

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA



MODULAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS E MONÓCITOS PELO
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 2

Rita Jorge Dias Cavaleiro

Tese orientada por:

Prof. Doutora Ana Espada de Sousa

Prof. Doutor Rui Victorino

DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDADE DE CIÊNCIAS BIOPATOLÓGICAS

2009

A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 14 de Julho de 2009.

**As opiniões expressas nesta publicação
são da exclusiva responsabilidade do seu
autor.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Lisboa, para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Biomédicas.**

A presente dissertação foi realizada na Unidade de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

O trabalho aqui apresentado foi co-financiado pelo POCI 2010 e o FSE.

Bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia

(referência: SFRH/BD/10409/2002)



Aos meus pais

À minha irmã

À minha sobrinha

ÍNDICE GERAL

| | |
|---------------------|------|
| AGRADECIMENTOS..... | i |
| ABREVIATURAS | v |
| SUMÁRIO..... | ix |
| SUMMARY | xiii |

CAPÍTULO 1:

| | |
|---|-----------|
| Introdução | 1 |
| 1. Estrutura, organização genética e ciclo biológico do HIV | 2 |
| 1.1 Estrutura e organização genética | 2 |
| 1.2 Ciclo biológico do HIV..... | 4 |
| 2. História natural da infecção HIV/SIDA | 6 |
| 3. Activação persistente do sistema imunitário na infecção pelo HIV | 10 |
| 4. Outras alterações imunológicas na infecção pelo HIV | 11 |
| 5. O papel das células dendríticas no sistema imunitário | 13 |
| 5.1 Ciclo de vida das células dendríticas | 14 |
| 5.2 Subpopulações de células dendríticas..... | 18 |
| 6. O papel das células dendríticas na imunopatogénese da infecção pelo HIV | 20 |
| 6.1 Infecção das células dendríticas pelo HIV | 21 |
| 6.2 As células dendríticas como disseminadoras da infecção pelo HIV | 22 |
| 6.3 Alterações da biologia das células dendríticas na infecção pelo HIV..... | 25 |
| 7. O papel dos monócitos/macrófagos no sistema imunitário | 29 |
| 8. O papel dos monócitos/macrófagos na imunopatogénese da infecção pelo HIV | 31 |
| 9. Contributo das células dendríticas e monócitos para a activação do sistema imunitário | 32 |
| 10. O papel do invólucro do HIV-1 na modulação de células dendríticas e monócitos..... | 36 |
| 10.1 Efeitos da gp120 na modulação de células dendríticas | 37 |
| 10.2 Efeitos da gp120 na modulação de monócitos/macrófagos..... | 40 |
| 11. O HIV-2 como modelo de estudo da patogénese da SIDA..... | 41 |
| Referências..... | 46 |

CAPÍTULO 2:

| | |
|---|-----------|
| Objectivos e plano do trabalho | 77 |
|---|-----------|

CAPÍTULO 3:

| | |
|--|-----------|
| Supressão de células T mediada pelas proteínas do invólucro de HIV-2 dependente de monócitos..... | 83 |
| <i>(Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins)</i> | |

| | |
|-------------------|----|
| Abstract | 85 |
| Introduction..... | 86 |

| | |
|----------------------------|-----|
| Results..... | 87 |
| Discussion | 94 |
| Materials and Methods..... | 97 |
| References | 101 |

CAPÍTULO 4:

Diferenciação e maturação de células dendríticas na presença do invólucro de HIV-2 107
(Dendritic cell differentiation and maturation in the presence of HIV-2 envelope)

| | |
|---|-----|
| Abstract..... | 109 |
| Introduction | 110 |
| Materials and Methods and Results | 111 |
| Discussion | 117 |
| References | 118 |

CAPÍTULO 5:

Células dendríticas mielóides na infecção pelo HIV-2 123
(Myeloid dendritic cells in HIV-2 infection)

| | |
|----------------------------|-----|
| Abstract..... | 125 |
| Introduction | 126 |
| Results..... | 127 |
| Discussion | 136 |
| Materials and Methods..... | 138 |
| References | 140 |

CAPÍTULO 6:

Depleção marcada de células dendríticas plasmacitóides na infecção pelo HIV-2..... 145
(Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease)

| | |
|----------------------------|-----|
| Abstract..... | 147 |
| Introduction | 148 |
| Results..... | 150 |
| Discussion | 161 |
| Materials and Methods..... | 165 |
| References | 167 |

CAPÍTULO 7:

Conclusões e perspectivas futuras 173

Referências 180

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Introdução

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura do HIV-1 | 3 |
| Figura 2. Ciclo biológico do HIV-1 | 4 |
| Figura 3. História natural da infecção pelo HIV-1 | 6 |
| Figura 4. Ciclo de vida das DC convencionais | 17 |
| Figura 5. Modelos de infecção em <i>trans</i> das células T CD4 ⁺ pelas DC | 24 |
| Figura 6. Translocação microbiana na infecção pelo HIV-1 | 34 |
| Figura 7. Mecanismos mediados por TLR conducentes à activação imunitária persistente na infecção pelo HIV | 35 |

CAPÍTULO 3:

Supressão de células T mediada pelas proteínas do invólucro de HIV-2 dependente dos monócitos

(Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins)

| | |
|--|----|
| Figure 1. Effects of the HIV-1 and HIV-2 Env proteins on TCR-mediated lymphocyte proliferation | 88 |
| Figure 2. HIV-2 Env proteins do not act on purified T cells | 89 |
| Figure 3. The anti-proliferative effect of HIV-2 Env proteins is independent of CD25 ⁺ cells or the immunosuppressive cytokines TGF- β or IL-10 | 90 |
| Figure 4. The anti-proliferative effect of HIV-2 Env proteins depends on the contact between monocytes and T cells | 91 |
| Figure 5. HIV-2 Env proteins activate TLR4 signaling | 93 |

CAPÍTULO 4:

Diferenciação e maturação de células dendríticas na presença do invólucro de HIV-2

(Dendritic cell differentiation and maturation in the presence of HIV-2 envelope)

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Effects of HIV-2 Env recombinant protein (gp105 _{ROD}) on DC differentiation | 112 |
| Figure 2. Effects of chemically inactivated HIV-2 (HIV-2Tx) on DC differentiation | 114 |

Figure 3. Impact of HIV-2 Env recombinant proteins or inactivated virus on DC maturation 116

CAPÍTULO 5:

Células dendríticas mielóides na infecção pelo HIV-2

(Myeloid dendritic cells in HIV-2 infection)

Figure 1. Circulating mDC levels in HIV-1 and HIV-2 infections 129

Figure 2. Relationship between absolute mDC numbers and parameters of disease progression in HIV-2 and HIV-1 infections..... 131

Figure 3. Phenotype of circulating mDC in HIV-1 and HIV-2 infections 133

Figure 4. Comparison of percentage of mDC expressing CD80 (A) or CD86 (B) in HIV-1 and HIV-2 infected cohorts 134

CAPÍTULO 6:

Depleção marcada de células dendríticas plasmacitóides na infecção pelo HIV-2

(Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease)

Figure 1. Similar reduction of circulating pDC in HIV-1 and HIV-2 infections 151

Figure 2. Relationship of pDC levels with CD4⁺ T cells, T cell activation and viremia. 152

Figure 3. pDC Phenotype 155

Figure 4. IFN- α production upon CpG stimulation..... 158

Figure 5. IL-10, IL-12p40, MIP-1 β and TNF- α levels upon CpG stimulation in Healthy, HIV-1 and HIV-2 cohorts 160

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 4:

Diferenciação e maturação de células dendríticas na presença do invólucro de HIV-2

(Dendritic cell differentiation and maturation in the presence of HIV-2 envelope)

Table 1. Effects of gp105_{ROD} on DC differentiation and maturation.....112

CAPÍTULO 5:

Células dendríticas mielóides na infecção pelo HIV-2

(Myeloid dendritic cells in HIV-2 infection)

Table 1. Characteristics of the cohorts studied128

Table 2. Correlations between the percentage of mDC expressing a particular molecule and parameters of disease progression135

CAPÍTULO 6:

Depleção marcada de células dendríticas plasmacitóides na infecção pelo HIV-2

(Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease)

Table 1. Characteristics of the cohorts studied150

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Doutora Ana Espada de Sousa, por ter insistido no meu regresso à investigação na área da imunopatogénese da infecção pelo HIV. Agradeço a confiança que depositou em mim, dando-me oportunidade de desenvolver este estudo na Unidade de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular, da qual é responsável. Agradeço a sua orientação científica e a disponibilidade com que sempre me recebeu para discutir os resultados em todas as fases do trabalho e as minhas dúvidas científicas, bem como o apoio constante nas minhas escolhas profissionais. Deixo ainda uma palavra de apreço pela oportunidade que me deu de poder leccionar nos módulos de Cursos de Mestrado que organizou.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor Rui Victorino, anterior orientador da minha Tese de Mestrado, pelos conselhos úteis na discussão dos resultados e na elaboração dos artigos científicos, bem como pelo seu apoio em todas as fases do Doutoramento.

Ao meu colega António Baptista que, durante o seu estágio directamente supervisionado por mim, colaborou na realização dos ensaios sobre os efeitos do invólucro do HIV-2 na diferenciação e maturação de células dendríticas a partir de monócitos. Saliento ainda a sua importante ajuda no estudo de caracterização *ex vivo* de células dendríticas em doentes infectados pelo HIV-1 e doentes infectados pelo HIV-2.

Ao meu colega Russell Foxall, por me ter cedido amostras do vírus HIV-2_{ROD} por ele inactivado quimicamente, fundamental no estudo dos efeitos do invólucro do HIV-2 na diferenciação e maturação de células dendríticas. Agradeço também os seus ensinamentos quanto ao processo de inactivação química do HIV-2 e o seu apoio nos estudos envolvendo doentes. Gostaria ainda de deixar uma palavra de apreço pela sua constante disponibilidade para rever os vários trabalhos apresentados ao longo do Doutoramento.

Aos meus colegas Rita Tendeiro e Rui Soares, pela sua colaboração nos estudos com amostras de doentes.

À minha colega Adriana Albuquerque, pelas experiências que realizou sobre os efeitos do invólucro do HIV-2 no período de tempo em que estive ausente do laboratório (desde o final do meu Mestrado até ao início do Doutoramento). Os resultados preliminares que obtive foram relevantes para o prosseguimento do meu trabalho nesta área.

Aos Prof. Doutores Jeffrey Platt e Gregory Brunn, da Mayo Clinic, Rochester, Minneapolis, EUA, co-autores de um dos trabalhos aqui apresentados, pela colaboração nos estudos sobre os efeitos do invólucro de HIV-1 e de HIV-2 nas vias de sinalização de TLR4, bem como pelas discussões de resultados e pela preciosa colaboração na escrita do artigo.

À Prof^a Doutora Perpétua Gomes do Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Medicina Transfusional do Hospital Egas Moniz, por ter quantificado a virémia nas amostras de plasma de todos os doentes infectados pelo HIV-2 aqui estudados.

Aos clínicos que seguiram os doentes estudados neste trabalho, nomeadamente a Prof^a Doutora Emília Valadas, a Dra. Manuela Doroana e o Prof. Doutor Francisco Antunes da Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, bem como a Dra. Margarida Lucas e o Dr. Luís Pinheiro da Clínica Universitária de Medicina 2, do Hospital de Santa Maria. Gostaria ainda de deixar uma palavra de apreço à Dra. Sara Sousa pela recolha de sangue e de muitos dos dados clínicos dos doentes estudados e ao Dr. Luís França pela recolha de alguns dos dados epidemiológicos dos doentes infectados pelo HIV-2.

Aos Prof. Doutores Nuno Taveira e Helena Barroso, ao Dr. José Marcelino, da Unidade de Retrovírus e Infecções Associadas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, bem como ao seu coordenador Prof. Doutor José Moniz Pereira, por nos terem cedido amostras do péptido C2-V3-C3 do HIV-2_{ALI}.

Aos Doutores Jeffrey Liffson e Julian Bess do *National Institute of Health*, Bethesda, EUA, pelos conselhos técnicos relativamente à preparação do vírus HIV-2_{ROD} inactivado.

À Eng^a Rita Murta, da Amerlab, pela sua inestimável ajuda na realização dos ensaios de quantificação simultânea de várias citocinas pela tecnologia Luminex. Agradeço a

formação que me deu nesta técnica, bem como todo o apoio logístico prestado que permitiu a instalação do aparelho Luminex e equipamentos adicionais no nosso laboratório.

Ao Instituto Português de Sangue - Centro Regional de Sangue de Lisboa, nomeadamente à sua presidente Dra. Gracinda Sousa e à técnica Maria João Alpoim, por nos terem cedido os *buffy coats* essenciais para alguns dos estudos aqui apresentados.

Ao *NIBSC Centralized facility for AIDS Reagents* apoiado pelo *EU Programme EVA (contract QLK2-CT-1999-00609)*, bem como o *UK Medical Research Council*, de onde obtivemos as glicoproteínas gp105 de HIV-2_{ROD} e gp120 de HIV-1_{IIIB}.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), pelo apoio financeiro concedido através da Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/10409/2002), co-financiada pelo POCI 2010 e o Fundo Social Europeu.

Aos colegas e trabalhadores da Unidade de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular com quem tive o privilégio de conviver ao longo dos anos, pela amizade e pelos momentos bem passados.

Aos dadores seronegativos e aos doentes, por nos terem cedido amostras do seu sangue, essencial para a concretização do trabalho.

Aos meus pais, pela sua compreensão quando tiveram que prescindir da minha presença em momentos familiares importantes. Agradeço o seu apoio incondicional.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| aa | Aminoácidos |
| AIDS | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| APC | Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cell</i>) |
| ARV | <i>AIDS-associated retroviruses</i> |
| AT-2 | Aldritiol-2 |
| BDCA | <i>Blood dendritic cell antigen</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CDC | <i>Center for Disease Control Prevention</i> |
| CLR | <i>C-type lectin receptor</i> |
| CpG | Sequências de DNA ricas em CpG |
| Cpm | <i>counts per minute</i> |
| DC | Célula dendrítica (<i>Dendritic cell</i>) |
| DC-SIGN | <i>DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| Env | Invólucro (<i>Envelope</i>) |
| FI | Intensidade de fluorescência (<i>Fluorescence intensity</i>) |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FLt3 | <i>Fms-like tyrosine kinase receptor-3</i> |
| FoxP3 | Forkhead box P3 |
| GALT | <i>Gut-associated lymphoid tissue</i> |
| GM-CSF | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |

| | |
|---------------------------------|---|
| Gp | Glicoproteína |
| HAART | <i>Highly active antiretroviral therapy</i> |
| HEV | <i>High endothelial venules</i> |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| HSP | <i>Heat shock proteins</i> |
| HSV | <i>Herpes simplex virus</i> |
| HTLV | <i>Human-T-lymphotropic virus</i> |
| HMGB1 | <i>High mobility group box 1</i> |
| iDC | Célula dendrítica imatura (<i>Immature dendritic cell</i>) |
| IDO | Indoleamina-2,3-dioxigenase |
| IFN | Interferão |
| IL | Interleucina |
| IRF7 | <i>interferon regulatory factor 7</i> |
| LAV | <i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i> |
| L-NMMA | N ^G -monometil-L-arginina |
| LPS | Lipopolissacárido |
| LTR | <i>Long Terminal Repeat Sequences</i> |
| mAb | Anticorpo monoclonal (<i>Monoclonal antibody</i>) |
| MCP-1 | <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> |
| mDC | Célula dendrítica mielóide (<i>Myeloid dendritic cell</i>) |
| MHC | Complexo Major de Histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>) |
| MIP-1α | <i>Macrophage inflammatory protein-1 alpha</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| MIP-1β | <i>Macrophage inflammatory protein-1 beta</i> |
| Mo-DC | Células dendríticas derivadas de monócitos (<i>Monocyte-derived dendritic cell</i>) |
| 1-MT | 1-metil-D-triptofano |
| NF-κB | <i>Nuclear factor κB</i> |
| NK | Células <i>Natural killer</i> |
| NO | Óxido nítrico (<i>Nitric oxid</i>) |
| PAMP | <i>Pathogen associated molecular pattern</i> |
| PBMC | Células mononucleadas do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PD | <i>programmed cell death</i> |
| pDC | Célula dendrítica plasmacitóide (<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>) |
| PD-L1 | <i>Programmed cell death ligand 1, B7-H1</i> |
| PD-L2 | <i>Programmed cell death ligand 2, B7-H2</i> |
| PE | <i>Phycoerythrin</i> |
| PE-Cy7 | <i>Phycoerythrin-cyanine</i> |
| PerCP | <i>Peridinin chlorophyll protein</i> |
| PRR | Pathogen recognition receptor |
| RANTES | <i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed</i> |
| RNA | Ácido ribonucleic (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| RsDPLA | <i>Rhodobacter sphaeroides diphosphoryl lipid A</i> |
| SEM | Erro padrão da media (<i>Standard error of the mean</i>) |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência adquirida |
| SIV | Vírus da imunodeficiência símia (<i>Simian immunodeficiency virus</i>) |

| | |
|--------------------------|--|
| Sp1 | <i>Specificity protein 1</i> |
| TCR | <i>T cell receptor</i> |
| ³H-TdR | Timidina tritiada |
| TIR | <i>Toll/Interleucin-1receptor</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF | Factor de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>) |

SUMÁRIO

A pandemia pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) constitui um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, estimando-se em cerca de 33 milhões o número de pessoas que estavam infectadas no final de 2007.

A infecção pelo HIV-2, apesar de apresentar um espectro clínico semelhante ao da infecção pelo HIV-1, está associada a um ritmo mais lento de progressão clínica, menores níveis de virémia e, conseqüentemente, menor transmissibilidade sexual e perinatal. Deste modo, a infecção pelo HIV-2 é considerada um modelo natural de doença “atenuada”, cujo estudo é importante para a compreensão da imunopatogénese da SIDA. Os estudos realizados no contexto da infecção pelo HIV-2 têm sido muito limitados, dado o confinamento do HIV-2 aos países da África Ocidental, ao contrário da disseminação mundial do HIV-1. Em particular, é escassa a literatura sobre a capacidade modulatória do HIV-2 na função dos monócitos/macrófagos e das células dendríticas (DC). Estas células são consideradas importantes elementos de ligação entre a imunidade inata e adquirida. Se, por um lado, servem de “sentinelas” do sistema inato com elevada capacidade de reconhecimento de microrganismos patogénicos, por outro lado diferenciam-se em células apresentadoras de antigénio fundamentais para o desenvolvimento de respostas de imunidade adquirida. Quer os monócitos quer as DC apresentam alterações em doentes infectados pelo HIV-1 e são potenciais alvos da infecção pelo vírus, podendo constituir reservatórios virais e contribuir para a transmissão viral, desempenhando assim um papel crucial na imunopatogénese da SIDA.

