a solução *Ficoll-Paque PREMIUM* (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA), de acordo com as descrições do fabricante. Após a separação, foram plaqueadas 1×10^5 células em meio de cultura RPMI1640 (Cell) contendo 0,1% de antibiótico gentamicina em duplicata em placas de 24 poços e incubadas a 37°C, a 5% de CO₂ durante 2 horas, para estabilização da cultura e produção natural de seu perfil de citocinas. As células foram estimuladas com as seguintes moléculas: o peptídeo funcional N-terminal da AnxA1, Ac2-26 (A, 20µM, como padronizado em ensaio piloto), na presença ou ausência de incubação prévia durante 30 min com os seguintes antagonistas de FPRs: BOC2 (B, 10 µM, bloqueador de FPR1 e FPR2/ALX) e WRW4 (W, 10 µM, bloqueador de FPR2/ALX e FPR3). A incubação com Ac2-26 foi mantida durante 3,5 h, e o sobrenadante da cultura foi coletado para a quantificação e determinação do perfil de citocinas. Como controle negativo, utilizou-se células incubadas somente em meio de cultura RPMI1640 contendo 0,1% de antibiótico gentamicina.

4.6 Cytometry Bead Array (CBA) para detecção de citocinas em culturas de PBMCs

Para avaliar a possível ação anti-inflamatória da AnxA1 frente ao contexto da infecção pelo HIV-1, por meio do kit *BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines*, quantificou-se em pg/mL os níveis das seguintes citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de PBMCs: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-12p70 (IL-12p70). Resumidamente, incubaram-se amostras e citocinas recombinantes humanas (curva padrão) durante 3 horas à temperatura ambiente com uma suspensão de esferas de captura e o reagente de detecção conjugado à ficoeritrina (PE). Após a incubação, a mistura foi lavada e as amostras adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences, EUA). A obtenção dos níveis de citocinas presentes nos sobrenadantes foi realizada utilizando o software FCAP (BD Biosciences, EUA).

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Inicialmente o teste de normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov) foi realizado e em seguida foram aplicados testes paramétricos para variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos para variáveis sem distribuição normal. Os testes utilizados foram ONE-Way ANOVA, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Fisher, teste t não-pareado e para significância o intervalo de confiança (CI) de 0,95 e $p < 0,05$ foram considerados. Além disso, as correlações entre os dados clínicos obtidos a partir da análise dos prontuários médicos (carga viral, contagem de CD4 e histórico de doenças oportunistas) e dados laboratoriais foram determinadas. Para dados paramétricos e não paramétricos foram utilizadas as correlações de Spearman e Pearson, respectivamente, e os resultados foram descritos como coeficientes de correlação e valores de p .

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1, com base em dados obtidos de prontuários médicos, estão resumidas nas tabelas 2 e 3. A tabela 2 descreve a idade dos pacientes e o tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV-1. O grupo CVND apresentou tempo de diagnóstico significativamente maior comparado ao grupo CVD. Em relação à duração do tratamento, todos os pacientes do grupo CVND encontravam-se sob uso regular de HAART. Além disso, a média de duração do tratamento desses pacientes foi de aproximadamente seis anos, um período relevante para avaliar o desempenho da HAART. Com relação aos níveis de carga viral detectados no grupo CVD, todos os pacientes apresentaram carga viral ativa, com grande variabilidade entre os pacientes (média = 292.500 ± 641.600 desvio padrão). Na avaliação da contagem de células CD4+ o grupo CVND apresentou níveis significativamente mais elevados comparados ao grupo CVD. Nenhuma diferença foi observada na contagem de células CD8+, embora o grupo CVND tenha apresentado maiores níveis da relação CD4 / CD8 quando comparado ao grupo CVD.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes infectados pelo HIV-1 com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).

Características dos Pacientes	CVND n = 56		N	CVD n = 23		Valor de p
	n	Média ± DP (Min-Max)		Média ± DP (Min-Max)		
Idade (anos)	56	42.12 ± 6.35 (26 – 58)	23	35.39 ± 11.68 (17 – 57)	0.002**	
Tempo de diagnóstico (anos)	56	8.48 ± 5.90 (0,25 – 21)	21	4.39 ± 5.91 (0 – 17)	0.002**	
Tempo de HAART regular (anos)	54	6.52 ± 4.73 (0.33 – 17)	23	-	-	
Carga Viral (cópias/mL)	56	-	23	292500 ± 641600 (40 – 2407000)	-	
Leucócitos (células/mm ³)	38	5943 ± 1184 (4200 – 8600)	21	4710 ± 1503 (2000 – 7400)	0.001**	
CD4 (células/μl)	56	630.7 ± 264.3 (73.49 – 1283)	23	322.3 ± 247.3 (2 – 848)	<0.0001***	
CD8 (células/μl)	56	1017 ± 381.8 (322 – 2156)	23	1398 ± 1012 (65 – 3363)	0.262	
CD4/CD8	56	0.72 ± 0.41 (0.08 – 1.74)	23	0.27 ± 0.21 (0.03 – 0.81)	<0.0001***	

DP = Desvio Padrão; HAART = terapia antirretroviral altamente ativa; CD4 = linfócitos T CD4+; CD8 = linfócitos T CD8+; CD4/CD8 = razão entre linfócitos T CD4 + e linfócitos T CD8 +. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

A tabela 3 apresenta o histórico de doenças oportunistas nos grupos infectados pelo HIV-1 e a classificação dos níveis de CD4. O grupo CVD (78,3%) apresentou percentual significativamente maior de acometimentos por doenças oportunistas entre seus membros quando comparado ao grupo CVND (41,1%). Entre as doenças oportunistas em curso, o grupo CVD (43,5%) apresentou maior incidência comparada ao grupo CVND (8,9%) e a tuberculose, sífilis, citomegalovírus e herpes foram as doenças mais comuns encontradas entre os pacientes. Quanto à contagem de células CD4+, o grupo CVD apresentou maior percentual de pacientes com CD4 <200 (30,4%, p <0,001), enquanto que o grupo CVND apresentou CD4 > 500 em 73,2% dos pacientes (p <0,0001). É importante notar que todos os pacientes do grupo CVND estavam sob regime regular de HAART.

Tabela 3. Histórico de doenças oportunistas e contagem de CD4 de pacientes HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD) e não detectável (CVND).

VARIÁVEIS	CVND n = 56		CVD n = 23		Valor de p
	N	%	n	%	
Histórico de Doenças Oportunistas	23	41.1	18	78,3	<0.005**
Doenças Oportunistas em Curso	5	8.9	10	43.5	<0.0001***
Toxoplasmose	1	1.8	2	8.7	0.2016
Criptococose	0	0	0	0	-
Pneumocistose	1	1.8	0	0	1.0000
Citomegalovírus	0	0	2	8.7	0.0821
Herpes	3	5.3	3	13.0	0.3496
Sífilis	0	0	1	4.3	0.2911
Tuberculose	0	0	2	8.7	0.0821
Doenças Oportunistas Tratadas	18	32.1	8	34.8	1.0000
Toxoplasmose	9	16.1	1	4.3	0.2659
Criptococose	2	3.6	0	0	1.0000
Pneumocistose	4	7.1	1	4.3	1.0000
Citomegalovírus	1	1.8	2	8.7	0.2016
Herpes	1	1.8	3	13.0	0.0719
Sífilis	2	3.6	4	17.4	0.0562
Tuberculose	6	10.7	1	4.3	0.6666
CD4<200	1	1,8	7	30.4	<0.0001***
CD4 200-499	14	25	10	43.8	0.1857
CD4>500	41	73.2	6	26.1	<0.0001***

CD4 = Linfócitos T CD4+. Teste exato de Fisher. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

5.2. Determinação do perfil transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX, FPR3

As análises da expressão transcricional de ANXA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 não revelaram diferenças significativas para os genes ANXA1 e FPR1 entre os grupos infectados e controle, embora o grupo CVD tenha uma ligeira diminuição da expressão de FPR1 quando comparado aos demais grupos (Figuras 4a e 4b). Em relação ao gene FPR2/ALX, o grupo CVND apresentou níveis de RNAm duas vezes mais baixos do que o observado no grupo controle (p <0,001), enquanto que o grupo CVD apresentou nível uma vez mais baixo comparado ao controle (Figura 4c). Para o gene FPR3, o grupo CVND apresentou níveis

cinco vezes mais elevados ($p < 0,001$) e o grupo CVD níveis quatro vezes mais elevados ($p < 0,01$) em relação ao controle (Figura 4d).

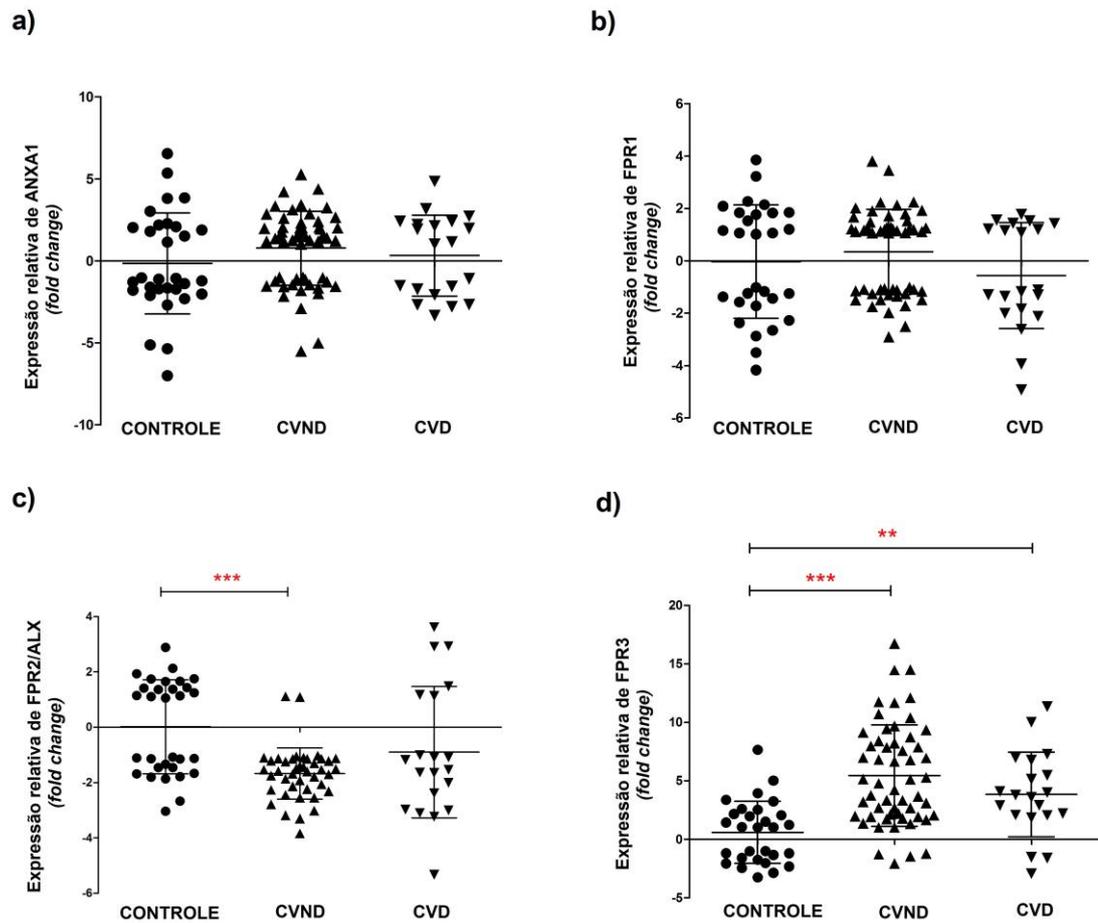


Figura 4: Expressão relativa de RNAm de ANXA1 e FPRs em sangue total. Expressão relativa de RNAm de ANXA1 (a), FPR1 (b), FPR2/ALX (c) e FPR3 (d) dos grupos HIV+ CVND (carga viral não detectável), HIV+ CVD (carga viral detectável) e controle. Os níveis de transcrição foram normalizados com o gene GAPDH e calibrados com o grupo controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3 ELISA *in-house* para detecção Anexina A1 humana

A quantificação dos níveis plasmáticos de AnxA1 detectados pelo método de ELISA *in-house*, demonstraram que a presença do vírus ativo encontrado no grupo CVD foi significativamente associada aos níveis plasmáticos de AnxA1 quando comparados aos grupos CVND e controle ($p < 0,01$) (Figura 5).