Este trabalho teve por objectivo investigar a modulação de DC/monócitos pelo HIV-2 e o seu possível contributo para o aparente melhor prognóstico da infecção pelo HIV-2 em comparação com a infecção pelo HIV-1.

Vários estudos têm enfatizado a importância da modulação de células não infectadas do hospedeiro, pelo invólucro do HIV-1, para a patogénese da SIDA. Demonstrámos em estudos anteriores que a glicoproteína gp105 do invólucro do HIV-2 apresentava propriedades imunossupressoras *in vitro* mais acentuadas do que a

proteína correspondente do invólucro de HIV-1 (gp120). Em particular, a presença de uma proteína recombinante gp105 de HIV-2_{ROD} em culturas de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) estimuladas por via do receptor específico das células T (TCR, *T cell receptor*) estava associada a uma diminuição da activação e da proliferação das células T. Por outro lado, observámos uma maior capacidade da gp105 do HIV-2 de induzir a produção de TNF- α pelos monócitos. No presente trabalho, tivémos como objectivo estudar o possível envolvimento dos monócitos no efeito supressor da proliferação de células T mediado pela gp105. Utilizando populações de células T purificadas e PBMC depletadas de monócitos de indivíduos seronegativos, verificámos que o efeito imunossupressor, quer da proteína completa gp105 de HIV-2_{ROD}, quer de um péptido do invólucro de uma outra estirpe de HIV-2, HIV-2_{ALI}, é abolido na ausência de monócitos. Para além disso, constatámos que esse efeito depende do contacto entre células T e monócitos. Os nossos dados sugerem ainda a possibilidade de a gp105 do HIV-2 estimular a via de sinalização de TLR4, uma molécula da família dos *Toll-like receptors* (TLR) expressa em monócitos, fundamental no reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos. Estes resultados são particularmente relevantes no contexto do crescente papel atribuído à activação persistente do sistema imunitário como factor determinante da depleção de células T CD4⁺ e consequente progressão para SIDA e da própria replicação do HIV. Assim, assumindo que estes efeitos *in vitro* da gp105 do HIV-2 têm relevância *in vivo*, é plausível que a gp105, ao actuar nos monócitos, suprima os processos de activação linfocitária e, dessa forma, contribua para reduzir a produção de vírus e o ritmo de progressão da doença. Tendo em conta a maior benignidade da infecção pelo HIV-2, estes resultados apontam para uma nova linha de investigação centrada nos monócitos que poderá conduzir à identificação de novos alvos terapêuticos baseados nas propriedades imunomoduladoras do invólucro do HIV-2.

Em face destes resultados, este trabalho prosseguiu com o estudo dos efeitos do invólucro do HIV-2 na diferenciação e maturação de DC obtidas a partir de monócitos de indivíduos seronegativos. Ao contrário dos efeitos directos nos monócitos, não observámos efeitos significativos do invólucro do HIV-2 em DC derivadas de monócitos (Mo-DC). Não se documentaram alterações morfológicas, fenotípicas ou funcionais

durante os processos de diferenciação e maturação de Mo-DC, quer na presença de proteínas recombinantes de duas estirpes distintas de HIV-2, quer na presença do vírus completo inactivado quimicamente mas mantendo a conformação intacta do invólucro. Estes resultados sugerem que os monócitos são susceptíveis aos efeitos do invólucro do HIV-2 antes do início do seu programa de diferenciação em células apresentadoras de antigénio especializadas.

As DC podem ser subdivididas em duas subpopulações principais, as DC mielóides (mDC), consideradas as células apresentadoras de antigénio clássicas, e as DC plasmacitóides (pDC), especializadas na produção de interferão (IFN)- α . Para além do seu papel antiviral, o IFN- α activa outros componentes do sistema imunitário. A última parte deste trabalho teve por objectivo a caracterização das mDC e pDC do sangue periférico no contexto da infecção pelo HIV-2. Para tal, foi feito um estudo transversal incluindo doentes infectados pelo HIV-2 e doentes infectados pelo HIV-1, não previamente expostos a terapêutica anti-retroviral, seleccionados de forma a apresentarem níveis de linfócitos T CD4⁺ semelhantes e a representarem as diferentes fases de evolução da doença. Constatámos que, apesar de se associar a um melhor prognóstico e a reduzidos ou indetectáveis níveis de virémia, a infecção pelo HIV-2 apresentou défices quantitativos nas duas subpopulações de DC semelhantes aos observados na infecção pelo HIV-1. Para além disso, as DC dos dois grupos de doentes apresentaram um aumento semelhante da expressão de marcadores de diferenciação, comparativamente ao grupo controlo de seronegativos. Enquanto o decréscimo de mDC foi significativo apenas nos indivíduos em estádios avançados de doença e/ou com virémia detectável, a diminuição dos níveis de pDC foi documentada independentemente do grau de depleção de células T CD4⁺ e, na infecção pelo HIV-2, mesmo na ausência de virémia. No entanto, apesar do decréscimo significativo dos níveis de pDC, os indivíduos infectados pelo HIV-2 sem virémia detectável apresentaram uma preservação da capacidade de produção de IFN- α pelas pDC após estimulação *in vitro* através do TLR9, ao contrário do que se observou nos doentes infectados pelo HIV-1. Os nossos resultados revelaram ainda uma correlação significativa entre o decréscimo de ambas as subpopulações de DC e o aumento da expressão de

marcadores de activação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, sugerindo uma associação entre a activação generalizada e persistente do sistema imunitário e os distúrbios das DC nas duas infecções.

Em resumo, o estudo aqui apresentado da modulação de DC/monócitos pela infecção pelo HIV-2 reforça a importância deste modelo natural de doença “atenuada” para a compreensão da imunopatogénese da SIDA.

Palavras-chave: HIV/SIDA, HIV-2, Invólucro do HIV, gp105 do HIV-2, Monócitos, Células dendríticas mielóides, Células dendríticas plasmacitóides, IFN- α

SUMMARY

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection remains a global health problem, with an estimated 33 million people living with HIV/AIDS by the end of 2007.

HIV-2, although exhibiting the same clinical spectrum as HIV-1, is associated with a slower rate of clinical progression, lower levels of viremia and lower sexual and perinatal transmission rates. Therefore, HIV-2 infection is considered a natural model of “attenuated” disease, which can be explored to better understand AIDS pathogenesis. The studies in the context of HIV-2 infection have been limited, due to the confinement of HIV-2 to West African countries, in opposition to HIV-1 that has a global distribution. In particular, the capacity of HIV-2 to modulate monocytes/macrophages and dendritic cells (DC) has not been explored. These cells provide a unique link between innate and adaptive immunity. On one hand, they are considered “sentinels” of the innate immune system with a high ability of pathogen recognition. On the other hand, they can differentiate into antigen presenting cells that are crucial for the initiation of adaptive immune responses. Both DC and monocytes exhibit alterations in HIV-1 infected individuals and are susceptible to HIV infection, constituting viral reservoirs and contributing to viral transmission. Therefore, DC and monocytes are thought to play a major role in AIDS immunopathogenesis.

The objective of this study was to investigate the modulation of DC/monocytes by HIV-2 and its possible contribution to the apparent better prognosis of HIV-2 infection relative to HIV-1.

Several studies reported that cell modulation by HIV-1 envelope (Env), independently of direct cell infection, contributes to AIDS pathogenesis. We have previously shown that HIV-2 Env glycoprotein, gp105, exhibited more marked immunosuppressive properties *in vitro* than the HIV-1 Env counterpart gp120. In particular, HIV-2_{ROD} gp105 inhibited T cell activation and proliferation in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after stimulation through the T cell receptor (TCR). In addition, we have shown that HIV-2 gp105 induces TNF- α production by

monocytes. In the present work, we investigated the possible involvement of monocytes in the gp105-mediated suppression of T cell proliferation. Using purified T cells and monocyte-depleted PBMC, we found that the HIV-2 Env immunosuppressive effect is abrogated in the absence of monocytes. This was observed using either the whole glycoprotein gp105 of HIV-2_{ROD} or an Env peptide of HIV-2_{ALI}. Moreover, using a transwell system, we found that the HIV-2 immunosuppressive effect was mediated by a mechanism dependent on the contact between T cells and monocytes. Our data also suggest that HIV-2 gp105 is able to signaling through TLR4, a molecule belonging to the toll-like receptor (TLR) family that is expressed on monocytes and is crucial for the recognition of pathogen molecular patterns. Our results are relevant in the context of the increasing role of chronic immune activation as a main contributing factor for CD4⁺ T cell depletion, AIDS progression and HIV replication. Therefore, assuming that these *in vitro* effects are relevant to the *in vivo* situation, it is plausible to admit that gp105, acting on monocytes, suppresses the bursts of T cell activation and contributes to reduce viral production and to slow the rate of disease progression. Considering the lower pathogenicity associated to HIV-2 infection, our results point to a new line of research centered on monocytes that could identify new therapeutic targets based on the immunomodulatory properties of HIV-2 Env.

Following these results, we evaluated the HIV-2 Env effects on the differentiation and maturation of monocyte-derived DC (Mo-DC) of seronegative donors. In opposition to the direct effects on monocytes, no significant effects of HIV-2 Env were found on Mo-DC. No morphological, phenotypical or functional alterations were found during DC differentiation or maturation, either in the presence of HIV-2 recombinant proteins or in the presence of the whole virus chemically inactivated but with preserved Env conformation. These results suggest that monocytes are only susceptible to HIV-2 Env effects before the initiation of their differentiation program into antigen presenting cells.

DC can be subdivided into two main subpopulations: myeloid DC (mDC), the classical antigen-presenting cells; and plasmacytoid DC (pDC), which, although also able to present antigens to T cells, are best recognized for their ability to secrete type I

interferons (IFN). In addition to its well-known antiviral effects, IFN- α is a potent stimulator of other immune cells. The last part of this work aimed to characterize peripheral blood DC during HIV-2 infection. A cross-sectional study was performed involving untreated HIV-2 patients and HIV-1 patients. The two HIV-infected cohorts were selected in order to represent all the disease stages and to enclose comparable degrees of CD4⁺ T-cell depletion. Despite the better prognosis of HIV-2 disease and its reduced to undetectable viremia levels, a similar decrease in circulating DC numbers and a comparable up-regulation of markers of DC differentiation were found in HIV-2 and HIV-1 infected patients relative to healthy controls. Whereas mDC levels were decreased only in individuals in advanced stage and/or with detectable viremia, the reduction in pDC numbers was observed throughout disease. Of note, pDC depletion was documented even in HIV-2 infected individuals with undetectable viremia. However, in contrast to HIV-1 patients and viremic HIV-2 individuals, we found that the pDC ability to produce IFN- α upon TLR9 stimulation is relatively preserved in HIV-2 patients with undetectable viremia. Importantly, the decrease in DC levels was tightly correlated with markers of T cell activation, suggesting an association between the generalized immune activation and the DC disturbances in both HIV infections.

Overall, the present work on the modulation of monocytes and DC in the context of this unique model of “attenuated” HIV-2 disease contributes to the understanding of the role of monocytes and DC in HIV/AIDS pathogenesis, which could be important in the development of new therapeutic approaches.

Keywords: HIV/AIDS, HIV-2, HIV envelope, HIV-2 gp105, Monocytes, Myeloid dendritic cells, Plasmacytoid dendritic cells, IFN- α

CAPÍTULO 1:

Introdução

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) surgiu como uma nova entidade clínica em 1981, inicialmente descrita em indivíduos homossexuais nos Estados Unidos da América que apresentavam um quadro clínico associado a uma imunodeficiência grave ^{1, 2}. Dois anos depois, na edição de 20 de Maio de 1983 da revista *Science*, dois grupos de investigação independentes, liderados por Luc Montagnier ³ e Robert Gallo ⁴, descreviam o isolamento de um retrovírus que, mais tarde, se demonstrou ser o agente etiológico da doença ^{5, 6}. Com os isolamentos que se seguiram por várias equipas de cientistas, surgiram diferentes designações para o mesmo vírus: *Lymphadenopathy-associated virus* (LAV) ⁷, *immunodeficiency-associated virus* (IDAV) ⁸, *Human-T-lymphotropic virus-III* (HTLV-III) ⁵ e *AIDS-associated retroviruses* (ARV) ⁹. No sentido de uniformizar a nomenclatura, passou a utilizar-se, a partir de 1986, a designação de *Human immunodeficiency virus* (HIV) para o vírus associado à SIDA ¹⁰⁻¹². Nesse mesmo ano, um outro vírus foi isolado a partir do sangue de doentes com SIDA provenientes da Guiné-Bissau e Cabo Verde, internados no Hospital Egas Moniz em Lisboa ¹³. Tendo em conta divergências genéticas de cerca de 40% em relação ao HIV inicialmente isolado (HIV-1), foi considerado tratar-se de um tipo diferente de HIV, sendo designado HIV tipo 2 (HIV-2) ¹⁴. Apesar de também causador de SIDA, o HIV-2 associa-se a uma infecção de patogenicidade mais atenuada, como adiante se descreve.

A pandemia originada pela infecção por HIV-1 constitui um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial. Segundo o relatório de 2008 da *United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS), a infecção pelo HIV/SIDA é responsável por 25 milhões de mortes desde os primeiros casos descritos, estimando-se em cerca de 33 milhões o número de pessoas que estavam infectadas pelo HIV no final de 2007 ¹⁵. Só nesse ano, foram infectadas 2.7 milhões de pessoas, tendo ocorrido 2 milhões de mortes por SIDA, 75% das quais nos países da África sub-Sahariana. É nestes países que se vive a situação mais dramática, com cerca de 22 milhões de pessoas infectadas pelo HIV ¹⁵.

Noutros países densamente povoados, como a Indonésia e a Federação Russa, também tem sido contabilizado um número crescente de novas infecções¹⁵.

Ao contrário do HIV-1, o HIV-2 é responsável por uma epidemia mais localizada, sobretudo em países da África Ocidental, onde esta infecção é considerada endémica¹⁶.

Em Portugal, no final de 2008 encontravam-se notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis 34,888 casos de infecção HIV/SIDA¹⁷. A estimativa de mortalidade anual por SIDA em Portugal é de cerca de 1,000 pessoas¹⁸. Devido às ligações históricas e intercâmbio populacional com as suas ex-colónias, Portugal é o país onde se encontra o maior número de casos de infecção por HIV-2 fora do continente Africano, com cerca de 5% dos casos notificados (3.3% correspondem a infecções por HIV-2 e 1.4% simultaneamente por HIV-1 e HIV-2)¹⁸.

Os progressos alcançados desde o aparecimento da SIDA melhoraram a compreensão da biologia do HIV, mas ainda não permitiram clarificar aspectos fundamentais da imunopatogénese associada a esta infecção. Neste capítulo, após uma descrição sumária das características do vírus e das diferentes fases clínicas da doença, abordar-se-ão os principais mecanismos da imunopatogénese da infecção pelo HIV, com particular ênfase para o papel da activação crónica do sistema imunitário e o desempenhado pelas células dendríticas e os monócitos/macrófagos. O estudo destas células no contexto da infecção pelo HIV-2, um modelo de doença com características mais benéficas para o hospedeiro do que a infecção pelo HIV-1, constitui a base deste trabalho que se espera contribuir para a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na imunopatogénese da infecção HIV/SIDA.

1. Estrutura, organização genética e ciclo biológico do HIV

1.1. Estrutura e organização genética

Os vírus associados à etiologia da SIDA, HIV-1 e HIV-2, pertencem à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/). Têm uma morfologia esférica conferida por um

invólucro cujo exterior é constituído por uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro e por glicoproteínas virais (Figura 1) ¹⁹⁻²². A glicoproteína externa, gp120 (no caso do HIV-1) ou gp105 (no caso do HIV-2), está ancorada ao invólucro pela glicoproteína transmembranar (gp41 ou gp36 de HIV-1 ou HIV-2, respectivamente), com a qual se encontra unida por ligações não covalentes, facilmente dissociáveis ^{23, 24}. Do lado interno da partícula viral, o invólucro encontra-se revestido pela proteína da matriz p17 que mantém a integridade estrutural do virião ²⁰. A proteína da matriz envolve uma cápside interna em forma cónica, constituída pela proteína p24/p26 (conforme se trate de HIV-1/HIV-2). No interior da cápside encontram-se as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease ²² e o genoma viral, duas cadeias de RNA revestidas pela nucleocápside ²¹.

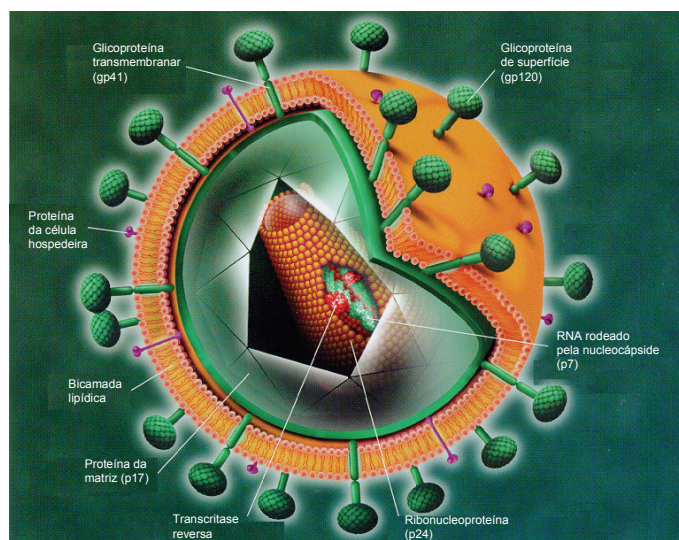


Figura 1. Estrutura do HIV-1 (adaptado de Erickson, 2001 ²¹)

Como todos os retrovírus, o genoma do HIV contém três genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, que codificam para proteínas precursoras que, após clivagem, originam a maior parte dos componentes estruturais do virião ²⁰. Assim, o gene *gag* origina as proteínas p17, p24/P26, p6 e nucleocápside; o gene *pol* origina as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase; e o gene *env* origina as glicoproteínas do invólucro, de superfície (gp120/gp105) e transmembranar (gp41/gp36) ²². Para além dos genes estruturais, o genoma do HIV contém seis genes reguladores/acessórios, *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* e *vpu* (só

no HIV-1) ou *vpx* (só no HIV-2) ²⁵. O genoma do HIV é flanqueado em cada extremidade por longas sequências repetitivas terminais (*Long Terminal Repeat Sequences*, LTR) que contêm locais de ligação para proteínas celulares e virais, controlando assim a transcrição do genoma viral ²⁶.