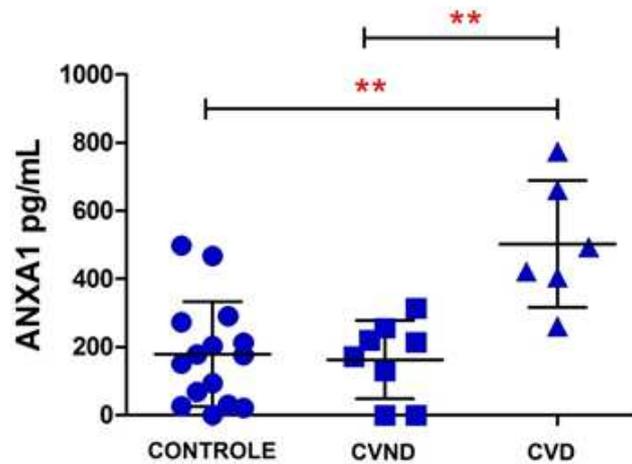


Figura 5: Níveis de AnxA1 detectados no plasma. Níveis de AnxA1 detectados em pg/mL no plasma dos grupos HIV+ CVND (carga viral não detectável), HIV+ CVD (carga viral detectável) e controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4 Análise de correlação entre expressão transcricional de FPR3, ANXA1, níveis plasmáticos de AnxA1, contagens de CD4, carga viral e histórico de doenças oportunistas

Observou-se correlação negativa significativa entre carga viral e contagem de CD4 ($n = 23$, grupo CVD, $r = -0,5174$), assim como entre contagem de CD4 e presença de doenças oportunistas [$n = 79$ (CVD grupo $n = 23$, CVND Grupo $n = 56$), $r = -0,3361$]. Curiosamente, encontrou-se ainda uma correlação positiva entre a carga viral e os níveis plasmáticos de AnxA1 [$n = 17$ (grupo CVD $n = 8$, grupo CVND $n = 9$), $r = 0,7823$], enquanto uma correlação inversa entre contagem de CD4 e níveis plasmáticos de AnxA1 [$n = 17$ (grupo CVD $n = 8$, grupo CVND $n = 9$), $r = -0,7273$]. Correlações positivas entre os níveis transcricionais de FPR3 e ANXA1 [$n = 77$ (grupo CVD $n = 21$, grupo CVND $n = 56$), $r = 0,5068$], e com a presença de doenças oportunistas [$n = 77$ (grupo CVD $n = 21$, grupo CVND $n = 56$); $r = 0,20$] também foram detectadas (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman, Pearson e seus valores de p entre os dados laboratoriais: carga viral (CV), linfócitos T CD4 +, doenças oportunistas (DO), expressão transcricional de ANXA1, FPR3 e níveis plasmáticos de AnxA1.

	CD4	Níveis de AnxA1 no plasma	FPR3 (qPCR)
CV	-0.51*	0.78**	-
CD4	-	-0.72**	-
DO	-0.33**	-	0.20*
ANXA1 (qPCR)	-	-	0.50***

* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

5.5 Análise de Citometria de Fluxo para detecção de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em leucócitos de sangue periférico

Avaliando a presença de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em linfócitos T CD4+ observamos que os grupos CVND e CVD demonstram tendência de aumento do percentual de células T CD4+/AnxA1+, bem como um aumento na concentração desta AnxA1 associado à superfície celular, com resultado significativo para o grupo CVD comparado ao grupo controle p <0,01 (Figuras 6a, 6b).

Para a concentração de AnxA1 intracelular presente em linfócitos T CD4+, o grupo CVND apresentou níveis significativamente maiores que o grupo CVD (p <0,05). Por outro lado, o grupo CVD exibiu tendência de diminuição da AnxA1 intracelular (Fig. 6c). Observou-se também que os grupos infectados pelo HIV-1 apresentaram percentual aumentado de células T CD4+/FPR1+ e células T CD4+/FPR2/ALX+. Entretanto, o grupo CVND apresentou o percentual mais significativo em relação ao controle (p <0,01 e p <0,05, respectivamente) (Figuras 6d, 6f). Ao mesmo tempo, a densidade de FPR1 na superfície das células T CD4+ tiveram níveis significativamente mais elevados no grupo CVD em comparação ao controle (p <0,05) (Figura 6e).

Por outro lado, não foram observadas diferenças no percentual de células T CD8+/AnxA1+ (Fig. 6h). A concentração de AnxA1 foi significativamente maior no grupo CVD em relação ao controle (p <0,01) (Fig. 6i). Entretanto, os níveis de AnxA1 intracelular nessas células foram maiores no grupo CVND quando comparados aos grupos controle e CVD (p <0,05) (Figura 6j). Somente o grupo CVD apresentou maior percentual de células T CD8+/FPR1+ (Fig. 6k), mas a densidade de FPR1 nestas células foi significativamente maior no grupo CVND quando comparado aos grupos controle e CVD (p <0,05) (Figura 6l). Ambos

os grupos CVND e CVD tenderam a apresentar um percentual aumentado de células T CD8+/FPR2/ALX+ (Fig. 6m), porém suas densidades nestas células não diferiram (Fig. 6n).

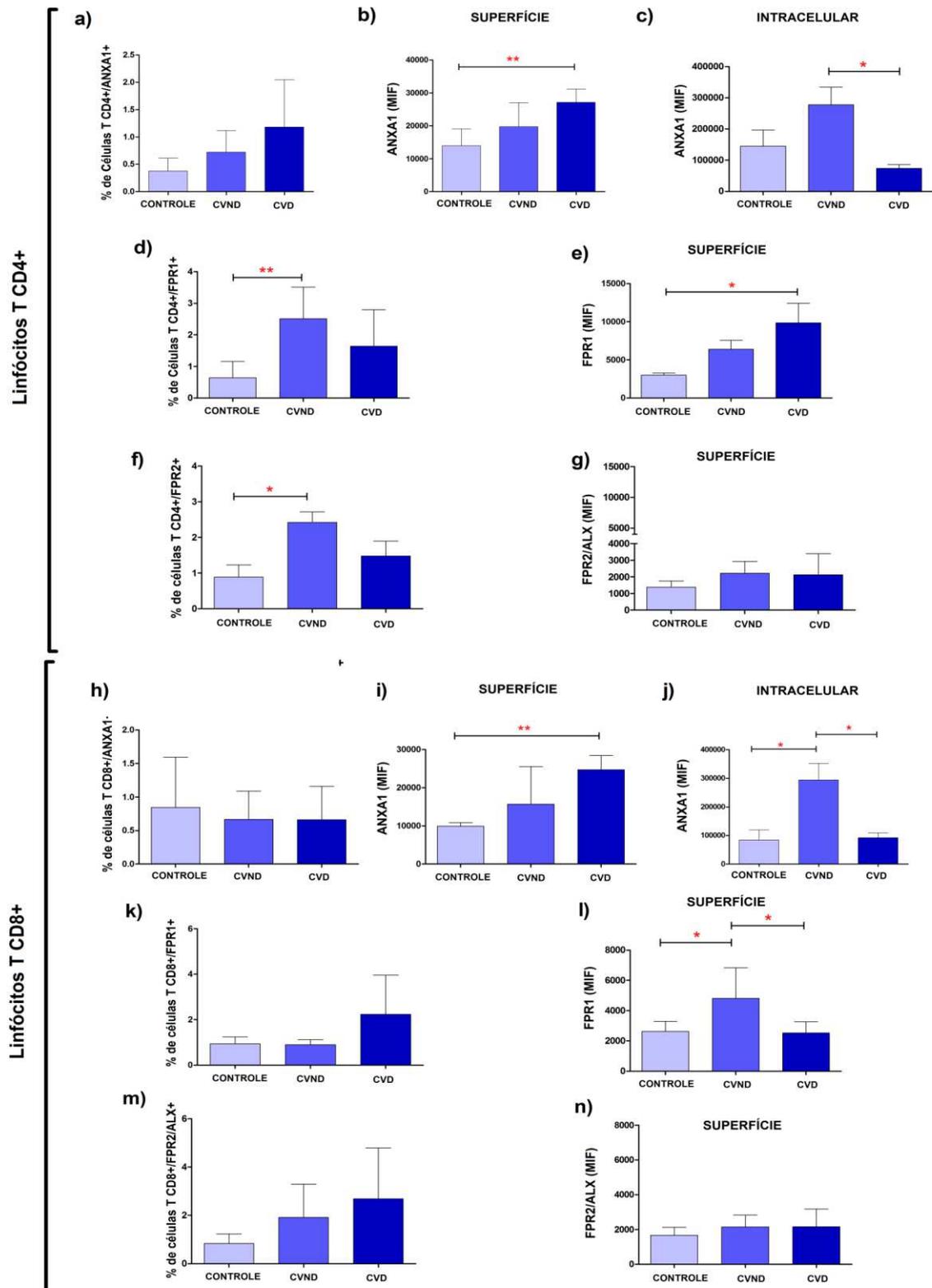


Figura 6: Citometria de fluxo exibindo o percentual e/ou a mediana da intensidade de fluorescência de células T CD4+ e CD8+ expressando AnxA1 e FPRs. Citometria de fluxo de leucócitos de sangue periférico de doadores saudáveis (controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e detectável (CVD). Percentual (%) de células T CD4+ expressando AnxA1 (a), FPR1 (d) e FPR2 / ALX (f) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (b), FPR1 (e), FPR2/ALX (g) na superfície e

AnxA1 intracelular (c). Percentual de células T CD8+ expressando AnxA1 (h), FPR1 (k) e FPR2/ALX (m) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (i), FPR1 (l) e FPR2/ALX (n) na superfície e AnxA1 intracelular (j). Os dados estão expressos como médias \pm DP. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Para descrever o perfil das diferentes subpopulações de monócitos na presença deste contexto infeccioso induzido pelo HIV-1, foram utilizados anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 para análise de citometria de fluxo. Ambos os grupos CVND e CVD apresentaram uma tendência de maior percentual de monócitos com perfil intermediário (CD14⁺⁺/CD16⁺), conforme observado na figura 7a.