1.2. Ciclo biológico do HIV

O primeiro passo no ciclo viral consiste na adsorção do virião à célula hospedeira, como resultado da interacção entre a proteína de superfície do invólucro gp120/gp105 e a molécula CD4 presente na membrana plasmática dos linfócitos T CD4⁺ e células da linhagem monócito-macrofágica (Figura 2) ²⁷⁻²⁹. A ausência de infecção por HIV-1 em

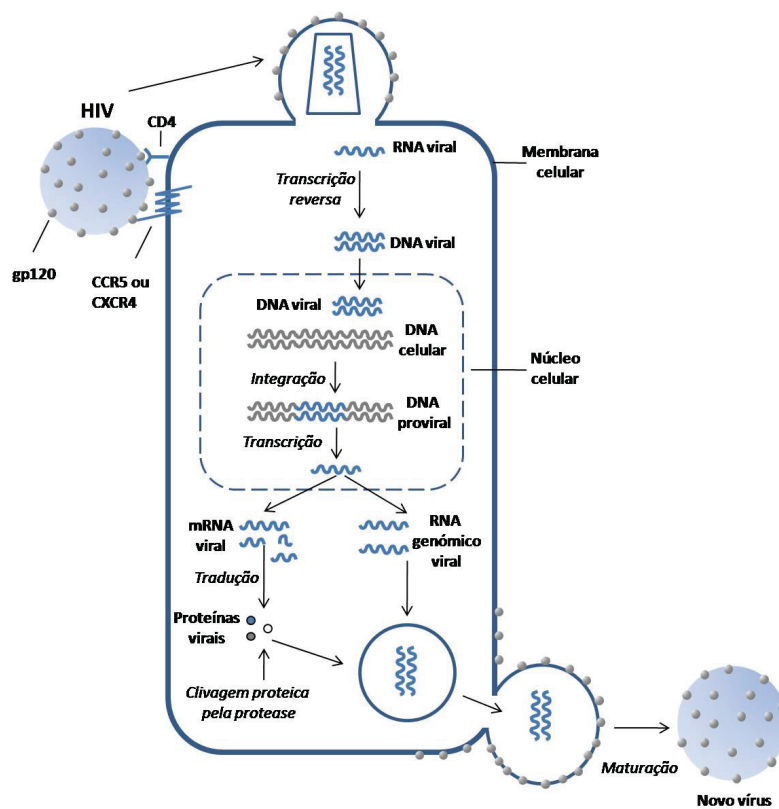


Figura 2. Ciclo biológico do HIV-1 (adaptado de Groot, 2006 ³⁰)

linhas celulares de mamíferos não primatas e em linhas celulares humanas com expressão normal da molécula CD4 levantou a hipótese de que outras moléculas da

superfície celular, ausentes nestas células, seriam necessárias para a entrada do vírus^{31, 32}. Esses co-receptores foram identificados em 1996 como pertencentes à já conhecida família de receptores de quimiocinas, os *G-protein coupled seven-transmembrane chemokine receptors*³³⁻³⁸. A interacção da gp105/gp120 com a molécula CD4 promove alterações conformacionais na proteína de superfície viral que conduzem à exposição do local de ligação aos referidos co-receptores³⁹⁻⁴². Dois dos principais co-receptores utilizados para a entrada do vírus na célula hospedeira são as moléculas CCR5 (receptor das quimiocinas CC designadas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES) e CXCR4 (receptor da quimiocina CXC designada CXCL12/SDF-1)⁴³ e as estirpes virais que os utilizam são designadas R5 e X4, respectivamente⁴⁴. A interacção da gp120/gp105 com a molécula CD4 e os co-receptores induz alterações conformacionais na proteína transmembranar gp41/gp36, expondo o péptido de fusão (localizado na sua extremidade N-terminal), essencial para a fusão do invólucro viral com a membrana da célula hospedeira e subsequente entrada da cápside viral^{45, 46}. No interior da célula hospedeira, o RNA viral é transcrito em DNA pela acção da transcriptase reversa⁴⁷. Algumas proteínas virais em associação com o DNA recém-formado constituem o complexo de pré-integração que, ao migrar para o núcleo da célula, permite a integração do DNA no genoma da célula hospedeira pela acção da integrase viral (DNA proviral)²². Em condições apropriadas que dependem do estado de activação celular, ocorre a transcrição do DNA proviral em RNA mensageiro (mRNA). Esse processo é mediado pela região promotora da sequência LTR a que se ligam vários factores de transcrição celulares⁴⁸. Da transcrição viral resultam várias classes de mRNA que se distinguem pelo momento em que são expressos e pelo tipo de processamento (*splicing*)^{49, 50}. Numa fase inicial são produzidos mRNA totalmente processados (*multiply spliced transcripts*) que codificam as proteínas reguladoras Tat, Nef e Rev. Numa fase tardia, são produzidos dois tipos de mRNA: mRNA parcialmente processados (*singly spliced*) que originam as proteínas Env, Vif, Vpr, Vpx (no HIV-2) e Vpu (HIV-1); e mRNA não processados (*unspliced*) que, para além de originarem as proteínas Gag e Pol, servem como RNA genómico que será integrado nas novas partículas virais^{49, 50}. Estes mRNA não totalmente processados necessitam da intervenção da proteína Rev para que

possam ser exportados do núcleo para o citoplasma^{22, 49, 50}. Após a síntese das proteínas no citoplasma, a morfogénese do virião ocorre ao nível da membrana plasmática ou em vacúolos intracitoplasmáticos levando à libertação dos viriões da célula hospedeira. Neste processo, as polipoproteínas precursoras estruturais associam-se ao RNA genómico viral, formando uma cápsula esférica de natureza ribonucleoproteica que, por sua vez, é rodeada pela bicamada lipídica originada a partir da membrana celular, por onde se projectam para o exterior as proteínas do invólucro viral^{22, 51}. Os viriões, ainda imaturos, libertam-se da célula hospedeira por gemulação. No exterior da célula, os viriões sofrem maturação, processo que envolve a clivagem dos polipéptidos precursores pela protease viral, essencial para a formação de viriões infecciosos⁵². Os viriões maduros estão assim prontos a iniciar um novo ciclo replicativo.

2. História natural da Infecção HIV/SIDA

Na ausência de terapêutica anti-retroviral, a infecção pelo HIV pode dividir-se em três fases distintas: infecção primária ou fase aguda, infecção crónica e SIDA (Figura 3).

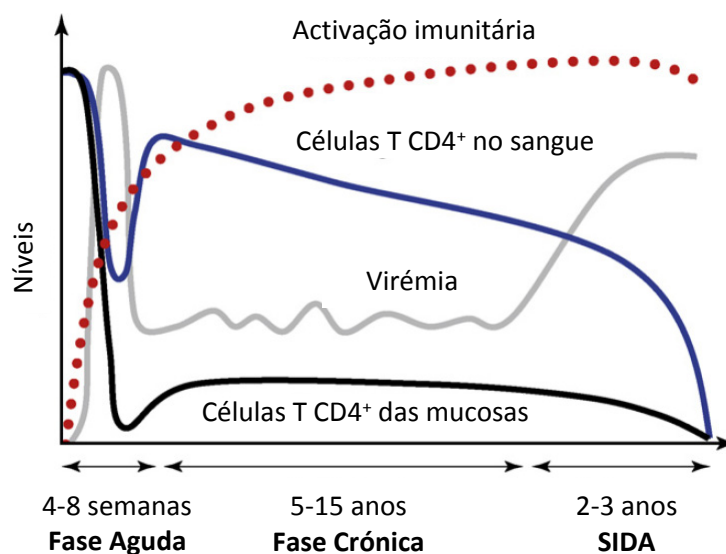


Figura 3. História natural da infecção pelo HIV-1 (adaptado de Forsman e Weiss, 2008⁵³)

A infecção primária decorre entre a exposição inicial ao vírus, por via sanguínea ou através da superfície das mucosas, e o estabelecimento da disseminação do vírus no hospedeiro. Dependendo da via de exposição, os mecanismos de infecção inicial podem variar. Nos casos de transmissão por via sanguínea (transusão, utilização de seringas contaminadas por toxicodependentes ou transmissão materno-fetal), o vírus é provavelmente removido da circulação pelo sistema reticulo-endotelial do baço, fígado e pulmões, infectando os tecidos linfóides nestes locais, onde se replica, disseminando-se para outros órgãos linfóides⁵⁴. Nos casos de transmissão através das mucosas rectal e genital por contacto sexual, o vírus atravessa a barreira da mucosa e, após algumas horas de infecção, estabelece-se na lâmina própria, onde infecta células T CD4⁺, *resting* e activadas, macrófagos e células dendríticas (DC)⁵⁵. O vírus e as células infectadas disseminam-se para os gânglios linfáticos de drenagem locais. Há que salientar o papel das DC na disseminação viral, uma vez que capturam os viriões no local da exposição e transportam-nos para a região paracortical dos gânglios linfáticos onde, através de sinapses infecciosas, transmitem o vírus às células T⁵⁶⁻⁵⁸. Através da corrente sanguínea e do sistema linfático, o vírus e as células infectadas são disseminados para outros tecidos linfóides.

Nesta fase aguda da infecção, ocorre uma marcada depleção de células T CD4⁺ de memória/efectoras no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*), provavelmente como resultado de infecção directa, prolongando-se por todas as fases da doença^{59, 60}. Por seu turno, no sangue periférico ocorre uma diminuição transitória no número de linfócitos T CD4⁺ e, devido à extensa replicação do HIV, uma subida abrupta dos níveis de cópias de RNA viral no plasma (virémia)⁵³. Durante a infecção aguda, cerca de 50% dos indivíduos infectados apresentam um síndrome clínico agudo, com manifestações clínicas semelhantes às de uma mononucleose aguda, auto-limitado e que dura geralmente algumas semanas^{54, 61}.

No final da infecção aguda, após a seroconversão, a virémia diminui para um patamar (*setpoint*) que tem um valor prognóstico da velocidade de progressão da doença^{62, 63}. Para esse decréscimo contribui a resposta do sistema imunitário à infecção, com o aparecimento de células T CD8⁺ citotóxicas e células T CD4⁺ *helper* específicas

contra o vírus⁶⁴, a retenção dos viriões nas células dendríticas foliculares dos centros germinativos dos gânglios linfáticos⁶⁵ e a acção de anticorpos anti-HIV incluindo anticorpos não neutralizantes que, em conjunto com o complemento, ajudam a eliminar partículas virais por opsonização^{53, 64, 66, 67}. Para além disso, a depleção de células T CD4⁺ CCR5⁺ no intestino reduz o número de células-alvo do HIV, diminuindo desse modo a replicação viral^{53, 64}. Paralelamente ao decréscimo da virémia, os níveis de células T CD4⁺ no sangue periférico tendem a normalizar sem, no entanto, atingirem os anteriores ao estabelecimento da infecção^{68, 69}. Apesar das respostas específicas geradas, não se verifica uma erradicação do vírus, estabelecendo-se por todo o organismo reservatórios virais, constituídos maioritariamente por células latentemente infectadas que possuem DNA proviral mas com reduzida expressão de proteínas virais, escapando ao controlo do sistema imunitário^{70, 71}.

Após a infecção aguda, estabelece-se um período de infecção crónica, com uma duração média de cerca de 9 anos antes do aparecimento de infecções oportunistas e outros critérios definidores de SIDA⁵³. Durante esta fase, ocorre uma replicação viral persistente e uma depleção progressiva das células T CD4⁺ no GALT e nos gânglios linfáticos^{59, 60}. Como consequência dos elevados níveis de replicação viral, a arquitectura folicular dos gânglios linfáticos sofre alterações histológicas progressivas, desde hiperplasia folicular até um padrão de involução folicular e completa destruição⁷²⁻⁷⁵. Tendo em conta o papel da arquitectura dos gânglios linfáticos como suporte das complexas interacções que ocorrem entre diversos tipos de células do sistema imunitário, facilmente se compreende que tais alterações comprometam o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada⁷⁵. Estas alterações estão ainda associadas a um progressivo aumento do número de células produtivamente infectadas pelo HIV e a uma diminuição da capacidade da rede de células dendríticas foliculares em reter as partículas virais, o que pode contribuir para uma redistribuição da carga viral entre os gânglios linfáticos e a periferia, com concomitante aumento da virémia⁵⁴. A acompanhar estas modificações, observa-se um declínio progressivo de células T CD4⁺ no sangue periférico, sendo o número dessas células considerado o melhor marcador laboratorial disponível para avaliar a progressão da doença⁵³. Em

conjunto com este parâmetro, a quantificação da virémia, também definidora de diferentes prognósticos de progressão da doença, serve de base às directivas para início de terapêutica anti-retroviral em indivíduos assintomáticos⁷⁶⁻⁷⁸.

A infecção pelo HIV, se não for tratada com terapêutica anti-retroviral, evolui para SIDA, o estágio final da doença. Os critérios actuais de diagnóstico de SIDA propostos pelo *Center for Disease Control Prevention* (CDC) baseiam-se num conjunto de manifestações clínicas definidoras de imunodeficiência grave e/ou nos níveis de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico inferiores a 200 células/ μ l⁷⁹. Estas condições traduzem-se numa perda da competência imunitária que possibilita o aparecimento de infecções oportunistas, sendo as mais comuns as infecções por *Pneumocystis jirovecii*, citomegalovirus, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, vírus herpes simplex (HSV), *Cryptosporidium*, *Isospora belli* e várias espécies de *Salmonella*. Por outro lado, podem ocorrer certas doenças neoplásicas que são também definidoras de SIDA, de que são exemplo o sarcoma de Kaposi e certos tumores linfóides como o linfoma das células B não-Hodgkin⁷⁹. A deterioração gradual do sistema imunitário característica da infecção pelo HIV conduz por fim à morte, caso não seja ministrada a terapêutica adequada.

Apesar das três fases acima descritas corresponderem à história natural da infecção na maioria dos indivíduos infectados, cerca de 5% de pessoas infectadas pelo HIV progridem muito mais lentamente ou não progridem para doença, mantendo-se com níveis estáveis de células T CD4⁺ na ausência de terapêutica anti-retroviral⁸⁰. Estes indivíduos, designados *Long Term Non Progressors* exibem respostas imunitárias mais robustas e menores níveis de virémia⁸¹, apesar de poderem apresentar replicação viral detectável⁸². Além disso, a arquitectura dos seus gânglios linfáticos encontra-se relativamente preservada⁸². No extremo oposto, cerca de 5% de indivíduos infectados pelo HIV sofrem um rápido declínio nos níveis de células T CD4⁺ e progridem para SIDA em 2 ou 3 anos após a seroconversão. Estes indivíduos apresentam respostas imunitárias mais fracas e maiores níveis de virémia^{83, 84}.

3. Activação persistente do sistema imunitário na infecção pelo HIV

A imunodeficiência associada à infecção pelo HIV é paradoxalmente caracterizada por uma activação persistente de vários componentes do sistema imunitário. Com efeito, documenta-se nos doentes infectados pelo HIV uma frequência aumentada de células T, B, *Natural killer* (NK) e monócitos com um fenótipo activado, uma activação policlonal de células B traduzida numa hipergamaglobulinemia, um aumento do número de células T em ciclo celular, hiperplasia dos gânglios linfáticos, aumento dos níveis de citocinas próinflamatórias e quimiocinas e de marcadores séricos de activação do sistema imune como, por exemplo, β 2-microglobulina e neopterina^{53, 75, 85}.

Apesar da activação do sistema imunitário ser um componente essencial de uma resposta imunitária apropriada a um antígeno estranho, a sua persistência pode ter consequências negativas.

Do ponto de vista virológico, a activação imunitária é crítica para a manutenção do estado infeccioso, uma vez que a replicação produtiva do HIV depende da activação celular^{86, 87}. A activação celular provoca a translocação para o núcleo de factores de transcrição celulares, tais como *Nuclear factor κ B* (NF- κ B) e *specificity protein 1* (Sp1), que se ligam em locais próprios das sequências LTR do genoma do vírus, dando origem à transcrição do DNA integrado, conduzindo à produção de novos viriões⁸⁸⁻⁹⁰. Assim, a activação imunitária gera os substratos para a replicação viral. Estabelece-se então um ciclo vicioso em que a replicação do vírus promove a activação celular que, por seu turno, induz a replicação viral. Este ciclo é ainda alimentado pelos elevados níveis de citocinas próinflamatórias presentes⁸⁵. De notar que a estimulação do sistema imunitário, através de vacinação, de indivíduos infectados pelo HIV, conduz a um aumento transitório dos níveis de replicação do HIV⁸⁹.

Do ponto de vista imunológico, o padrão crónico de activação imunitária pode impedir uma resposta adequada das células ao antígeno. A activação imunitária crónica conduz à expansão clonal dos linfócitos T que, por um lado, aumenta a susceptibilidade linfocitária à apoptose e, por outro, leva à exaustão dessas células, impedindo-as de responder aos antígenos (anergia)⁸⁵. Além disso, os elevados níveis de inflamação nos

gânglios linfáticos podem contribuir para a destruição da sua arquitectura, promovendo alterações de tráfego celular e interferindo com o desenvolvimento da resposta imune ^{75, 91}.