Considerando que a população de monócitos intermediários foi mais frequente entre os grupos infectados pelo HIV-1, avaliou-se a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 nesta população celular. O percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺/AnxA1⁺ apresentou tendência a diminuição no grupo CVND (Figura 7b), enquanto a concentração da AnxA1 ligada à superfície celular aumentou nos grupos CVND e CVD (Figura 7c), que foram significativamente diferente comparados ao controle (p <0,05 e p <0,01, respectivamente). Os níveis de AnxA1 intracelular foram significativamente maiores no grupo CVND quando comparado ao controle (p <0,05) (Figura 7d). Não houve diferença significativa no percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺ expressando FPR1 e FPR2/ALX, assim como na densidade destes receptores entre os grupos (Figuras 7e, 7f, 7g, 7h). Contudo, o percentual de monócitos CD14⁺⁺/CD16⁺/FPR3⁺ foi significativamente maior no grupo CVD em comparação aos grupos CVND e controle (p <0,001) (Figura 7i). Um ligeiro aumento nos níveis de FPR3 nestas células foi também observado no grupo CVND (Figura 7j).

A expressão de FPR3 também foi investigada em células dendríticas circulantes totais. O grupo CVD apresentou um aumento significativo no percentual de células dendríticas que expressam FPR3 (Figura 7k), enquanto que ambos os grupos CVND e CVD apresentaram alta densidade deste receptor na superfície celular (p <0,05 e p <0,01, respectivamente) (Figura 7l).

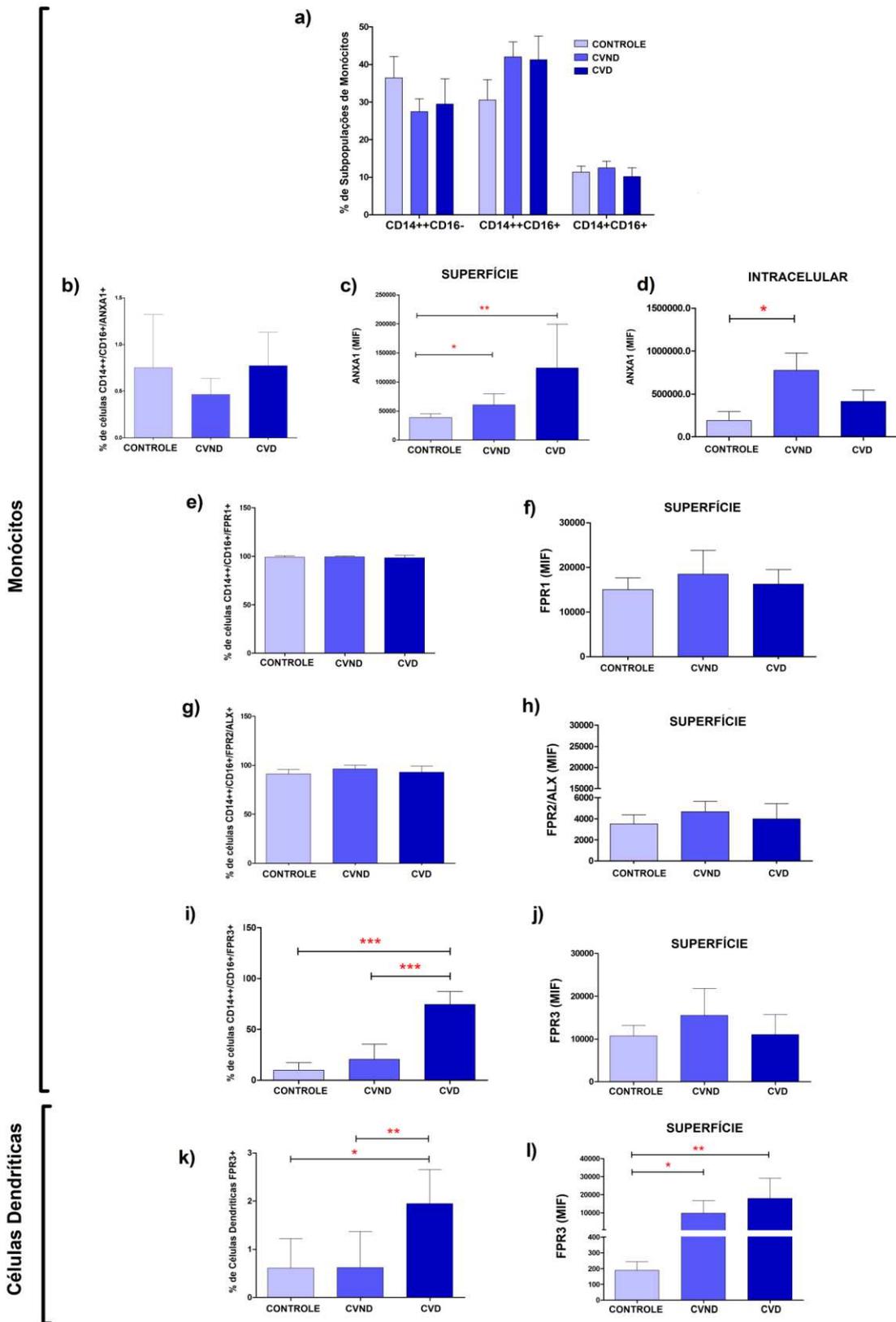


Figura 7: Análises de citometria de fluxo de subpopulações de monócitos e de células dendríticas. Análises de citometria de fluxo determinando a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 em monócitos e FPR3 em células dendríticas de doadores saudáveis

(controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD). Avaliação das subpopulações de monócitos: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (a). O percentual de monócitos CD14⁺⁺CD16⁺ expressando AnxA1 (b), FPR1 (g), FPR2/ALX (e) e FPR3 (i) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (c), FPR1 (f), FPR2/ALX (h) e FPR3 (j) na superfície e ANXA1 intracelular (d). O percentual de células dendríticas expressando FPR3 (k) na superfície e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de FPR3 (l) na superfície. Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

A expressão de FPRs e AnxA1 também foi avaliada em granulócitos CD66b⁺. Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de granulócitos CD66⁺/AnxA1⁺ entre os grupos (Figura 8a), porém o grupo CVD apresentou aumento significativo na concentração de AnxA1 ligado à superfície celular em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 8b). Os níveis de AnxA1 intracelular foram maiores no grupo CVND comparado aos grupos CVD e controle (Figura 8c). Em relação à expressão de FPR1, o grupo CVD apresentou percentual significativamente menor em relação aos grupos CVND e controle ($p < 0,001$) (Figura 8d), no entanto, não houve diferença na densidade desse receptor entre os grupos (Figura 8e). Na avaliação da expressão de FPR2/ALX em granulócitos CD66⁺, ambos os grupos HIV-1⁺ apresentaram diminuição significativa no seu percentual ($p < 0,05$) (Figura 8f), porém o grupo CVD demonstrou aumento significativo na densidade de FPR2/ALX nestas células quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 8g).

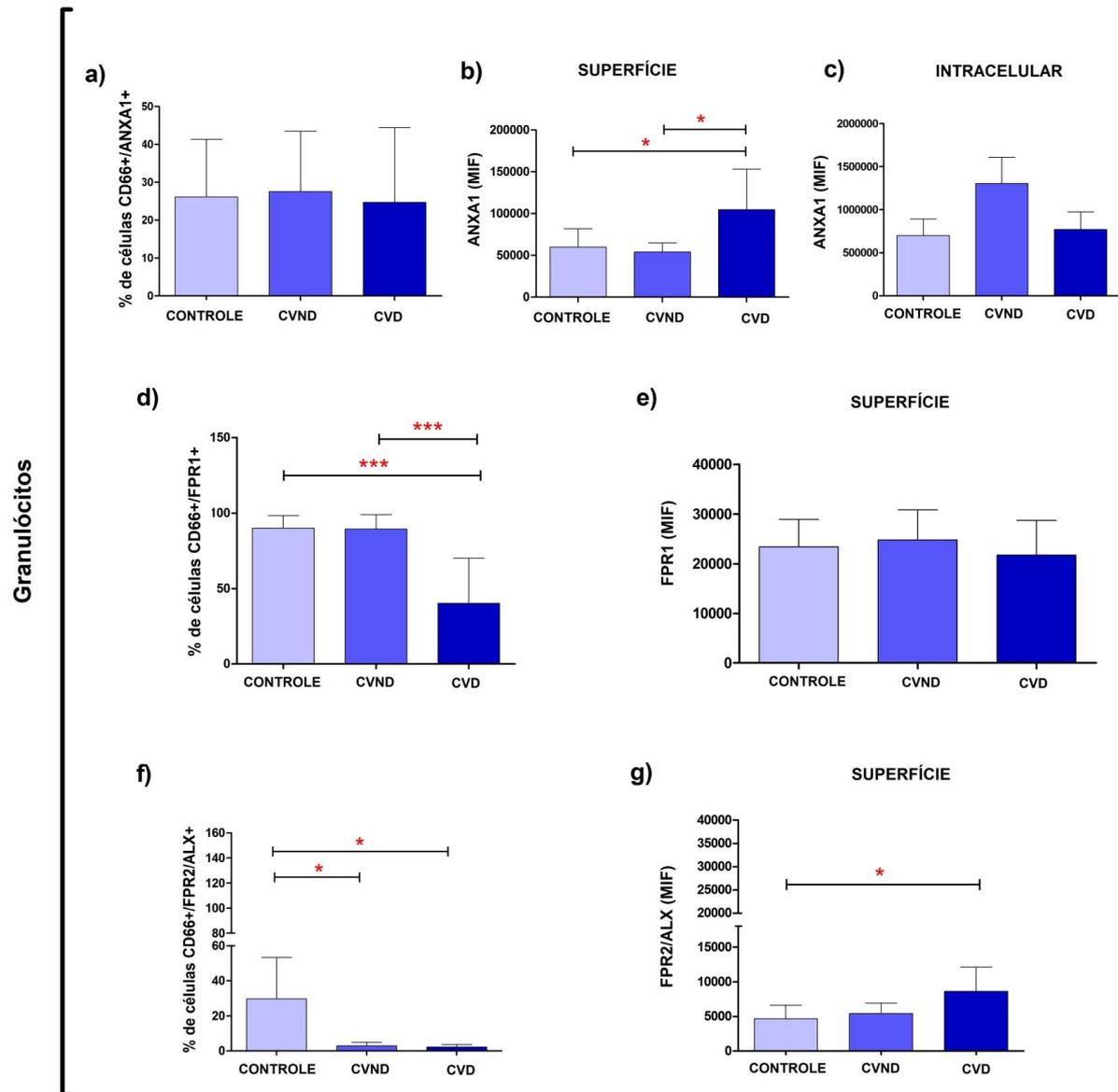


Figura 8: Análise de Citometria de Fluxo exibindo o percentual e/ou mediana da intensidade de fluorescência de granulócitos expressando AnxA1 e FPRs. Citometria de fluxo de leucócitos de sangue total de doadores saudáveis (Controle), pacientes HIV-1 positivos com carga viral não detectável (CVND) e HIV-1 positivos com carga viral detectável (CVD). Percentual de granulócitos CD66b+ expressando AnxA1 (a), FPR1 (d) e FPR2/ALX (f) na superfície. Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de AnxA1 (b), FPR1 (e) e FPR2/ALX (g) na superfície e AnxA1 intracelular (c). Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6 Cultura e estímulos de células mononucleares de sangue periférico