Mais do que a própria replicação viral, a activação crónica generalizada do sistema imunitário é hoje considerada um factor determinante e de prognóstico do ritmo de depleção de células T CD4⁺ e da progressão da doença na infecção pelo HIV ⁹²⁻⁹⁵. Estudos de modelos de infecção não patogénica pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV, *Simian immunodeficiency virus*) têm contribuído significativamente para o reconhecimento do papel nocivo da activação imunitária ⁹⁶. Com efeito, os hospedeiros naturais dos vírus SIV_{sm} e SIV_{agm}, os macacos africanos *Sooty mangabey* (*Cercocebus atys*) e os *African green monkeys* (género *Chlorocebus*), respectivamente, não apresentam depleção significativa de células T CD4⁺ circulantes nem desenvolvem doença, apesar de exibirem elevados níveis de replicação viral ^{97, 98}. Pelo contrário, a transmissão de SIV de hospedeiros naturais africanos para macacos asiáticos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) resulta numa perda progressiva de células T CD4⁺ em circulação e desenvolvimento de doença ⁹⁹. Ao contrário do que acontece no modelo patogénico de infecção pelo SIV e HIV, no modelo não patogénico de infecção pelo SIV os hospedeiros conseguem montar uma resposta precoce anti-inflamatória que poderá impedir a hiperactivação crónica e generalizada do sistema imunitário ¹⁰⁰.

4. Outras alterações imunológicas na infecção pelo HIV

Durante o curso da infecção pelo HIV observa-se uma desregulação de praticamente todos os componentes do sistema imunitário. Tal como previamente referido, uma das principais alterações consiste numa destruição precoce das células T CD4⁺ no GALT, acompanhada por uma diminuição progressiva dessas células no sangue periférico. Vários factores têm sido implicados nessa depleção e incluem mecanismos virológicos directos e mecanismos indirectos devidos a uma reacção inadequada do próprio sistema imunitário ^{53, 60}.

Mesmo antes de haver uma perda significativa do número de células T CD4⁺ circulantes, estão presentes alterações qualitativas que se traduzem numa diminuição da capacidade proliferativa linfocitária em resposta a antígenos (toxóide tetânico, vírus Influenza e *Candida albicans*), anticorpos anti-CD3, aloantígenos e mitogénios¹⁰¹⁻¹⁰⁶. Segundo estudos imunológicos longitudinais, essas alterações são sequenciais e associam-se a progressão da doença, observando-se inicialmente perda de respostas proliferativas *in vitro* a antígenos solúveis, depois a aloantígenos e, por fim, a mitogénios^{107, 108}.

Tal como as células T CD4⁺, também as células T CD8⁺ circulantes sofrem um decréscimo no início da infecção. No entanto, três a quatro semanas após o início do quadro clínico, observa-se um aumento do número de linfócitos T CD8⁺ para níveis iguais ou superiores aos anteriores à infecção, documentando-se, no final da infecção primária, uma expansão desta população de células e, por não ser acompanhada por uma recuperação total do número de células T CD4⁺, uma inversão da razão CD4:CD8 no sangue periférico que se mantém durante toda a infecção⁵⁴. Qualitativamente, as células T CD8⁺ de indivíduos infectados pelo HIV apresentam um fenótipo activado, verificando-se uma associação entre o aumento da expressão do marcador CD38 nas células T CD8⁺ circulantes e um prognóstico adverso¹⁰⁹.

Para além das alterações qualitativas e quantitativas das células T, observa-se uma desregulação em todas as populações celulares envolvidas na resposta imunitária, tais como células B¹¹⁰, NK¹¹¹, monócitos/macrófagos¹¹² e DC¹¹³.

Os monócitos/macrófagos e DC actuam como “sentinelas” de imunidade inata e, devido ao seu papel como células apresentadoras de antígeno (APC, *Antigen presenting cells*), permitem activar a imunidade adquirida¹¹². A susceptibilidade destas células à infecção pelo HIV-1, a possibilidade de se tornarem reservatórios virais e as alterações funcionais que apresentam em doentes infectados pelo HIV-1, evidenciam o papel crucial que desempenham na imunopatogénese desta infecção^{112, 114, 115}.

A revisão introdutória desta Tese focar-se-á nas alterações que as DC e monócitos/macrófagos apresentam e no papel destas células na infecção pelo HIV.

5. O papel das células dendríticas no sistema imunitário

As células dendríticas (DC) foram observadas pela primeira vez na pele em 1868, por Paul Langherhans, tendo sido baptizadas com o seu nome e erradamente consideradas células nervosas cutâneas¹¹⁶. Mais de um século depois, em 1973, Ralph Steinmann e Zanvil Cohn descobriram estas células em suspensões celulares de baço de ratinho e, com base na sua morfologia peculiar caracterizada por prolongamentos ou dendrites, designaram-nas “células dendríticas”¹¹⁷, caracterizando-as *in vitro*¹¹⁸ e *in vivo*¹¹⁹. A possibilidade de purificar DC a partir de fracções de baço de ratinho permitiu avaliar a sua capacidade estimuladora de células T em reacções leucocitárias mistas, tendo sido reconhecida a sua importância como APC. Estes estudos permitiram concluir que as DC activavam a proliferação de linfócitos T em reacções leucocitárias mistas com uma eficiência pelo menos 100 vezes superior à de macrófagos ou células B¹²⁰. Estudos posteriores demonstraram a capacidade das DC de estimular células T citotóxicas¹²¹ e respostas mediadas por anticorpos dependentes de células T CD4⁺ *helper*¹²². Utilizando células de *Langherhans* da epiderme de ratinho, foi possível estabelecer uma dissociação entre duas propriedades das DC enquanto APC: num estágio imaturo, as DC servem de “sentinelas” nos tecidos não linfóides prontas a capturar antígenos; após maturação, apresentam esses antígenos a células T, estimulando-as^{123, 124}. As DC podem assim ser caracterizadas por uma elevada capacidade de captura, processamento e retenção no seu interior, de péptidos/antígenos microbianos, apresentando-os, subsequentemente, no contexto do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC, *Major histocompatibility complex*), a células T *naïve* (células que ainda não foram expostas ao antígeno para o qual são específicas), activando-as¹²⁵.

Estudos mais recentes permitiram reconhecer um papel mais abrangente das DC no sistema imunitário. Para além de indutoras de imunidade, as DC têm propriedades tolerogénicas, essenciais para eliminar linfócitos auto-reactivos, minimizando reacções auto-imunes^{126, 127}.

A identificação das DC há 36 anos abriu caminho a uma nova área de investigação centrada na biologia destas células. Actualmente, reconhece-se que as DC promovem a ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida, uma vez que integram a

informação que recebem através do reconhecimento de padrões microbianos pelo sistema imune inato e originam uma resposta imune adquirida adequada ^{125, 128}. Descrevem-se seguidamente aspectos da biologia das DC, nomeadamente o seu ciclo de vida, o modo como utilizam o maior sistema de reconhecimento de microrganismos em vertebrados, a família dos *Toll-like receptors* (TLR), bem como as suas subpopulações.

5.1. *Ciclo de vida das células dendríticas*

As DC derivam de progenitores da medula óssea através de células intermediárias ainda não completamente caracterizadas ¹²⁹. Os precursores de DC no sangue migram para os tecidos periféricos, como a pele e as mucosas, locais privilegiados de exposição a antigénios. Enquanto estrategicamente residentes nos tecidos periféricos, as DC imaturas são consideradas “sentinelas” do organismo, dada a elevada capacidade com que reconhecem agentes patogénicos. Para tal, as DC dispõem de um vasto repertório de moléculas que reconhecem padrões moleculares conservados específicos da superfície de agentes patogénicos (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP), tais como lípidos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos. As moléculas que reconhecem tais padrões são designadas *pattern recognition receptors* (PRR), dos quais fazem parte duas importantes famílias, a dos *C-type lectin receptors* (CLR) e a dos *Toll-like receptors* (TLR) ^{130, 131}. Os CLR são particularmente importantes para o reconhecimento de carboidratos e subsequente internalização dos antigénios glicosilados em compartimentos lisossomais existentes nas DC, iniciando o processamento e apresentação de antigénios no contexto de moléculas MHC, não resultando necessariamente na indução de células T efectoras ¹³². Por seu turno, o reconhecimento de microrganismos através dos TLR dá início a uma cascata de sinalização intracelular, conduzindo à maturação e activação de DC, fundamental para a indução de células T efectoras ¹³², pelo que têm sido considerados como os principais PRR capazes de induzir uma completa maturação de DC ¹³¹.

A designação de TLR deve-se à sua semelhança com a molécula Toll, um receptor inicialmente conhecido pela sua função no desenvolvimento embrionário de *Drosophila*

*melanogaster*¹³³ e, mais tarde, pela sua contribuição no controlo de infecções fúngicas no insecto adulto¹³⁴. A importância dos TLR tornou-se evidente a partir da identificação de um homólogo do receptor Toll em mamíferos (actualmente designado TLR4) com capacidade de induzir a expressão de genes envolvidos em respostas inflamatórias¹³⁵ e, posteriormente, pela identificação de uma mutação pontual no gene *tlr4* numa estirpe de ratinho incapaz de responder ao lipopolissacárido (LPS), um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas¹³⁶.

Presentemente, conhecem-se 13 moléculas TLR em mamíferos, dos quais pelo menos 10 no ser humano^{137, 138}. Alguns destes receptores são expressos na superfície celular e reconhecem componentes das paredes bacterianas e fúngicas, tais como lipopéptidos e peptidoglicanos (TLR1,2,6), LPS (TLR4) e flagelina bacteriana (TLR5). Outros (TLR3,7,8,9) localizam-se em membranas intracelulares e reconhecem ácidos nucleicos¹³⁸.

Os TLR são receptores transmembranares de tipo I estruturalmente constituídos por três domínios: uma região extracelular composta por sequências ricas em leucina responsável pelo reconhecimento dos seus ligandos; um pequeno domínio transmembranar; e um domínio citoplasmático conservado partilhado pela família de receptores de IL-1 (IL-1R), designado Toll/IL-1R (TIR), requerido para o início da cascata de sinalização intracelular^{139, 140}. Dependendo de vários factores (como o tipo de TLR, de células ou de ligandos), os TLR podem activar diferentes vias de sinalização utilizando vários co-factores e moléculas adaptadoras, gerando respostas imunes específicas. Uma das vias de sinalização mais importantes é mediada pela molécula adaptadora MyD88, conduzindo à translocação do factor de transcrição NF- κ B para o núcleo e subsequente transcrição de genes que codificam para citocinas pró- e anti-inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias, com funções envolvidas em respostas imunes inatas e adquiridas^{139, 141}.

Para além de reconhecerem estruturas microbianas conservadas, os TLR também detectam um conjunto de ligandos endógenos que são libertados como sinais de alerta na sequência de danos nos tecidos, tais como produtos de degradação de macromoléculas, produtos de cascatas proteolíticas, componentes intracelulares de

células danificadas e produtos de genes activados por inflamação. Exemplos de ligandos endógenos incluem proteínas de choque térmico (HSP, *Heat shock proteins*), ácidos nucleicos e produtos de degradação da matriz extracelular (heparano sulfato, fibrinogénio, fibronectina e proteínas *high mobility group box 1* - HMGB1)^{131, 139, 142}. Assim, a interacção destes ligandos endógenos com os respectivos TLR tem um papel importante no controlo da homeostasia dos tecidos¹³⁹. O hospedeiro dispõe de um apertado sistema de regulação da disponibilidade de ligandos endógenos e da quantidade de TLR na superfície celular, de modo a que as respostas mediadas por TLR sejam suficientes para conter os agentes patogénicos sem serem nocivas para o hospedeiro¹⁴².

Para além dos PRR, as DC expressam receptores de um grande número de citocinas e quimiocinas e outras substâncias produzidas em resposta à alteração do ambiente circundante, o que lhes confere um importante papel na modulação da resposta imunitária¹³⁰.

Enquanto imaturas, as DC têm uma elevada capacidade para capturar os antigénios (por micropinocitose, endocitose e fagocitose) e processá-los¹³⁰. Nas barreiras epiteliais das mucosas, as DC parecem ser capazes de migrar para a superfície apical do epitélio onde, projectando as suas dendrites para o exterior, capturam os antigénios¹⁴³.

Ao serem expostas a certos estímulos (ex: PAMP reconhecidos pelos TLR expressos pelas DC), as DC sofrem maturação, processo que se caracteriza por alterações fenotípicas, morfológicas e fisiológicas. Durante esta etapa, as DC migram para os órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos de drenagem), o que depende, em parte, da expressão *de novo* da molécula CCR7, receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21 presentes nas zonas ricas em células T dos gânglios linfáticos¹⁴⁴. A alteração no reportório de receptores de quimiocinas estende-se também a uma diminuição da expressão de CCR5 e um aumento da expressão de CXCR4¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Além disso, as DC perdem a capacidade de capturar e processar antigénios, dirigindo a especificidade da células T para os antigénios já capturados nos tecidos periféricos. A par dessas alterações, ocorre um aumento da expressão de complexos MHC-péptido na superfície das DC. As DC passam também a expressar CD83, sofrem um aumento da expressão de

CD40 e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e secretam várias citocinas (TNF- α , IL-12 e interferões - IFN) e quimiocinas. Os eventos ocorridos durante o processo de maturação de DC promovem a interacção destas células com os linfócitos T *naive* nos gânglios linfáticos, com subsequente apresentação antígenica e activação das células T¹³⁰ (Figura 4). Dependendo de vários factores (incluindo o tipo de microrganismo, os PRR, a subpopulação de DC e as citocinas secretadas por células circundantes), podem ser iniciadas respostas de linfócitos T CD4+/*helper* ou respostas mediadas por células T citotóxicas¹⁴⁸⁻¹⁵³. Por outro lado, as DC podem activar células B¹⁵⁴ e estabelecer interacções recíprocas com células da imunidade inata, tais como células NK, NKT e células T $\gamma\delta$ ¹⁵⁵.

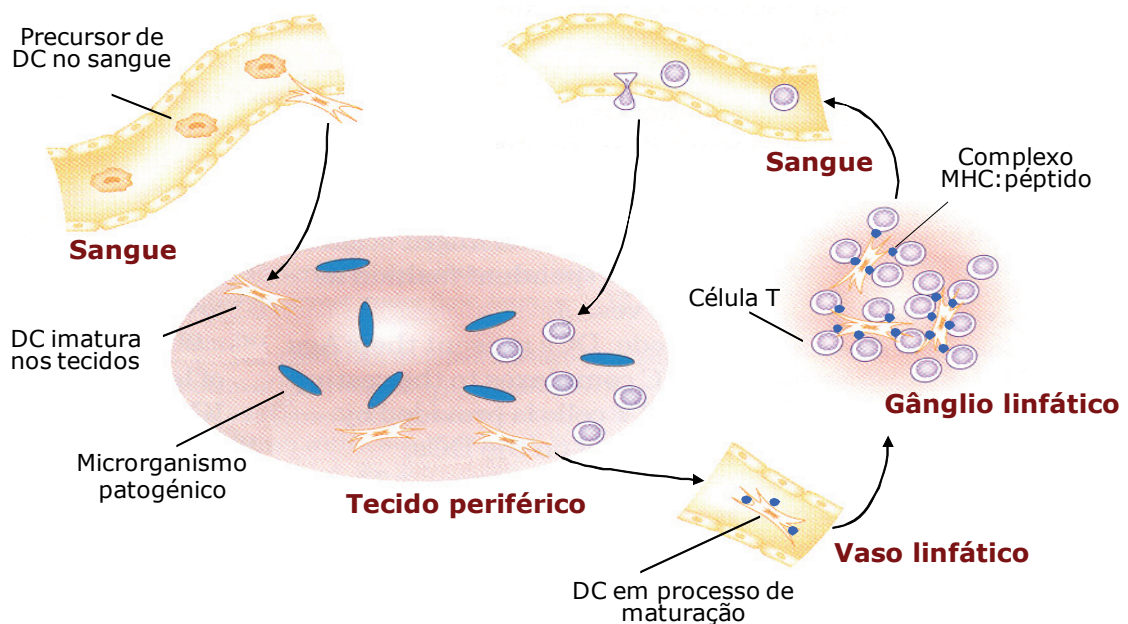


Figura 4. Ciclo de vida das DC convencionais (adaptado de Bleijs *et al*¹⁵⁶).

Entre as DC imaturas e maduras, pode considerar-se a existência de DC num estágio de maturação parcial, designadas semi-maduras¹⁵⁷. Segundo Lutz e Schuler, estas células originam-se a partir da exposição de DC imaturas a auto-antígenos (provenientes do *turnover* de tecidos ou de células apoptóticas), na ausência de agentes patogénicos. Mesmo em condições homeostáticas, estas células adquirem parte das

características de DC maduras, tais como a expressão de CCR7, o que permite a sua migração espontânea para os gânglios linfáticos de drenagem, e o aumento da expressão de moléculas MHC e de co-estimulação¹⁵⁷. No entanto, ao contrário das DC maduras, as DC semi-maduras não têm capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias (como a IL-12) necessárias para a activação das células T e sua polarização no que respeita a produção de citocinas. Em vez disso, a interacção entre as DC semi-maduras e as células T promove a tolerância aos auto-antígenos apresentados na superfície das DC¹⁵⁷. Assim, em condições de estado estacionário, quer as DC semi-maduras quer as imaturas têm sido apontadas como relevantes para o desenvolvimento de células T reguladoras, importantes mediadores de supressão de respostas inatas e adquiridas, envolvidas no controlo da homeostasia periférica^{158, 159}. Numa situação de desequilíbrio do sistema imunitário, como uma infecção, as DC podem ser manipuladas por agentes patogénicos e, mesmo sofrendo completa maturação, induzir células T reguladoras e tolerância^{160, 161}.

5.2. *Subpopulações de células dendríticas*

As DC constituem uma população heterogénea de células, sendo as várias subpopulações distinguidas com base na sua localização, nas vias de migração, nos perfis de expressão de moléculas e na função que desempenham¹²⁹. No ser humano, podem distinguir-se duas subpopulações principais, as DC mielóides (mDC) e as DC plasmacitóides (pDC)¹⁶², que constituem menos de 1% do total de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)^{163, 164}.