Para avaliar o papel funcional da sinalização externa da AnxA1 em PBMC de indivíduos dos grupos CVND, CVD e controle, estímulos foram realizados utilizando o peptídeo funcional da AnxA1, o Ac2-26, e os antagonistas de FPRs, BOC-2 e WRW4. Houve aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo IL-8, IL-6 e TNF- α , após o estímulo com Ac2-26 em todos os grupos (figuras 9a, 9b, e 9c). Os níveis basais de produção de IL-8 foram significativamente maiores nos grupos CVND e CVD quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e sua liberação foi significativamente exacerbada após o estímulo com Ac2-26 em todos os grupos, especialmente nos grupos CVND e CVD em comparação ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (figura 9a). Após o bloqueio preferencial de FPR2/ALX e bloqueio parcial de FPR1 por meio do estímulo com BOC-2, observou-se diminuição significativa na produção de IL-8 quando comparado ao estímulo com Ac2-26 ($p < 0,01$). O bloqueio de FPR2/ALX e FPR3 por WRW4 levou a um ligeiro aumento desta citocina em relação ao estímulo com Ac2-26. Contudo, este aumento na produção de IL-8 pelo antagonista WRW4 foi significativamente mais elevado nos grupos CVND e CVD em comparação ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 9a).

A produção de IL-6 também foi detectada em condições basais entre os grupos, mas níveis mais elevados foram observados em grupos HIV-1 positivos, especialmente no grupo CVD. Além disso, após os estímulos Ac2-26, os níveis de IL-6 foram fortemente aumentados em todos os grupos e significativamente diferentes entre os grupos infectados pelo HIV-1 e entre os grupos CVD e controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Após o bloqueio por BOC-2 ou WRW4, a produção de IL-6 foi ligeiramente diminuída em todos os grupos, mas com uma redução significativa no CVND em comparação com o grupo CVD sob bloqueio WRW4 ($p < 0,05$) (Figura 9b). Da mesma forma, a produção de TNF- α também aumentou após os estímulos Ac2-26, com diferenças significativas entre os controles ($p < 0,05$) e entre CVD versus controle ($p < 0,05$), seguido de uma pequena diminuição após o bloqueio com BOC-2 ou WRW4. A ação de BOC-2 demonstrou-se ligeiramente mais eficaz do que WRW4 (Fig. 9c).

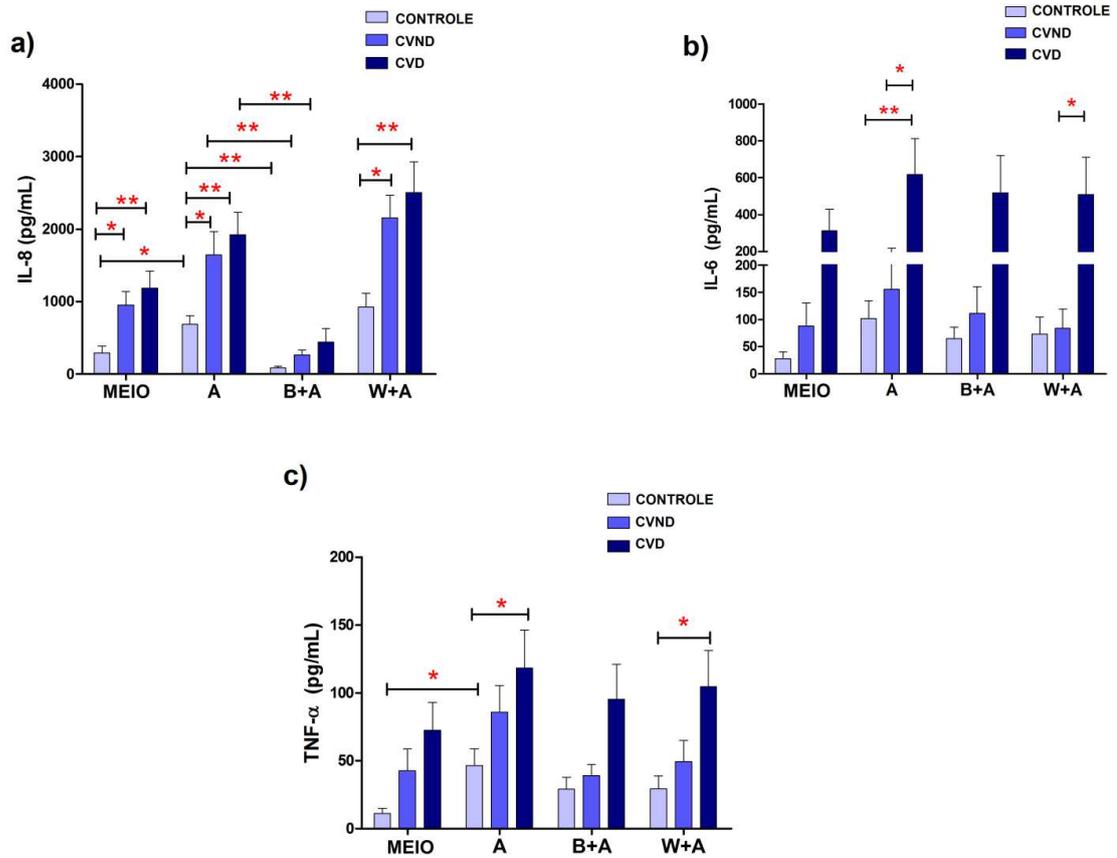


Figura 9: Perfil de citocinas determinado por Cytometry Bead Array (CBA) frente aos estímulos com agonistas e antagonistas de FPRs. Ensaio de CBA (pg/mL) para a detecção de IL-8 (a), IL-6 (b) e TNF- α (c) no sobrenadante de cultura de PBMC de doadores saudáveis (controle), pacientes HIV-1 positivo com carga viral não detectável (CVND) e pacientes HIV-1 positivo com carga viral detectável (CVD), após estímulo com Ac2-26 e antagonistas de FPRs. Meio de cultura (Meio); Ac2-26 (A); BOC-2 (B); WRW4 (W). Os dados foram expressos como médias \pm DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

O polêmico cenário imunológico desencadeado pela infecção pelo HIV-1, o qual é marcado pela depleção de células T CD4+ e intensa imunoativação sistêmica, eventos críticos para a progressão e desenvolvimento da AIDS, ainda encontra-se sob intensa investigação (APPAY; SAUCE, 2008). Neste estudo, descrevemos pela primeira vez o envolvimento dos FPRs e AnxA1 durante a ativação celular desencadeada pela infecção pelo HIV-1. Observamos que o vírus é capaz de modular a translocação da AnxA1 com maior liberação para a membrana e meio extracelular em leucócitos de sangue periférico, que juntamente com sua sinalização externa exacerba a inflamação sistêmica e crônica neste cenário infeccioso. Além disso, a detecção do vírus circulante parece induzir alterações significativas nos FPRs de maneira célula específica, com significativo aumento de expressão de FPR3 em monócitos intermediários e células dendríticas e diminuição de FPR2/ALX em granulócitos possivelmente disfuncionais. A modulação dos receptores foi ainda associada a diferentes perfis funcionais.

Nossos resultados foram obtidos de grupos heterogêneos de indivíduos que representam os dois principais perfis de pacientes infectados pelo HIV-1: pacientes HIV-1+ com carga viral detectável (CVD) sem HAART e pacientes HIV-1+ com carga viral não detectável (CVND) sob intenso e regular regime de HAART. Detectamos que aquele primeiro grupo foi marcado por contagens baixas de leucócitos, baixos níveis de células T CD4+, baixa relação CD4/CD8, e histórico significativo de doenças oportunistas (DO). Estes achados foram acompanhados por correlações significativas observadas entre CV, CD4 e DO, mostrando o curso natural da doença, com redução crônica da contagem de células T CD4+ nos pacientes sem tratamento (MAARTENS et al., 2014; SIMON; HO; ABDOOL KARIM, 2006). Esta reduzida contagem de células T CD4+ provavelmente foi condicionada pelo aumentando da carga viral que causa efeitos citopáticos direto e perda de células CD4+, uma característica crítica para o prognóstico dos pacientes. Contrariamente, observamos que o uso regular de HAART pode reduzir a carga viral, suprimir a replicação do vírus, aumentando a contagem de células T CD4+, diminuindo o aparecimento de doenças oportunistas e melhorando a condição geral dos pacientes do grupo CVND (SIMON et al., 2006).

Frente a este intrigante paradoxo da resposta imune anti-HIV, assim como frente à descoberta de que o FPR2/ALX é um co-receptor alternativo do HIV-1 (COETZER et al., 2011; NEDELLEC et al., 2009; SHIMIZU et al., 2008) nos levou a investigar, em

populações de leucócitos de sangue periférico, a influência do HIV-1 na expressão de FPRs e na translocação e função da AnxA1, a qual é intensamente descrita com papel anti-inflamatório em outras condições patológicas (DALLI et al., 2012; KAMAL; FLOWER; PERRETTI, 2005; SUGIMOTO et al., 2016). Embora não tenham sido detectadas alterações nos níveis de transcrição de ANXA1 entre os grupos, observou-se a liberação desta proteína para o meio extracelular, a qual foi dependente da ativação celular induzida pelo HIV-1, provavelmente afetando o seu papel funcional (PERRETTI et al., 2000; PERRETTI et al., 1996). Curiosamente, este comportamento específico foi um perfil comum em todos os tipos de células avaliadas sob a infecção pelo HIV-1. Portanto, acreditamos que a presença de ativação imune induzida pelo vírus ativo determinou a translocação da AnxA1, evidenciado por sua baixa concentração intracelular e maior detecção na superfície celular e no plasma de pacientes HIV-1 + do grupo CVD. Um perfil distinto e oposto foi verificado no grupo CVND, possivelmente mediado pela terapia antirretroviral efetiva, que apontou diminuição da liberação de AnxA1 para o meio extracelular, evidenciada pelos baixos níveis plasmáticos e níveis crescentes no compartimento intracelular. Além disso, embora HAART tenha um papel decisivo no prognóstico de pacientes HIV-1+, não foi capaz de redirecionar a condição imunológica geral do paciente para um perfil semelhante ao de indivíduos saudáveis. É importante notar que o grupo controle apresentou maior equilíbrio dos níveis de AnxA1 tanto no meio intracelular, como no meio extracelular e membrana. A correlação positiva entre os níveis plasmáticos de AnxA1 e a carga viral, bem como a correlação negativa entre os níveis plasmáticos de AnxA1 e a contagem de CD4+, sugerem uma dependência direta da presença de vírus ativos neste processo e associação com pior prognóstico para o paciente.

Além da interferência na translocação de AnxA1, a infecção também modula seus receptores alvo, os FPRs. A interação dos FPRs com vários ligantes pró e anti-inflamatórios faz com que estes receptores adquiram a capacidade reguladora de múltiplas condições patológicas, incluindo a inflamação (KAO et al., 2014), os processos infecciosos (SHIMIZU et al., 2008) e a tumorigênese (CHEN et al., 2013; GASTARDELO et al., 2014). Em nosso estudo, observamos que os FPRs foram modulados de forma célula específica, provavelmente ocasionando o comprometimento de diferentes populações celulares, com diferentes papéis funcionais dentro do sistema imunológico, particularmente no processo infeccioso.

O papel dos FPRs nas populações de linfócitos ainda é pouco descrito. Assim, a expressão de FPRs em linfócitos T CD4+ foi caracterizada frente à infecção por HIV-1 e, embora uma depleção grave destas células tenha sido especialmente observada no grupo CVD, ambos os grupos HIV-1+ apresentaram um aumento no percentual de células que

expressam FPR1 e FPR2/ALX em comparação ao grupo controle, sugerindo que a modulação de ambos os FPRs é diretamente influenciada pela infecção viral. Curiosamente, o grupo CVND apresentou a maior expressão dos dois FPRs, indicando uma possível associação com a ação da HAART. Além disso, a densidade de FPR1 nas células T CD4+ foi extremamente superior ao FPR2/ALX. No grupo CVD isto foi acompanhado de perda da AnxA1 endógena, aumento da sua translocação para a membrana e liberação para o meio extracelular. Interessantemente, a literatura demonstrou o envolvimento da AnxA1 em três diferentes modelos de inflamação mediada por células T CD4+ confirmando que a deficiência de AnxA1 está associada com a exacerbação da inflamação dependente de células T (YANG, Y. H. et al., 2013). Sendo assim, sugerimos que, sob a infecção pelo HIV-1, a AnxA1 transloca para a superfície das células T CD4+, principalmente no grupo CVD, preferencialmente agindo via FPR1, apresentando um perfil pró-inflamatório.

Interessantemente, foi demonstrado que a exportação de AnxA1 para a membrana plasmática externa de linfócitos apoptóticos co-localizados com fosfatidilserina é um requisito para a depuração eficiente de células apoptóticas, sugerindo um papel da AnxA1 como sinal apoptótico de células CD4+ para a atuação de fagócitos (ARUR et al., 2003). Portanto, a translocação de AnxA1 pode funcionar como um sinal apoptótico ativo quando combinada com células T CD4+ infectadas, permitindo a depuração de células apoptóticas mediadas por fagócitos, provavelmente explicando parte de sua grave depleção durante a progressão da doença. Este fato é ainda corroborado pelo comportamento oposto da expressão de FPRs em linfócitos T CD8+, que apresentou o maior percentual de expressão de ambos os receptores no grupo CVD e maior densidade de FPR1 no grupo CVND, provavelmente apoiando a expansão das células T CD8+ devido à presença de ambos os receptores. Portanto, levantamos a hipótese de que, sob alta carga viral, AnxA1 é secretada e se torna um sinal apoptótico quando o receptor FPR1 é altamente expresso. Assim, a presença de ambos os receptores pode estar associada à proliferação de células T, enquanto a depleção de FPR2 e expressão de FPR1 estão provavelmente relacionadas com sinais de morte.

Nossos dados também demonstraram que a infecção pelo HIV-1 não apenas influenciou o perfil dos linfócitos, como também determinou a mudança do fenótipo dos monócitos, exibindo maiores níveis de monócitos intermediários CD14⁺⁺CD16⁺ durante a infecção. Isto é corroborado pelo aumento das subpopulações de monócitos de CD14⁺CD16⁺⁺ (não clássicos) e CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediários) em doenças cardiovasculares e inflamatórias e durante a infecção pelo HIV-1, sendo que a subpopulação de monócitos intermediários pode atingir 10-50% da população total de monócitos durante a

infecção pelo HIV-1 (CAMPBELL et al., 2014; YANG, J. et al., 2014). Além disso, na infecção pelo HIV-1, a proporção desta subpopulação está diretamente relacionada aos níveis de viremia, ativação das células T (HLA-DR e CD38), aumento dos níveis de IL-6 e, portanto, está relacionado à pior prognóstico (CAMPBELL et al., 2014; FUNDERBURG et al., 2012; YANG, J. et al., 2014). A literatura ainda demonstra que esta subpopulação de monócitos exibe altos níveis de CCR2 e CCR5, tornando-se não só mais suscetível à infecção pelo HIV-1, mas também sustentando a replicação do vírus. Ao mesmo tempo, os monócitos intermediários apresentam atividade inflamatória significativa, que estão de acordo com os nossos resultados. Sabe-se também que monócitos expressando CD16+ têm um fenótipo imunológico mais maduro, que é consistente com o perfil de macrófagos, explicando parcialmente a sua capacidade de migrar e de se infectar (CAMPBELL et al., 2014).

Investigando o perfil de FPRs nesta subpopulação de monócitos CD14++CD16+, observou-se que o HIV-1 não afetou os níveis de FPR1 e FPR2/ALX; no entanto, apresentou aumento significativo na expressão de FPR3. Esta alta expressão de FPR3 também ocorreu em células dendríticas circulantes, especialmente no grupo CVD. Estes achados também são corroborados pelo fato de que os monócitos CD16+ encontrados em níveis mais elevados nos grupos HIV-1 são os principais precursores de DCs na circulação (QU et al., 2014; RANDOLPH et al., 2002). Yang e colaboradores (2002) descreveram a expressão de FPR3 em populações de monócitos, bem como em DCs derivadas destes monócitos. Além disso, os autores relataram que as DCs mantêm a expressão funcional deste receptor mesmo após a sua maturação, o que pode estar envolvido na regulação do tráfico de células durante a captura e processamento de antígenos na periferia, bem como na estimulação de células T durante a resposta imune (YANG, D. et al., 2002).

Propomos que a mudança fenotípica da população de monócitos para um perfil mais inflamatório (CD14++CD16+) durante a infecção pelo HIV-1 possa estimular a expressão de FPR3, provavelmente atuando sobre o tráfico de células por meio da associação a ligantes endógenos disponíveis no microambiente (KAO et al., 2014). Sugerimos que os monócitos intermediários funcionam como reservatórios virais à medida que se tornam mais suscetíveis à infecção pelo HIV-1 devido ao aumento da expressão de CCR5 na superfície. Além disso, tanto os monócitos como as células dendríticas apresentam maior capacidade de migração tornando-se carreadoras da infecção, o que determinaria a disseminação do vírus e possível progressão da doença.

Tem sido relatado que a AnxA1 presente nos exsudatos inflamatórios, bem como liberada pelas células apoptóticas, é capaz de sinalizar via FPR2/ALX presente em monócitos

direcionando-os para locais de inflamação e estimulando a depuração de células apoptóticas (MCARTHUR et al., 2015). Além disso, um ligante de alta afinidade ao FPR3, o F2L (peptídeo acetilado de 21 aminoácidos derivado da região N terminal da proteína intracelular de ligação a heme, HEBP1), é altamente liberado após dano e morte celular (DEVOSSE et al., 2011; MIGEOTTE et al., 2005). Portanto, sugerimos que os monócitos intermediários que expressam FPR2/ALX são capazes de manter e provavelmente estimular a expressão de FPR3, que também pode estar envolvido na depuração de neutrófilos e células T CD4+ apoptóticas sob intensa replicação viral. Além disso, a liberação de F2L também pode contribuir para a expressão aumentada de FPR3 em monócitos intermediários e DCs, os quais podem estar envolvidos na tentativa de resolução da inflamação crônica, sugerindo outra atuação para estas células.

A correlação positiva entre os níveis de transcrição de FPR3, a presença de doenças oportunistas e os níveis de transcrição de ANXA1, sustentam ainda mais os nossos resultados, sugerindo uma participação direta ou indireta de AnxA1 na ativação imune crônica e seu possível envolvimento como sinalizadora para *clearance* de células apoptóticas. A AnxA1 pode ainda contribuir para eventos que culminam com a liberação de mais ligantes ativadores de FPR3. No entanto, sua associação com doenças oportunistas ainda precisa ser melhor avaliada. Não podemos descartar a possibilidade de ativação de FPR3 por produtos microbianos circulantes, no entanto, a associação com a perda de células T CD4+ é a hipótese mais plausível para explicar a predisposição dos pacientes à aquisição de infecções oportunistas.

Durante o curso da infecção pelo HIV-1, os indivíduos tornam-se mais susceptíveis a infecções oportunistas devido à sua imunodeficiência grave. Os granulócitos, especialmente os neutrófilos, têm um papel importantíssimo na defesa imunológica contra infecções oportunistas, porém durante a patogênese do HIV-1, uma redução no número de granulócitos, perda de função e altas taxas de morte celular são observadas (DOBMEYER et al., 1995). É interessante notar que o papel anti-inflamatório de FPR2/ALX nos neutrófilos é bastante conhecido, o qual é regulado no sítio inflamatório para a resolução adequada da inflamação (NATHAN, 2006), porém a expressão dos FPRs nos granulócitos durante a infecção pelo HIV-1 ainda não foi explorado. Nesta investigação, avaliamos os perfis de expressão de FPR1 e FPR2/ALX em granulócitos durante a infecção pelo HIV-1, o que revelou uma significativa diminuição de ambos os receptores no grupo CVD, enquanto que o grupo CVND apresentou níveis diminuídos apenas de FPR2/ALX. Estes achados são corroborados por outros estudos que demonstraram que o HIV-1 pode induzir disfunção de neutrófilos, especialmente em

pacientes com carga viral detectável (DOBMEYER et al., 1995). Isto ainda é reforçado por resultados que mostraram neutrófilos menos responsivos em indivíduos HIV positivos comparados a indivíduos HIV-1 negativos após a estimulação *in vitro* com N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), um agonista de FPR1 (MOORE; HENDERSON; GAZZARD, 1998).