As mDC podem encontrar-se nos tecidos periféricos não linfóides, nos tecidos linfóides e na circulação periférica¹⁶⁵. Também designadas por DC convencionais¹⁶⁶, as mDC constituem as APC por excelência. De acordo com as suas características migratórias, esta subpopulação pode ainda subdividir-se em DC “migratórias” e em DC “residentes” em tecidos linfóides¹²⁹. As DC migratórias apresentam o ciclo de vida clássico descrito na secção anterior, ou seja, constituem “sentinelas” nos tecidos periféricos e, em resposta a sinais de perigo, migram para os gânglios linfáticos de drenagem¹²⁹. De acordo com a sua localização nos tecidos periféricos, têm sido

agrupadas em células de *Langerhans* (epiderme da pele, epitélio do tracto intestinal, respiratório e reprodutor), DC dérmicas (derme) e DC intersticiais (fígado e pulmões) ¹²⁹. Ao contrário das DC migratórias, as DC residentes em tecidos linfóides (DC do timo, baço e cerca de metade das DC nos gânglios linfáticos) capturam e apresentam os antigénios directamente no órgão linfóide ¹²⁹.

As pDC, assim designadas devido à semelhança da sua morfologia com a de plasmócitos, localizam-se preferencialmente no sangue periférico e órgãos linfóides secundários ¹⁶⁷. Graças à expressão de L-selectina na sua superfície, as pDC em circulação podem migrar directamente através dos *high endothelial venules* (HEV) para os órgãos linfóides secundários ¹⁶⁸. Funcionalmente, as pDC destacam-se pela elevada capacidade de produzir IFN - tipo I (IFN-I), nomeadamente IFN- α , após estimulação antigénica. Esta citocina, para além de ter um importante papel antiviral, constitui um agente modulador das próprias pDC e de outras células do sistema imunitário, entre as quais células NK, mDC e células B ^{166, 169}. As pDC podem também desempenhar um papel como APC, tendo sido recentemente sugerido que os seus mecanismos de apresentação antigénica são distintos dos utilizados pelas mDC ^{170, 171}. Esta dicotomia funcional das pDC (produção de IFN-I e apresentação antigénica) pode ser induzida sequencialmente por um determinado estímulo ¹⁷². Segundo Soumelis e Liu, a estimulação antigénica das pDC induz a transição entre dois estádios de diferenciação: (i) estágio plasmacitóide, em que as células têm uma morfologia plasmacitóide e uma elevada capacidade de produção de IFN tipo I; (ii) estágio de DC, em que as células adquirem dendrites típicas de DC e tornam-se capazes de apresentar antigénios às células T *naïve*, activando-as, mas perdem cerca de 95%-99% do seu potencial de produção de IFN-tipo I ¹⁷². Com base na morfologia e função das pDC no primeiro estágio, vários autores têm caracterizado esta subpopulação como pré-DC ^{129 172}. A possibilidade das duas funções das pDC como produtoras de IFN-I e apresentadoras de antigénios serem co-induzidas por um mesmo estímulo foi contrariada por um estudo recente que demonstrou que, dependendo da estimulação, as pDC adquirem uma ou outra função ¹⁷³.

Apesar de, inicialmente, se ter atribuído às subpopulações mDC e pDC uma origem mielóide e linfóide, respectivamente, existe evidência de que ambas podem ter como

origem células progenitoras mielóides ou linfóides que expressam Flt3 (*fms-like tyrosine kinase receptor-3*), um receptor da citocina Flt3L que promove o desenvolvimento das DC *in vivo* e *in vitro* ^{165, 174}.

Fenotipicamente, ambas as subpopulações expressam HLA-DR e são negativas para a expressão de marcadores específicos de linhagem de outras células do sistema imunitário, tais como CD19/CD20 (células B), CD3 (células T), CD14 (monócitos) e CD16/CD56 (células NK) ¹⁶⁹. No entanto, as mDC distinguem-se das pDC pela elevada expressão de marcadores mielóides como CD11b, CD11c, CD13, CD33 e BDCA-3. Por seu turno, as pDC expressam CD123 (receptor de IL-3), BDCA2 e BDCA4 ^{169, 175}.

O perfil de expressão de TLR é distinto e complementar nestas duas subpopulações de DC. No ser humano, as pDC expressam selectivamente TLR7 e TLR9, permitindo-lhes reconhecer RNA em cadeia simples e sequências de DNA não metilado ricas em oligonucleótidos CpG, respectivamente. As mDC expressam preferencialmente TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR8 ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, o que lhes confere uma capacidade de reconhecimento de outros estímulos.

Apesar da função especializada de cada subpopulação de DC, a regulação da resposta imune depende também da flexibilidade com que uma célula responde a diferentes estímulos microbianos e ambientais, desempenhando diversas funções, e da interacção entre as várias subpopulações de DC ¹⁷⁸.

Dado o papel central das DC na indução de respostas imunes, a modulação da função destas células constitui um mecanismo estratégico utilizado por agentes patogénicos como o HIV para diminuir a capacidade de vigilância do sistema imunitário.

6. O papel das células dendríticas na imunopatogénese da infecção pelo HIV

Actualmente reconhece-se como sendo da maior importância o papel das DC na imunopatogénese da infecção pelo HIV. Não só constituem potenciais alvos de infecção pelo HIV, como são cruciais na transmissão do vírus devido à sua capacidade migratória e de recrutamento de um elevado número de células T ^{56, 58, 147, 179-182}. Além disso, as DC

podem constituir reservatórios virais^{115, 183, 184}, contribuindo continuamente para a infecção de novas células T. Por fim, as próprias DC apresentam alterações quantitativas e qualitativas que, tendo em conta o papel destas células nos mecanismos de defesa imunitária, contribuem para a desregulação do sistema imunitário na infecção pelo HIV¹⁸¹.

6.1. Infecção das células dendríticas pelo HIV

As diferentes populações de DC expressam CD4 e os co-receptores CXCR4 e CCR5 necessários à entrada do HIV na célula^{147, 185-187}, pelo que são consideradas potenciais alvos da infecção pelo vírus. Estudos *in vitro* utilizando diferentes subpopulações de DC, incluindo células de *Langerhans* da pele¹⁸⁸⁻¹⁹¹ e vaginais¹⁹², DC do sangue^{186, 187, 193, 194} e DC geradas a partir de monócitos (Mo-DC)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ ou precursores CD34⁺¹⁹⁸, demonstraram que as DC podem ser infectadas, mas com uma frequência inferior à de células T CD4⁺⁵⁸. A susceptibilidade à infecção parece depender da estirpe em causa (X4 or R5) o que, por sua vez, pode ser condicionado pelo estágio de maturação das DC. Experiências *in vitro* feitas em Mo-DC¹⁹⁵ ou DC obtidas a partir de células CD34⁺¹⁹⁸ demonstraram que DC imaturas são susceptíveis a infecção produtiva somente por estirpes R5. Contudo, após maturação das DC, a expressão de CCR5 diminui e a de CXCR4 aumenta, o que favorece a infecção destas células por estirpes X4^{145, 146, 198}. Apesar da evidência recente de que as células de *Langerhans* são resistentes à infecção pelo HIV-1¹⁹⁹, foi possível documentar a replicação de estirpes R5 em células frescas²⁰⁰ e de estirpes X4 após cultura celular *in vitro*¹⁴⁷. Consistentes com estas observações, estudos de infecção de células de *Langerhans in situ* têm demonstrado que a entrada do HIV-1 ocorre predominantemente através de CCR5, o que ajuda a explicar a reduzida transmissão de estirpes X4 através das membranas das mucosas²⁰⁰. DC isoladas a partir do sangue periférico apresentam susceptibilidade à infecção *in vitro* por estirpes R5 ou X4^{187, 201, 202}, apesar de, em alguns casos, serem mais susceptíveis a infecção por estirpes R5^{186, 203}. No entanto, num estudo efectuado por Fong e colaboradores, as pDC só se tornaram susceptíveis à infecção por estirpes R5 ou X4 após estimulação por CD40L²⁰⁴. Apesar das discrepâncias entre os vários estudos, a maturação das DC, além de estar

associada a uma diminuição da expressão de CCR5, parece contribuir para um decréscimo da capacidade de fusão do vírus com a membrana celular¹⁹⁶ e da transcrição viral após integração do seu genoma no DNA do hospedeiro¹⁴⁶. Ao contrário do que acontece com as células de *Langerhans*, há evidência de que as DC dérmicas são indiscriminadamente susceptíveis à infecção por estirpes R5 e X4²⁰⁰.

Apesar de vários estudos terem demonstrado que as DC são susceptíveis à infecção por HIV-1 *in vitro*, o contributo da infecção de DC *in vivo* para a patogénese da SIDA permanece controverso. Para investigar a infecção de DC *in vivo*, tem sido utilizado o modelo da infecção de macacos *Rhesus* pelo SIV, através da mucosa vaginal. Apesar da baixa frequência de infecção, o SIV tem sido detectado nas DC logo após o epitélio escamoso estratificado vaginal e exocervix uterino^{205, 206}. Em estudos efectuados no GALT, foi possível a detecção de infecção de SIV em DC, apesar de mais lentamente do que em células T CD4⁺^{55, 207}. Do mesmo modo, em tecidos linfóides de macacos infectados por SIV e de indivíduos infectados pelo HIV, a existência de RNA viral em DC é mais dificilmente detectada do que em linfócitos T CD4⁺⁵⁸.

A fim de melhor se perceber o grau de infecção de DC pelo HIV, mais estudos deverão ser efectuados, sobretudo em tecidos linfóides associados às mucosas, locais privilegiados de infecção produtiva⁵⁸.

6.2. As células dendríticas como disseminadoras da infecção pelo HIV

As DC têm propriedades que as tornam veículos de disseminação viral por excelência. A sua elevada capacidade de migração da periferia para os gânglios linfáticos e o seu potencial de recrutamento de células T, armas essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida, são exploradas pelo HIV de modo a atingir os seus principais alvos, as células T CD4⁺¹⁷⁹. Com efeito, o contacto entre DC previamente expostas ao HIV e células T promove a infecção das células T^{56-58, 208, 209}. Por outro lado, ao estimularem as células T, as DC aumentam ainda mais a permissividade daquelas à replicação viral, contribuindo para a disseminação do vírus²⁰².

Um dos potenciais mecanismos implicados na transferência do HIV das DC para as células T envolve uma molécula da família dos CLR designada *DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) ou CD209. Esta molécula, identificada em 1992 a partir de uma biblioteca de cDNA de placenta como tendo elevada afinidade para os resíduos de fucose e manose existentes na gp120 do invólucro viral ²¹⁰, é expressa em DC derivadas de monócitos ²¹¹ ou de células CD34⁺ ²¹², em macrófagos ^{213, 214} e em DC dérmicas ⁵⁸ e das mucosas ^{215, 216}. Estudos utilizando Mo-DC mostraram que a molécula DC-SIGN está implicada, não só na interação de DC com células T ²¹¹, mas também na captura do vírus pelas DC e na sua transferência para as células T ²¹⁷. Estes estudos conduziram a um modelo de disseminação viral designado “infecção em *trans*”, segundo o qual a molécula DC-SIGN se liga com elevada afinidade à gp120 do HIV ²¹⁰, promovendo a captura de viriões pelas DC e subsequente transmissão do vírus para as células T CD4⁺ ²¹⁷⁻²²⁰. De notar que a molécula DC-SIGN não parece promover a fusão do vírus com a membrana das DC, pelo que, mesmo sem serem infectadas, as DC podem facilitar a infecção produtiva de células T CD4⁺ ²⁰⁸.

Os mecanismos moleculares pelos quais as DC transmitem o HIV em *trans* para as células T não são completamente conhecidos (Figura 5). Uma possibilidade envolve a internalização do vírus em compartimentos não lisossomais de baixo pH ²¹⁸. Segundo este modelo, o HIV utiliza as DC como “cavalos de Tróia”, ou seja, usa a molécula DC-SIGN para aceder a endossomas ou corpos multivesiculares das DC onde, protegido de degradação, persiste durante tempo suficiente para posteriormente ser transportado para a “sinapse infecciosa” formada pela interação entre as DC e as células T ²²¹. A transmissão viral pode ainda ocorrer através da libertação para o meio extracelular de exossomas contendo o vírus ²²². Estudos mais recentes sugeriram que a infecção em *trans* é mediada sobretudo por viriões à superfície de DC e não por viriões internalizados (Figura 5) ^{208, 223}.

Apesar da importância da molécula DC-SIGN na infecção pelo HIV em *trans*, vários estudos concluíram que esse poderá não ser o único factor na promoção da transferência do vírus das DC para as células T CD4⁺ ^{213, 224, 225}. A discrepância entre os estudos provavelmente reflecte diferenças no tipo de células usadas (DC primárias

versus linhas celulares transfectadas com DC-SIGN) e no estágio de maturação das DC ⁵⁸. É também possível que as DC usem outras moléculas da família CLR para a infecção em *trans* das células T ²⁰⁸.

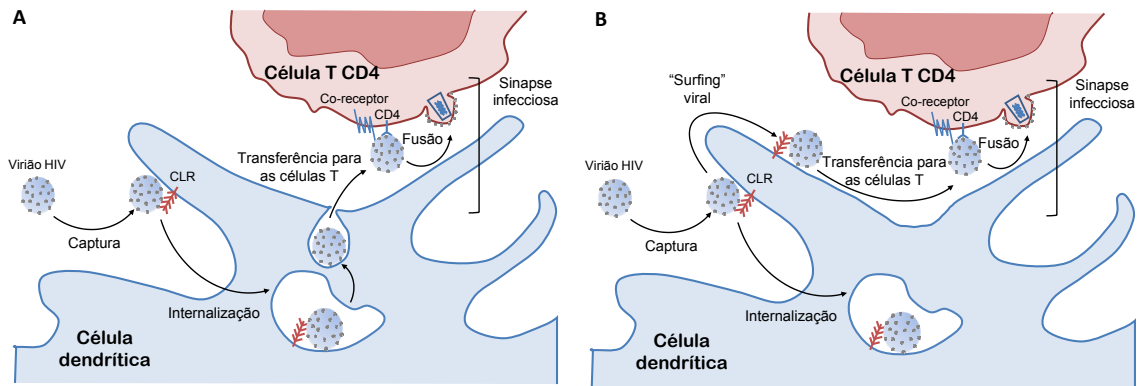


Figura 5. Modelos de infecção em *trans* das células T CD4⁺ pelas DC. No modelo prevalente (A), a infecção em *trans* é mediada por viriões internalizados. No modelo sugerido mais recentemente (B), os viriões que permanecem à superfície das DC são os principais responsáveis pela infecção em *trans* (adaptado de Cavrois *et al*, 2008 ²⁰⁸).

Por outro lado, apesar da detecção da expressão de DC-SIGN em DC de vários tecidos humanos ^{211, 213-216, 226-228}, não foi ainda claramente demonstrada expressão de DC-SIGN *in vivo* em qualquer das subpopulações de DC no sangue, mDC e pDC, nem em células de *Langerhans* ^{186, 211, 213, 229-231}, pelo que o papel desta molécula na disseminação viral *in vivo* permanece por esclarecer ⁵⁶.

A transmissão do HIV das DC para as células T pode ocorrer, não só pelo mecanismo de infecção em *trans*, mas também por um mecanismo de infecção em *cis* que, ao contrário do primeiro, envolve infecção das DC ²³². Tendo em conta estudos recentes que descrevem uma rápida degradação do HIV nas primeiras 24 horas após a sua captura pelas DC ²³³, a transmissão de HIV das DC para as células T após esse período pode implicar produção de vírus *de novo*, ou seja, replicação viral nas DC. Assim, Turville e colaboradores admitem a existência de duas fases, não necessariamente sequenciais ou interdependentes, para a transferência do HIV para as células T CD4⁺: a primeira fase (nas primeiras 24 horas após a exposição ao HIV) pode envolver translocação de vírus capturados nos endossomas para a sinapse infecciosa DC-células T; a segunda fase (de

24 a 72 horas após a exposição ao HIV) pode envolver a replicação viral *de novo* nas DC²³³. No entanto, tendo em conta os baixos níveis de replicação do HIV nas DC *in vivo*, permanece por clarificar a relevância *in vivo* da transmissão de vírus sintetizado *de novo* das DC para as células T⁵⁶.

6.3. Alterações da biologia das células dendríticas na infecção pelo HIV

Durante a infecção pelo HIV, observam-se alterações quantitativas e qualitativas nas DC que podem comprometer o desenvolvimento de uma resposta imunitária adequada. Vários estudos documentaram uma diminuição acentuada das principais subpopulações de DC no sangue periférico, mDC e pDC, em indivíduos infectados pelo HIV-1, quer durante a infecção aguda²³⁴⁻²³⁷, quer durante a infecção crónica^{163, 185, 238-246}. Este decréscimo parece ser mais pronunciado quanto menor o número de linfócitos T CD4⁺^{163, 185, 237, 243, 246} e maior a quantidade de vírus em circulação^{163, 185, 237, 239-241, 243, 246}. Além disso, os indivíduos *Long Term Non Progressors* apresentam níveis de pDC^{239, 242} e mDC²⁴² mais elevados do que os que progridem mais rapidamente. Fenotipicamente, as DC dos indivíduos infectados apresentam uma maior expressão *ex vivo* de moléculas co-estimulatórias^{163, 247} que se parece associar a uma maior virémia e menor número de linfócitos T CD4⁺¹⁶³. Tal pode reflectir o estado generalizado de activação imunitária crónica que estes indivíduos apresentam. No entanto, a capacidade das pDC se diferenciarem após estimulação *in vitro* com ligandos de TLR7 é menor nos doentes infectados pelo HIV-1 do que nos indivíduos seronegativos²⁴⁷.