Portanto, FPR1 tem um papel extremamente importante na indução da migração de neutrófilos na defesa contra processos infecciosos (DORWARD et al., 2015). Assim, a perda parcial da sua expressão no grupo CVD pode prejudicar diretamente a migração dos neutrófilos para locais de inflamação e, portanto, os processos infecciosos não podem ser contidos durante a progressão da doença. Levando em consideração os perfis de expressão de FPRs em outras células imunes, podemos afirmar que a redução mais significativa nos níveis de transcrição de FPR2/ALX detectada em ambos os grupos HIV-1 positivos foi devido à intensa perda nos granulócitos. Portanto, sugerimos ainda que a expressão muito baixa de FPR2/ALX é capaz de prejudicar a resolução da inflamação, que pode ainda ser dependente da translocação de AnxA1 para o meio extracelular, explicando o perfil circulante inflamatório e a ativação crônica em indivíduos HIV-1 positivos. Além disso, observou-se que o grupo CVND não apresentou baixa expressão de FPR1, e também não apresentou alta concentração de AnxA1 na superfície. É possível que a ausência de partículas virais circulantes controladas pela terapia antirretroviral no grupo CVND não desencadeie a liberação de AnxA1 para o meio e também pode ter impedido a perda da expressão de FPR1, que sem estímulos virais não se internaliza. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que a proteína do envelope gp41 do HIV-1 pode ativar especificamente o FPR1 (SU; GAO; et al., 1999; SU; GONG; et al., 1999), e após a ligação de um ligante específico de FPR1, a célula torna-se rapidamente não responsiva à estimulação subsequente, devido à internalização e dessensibilização do receptor. Além disso, a expressão de FPR1 nos leucócitos também pode servir como um marcador para a inflamação sistêmica (STOCKLEY et al., 1994). Nossos resultados são ainda corroborados por relatos que demonstram que a diminuição da carga viral controlada por HAART foi associada a uma recuperação parcial da função dos neutrófilos (MASTROIANNI et al., 1999).

Além da caracterização de AnxA1 em várias populações celulares envolvidas na resposta imune contra o HIV-1, avaliou-se ainda qual seria o seu papel na sinalização extracelular por meio do estímulo de PBMCs com seu peptídeo funcional Ac2-26. Estudos têm demonstrado que AnxA1 aumenta a proliferação e ativação de células T *in vitro*, e ainda induz a diferenciação de células Th0 em fenótipo Th1 (D'ACQUISTO; MERGHANI; et al.,

2007). Além disso, os monócitos e macrófagos são fontes importantes de AnxA1 endógena, que atua facilitando a fagocitose de células apoptóticas (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). No entanto, o estímulo de macrófagos com AnxA1 recombinante ou seu peptídeo Ac2-26 inibe a liberação de prostanóides, a geração de superóxido e a fagocitose (D'ACQUISTO et al., 2008). O paradoxo entre a sinalização interna e externa de AnxA1 coloca uma interrogação sobre como ocorre a sinalização da apoptose, que parece ser dependente da translocação de AnxA1. Dado os papéis distintos de AnxA1, nossos resultados demonstram que a estimulação com Ac2-26 induziu aumento significativo de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-6 e TNF- α) em todos os grupos, incluindo os controles. No entanto, nos grupos HIV-1 positivos a inflamação torna-se extremamente exacerbada pela presença deste peptídeo. Quando o bloqueio de FPRs é feito com BOC-2 (bloqueio FPR1 ou FPR2 / ALX) ou WRW4 (bloqueio FPR2/ALX ou FPR3), observou-se uma redução significativa da produção de IL-8 frente ao antagonismo de BOC-2, mas não com WRW4. Isto sugere que uma maior liberação de IL-8 é modulada através de FPR1, o que justifica a quimiotaxia de neutrófilos na presença de IL-8 com aumento do perfil inflamatório mediado por FPR1 na ausência de antagonistas, tal como descrito em outro estudo (DORWARD et al., 2015). No entanto, o mesmo efeito não foi observado na produção de IL-6 e TNF- α com o uso de bloqueadores de FPRs, que apresentaram perfis semelhantes com uma ligeira redução sob estímulos dos antagonistas. Portanto, as vias de ativação para ambas as citocinas pró-inflamatórias não são diretamente dependentes de FPRs, embora possam ser parcialmente moduladas sob a sinalização de AnxA1.

7. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo concluímos que:

- A ativação imunológica desencadeada pelo vírus altera a translocação da Anxa1 com maior liberação para a superfície e meio extracelular em todos os tipos celulares avaliados, marcando sua possível participação na inflamação, ativação imunológica e na sinalização para *clearance* de células apoptóticas.
- A presença do vírus ativo é capaz de modular a expressão dos FPRs de modo célula específica, com foco no aumento da expressão de FPR3 em monócitos de perfil intermediário e células dendríticas, assim como diminuição de FPR2/ALX em granulócitos possivelmente disfuncionais.
- Houve mudança fenotípica de monócitos para um perfil intermediário que caracteriza um papel funcional mais inflamatório, e juntamente com as células dendríticas são apontados como possíveis reservatórios virais.
- A sinalização externa induzida pelo peptídeo funcional da AnxA1 (Ac2-26) está associado à exacerbação da inflamação, com aumento da produção de IL-8, IL-6 e TNF- α . A produção de IL-8 é abortada pelo uso do bloqueador BOC-2, sugerindo sinalização via FPR1.

Sendo assim, descrevemos, pela primeira vez, os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre a modulação de FPRs, a translocação de AnxA1 e a possível participação deste eixo de sinalização FPRs/AnxA1 na ativação celular desencadeada pela infecção e os impactos sob progressão da doença. Além disso, nossos resultados trazem evidências relevantes sobre a complexidade e a diversidade de fatores que podem estar contribuindo para a manutenção do paradoxo da resposta imune anti-HIV.

8. PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao estudo, pretende-se confirmar as principais hipóteses levantadas neste estudo, por meio de investigações baseadas na utilização da infecção *in vitro*.

REFERÊNCIAS

APPAY, V. et al. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. **Exp Gerontol**, v. 42, n. 5, p. 432-7, May 2007.

APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 231-41, Jan 2008.

ARUR, S. et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**, v. 4, n. 4, p. 587-98, Apr 2003.

BIRX, D. L. et al. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2303-10, Dec 01 1990.

BLACKWELL, G. J. et al. Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 147-9, Sep 11 1980.

BOULOUGOURA, A.; SERETI, I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 11, n. 2, p. 191-200, Mar 2016.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, v. 12, n. 12, p. 1365-71, Dec 2006.

BRENCHLEY, J. M. et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 749-59, Sep 20 2004.

CALADO, M. et al. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: the relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. **Virology**, v. 408, n. 2, p. 174-82, Dec 20 2010.

CAMPBELL, J. H. et al. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. **AIDS**, v. 28, n. 15, p. 2175-87, Sep 24 2014.

CECCHINATO, V. et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 4, p. 279-88, Jul 2008.

CHASE, A. J. et al. Severe depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 81, n. 23, p. 12748-57, Dec 2007.

CHEN, K. et al. Formylpeptide receptor-2 contributes to colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 4, p. 1694-704, Apr 2013.

COETZER, M. et al. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 56, n. 1, p. 9-15, Jan 1 2011.

COOPER, A. et al. HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 376-9, Jun 20 2013.

CROUSER, E. D. et al. Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. **Crit Care Med**, v. 37, n. 6, p. 2000-9, Jun 2009.

D'ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095-102, Feb 01 2007.

D'ACQUISTO, F. et al. Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 11, p. 3131-42, Nov 2007.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 2, p. 152-69, Sep 2008.

D'ACUNTO, C. W. et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cell Signal**, v. 26, n. 1, p. 173-8, Jan 2014.

DALLI, J. et al. Annexin A1 N-terminal derived Peptide ac2-26 exerts chemokinetic effects on human neutrophils. **Front Pharmacol**, v. 3, p. 28, 2012.

DE PAULIS, A. et al. HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human Fc epsilon RI+ cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. **J Immunol**, v. 169, n. 8, p. 4559-67, Oct 15 2002.

DENG, X. et al. A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1165-73, Aug 15 1999.

DERDEYN, C. A.; SILVESTRI, G. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 366-73, Aug 2005.

DEVOSSE, T. et al. Processing of HEBP1 by cathepsin D gives rise to F2L, the agonist of formyl peptide receptor 3. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1475-85, Aug 1 2011.

DOBMEYER, T. S. et al. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. **Eur J Med Res**, v. 1, n. 1, p. 9-15, Oct 16 1995.

DOISNE, J. M. et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. **J Immunol**, v. 173, n. 4, p. 2410-8, Aug 15 2004.

DORWARD, D. A. et al. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. **Am J Pathol**, v. 185, n. 5, p. 1172-84, May 2015.

EGGENA, M. P. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4407-14, Apr 01 2005.

EPPLE, H. J. et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3072-8, Nov 01 2006.

ERNST, S. et al. An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7669-7676, June 15, 2004 2004.

FUNDERBURG, N. T. et al. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4599-608, Nov 29 2012.

GASCHEN, B. et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2354-60, Jun 28 2002.

GASTARDELO, T. S. et al. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e111317, 2014.

GAVINS, F. N. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-7, May 15 2003.

GEORGE, M. D. et al. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. **J Virol**, v. 79, n. 5, p. 2709-19, Mar 2005.

GOULDING, N. J. et al. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. **Inflamm Res**, v. 47 Suppl 3, p. S158-65, Oct 1998.

HAZENBERG, M. D. et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1881-8, Sep 5 2003.

HERBEUVAL, J. P. et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13974-9, Sep 27 2005.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-6, Jan 12 1995.

JONES, N. A. et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. **J Exp Med**, v. 200, n. 10, p. 1243-56, Nov 15 2004.

KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 39-47, Mar 2005.

KAO, W. et al. A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 17, p. 4087-96, Sep 2014.

LE, Y.; MURPHY, P. M.; WANG, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 541-8, Nov 2002.

LE, Y.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12, n. 1, p. 91-105, Mar 2001.

LEONI, G. et al. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **J Clin Invest**, v. 125, n. 3, p. 1215-27, Mar 02 2015.

LI, B. Q. et al. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2941-7, May 15 2001.

LIM, L. H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 968-75, Apr 2007.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258-71, Jul 19 2014.

MACALLAN, D. C. Immune responses to HIV and vaccination. **Medicine**, v. 41, n. 8, p. 425-429, 2013.

MASTROIANNI, C. M. et al. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 13, n. 8, p. 883-90, May 28 1999.

MCARTHUR, S. et al. Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 1139-51, Aug 01 2015.

MEHANDRU, S. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 761-70, Sep 20 2004.

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.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 501-19, Dec 2006.

MIGEOTTE, I. et al. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. **J Exp Med**, v. 201, n. 1, p. 83-93, Jan 3 2005.

MOCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 373-85, Aug 1 2015.

MOLINA, J. M. et al. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. **J Clin Invest**, v. 84, n. 3, p. 733-7, Sep 1989.

MOORE, D. A.; HENDERSON, D.; GAZZARD, B. G. Neutrophil adhesion molecules in HIV disease. **Clin Exp Immunol**, v. 114, n. 1, p. 73-7, Oct 1998.

MORAND, E. F. et al. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 76, n. 2, p. 195-202, Aug 1995.

MUNCH, J. et al. Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13852-64, Dec 2007.

MURPHY, P. M. et al. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. **J Biol Chem**, v. 267, n. 11, p. 7637-43, Apr 15 1992.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-82, Mar 2006.

NEDELLEC, R. et al. Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. **J Virol**, v. 83, n. 17, p. 8353-63, Sep 2009.

PAIARDINI, M.; MULLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. **Immunol Rev**, v. 254, n. 1, p. 78-101, Jul 2013.

PERRETTI, M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. **Gen Pharmacol**, v. 31, n. 4, p. 545-52, Oct 1998.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biol Int**, v. 24, n. 3, p. 163-74, 2000.

PERRETTI, M. et al. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1259-62, Nov 1996.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009.

PRENDERGAST, A. et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. **AIDS**, v. 24, n. 4, p. 491-502, Feb 20 2010.

QU, C. et al. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. **Int J Infect Dis**, v. 19, p. 1-5, Feb 2014.

RANDOLPH, G. J. et al. The CD16(+) (FcγR3(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. **J Exp Med**, v. 196, n. 4, p. 517-27, Aug 19 2002.

ROSENGARTH, A.; GERKE, V.; LUECKE, H. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. **J Mol Biol**, v. 306, n. 3, p. 489-98, Feb 23 2001.

ROTHHUT, B. et al. Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase protein "renocortin". **Biochem Biophys Res Commun**, v. 117, n. 3, p. 878-84, Dec 28 1983.

SANDLER, N. G.; SERETI, I. Can early therapy reduce inflammation? **Curr Opin HIV AIDS**, v. 9, n. 1, p. 72-9, Jan 2014.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Development of small molecule non-peptide formyl peptide receptor (FPR) ligands and molecular modeling of their recognition. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 13, p. 1478-504, 2014.

SCHINDLER, M. et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1055-67, Jun 16 2006.

SCHNEIDER, E. et al. Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years--United States, 2008. **MMWR Recomm Rep**, v. 57, n. RR-10, p. 1-12, Dec 05 2008.

SENA, A. A. et al. Divergent Annexin A1 expression in periphery and gut is associated with systemic immune activation and impaired gut immune response during SIV infection. **Sci Rep**, v. 6, p. 31157, Aug 03 2016.

SHIMIZU, N. et al. A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. **Retrovirology**, v. 5, p. 52, Jun 25 2008.

SIMON, V.; HO, D. D.; ABDOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489-504, Aug 5 2006.

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1498-500, Jul 2006.

STACEY, A. R. et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3719-33, Apr 2009.

STOCKLEY, R. A. et al. Neutrophil formyl-peptide receptors. Relationship to peptide-induced responses and emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 149, n. 2 Pt 1, p. 464-8, Feb 1994.

SU, S. B. et al. T21/DP107, A synthetic leucine zipper-like domain of the HIV-1 envelope gp41, attracts and activates human phagocytes by using G-protein-coupled formyl peptide receptors. **J Immunol**, v. 162, n. 10, p. 5924-30, May 15 1999.

SU, S. B. et al. T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3885-92, Jun 1 1999.

SUGIMOTO, M. A. et al. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 8239258, 2016.

TAGOE, C. E. et al. Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2813-20, Aug 15 2008.

TENORIO, A. R. et al. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. **J Infect Dis**, v. 210, n. 8, p. 1248-59, Oct 15 2014.

VANCOMPERNOLLE, S. E. et al. Expression and function of formyl peptide receptors on human fibroblast cells. **J Immunol**, v. 171, n. 4, p. 2050-6, Aug 15 2003.

VEAZEY, R. S. et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science**, v. 280, n. 5362, p. 427-31, Apr 17 1998.

WEIN, S. et al. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. **Biochem Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 1195-202, Mar 15 2004.

WEISS, L. et al. HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) in vivo and with an abnormal release of IL-1 alpha in vitro. **AIDS**, v. 3, n. 11, p. 695-9, Nov 1989.

WHO. **HIV/AIDS - Global Health Observatory (GHO) data**, 2015.

YANG, D. et al. Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPRL2) throughout maturation. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 3, p. 598-607, Sep 2002.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**, v. 2, n. 1, p. 1, Jan 07 2014.

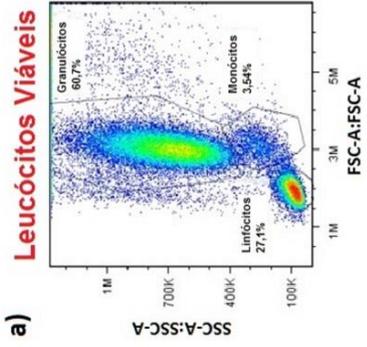
YANG, Y. H. et al. Deficiency of annexin A1 in CD4+ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 997-1007, Feb 1 2013.

ZHAO, B. et al. Annexin A1 translocates to nucleus and promotes the expression of pro-inflammatory cytokines in a PKC-dependent manner after OGD/R. **Sci Rep**, v. 6, p. 27028, Jul 18 2016.

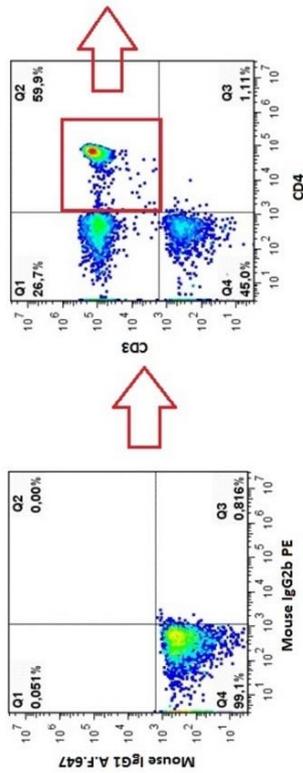
ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 3, p. 584-92, Mar 2007.

APÊNDICE

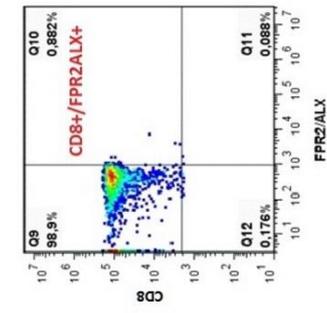
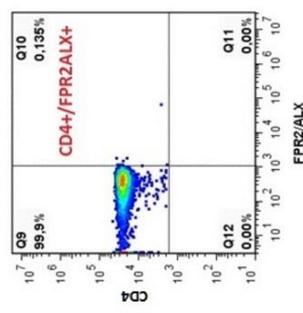
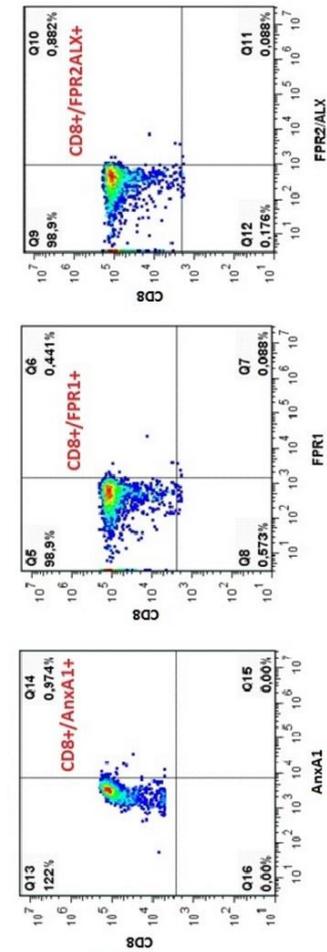
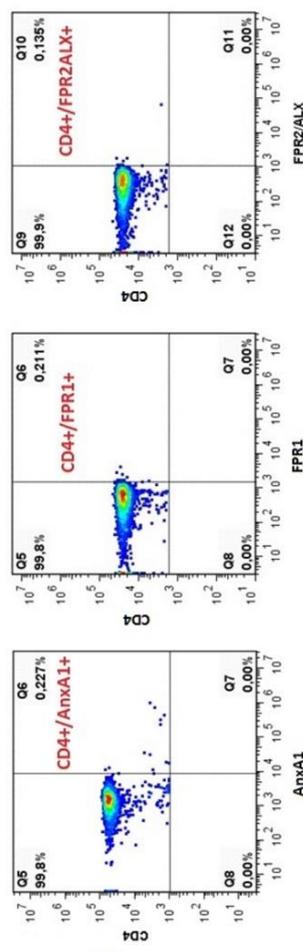
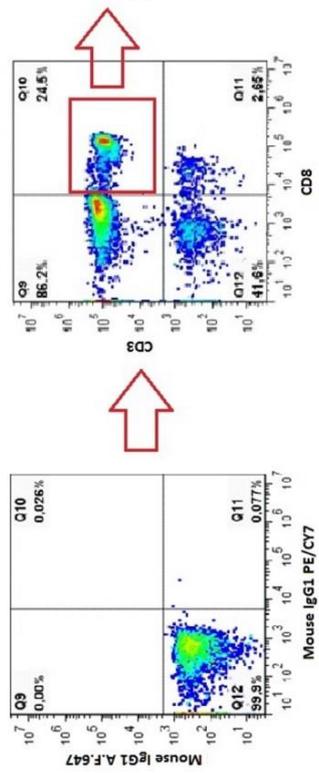
APÊNDICE A: Estratégia de *Gating* da Citometria de Fluxo. Gráficos representativos de um doador saudável (grupo controle) demonstrando a estratégia de *gating* utilizada para a análise de citometria de fluxo. As análises das subpopulações foram realizadas de acordo com estratégias de *gating* distintas utilizando o software FlowJo v7.6.5. Um limite de aquisição foi estabelecido de tal modo que quaisquer eventos indesejáveis tais como plaquetas, hemácias e debris celulares não fossem registrados. A compensação espectral foi realizada e os quadrantes foram definidos utilizando *Isotype control* específicos. Em primeiro lugar, os leucócitos foram visualizados num gráfico de dispersão direta (FSC) versus dispersão lateral (SSC), pelo qual foram identificados três subpopulações de leucócitos: linfócitos, monócitos e granulócitos (a). Em seguida, para a identificação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ considerou-se as populações CD3+/CD4+ (a) e CD3+/CD8+ (b), respectivamente. Com base nestas populações selecionadas, determinou-se a expressão de AnxA1, FPR1 e FPR2/ALX. Utilizando o *gating* de monócitos, determinou-se as subpopulações de monócitos clássicos (CD14++ CD16-), intermediários (CD14++ CD16+) e não clássicos (CD14+ CD16++). Em seguida, utilizando a população de monócitos intermediários, identificou-se a expressão de AnxA1, FPR1, FPR2/ALX e FPR3 individualmente (d). Por meio do *gating* de granulócitos identificou-se o marcador específico para esta população de células, o CD66b, juntamente com a expressão de AnxA1, FPR1 ou FPR2 / ALX (e). Para identificar as populações de células dendríticas, inicialmente detectou-se as subpopulações de células viáveis e, em seguida, selecionou-se a população de células Lin+/HLA+ para excluir outras populações de células que não eram as dendríticas. Em seguida, detectou-se células HLA+/CD11cCD123+ como a população de células dendríticas. Finalmente, determinou-se a expressão de FPR3 a partir desta última população selecionada (f). Os dados foram apresentados como percentagem do valor absoluto das subpopulações.