As razões pelas quais se verifica a depleção de DC em circulação não estão completamente elucidadas. Uma possibilidade consiste na migração de DC para os órgãos linfóides. Com efeito, tem sido observada uma acumulação de DC com um fenótipo parcialmente activado nos tecidos linfóides de indivíduos infectados pelo HIV-1, durante a fase aguda²²⁶ e crónica²⁴⁸⁻²⁵⁰. Um estudo recente demonstrou existir uma acumulação de pDC no baço de doentes em fase crónica da infecção pelo HIV-1²⁵¹. Para além disso, em modelos de infecção patogénica de macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*)²⁵² e não patogénica de *African green monkeys* (*Chlorocebus sabaeus*)²⁵³

por SIV_{mac251} e SIV_{AGM}, respectivamente, verificou-se, durante a infecção aguda, um decréscimo de pDC no sangue periférico e, paralelamente, um aumento dessas células nos gânglios linfáticos, consistente com um recrutamento das pDC para os tecidos linfóides. Outros estudos, no entanto, apresentaram evidência de que a redistribuição de DC para os gânglios linfáticos não pode, por si só, explicar a depleção de DC no sangue periférico. Por exemplo, em macacos *Rhesus* infectados por SIV/DeltaB670 que desenvolveram SIDA, foi recentemente demonstrado um decréscimo de mDC e pDC, quer no sangue, quer nos tecidos linfóides²⁵⁴. Além disso, verificou-se uma depleção muito acentuada de pDC e de mDC nos gânglios linfáticos de indivíduos com infecção crônica pelo HIV-1, em comparação com indivíduos não infectados²⁵⁵. Adicionalmente, Tilton e colaboradores avaliaram as frequências de pDC simultaneamente em PBMC e em gânglios linfáticos de indivíduos infectados pelo HIV-1 e observaram uma ausência de correlação entre ambas, sugerindo que o decréscimo do número de pDC no sangue periférico não era devido a uma acumulação nos gânglios linfáticos²⁵⁶. Uma hipótese alternativa para explicar a depleção de DC no sangue periférico consiste na infecção directa das DC pelo vírus e consequente morte celular. De acordo com esta hipótese, um estudo recente demonstrou que a exposição de pDC a uma linha celular que expressava HIV induzia níveis elevados de apoptose e necrose das pDC²⁵⁷. O decréscimo de DC no sangue periférico pode também resultar de alterações na hematopoiese que podem contribuir para a diminuição de progenitores de DC^{258, 259}.

Para além das alterações quantitativas e fenotípicas, observa-se na infecção pelo HIV-1 uma diminuição da capacidade de maturação das DC que se traduz em alterações da sua função. Relativamente às pDC, tem sido descrita uma menor capacidade de produção de IFN- α em resposta a diversos estímulos²⁶⁰, tais como HSV^{236, 238-241}, Influenza^{240, 243}, imidazoquinolinas (3M-001, 3M-002 e 3M-011, ligandos sintéticos de TLR7, TLR8 e TLR7/8, respectivamente)²⁴⁷, sequências de DNA não metilado ricas em motivos CpG (ligandos de TLR9)^{243-245, 247} e ao próprio HIV-1 inactivado²⁴⁷. Estas observações têm sido descritas quer durante a infecção primária²³⁶, quer durante a infecção crônica^{238-241, 243-245, 247} e não parecem verificar-se em indivíduos *Long Term Non Progressors*²³⁹. Para além disso, quer as pDC²⁶¹ quer as mDC²⁶¹⁻²⁶³ apresentam

uma diminuição da capacidade de estimular a proliferação de células T alogénicas em reacções leucocitárias mistas. O decréscimo da capacidade de maturação funcional das mDC é particularmente evidente nas fases mais avançadas da doença associando-se a uma menor capacidade de indução de expressão de CD40L em células T CD4⁺ ²⁶². Um dos possíveis factores recentemente sugeridos para a menor capacidade estimulatória das células T pelas mDC na infecção pelo HIV-1 é a molécula PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*, B7-H1) ²⁶³, uma molécula da família B7-CD28 que, através da interacção com o seu receptor PD1 (*programmed cell death 1*), está envolvida na supressão da activação das células T ²⁶⁴ e na exaustão de células T específicas do HIV-1 ²⁶⁵⁻²⁶⁸. Foi documentado um aumento da expressão de PD-L1 nas mDC de indivíduos infectados pelo HIV-1 relativamente à observada nas mDC de indivíduos seronegativos, tendo o bloqueio de PD-L1 *in vitro* aumentado a capacidade das mDC de estimular a proliferação das células T ²⁶³.

Para além das DC do sangue periférico, também as DC acumuladas nos tecidos linfóides de indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam defeitos funcionais. Com efeito, estas células têm, como já referido, um fenótipo semi-maduro, nuns casos expressando CD40 mas com reduzida expressão de CD80 e CD86 ²²⁶, noutros sem expressão significativa de CD40 e incapazes de secretarem IL-12 ²⁵⁰. A acumulação de DC semi-maduras no contexto da infecção pelo HIV pode ter um papel importante na indução de células T reguladoras que, por sua vez, suprimem as respostas antivirais com consequente aumento da persistência viral ²⁵⁰.

A avaliação dos efeitos de HAART na restauração dos níveis e função das DC tem conduzido a resultados discrepantes. Alguns estudos apontam para uma incapacidade de recuperação dos níveis de ambas as subpopulações de DC após HAART ²³⁴, enquanto que outros defendem uma recuperação apenas parcial dessas células ¹⁶³. Por outro lado, foi documentada recentemente uma recuperação de pDC mas não de mDC após HAART ²⁶⁹. Pelo contrário, outros estudos demonstraram existir uma completa recuperação dos níveis de mDC mas apenas uma recuperação parcial dos níveis de pDC ^{240, 241, 244}. Essa incapacidade de se atingir os níveis normais de pDC após HAART pode traduzir-se numa também parcial recuperação da capacidade produtora de IFN- α por PBMC estimuladas

com HSV²⁴¹. No entanto, num estudo realizado por Kamga e colaboradores, apesar de os níveis de pDC nos indivíduos infectados pelo HIV-1 após 1 ano de HAART se manterem abaixo dos detectados nos seronegativos, a capacidade de produção de IFN- α por PBMC estimulados com HSV foi completamente recuperada²³⁶. Tem também sido sugerido que administração de HAART na fase inicial da infecção pode restaurar os próprios níveis de pDC. Com efeito, foi observada uma recuperação dos níveis de pDC, mas não de mDC, após 24-48 semanas de HAART, iniciada ainda na fase aguda da infecção²³⁷. Para além disso, em estudos experimentais de interrupção de terapêutica anti-retroviral, foi documentada uma correlação inversa entre os níveis de pDC apresentados após um mês de terapêutica anti-retroviral e os níveis de virémia detectados após interrupção dessa terapêutica²³⁵. Tal pode estar relacionado com uma recuperação sustentada da produção de IFN- α que, por sua vez, tem um papel inibitório da replicação viral²³⁵. Assim, tem sido sugerida a utilização dos níveis de pDC em doentes tratados com HAART como um parâmetro preditivo do controlo viral^{235, 270}. A nível dos gânglios linfáticos, a HAART parece também reduzir a acumulação de DC semi-maturas, nomeadamente ao nível da subpopulação de mDC²⁵⁰.

Além das alterações acima descritas observadas em indivíduos infectados pelo HIV-1, estudos realizados a partir da infecção *in vitro* de DC isoladas *ex vivo* ou de Mo-DC têm também contribuído para o conhecimento da biologia das DC no contexto desta infecção. Experiências de infecção *in vitro* de pDC e mDC têm originado resultados discrepantes quanto à capacidade do vírus de induzir maturação destas células. Ao contrário de Smed-Sorensen e colaboradores, cujas experiências apenas detectaram uma baixa capacidade do vírus de induzir maturação de pDC e mDC¹⁸⁷, vários estudos demonstraram existir uma activação directa das pDC pelo HIV-1^{201, 271}. No entanto, a maturação das mDC pode ocorrer apenas indirectamente como resultado dos efeitos de citocinas secretadas pelas pDC activadas²⁷¹. Alterações consideráveis nas propriedades das DC também se observaram em estudos de infecção *in vitro* de Mo-DC. Apesar do HIV-1 ter induzido uma maturação fenotípica traduzida num aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, provocou alterações funcionais nestas células inibindo a sua capacidade de produzir citocinas em resposta a estímulos de maturação²⁷². Por seu

turno, Granelli-Piperno e colaboradores demonstraram existir uma incapacidade destas células maturarem fenotipicamente e funcionalmente em resposta a diferentes estímulos de maturação²⁷³.

Em resumo, os estudos efectuados em DC na infecção pelo HIV-1, quer utilizando células de indivíduos infectados, quer utilizando células infectadas *in vitro*, sugerem a existência de alterações importantes na biologia das DC que podem impedir o desenvolvimento de uma resposta imunitária apropriada²⁷⁴.

7. O papel dos monócitos/macrófagos no sistema imunitário

Os monócitos constituem uma população pleiomórfica e pleiotrópica de células mononucleadas no sangue periférico humano²⁷⁵, representando cerca de 5-10% do total de leucócitos¹⁶⁴. Estas células desenvolvem-se a partir de um progenitor mielóide comum da medula óssea e são libertadas para o sangue periférico, onde circulam durante vários dias antes de migrarem para os tecidos²⁷⁶. Enquanto em circulação, os monócitos contribuem para a homeostasia, na medida em que constituem um reservatório de precursores mielóides para a renovação de macrófagos e DC nos tecidos^{275, 277, 278}. Enquanto as DC activam células T *naive*, os macrófagos actuam sobretudo amplificando a resposta imune nos tecidos e activam células T memória¹¹².

Numa situação patológica como uma infecção, os monócitos/macrófagos desempenham diversas actividades antimicrobianas²⁷⁵. Como fagócitos que são, internalizam e digerem bactérias e outras células, removem compostos tóxicos produzidos pelo metabolismo, produzem mediadores inflamatórios que podem matar bactérias, parasitas e vírus, e contribuem para a activação de outras células¹⁶⁴. Deste modo, os monócitos/macrófagos desempenham funções importantes em processos inflamatórios^{164, 279}.

Os monócitos constituem uma população heterogénea de células. As diferenças fenotípicas e funcionais que apresentam têm servido de base à caracterização de várias subpopulações. Tendo em conta a expressão de CD14 (um componente do complexo receptor de LPS) e CD16 (um receptor de imunoglobulina FcγRIII), têm sido distinguidas

no sangue periférico humano 3 subpopulações¹⁶⁴. A principal subpopulação (CD14⁺CD16⁻) representa 80% a 90% dos monócitos no sangue e é constituída por células com uma elevada actividade fagocítica¹⁶⁴. Com base no fenótipo característico que apresentam, estas células têm sido designadas por monócitos “clássicos”. Por outro lado, cerca de 10% dos monócitos em circulação são CD16⁺²⁷⁵, têm um diâmetro inferior, e podem ainda ser subdivididos em 2 grupos de acordo com os níveis de expressão de CD14^{164, 280, 281}. Assim, pode considerar-se uma subpopulação que expressa CD14 e CD16 (CD14⁺CD16⁺) e uma subpopulação que expressa CD16 mas baixos níveis de CD14 (CD14^{dim}CD16⁺)^{164, 282, 283}. A literatura apresenta dados controversos relativamente à caracterização das várias subpopulações de monócitos, nomeadamente à capacidade de produção de citocinas em resposta à estimulação com LPS. Vários estudos têm designado a população CD14^{dim}CD16⁺ como “pro-inflamatória”, na medida em que parece produzir elevadas concentrações de TNF- α em resposta a LPS^{284, 285} e encontra-se expandida em situações de infecção e inflamação^{286, 287}, sobretudo em condições de sepsis²⁸⁸. No entanto, Auffray e colaboradores consideraram a subpopulação CD14⁺CD16⁺ como a principal responsável pela produção de TNF- α e IL-1 em resposta a LPS¹⁶⁴. Pelo contrário, um estudo recente documentou uma elevada produção de IL-10 por monócitos CD14⁺CD16⁺ em resposta ao LPS, tendo estes monócitos sido designados por “anti-inflamatórios”²⁸⁵.

Vários estudos têm avaliado a capacidade das subpopulações de monócitos se diferenciarem em DC *in vitro*²⁸⁹. Apesar de parecer haver uma predisposição dos monócitos CD16⁺ para se diferenciarem em DC²⁹⁰, não se pode excluir a contribuição dos monócitos CD14⁺CD16⁻ para a população de DC^{276, 289, 291}. Com efeito, a extensão da capacidade de diferenciação de monócitos em DC ou macrófagos depende, em grande parte, de factores presentes na cultura^{276, 289}. Sallusto e Lanzavecchia desenvolveram, há mais de uma década, um processo para obter DC imaturas a partir de monócitos (Mo-DC) em meio suplementado com *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e IL-4²⁹². Quer a subpopulação CD16⁻ quer a CD16⁺ se podem diferenciar em monócitos *in vitro* na presença destes factores²⁹³. As Mo-DC podem, posteriormente, sofrer maturação em algumas condições, como na presença de TNF- α ou LPS. Apesar de

ser questionada a sua relevância *in vivo*²⁸⁹, as Mo-DC constituem um modelo frequentemente utilizado para o conhecimento de vários aspectos da biologia das DC.

8. O papel dos monócitos/macrófagos na imunopatogênese da infecção pelo HIV

Os monócitos/macrófagos desempenham um papel importante em múltiplos aspectos da patogênese da infecção pelo HIV. Tal como as células T e as DC, os monócitos/macrófagos expressam os receptores para a entrada do vírus e, como tal, constituem potenciais alvos do HIV¹⁸³. Apesar disso, os dados da literatura sugerem que os monócitos não são produtivamente infectados *in vitro*¹¹⁵. No entanto, ao diferenciarem-se em macrófagos *in vitro*, os monócitos sofrem um aumento da expressão de CCR5, tornando-se mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1^{294, 295}. *In vivo*, o HIV-1 pode ser isolado a partir de monócitos de indivíduos infectados²⁹⁶, mas numa baixa frequência^{297, 298}.

Apesar do número absoluto de monócitos/macrófagos infectados no organismo ser baixo comparativamente ao de células T CD4⁺^{147, 297, 298}, a infecção de macrófagos reveste-se de características peculiares. Ao contrário das células T, os macrófagos são mais resistentes aos efeitos citopáticos do vírus^{114, 299}. Assim, na ausência de morte celular, os macrófagos infectados são preservados, produzindo e acumulando viriões durante um longo período de tempo^{112, 114}, constituindo reservatórios virais. Na realidade, foi documentada a presença de monócitos infectados pelo HIV em indivíduos sob tratamento com HAART³⁰⁰, tendo sido possível quantificar o DNA proviral nestas células, mesmo em situações de supressão de virémia^{301, 302}. A longevidade de macrófagos relativamente à de linfócitos T infectados pelo HIV-1 pode reflectir diferenças na dinâmica de replicação viral^{112, 114}. Tendo em conta a sua capacidade de atravessar a barreira sangue-tecidos, os macrófagos infectados podem transmitir o vírus para tecidos e órgãos, incluindo o cérebro¹¹⁴. Assim, os monócitos/macrófagos têm um papel fundamental na persistência e disseminação do vírus pelo organismo¹¹⁴.

Apesar dos monócitos/macrófagos não serem significativamente depletados na infecção pelo HIV¹⁴⁷ e de alguns estudos não terem documentado alterações na função de monócitos/macrófagos de indivíduos infectados pelo HIV-1^{303, 304}, vários outros estudos têm reconhecido anomalias nas suas funções *in vivo* e *in vitro*^{147, 305-309}. Tais defeitos incluem anomalias na fagocitose^{305, 306}, na capacidade de matar microrganismos intracelulares³⁰⁵ e na sua função de apresentação antigénica³⁰⁷⁻³⁰⁹. Os defeitos de apresentação antigénica podem relacionar-se com uma expressão alterada de moléculas MHC-II, de adesão e co-estimulatórias, bem como com uma desregulação da produção de citocinas e quimiocinas^{147, 310-313}. Em indivíduos infectados pelo HIV-1 foi também documentada uma diminuição da capacidade de maturação dos monócitos em resposta a CpG, alteração essa associada a maiores níveis de virémia³¹⁴. Os defeitos funcionais dos monócitos/macrófagos podem ter um importante impacto na imunopatogénese da infecção pelo HIV.

9. Contributo das células dendríticas e monócitos para a activação do sistema imunitário

Como já foi referido, a infecção pelo HIV é caracterizada por uma activação persistente de vários componentes do sistema imunitário que se sabe ser um dos principais factores que determinam o défice imunitário progressivo.

A activação imunitária na infecção pelo HIV pode resultar da conjugação de vários mecanismos, sendo estes actualmente motivo de um aceso debate. Por um lado, há o contributo da exposição crónica ao próprio vírus⁸⁵. Devido à incapacidade do sistema imunitário em eliminar completamente o vírus após a infecção primária, a replicação viral persistente constitui uma fonte permanente de células infectadas pelo vírus, viriões infecciosos livres e antigénios virais solúveis. Por outro lado, vírus como o citomegalovírus e o Epstein-barr podem, perante o descontrolo dos vários componentes do sistema imunitário, ser reactivados e sofrer replicação, contribuindo assim para a activação imunitária⁸⁵.

Mais recentemente, tem sido considerado o envolvimento do sistema imune inato, através da via dos TLR, na génese da activação imunitária persistente observada na infecção pelo HIV-1 (Figura 6). Segundo Brenchley e colaboradores, a depleção massiva de linfócitos T CD4⁺ que ocorre na infecção aguda nos tecidos linfóides da mucosa intestinal pode resultar na ruptura da integridade do epitélio intestinal, permitindo a translocação de componentes de bactérias comensais do tracto gastrointestinal para a lâmina própria e os gânglios linfáticos mesentéricos (Figura 6)^{60, 315}. Os produtos microbianos libertados, como o LPS, a flagelina e o DNA não metilado rico em motivos CpG, podem activar o sistema imune inato através do seu reconhecimento pelos TLR em DC e monócitos/macrófagos. A activação destas células induz a produção de citocinas proinflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), conduzindo à estimulação crónica e contínua observada no sistema imunitário dos indivíduos infectados⁸⁵. Com efeito, um estudo recente demonstrou que a exposição de PBMC a vários ligandos de TLR conduz à activação das células T, nomeadamente células efectoras e de memória³¹⁶. A suportar a hipótese da translocação microbiana como causa da activação imunitária, foi observado um aumento significativo dos níveis de LPS no plasma de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1, em correlação directa com parâmetros da activação imunitária³¹⁵. Para além disso, quanto maiores os níveis de LPS, menor a capacidade de restauração dos níveis de células T CD4⁺ em circulação após HAART³¹⁵. Um aumento da quantidade de LPS em circulação foi também documentado no modelo patogénico de infecção de macacos *Rhesus* pelo SIV³¹⁵. Curiosamente, apesar de uma também marcada depleção de células T CD4⁺ na mucosa intestinal, não se observam níveis aumentados de LPS no modelo de infecção não patogénica de *Sooty mangabeys* pelo SIV³¹⁵. A resposta anti-inflamatória precoce montada por estes símios pode ajudar a manter a integridade da barreira intestinal e prevenir a enteropatia característica da infecção pelo HIV⁹⁶. Além disso, ao contrário do que se observou em indivíduos infectados pelo HIV e em macacos *Rhesus* infectados por SIV, no intestino de *Sooty mangabeys* não se documentou um decréscimo de células T CD4⁺ que secretam IL-17^{317, 318}, células que desempenham um importante papel no controlo de agentes patogénicos extracelulares como bactérias e fungos, nomeadamente na superfície das mucosas³¹⁹. Assim, é

possível que a depleção destas células na infecção pelo HIV e em modelos patogénicos de infecção pelo SIV contribua para a translocação microbiana pela mucosa danificada.