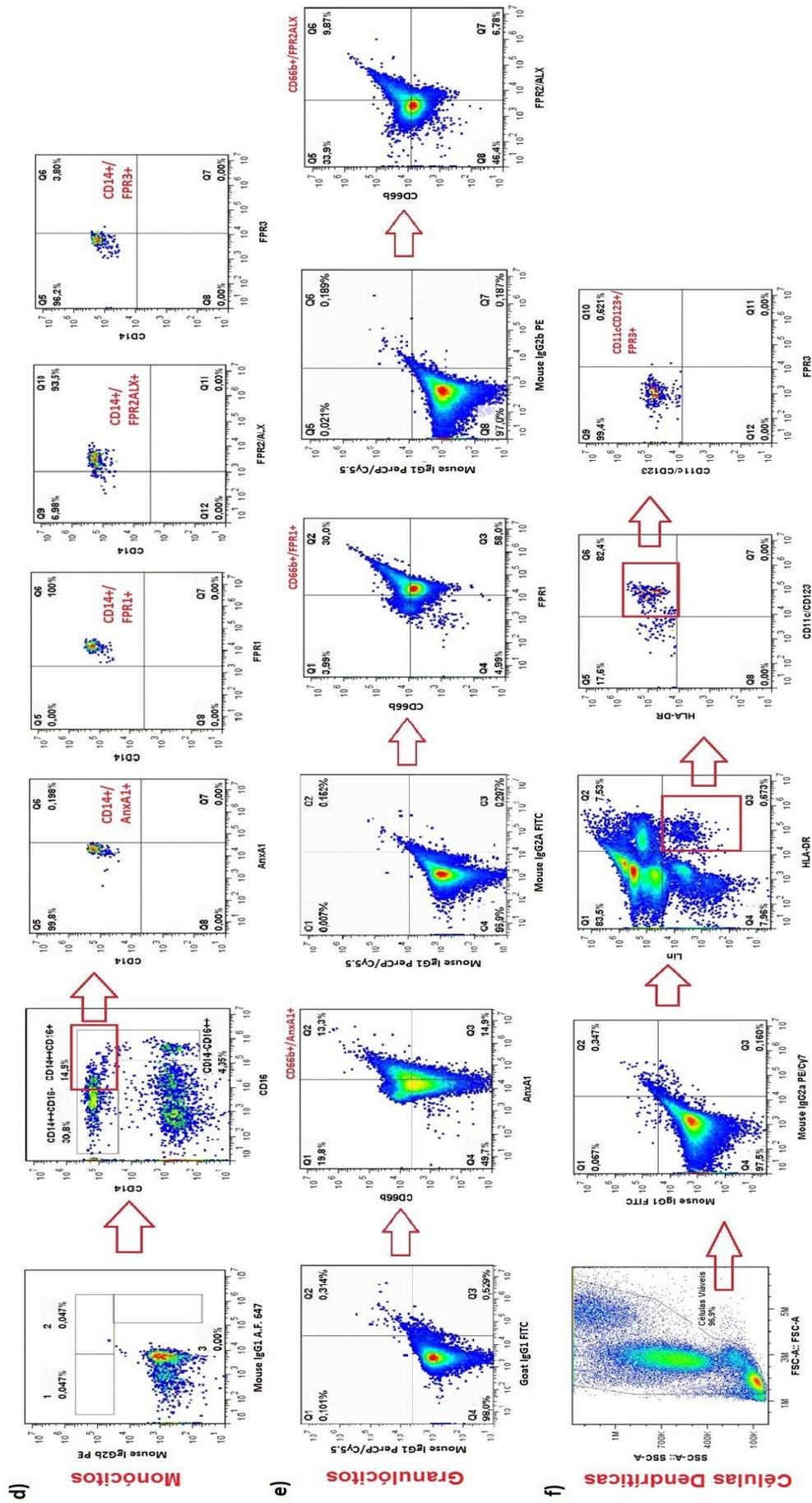


b) Linfócitos T CD4+



c) Linfócitos T CD8+





APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Laboratório de Nanobiotecnologia**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “Estudo do papel das bactérias lácticas na resposta inflamatória modulada via receptores de peptídeos formilados (FPRs) em indivíduos HIV-1 positivos” sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, Dr. Aécio Sebastião Borges, Msc. Cláudia Mendonça Rodrigues e Dra. Angela Aparecida S. de Sena Priuli. Nesta pesquisa nós estamos buscando entender qual a função da bactéria *Lactococcus lactis* e de uma proteína naturalmente presente nas células do sangue, a Anexina A1, na regulação da inflamação presente em determinados momentos no paciente HIV-1 positivo e também se esta bactéria e esta proteína são capazes de utilizar os receptores chamados FPRs (presentes nas células do sangue) para realizar seu papel. Para isso será necessário realizar a coleta de dois tubos (cerca de 15mL) do sangue periférico. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora e Biomédica Cláudia Mendonça Rodrigues durante o atendimento no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Na sua participação você será submetido a uma rápida entrevista, será convidado a assinar este termo e em seguida será realizada a coleta do sangue. Você poderá fazer parte de um dos três grupos envolvidos no estudo, o grupo dos indivíduos HIV-1 positivos em tratamento, o grupo dos HIV-1 positivos sem tratamento ou grupo controle dos indivíduos saudáveis, sem infecção pelo HIV-1. Estas amostras serão processadas no laboratório e em seguida serão submetidas ao tratamento com a bactéria citada, um similar da proteína Anexina A1 e outros ligantes associados aos FPRs. Posteriormente será realizada a extração de RNA e proteínas para análise final do estudo. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Os riscos consistem na possibilidade do aparecimento de um pequeno hematoma e o desconforto ocasionado pela picada necessária para a realização da coleta de sangue. Os benefícios serão a possibilidade de descobrirmos um novo microorganismo que está presente em alimentos e identificar atividades de uma proteína naturalmente presente nas células do sangue e que podem ser benéficos no tratamento de imunodeficiências (como AIDS) ou de outras doenças que induza a perda do equilíbrio imunológico sistêmico e local. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia e Cláudia Mendonça Rodrigues: Universidade Federal de Uberlândia – Av. Amazonas s/n Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia – Fone: 3218-2478. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, dede 20.....

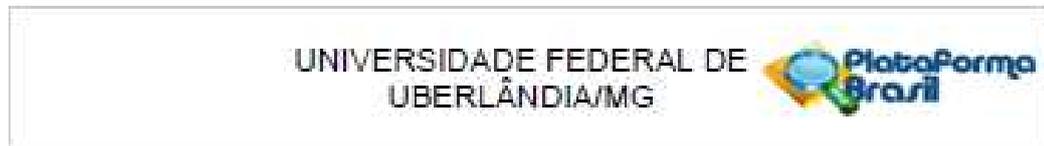
Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO PAPEL DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA MODULADA VIA RECEPTORES DE PEPTÍDEOS FORMILADOS (FPRs) EM INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS

Pesquisador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05903312.9.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFUI MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 198.897

Data da Relatoria: 01/02/2013

Apresentação do Projeto:

A AIDS ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), causada pela infecção do HIV-1, é caracterizada pela imunodeficiência linfocitária contextualizada ao descontrole da ativação imunológica generalizada. As estatísticas descritas até o momento são consequências da perda das células T CD4+, que deixam os indivíduos infectados fatalmente susceptíveis a infecções oportunistas, levando a imunotivação sistêmica aliada a anergia da imunidade das mucosas. Apesar da alta eficácia das poli-terapias anti-retrovirais, a busca por tratamentos inovadores e com menos efeitos adversos tem sido foco de investigações. Neste ponto, vale comentar que as bactérias lácticas (BL), presentes em alimentos com alegações de propriedades funcionais, podem estar envolvidas em mecanismos de resposta anti e pró-inflamatória da mucosa intestinal. Os receptores de peptídeos formilados (FPRs) são receptores capazes de receber mensagens e viabilizar a sinalização de uma ampla variedade de ligantes, incluindo moléculas derivadas de bactérias Gram-positivas, como as *L. lactis*, e proteínas do envelope do vírus HIV-1. Por meio desta família de receptores, são regulados processos que favorecem ou previnem a resposta inflamatória, de acordo com o ligante disponível à superfície celular, sendo mais abundante ou com maior afinidade aos FPRs. Sendo assim, este estudo busca investigar o papel da bactéria láctica, *L. lactis* NCD-02118, na regulação da resposta inflamatória mediadas por leucócitos do sangue periférico de indivíduos HIV-1 positivos e negativos e em células epiteliais intestinais, via

Endereço: Av. João Neres de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Receptores de Peptídeos Formilados (FPRs).

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o papel da *L. lactis* NCO02118 na regulação da resposta inflamatória mediadas por leucócitos do sangue periférico e em células epiteliais intestinais frente à infecção por HIV-1, via Receptores de Peptídeos Formilados (FPRs).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferecerá risco considerável, garantirá o sigilo dos dados coletados e os indivíduos envolvidos apenas serão identificados por meio de códigos (números). Um leve desconforto poderá ocorrer apenas devido a possibilidade de formação de um pequeno hematoma no local de punção venosa e devido a picada necessária para o procedimento de coleta de sangue dos pacientes, contudo poderá ser amenizado pela realização do mesmo pela profissional habilitada. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 196/96 para a pesquisa de seres humanos.

Benefícios:

Os resultados deste estudo são de extremo interesse clínico, visto que a descrição das atividades e vias imunobiológicas dos micro-organismos presentes nos alimentos com potencial terapêutico, pode ser uma estratégia simples e eficiente no tratamento de imunodeficiências e doenças que envolvem a perda da homeostasia imunológica sistêmica e de mucosa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de alto nível científico e de grande interesse clínico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência apontada no parecer 177.133 foi respondida.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 234 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatórios Parciais: maio de 2014; maio de 2015.

Data para entrega de Relatório Final: maio de 2016.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- ¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- ¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- ¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.
- ¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de

Endereço: Av. João Neves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4308 E-mail: cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLÂNDIA, 18 de Fevereiro de 2013

Assinado por:
Sandra Teresinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121- Bloco "1A", sala 234 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3238-4131 Fax: (34)3238-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br