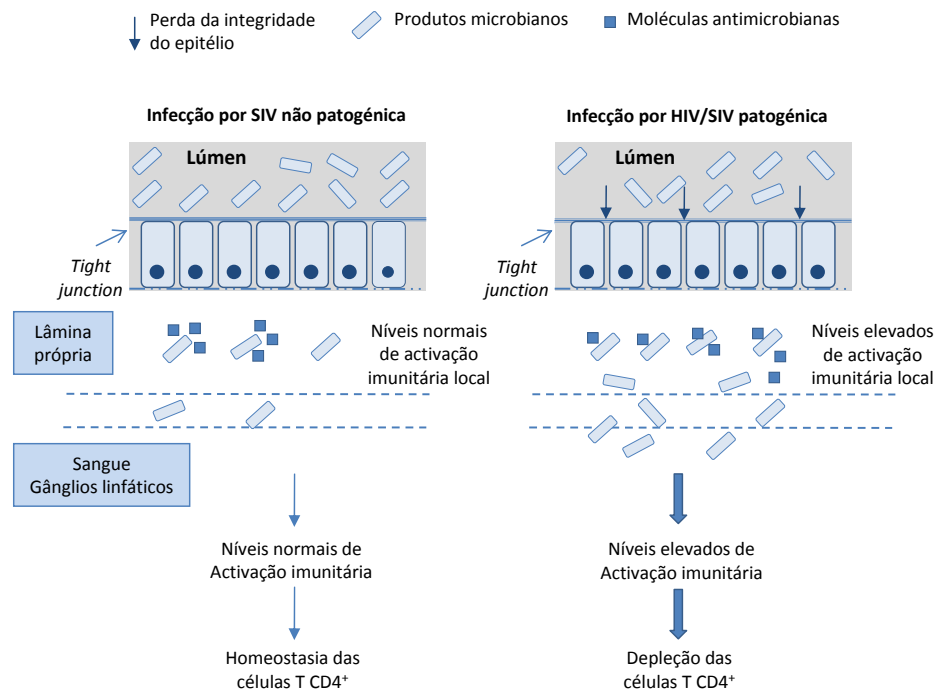


Figura 6. Translocação microbiana na infecção pelo HIV-1 (adaptado de Paiardini *et al*, 2008⁶⁰)

Para além do papel de componentes bacterianos na activação imunitária crónica observada nesta infecção, o próprio HIV-1 codifica para múltiplos ligandos TLR7/TLR8 que podem activar *in vitro* células do sistema imunitário^{320, 321}.

Recentemente, foi demonstrado num modelo murino que a estimulação via TLR7 pode conduzir directamente à activação imunitária, bem como a distúrbios no sistema imunitário semelhantes aos observados na infecção crónica pelo HIV-1³²². Esses resultados são consistentes com estudos anteriores no rato que demonstraram existir uma alteração da morfologia e função dos órgãos linfóides após administração diária de CpG, um ligando de TLR9³²³.

O envolvimento dos TLR na activação imunitária persistente observada na infecção pelo HIV ganhou também consistência com um estudo de Mandl e colaboradores que documentou diferenças na resposta imune inata específicas do hospedeiro entre macacos *Rhesus* e *Sooty mangabeys*, nomeadamente a presença, nos macacos *Rhesus*, de níveis mais elevados de produção de IFN- α pelas pDC em resposta a SIV ou ligandos

de TLR7 e TLR9 ³²⁴. Para além disso, foram encontrados nos *Sooty mangabeys* polimorfismos do gene que codifica para o *Interferon regulatory factor 7* (IRF7), um factor de transcrição envolvido na via de sinalização de TLR7 e TLR9, conducente à produção de IFN-tipo I ³²⁴. Tendo em conta os baixos níveis de activação imunitária presentes nos *Sooty mangabeys*, estes resultados sugerem que a produção aumentada de IFN- α pode ser um factor responsável pela activação imunitária generalizada observada nas infecções pelo HIV no ser humano e pelo SIV nos macacos *Rhesus* ³²⁵.

No seu conjunto, estes estudos são consistentes com um modelo em que a estimulação crónica do sistema imune inato por ligandos de TLR, sejam eles codificados pelo próprio HIV-1 ou presentes na circulação após translocação microbiana através do epitélio intestinal, resulta numa produção crónica de citocinas proinflamatórias, conduzindo à activação imunitária persistente e generalizada que se observa na infecção pelo HIV (Figura 7). Nesse sentido, a utilização terapêutica de antagonistas de TLR pode vir a constituir uma estratégia de redução da imunopatologia presente nesta infecção

326

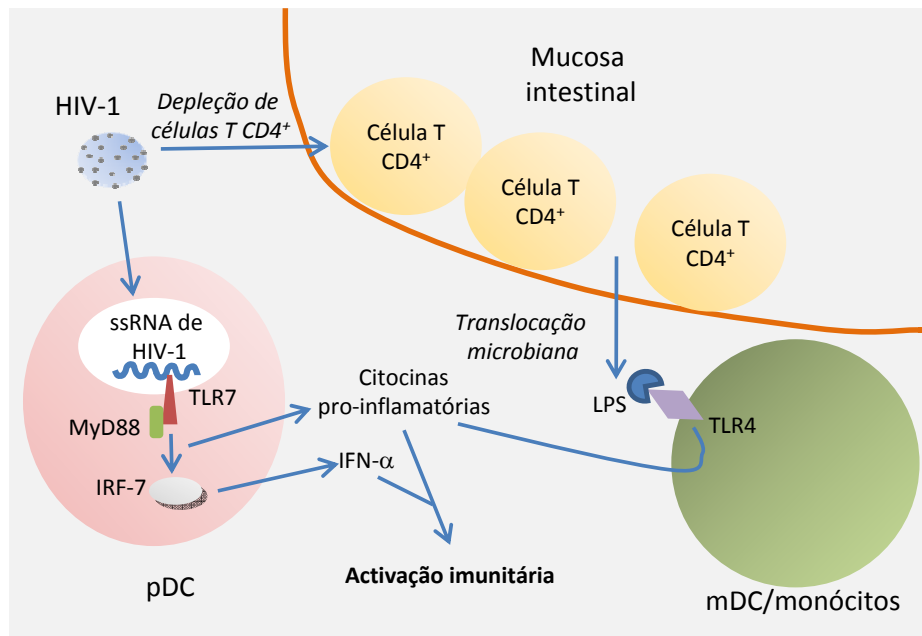


Figura 7. Mecanismos mediados por TLR conducentes à activação imunitária persistente na infecção pelo HIV-1: translocação de componentes microbianos (LPS na figura) pelo epitélio da mucosa intestinal, com concomitante activação imunitária via estimulação de TLR (TLR4 na figura); e estimulação de pDC por ligandos de TLR7 codificados pelo HIV-1, induzindo a produção de IFN- α e citocinas proinflamatórias (adaptado de Chang e Altfeld, 2009 ³²⁶).

10. O papel do invólucro do HIV-1 na modulação de células dendríticas e monócitos

Independentemente da sua infecção directa, as células do hospedeiro podem ser expostas a diferentes proteínas do HIV, quer expressas na superfície de células infectadas, quer secretadas para o microambiente circundante. Têm sido descritos vários efeitos de proteínas do HIV solúveis em células do sistema imunitário. Em particular, a glicoproteína do invólucro viral gp120, para além de facilitar a entrada do vírus na célula, pode, independentemente da infecção, modular a função de diversos tipos de células, tais como células T, B, NK, monócitos/macrófagos e DC e, dessa forma, contribuir para a imunopatogénese da infecção pelo HIV-1³²⁷⁻³³³.

As glicoproteínas do invólucro são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso da célula infectada como um único precursor polipeptídico que, após glicosilação, forma a glicoproteína gp160²⁹. Esta é transportada para o complexo de Golgi, onde é clivada por uma protease celular originando a gp120 de superfície e a gp41 transmembranar²⁹. Estas duas glicoproteínas encontram-se unidas por interações não covalentes lábeis²³, possibilitando o fácil desprendimento da gp120. Assim, a gp120 pode encontrar-se nos tecidos e no sangue de doentes infectados pelo HIV-1, quer à superfície de viriões, quer como proteína livre^{334, 335}.

Tendo em conta que somente uma fracção limitada de viriões em circulação (\approx 0.1%) é infecciosa^{336, 337}, muitos dos estudos sobre os efeitos *in vitro* da gp120 no sistema imunitário utilizam, não só proteínas recombinantes, mas também vírus inactivado com aldritol-2 (AT-2), um químico que bloqueia a infecciosidade preservando a conformação do invólucro viral³³⁸. Deste modo, a exposição celular *in vitro* a vírus inactivados quimicamente permite mimetizar as interações entre o HIV e as células-alvo que mais frequentemente ocorrem *in vivo*¹⁸¹.

Os estudos de caracterização dos efeitos *in vitro* da gp120 no sistema imunitário têm conferido a esta proteína propriedades imunossupressoras que se manifestam pela sua capacidade de inibir a proliferação de células T via receptor das células T (TCR, *T cell receptor*), de induzir a apoptose de células T e de provocar alterações no perfil de produção de citocinas³²⁷. Um dos mecanismos que pode contribuir para essas

alterações qualitativas das células T consiste na modulação da função de DC e monócitos/macrófagos pela própria gp120.

10.1 Efeitos da gp120 na modulação de células dendríticas

As DC podem ser moduladas pela gp120, quer através da sua exposição directa à proteína, quer através da sua interacção com células T CD4⁺ previamente expostas à gp120^{147, 181}.

A avaliação da capacidade do invólucro do HIV-1 de modular o fenótipo e a função de DC tem sido efectuada utilizando Mo-DC ou subpopulações de DC isoladas *ex vivo* incubadas na presença de gp120 recombinante ou HIV-1 inactivado. Os estudos gerados têm sido contraditórios. Segundo alguns autores, a exposição de Mo-DC a HIV-1 inactivado ou a gp120 recombinante induz a sua maturação fenotípica, traduzida num aumento da expressão de moléculas de co-estimulação e de MHC e no aparecimento do marcador de maturação CD83^{328, 329}. Por seu turno, Harman e colaboradores mostraram que a gp120 recombinante, ao contrário do vírus inactivado, era incapaz de induzir um fenótipo maduro nas DC³³⁹.

Os estudos sobre os efeitos do invólucro de HIV-1 na função de DC têm também originado resultados discrepantes. Segundo Fantuzzi e colaboradores, a maturação fenotípica das DC induzida pela gp120 não se traduz num aumento da capacidade de produção de citocinas (IL-12 e TNF- α) e quimiocinas (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES), nem num maior potencial estimulador de respostas proliferativas de células T alogénicas³²⁹, ao contrário do que acontece quando as células são expostas ao LPS, um estímulo típico de maturação. Por seu turno, Williams e colaboradores demonstraram que a aquisição de um fenótipo maduro após exposição das DC à gp120 se correlaciona com um aumento da produção de IL-12 e da capacidade de estimulação da proliferação de células T alogénicas³²⁸. Tais discrepâncias podem ser um reflexo das diferentes estirpes de gp120 utilizadas e de variações nas condições experimentais.

Para além das alterações observadas após exposição das Mo-DC ao invólucro do HIV-1, verificaram-se também alterações funcionais durante a diferenciação de DC a

partir de monócitos, embora sem alterações fenotípicas significativas³²⁹. A presença de gp120 durante a diferenciação de DC inibiu a sua capacidade de induzir a proliferação de células T alogénicas³²⁹. Mesmo após subsequente estimulação com LPS ou CD40L, a capacidade de induzir respostas de células T e de produzir IL-12 foi inferior à de DC geradas na ausência de gp120³²⁹. Estes resultados sugerem que a gp120 pode afectar a biologia das DC actuando a diversos níveis. Por um lado, a gp120 pode actuar nos precursores de DC (como os monócitos) que, assim, se diferenciam em DC de fenótipo normal mas com alterações funcionais. Por outro lado, a gp120 pode actuar nas DC já diferenciadas, promovendo a sua maturação fenotípica mas não funcional³²⁹.

Tal como nos estudos realizados em Mo-DC, têm sido documentadas alterações em subpopulações de DC isoladas *ex vivo* expostas ao invólucro do HIV-1. Relativamente às pDC, resultados discrepantes têm sido gerados quanto à capacidade da gp120 de induzir a produção de IFN- α por estas células. Segundo Del Corno e colaboradores, a gp120, por si só, induz a produção de IFN- α por pDC³⁴⁰. No entanto, um estudo realizado por Herbeuval e colaboradores mostrou que somente o HIV-1 inactivado, e não a gp120, era capaz de induzir a produção de IFN- α por pDC³⁴¹. Por outro lado, a gp120 parece interferir com a activação das pDC em resposta a ligandos de TLR9, traduzindo-se numa inibição da sua capacidade de produção de IFN- α e de citocinas proinflamatórias, bem como numa supressão da sua capacidade de activação de células NK³³³. Os efeitos directos da gp120 nas pDC incluem também a indução da produção de β -quimiocinas (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β)³⁴⁰. Além disso, a exposição de PBMC a HIV-1 inactivado induz a expressão, nas pDC, de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima que catabolisa o triptofano e inibe a proliferação das células T³³². Por sua vez, as mDC purificadas não parecem sofrer os efeitos directos do invólucro viral³⁴⁰, mas podem ser activadas indirectamente através de citocinas (TNF- α e IFN- α) secretadas por pDC estimuladas pelo invólucro viral²⁷¹.

Além dos seus efeitos directos nas DC, o invólucro viral pode, através das suas propriedades inibitórias das células T, contribuir indirectamente para a desregulação das DC¹⁸¹. Com efeito, para que as DC sejam adequadamente activadas, é fundamental a sua comunicação com células T CD4⁺ activadas, através do estabelecimento de

interacções entre moléculas co-estimulatórias que resultam numa sinalização bidireccional importante na activação dos dois tipos de células ³⁴². A interacção entre a molécula CD40, expressa constitutivamente nas DC, e a molécula CD40L, cuja expressão é induzida via TCR nas células T CD4⁺, constitui uma das vias fundamentais para a activação das DC ³⁴². Deste modo, Chougnnet e colaboradores propuseram um mecanismo segundo o qual a exposição de células T CD4⁺ ao invólucro viral conduziria a défices na interacção CD40/CD40L que, por sua vez, estariam na base de uma menor activação de DC ^{181, 343}. Por um lado, vários estudos documentaram um decréscimo na capacidade de indução da expressão de CD40L após activação em células T CD4⁺ expostas à gp120 ³⁴⁴⁻³⁴⁶. Por outro lado, foram observadas anomalias na função de DC incubadas com células T CD4⁺ autólogas previamente expostas a estirpes de HIV-1 inactivado ³⁴³. Essas alterações traduziram-se num menor aumento da expressão de CD40, CD86 e CD83, numa diminuição da secreção de IL-10 e IL-12p40, bem como num menor potencial estimulador da proliferação de células T alogénicas ³⁴³. Estes efeitos foram anulados pela adição, às co-culturas, de CD40L recombinante, sugerindo que uma interacção deficiente entre CD40L das células T e CD40 das DC pode constituir um mecanismo de desregulação da biologia das DC ³⁴³.

Como consequência dos efeitos directos ou indirectos da gp120, as DC, estando deficitárias a vários níveis, podem ser incapazes de permitir uma sinalização adequada às células T CD4⁺. Com efeito, células T *naive* alogénicas incubadas com DC disfuncionais parecem adquirir um perfil semelhante ao de células T reguladoras, com uma baixa capacidade proliferativa e de produção de IFN- γ , mas elevada produção de IL-10 ³⁴³. Assim, a gp120 pode contribuir para o estabelecimento de um ciclo vicioso que conduz à desregulação de DC e de células T CD4⁺ característica da infecção pelo HIV-1.

Para além dos efeitos da gp120, livre ou à superfície de viriões, na modulação de DC, podem ainda considerar-se os efeitos da gp120 secretada por DC infectadas. Neste sentido, é de salientar o estudo de Kawamura e colaboradores que mostrou que populações enriquecidas de Mo-DC infectadas pelo HIV-1 apresentam um decréscimo na capacidade de estimular a proliferação de células T CD4⁺ e a produção de IL-2, efeito que parece dever-se à gp120 solúvel secretada pelas DC infectadas ³⁴⁷.

Em conclusão, a gp120, quer sob a forma solúvel no soro e nos tecidos de indivíduos infectados, quer à superfície de viriões e/ou células infectadas, pode, directa ou indirectamente, exercer efeitos consideráveis nas DC, alterando as suas propriedades. Tais efeitos podem contribuir para uma desregulação das respostas mediadas pelas células T CD4⁺ *in vivo*.

10.2 Efeitos da gp120 na modulação de monócitos/macrófagos

Vários estudos demonstraram existir efeitos directos da gp120 na função de monócitos/macrófagos. Em particular, foi documentada uma indução da secreção de citocinas por monócitos/macrófagos, incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10^{327, 348-355}. O desequilíbrio de produção de citocinas pode ter consequências importantes na imunopatogénese da infecção pelo HIV. Para além disso, há evidência de que as proteínas do invólucro viral inibem a expressão de receptores de ligandos quimiotáxicos e as funções quimiotáxicas de monócitos em circulação^{356, 357}. Foi também observada uma inibição da fusão fagolisossomal^{358, 359} e da fagocitose mediada por receptores Fc³⁵¹ em monócitos do sangue periférico expostos à gp120. Esta diminuição da função efectora de monócitos/macrófagos pode traduzir-se num decréscimo da capacidade de resposta a vários agentes patogénicos intracelulares. Com efeito, constatou-se que a gp120 diminui a actividade anti-*Cryptococcus* em macrófagos bronco-alveolares³⁶⁰, promove o crescimento intracelular de *Mycobacterium avium* em monócitos em circulação³⁶¹ e inibe funções efectoras dos monócitos contra *Candida albicans*³⁶².

Por outro lado, há evidências de que a gp120 pode diminuir a função apresentadora de antígenos dos monócitos/macrófagos. Por exemplo, um estudo mostrou que um fragmento de gp120 que inclui a região de ligação a CD4 diminui a capacidade dos monócitos apresentarem o antígeno PPD a linfócitos T autólogos, efeito esse que foi associado à produção de TNF- α por monócitos induzida pela gp120³⁶³. Além disso, a gp120 parece regular sinais moleculares envolvidos na apresentação de *Cryptococcus neoformans*, promovendo uma resposta Th2 ao fungo, nomeadamente pela indução de IL-4 e inibição da produção de IFN- γ ³⁶⁴. Foi também demonstrado que macrófagos

expostos a lipossomas contendo a região V3 da gp120 à sua superfície e toxóide tetânico na fase aquosa são capazes de activar células T CD4⁺ durante a estimulação primária, mas não após restimulação nove dias mais tarde³⁶⁵.

Em conclusão, a interacção das proteínas do invólucro do HIV com monócitos/macrófagos pode conduzir a uma incapacidade de lidar com infecções oportunistas, contribuindo para a progressão da doença.

11. O HIV-2 como modelo de estudo da patogénese da SIDA

Os factores virais e do hospedeiro que podem conferir protecção contra a infecção ou progressão da doença constituem um dos principais aspectos que permanece por elucidar na patogénese da infecção pelo HIV. Neste sentido, o estudo de um modelo mais atenuado de doença, como a infecção pelo HIV-2, pode permitir desvendar mecanismos que diminuem a progressão da doença.

Apesar de o HIV-1 e o HIV-2 se associarem a um espectro clínico semelhante, estudos comparativos entre as duas infecções têm demonstrado que o declínio de células T CD4⁺ em circulação e a progressão para doença ocorrem mais lentamente na infecção pelo HIV-2 do que na infecção pelo HIV-1³⁶⁶⁻³⁷³. Para além disso, a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-2 tem níveis de virémia abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas e, nos casos em que a virémia é detectável, os valores são muito inferiores aos observados na infecção pelo HIV-1³⁷⁴⁻³⁷⁸. Esta reduzida virémia contribui para a menor transmissibilidade sexual³⁷⁹⁻³⁸¹ e perinatal^{366, 382-390} da infecção pelo HIV-2 e, conseqüentemente, para uma disseminação geográfica mais limitada, sobretudo confinada a países de África Ocidental^{16, 369, 391, 392}. Em alguns desses países, a infecção pelo HIV-2 tem vindo mesmo a decrescer nos últimos anos, provavelmente devido à sua baixa taxa de transmissão³⁹³. Devido às relações com as suas ex-colónias, Portugal é o único país não-africano com uma prevalência significativa de infecção pelo HIV-2 (cerca de 5% dos casos notificados, segundo a Coordenação Nacional para a Infecção VIH/sida¹⁸), tornando-se um local privilegiado para o estudo desta infecção.

Os factores responsáveis pelas diferenças entre as infecções pelo HIV-1 e pelo HIV-2 não estão clarificados, mas envolvem provavelmente mecanismos virológicos e imunológicos.

O HIV-2 tem uma organização genética e proteica semelhante à do HIV-1. Com excepção do gene *vpx* (que existe no HIV-2 e está ausente no HIV-1) e do gene *vpu* (específico do HIV-1), os restantes genes são comuns aos dois vírus³⁶⁹. No entanto, o HIV-2 partilha com o HIV-1 apenas cerca de 60% dos aminoácidos ao nível de Gag e Pol e 30 a 40% ao nível de Env³⁹⁴. Na realidade, o HIV-2 tem mais homologia (75%) com o SIV que infecta o *Sooty mangabey*³⁹⁵, um pequeno macaco da África Ocidental que se crê ter transmitido o SIV_{sm} à população humana em, pelo menos, oito eventos distintos, originando os oito subtipos de HIV-2 que se conhecem até à data^{396, 397}. Por seu turno, os dados disponíveis apontam para uma origem do HIV-1 a partir de transmissões zoonóticas de dois vírus distintos, SIV_{cpz} e SIV_{gor}, que infectam naturalmente chimpanzés e gorilas, respectivamente⁹⁶.

Do ponto da capacidade citopática, não se verificaram diferenças entre o HIV-1 e o HIV-2 em culturas de tecidos linfóides, sendo a citopaticidade determinada pelos co-receptores utilizados pelos vírus³⁹⁸. De notar que o HIV-2 é capaz de utilizar uma maior gama de co-receptores do que o HIV-1, muito provavelmente devido à estrutura mais “aberta” do seu invólucro³⁹⁹.

Apesar da menor quantidade de vírus em circulação nos indivíduos infectados pelo HIV-2, os níveis de DNA proviral, ou seja, DNA integrado no genoma da célula hospedeira, são equivalentes entre as duas infecções^{378, 400-404}. Esta aparente discrepância entre a semelhança na quantidade de DNA proviral e a diferença de virémia observadas nas duas infecções pode ser devida a uma menor capacidade replicativa do HIV-2. Com efeito, foram recentemente detectados menores níveis de mRNA *in vivo* na infecção pelo HIV-2 do que na infecção pelo HIV-1, sugerindo que, apesar de ser capaz de se estabelecer como provírus na célula hospedeira, o HIV-2 se associa a uma menor transcrição viral⁴⁰⁵. Tal pode ser devido à selecção de distintos locais de integração⁴⁰⁶, a diferenças entre os LTR e, por conseguinte, a diferenças quanto à regulação da transcrição⁴⁰⁷⁻⁴¹¹. A menor taxa de replicação do HIV-2 pode ajudar a explicar os

menores níveis de virémia que se observam na infecção por este vírus. Para além disso, análises da evolução da sequência C2-V3-C3 do invólucro viral ao longo de cerca de 10 anos mostraram menor divergência e diversificação em indivíduos infectados pelo HIV-2 do que nos infectados pelo HIV-1, o que é consistente com um menor *turnover* do vírus⁴¹².

Do ponto de vista do hospedeiro, há evidências de que o sistema imunitário tem uma melhor capacidade de controlar a infecção pelo HIV-2 do que a infecção pelo HIV-1. Por exemplo, tem sido documentada uma prevalência superior de anticorpos neutralizantes contra vírus autólogos⁴¹³ e heterólogos⁴¹⁴ na infecção pelo HIV-2 do que na infecção pelo HIV-1. Comparativamente aos indivíduos infectados pelo HIV-1, os indivíduos infectados pelo HIV-2 parecem conseguir produzir anticorpos neutralizantes com uma acção mais alargada⁴¹⁴. Para além disso, um estudo longitudinal mostrou que os soros de indivíduos infectados pelo HIV-2 são capazes de neutralizar virus autólogos isolados há vários anos, o que evidencia reduzido escape à neutralização na infecção pelo HIV-2⁴¹⁵, contrariamente ao observado na infecção pelo HIV-1⁴¹⁶. Tal pode ser devido à menor capacidade replicativa⁴⁰⁵ e à mais lenta evolução do HIV-2 do que do HIV-1⁴¹². A maior sensibilização à neutralização por anticorpos do HIV-2 pode ser devida à existência de menos sítios de glicosilação no domínio V3 da gp105 do HIV-2, tornando esse domínio “mais aberto” e mais acessível à acção dos anticorpos do que no correspondente domínio da gp120 do HIV-1⁴¹⁵. Essa maior abertura da gp105 pode também contribuir para a utilização de uma gama mais alargada de co-receptores para a entrada do vírus na célula³⁹⁹.

Os estudos disponíveis sobre a avaliação de respostas de células T CD4⁺ específicas de Gag, considerada a proteína mais imunogénica na infecção pelo HIV-2⁴¹⁷, sugerem ainda que as respostas específicas são superiores na infecção pelo HIV-2 do que na infecção pelo HIV-1, particularmente na capacidade dos linfócitos T CD4⁺ específicos produzirem IL-2 e proliferarem^{418, 419}. Para além disso, o nosso laboratório documentou na infecção pelo HIV-2 uma correlação negativa entre a frequência de células T CD4⁺ específicas de Gag e os níveis de DNA proviral⁴²⁰.

Quanto às respostas específicas mediadas por células T CD8⁺ citotóxicas, os estudos comparativos entre as duas infecções não parecem revelar diferenças significativas^{421, 422}, tendo sido documentada uma associação entre a preservação de respostas contra certos epitopos de Gag e o controlo da replicação viral na infecção pelo HIV-2⁴¹⁷.

A função das células NK parece estar preservada em indivíduos infectados pelo HIV-2 com níveis normais de células T CD4⁺, ao contrário do que se observa em indivíduos infectados pelo HIV-1 com níveis semelhantes de células T CD4⁺⁴²³. No entanto, com a progressão da doença, quer os indivíduos infectados pelo HIV-1 quer os infectados pelo HIV-2 apresentam um decréscimo na eficiência da actividade de células NK⁴²³.

Com o objectivo de compreender a imunopatogénese da infecção pelo HIV em geral a partir dos mecanismos envolvidos na menor patogenicidade da infecção pelo HIV-2, o nosso laboratório tem centrado a sua investigação no estudo comparativo entre as duas infecções desde o início da epidemia^{94, 404, 420, 424-430}. Relativamente à representação relativa de células *naive versus* memória/efectoras, não foram detectadas diferenças significativas entre as duas infecções quando foram comparados indivíduos infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2 com o mesmo grau de depleção de células T CD4⁺⁹⁴. Por outro lado, foi documentada uma maior preservação da frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-2 na infecção pelo HIV-2 do que na infecção pelo HIV-1, o que, tendo em conta o papel desta citocina na proliferação e sobrevivência linfocitárias, pode contribuir para a menor taxa de declínio de células T CD4⁺ na imunodeficiência associada ao HIV-2⁴²⁷. Foi também sugerido que a infecção pelo HIV-2 se associa a uma melhor preservação da actividade tímica do que a infecção pelo HIV-1, que pode compensar, pelo menos parcialmente, a perda de células T CD4⁺⁴²⁹. A IL-7, uma citocina que, actuando na timopoiese e na periferia, é crucial na homeostasia das células T⁴³¹⁻⁴³⁴, poderá ser um dos factores que contribui para o ritmo mais lento da perda de células T CD4⁺. Com efeito, documentou-se na infecção pelo HIV-2 uma correlação negativa entre o número absoluto de células T CD4⁺ em circulação e os níveis séricos de IL-7, bem como uma melhor preservação da expressão do receptor de IL-7 do que na infecção pelo HIV-1⁴²⁸.

Apesar da importância da activação imunitária crónica no decréscimo de células T CD4⁺ na infecção pelo HIV, foi documentado um aumento semelhante da frequência de células T activadas nos indivíduos infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2 estratificados para o mesmo grau de depleção de células T CD4⁺ ⁹⁴. No entanto, tendo em conta o ritmo mais lento com que ocorre a depleção de células T CD4⁺, o aumento dos níveis de activação na infecção pelo HIV-2 poderá também ocorrer mais lentamente. Os factores que poderão limitar os processos de activação imunitária crónica na infecção pelo HIV-2 são desconhecidos. Uma possibilidade está relacionada com as propriedades imunológicas da proteína do invólucro do HIV-2. Ao contrário do que acontece em relação à gp120 do HIV-1, a informação existente sobre os efeitos no sistema imunitário da proteína correspondente do HIV-2, gp105, é muito escassa. Foi descrita a ligação da gp105, não só à molécula CD4, mas também à molécula CD8, ao contrário da gp120 que apenas se liga à molécula CD4 ⁴³⁵. A ligação da gp105 à cadeia α da molécula CD8 induz a fosforilação da proteína tirosina cinase p56^{lck} nas células T CD8⁺, podendo transduzir sinais para essas células ⁴³⁶ e contribuir para uma maior secreção das β -quimoquinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES em resposta à gp105 do que em resposta à gp120 ^{436, 437}. Além disso, usando culturas de PBMC estimuladas com anti-CD3 *in vitro*, o nosso grupo documentou propriedades imunossupressoras da gp105 mais acentuadas do que as da gp120 do HIV-1 ou de SIV ⁴²⁶. Embora a extrapolação para a sua relevância *in vivo* deva ser cautelosa e, apesar do aparente paradoxo de uma proteína de um vírus menos patogénico ser mais imunossupressora, é possível que estes efeitos da gp105 do HIV-2 sejam benéficos para o hospedeiro, uma vez que, ao limitarem os processos de activação linfocitária, podem contribuir para reduzir a produção de vírus e retardar a progressão da doença.

É plausível admitir que os monócitos e as DC tenham um papel importante nos efeitos imunossupressores da gp105 do HIV-2. A informação relativa a estas células na infecção pelo HIV-2 é muito limitada. Foi documentada uma menor susceptibilidade das DC à infecção *in vitro* pelo HIV-2 do que pelo HIV-1 ⁴³⁸. No entanto, desconhece-se qual o impacto, em termos quantitativos e qualitativos, da infecção pelo HIV-2 nestas células. Tendo em conta o papel crucial dos monócitos e das DC no sistema imunitário e na

infecção pelo HIV-1, o estudo da modulação destas células pelo HIV-2 poderá contribuir para revelar potenciais mecanismos de menor patogenicidade do HIV-2 em relação ao HIV-1 e para a compreensão da imunopatogénese da infecção pelo HIV em geral.

Referências

1. Centers for Disease Control: *Pneumocystis pneumonia* - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1981; 30:250-252.
2. Gottlieb MS, R Schroff, HM Schanker, JD Weisman, PT Fan, RA Wolf, A Saxon: *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. *N Engl J Med* 1981; 305:1425-1431.
3. Barre-Sinoussi F, JC Chermann, F Rey, MT Nugeyre, S Chamaret, J Gruest, C Dauguet, C Axler-Blin, F Vezinet-Brun, C Rouzioux, W Rozenbaum, L Montagnier: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-871.
4. Gallo RC, PS Sarin, EP Gelmann, M Robert-Guroff, E Richardson, VS Kalyanaraman, D Mann, GD Sidhu, RE Stahl, S Zolla-Pazner, J Leibowitch, M Popovic: Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:865-867.
5. Gallo RC, SZ Salahuddin, M Popovic, GM Shearer, M Kaplan, BF Haynes, TJ Palker, R Redfield, J Oleske, B Safai, et al.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500-503.
6. Sarngadharan MG, AL DeVico, L Bruch, J Schupbach, RC Gallo: HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 1984; 15:301-308.
7. Montagnier L, JC Chermann, F Barre-Sinoussi, D Klatzmann, S Wain-Hobson, M Alizon, F Clavel, F Brun-Vezinet, E Vilmer, C Rouzioux, et al.: Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 1984; 15:319-331.
8. Vilmer E, F Barre-Sinoussi, C Rouzioux, C Gazengel, FV Brun, C Dauguet, A Fischer, P Manigne, JC Chermann, C Griscelli, et al.: Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet* 1984; 1:753-757.
9. Levy JA, AD Hoffman, SM Kramer, JA Landis, JM Shimabukuro, LS Oshiro: Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225:840-842.
10. Ratner L, RC Gallo, F Wong-Staal: HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 1985; 313:636-637.
11. Coffin J, A Haase, JA Levy, L Montagnier, S Oroszlan, N Teich, H Temin, K Toyoshima, H Varmus, P Vogt, et al.: What to call the AIDS virus? *Nature* 1986; 321:10.

12. Coffin J, A Haase, JA Levy, L Montagnier, S Oroszlan, N Teich, H Temin, K Toyoshima, H Varmus, P Vogt, et al.: Human immunodeficiency viruses. *Science* 1986; 232:697.
13. Clavel F, D Guetard, F Brun-Vezinet, S Chamaret, MA Rey, MO Santos-Ferreira, AG Laurent, C Dauguet, C Katlama, C Rouzioux, et al.: Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-346.
14. Clavel F, M Guyader, D Guetard, M Salle, L Montagnier, M Alizon: Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 1986; 324:691-695.
15. UNAIDS: 2008 Report on the global AIDS epidemic. 2008.
16. Pádua E: 2004. Epidemiologia da infecção por VIH-2. In *Manual sobre SIDA*. F. Antunes, ed. Permanyer Portugal, Lisboa, p. 69-71.
17. Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas: Infecção VIH/SIDA - A situação em Portugal 31 de Dezembro de 2008. 2009.
18. Coordenação Nacional para a Infecção VIH/sida: Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção VIH/sida- 2007-2010. Um compromisso com o futuro. 2007.
19. Rabson AB, MA Martin: Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* 1985; 40:477-480.
20. Gelderblom HR, EH Hausmann, M Ozel, G Pauli, MA Koch: Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987; 156:171-176.
21. Erickson J: 2001. Virology. In *HIV Resistance and Implications for Therapy*. M. Valotti, ed. MediCom Inc., Atlanta, GA, p. 1.1.1-1.4.10.
22. Azevedo-Pereira JM, H Lourenço: 2004. Ciclo biológico de VIH. In *Manual sobre SIDA*. F. Antunes, ed. Permanyer Portugal, Lisboa, p. 13-22.
23. Helseth E, U Olshevsky, C Furman, J Sodroski: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 1991; 65:2119-2123.
24. Ivey-Hoyle M, RK Clark, M Rosenberg: The N-terminal 31 amino acids of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 contain a potential gp41 contact site. *J Virol* 1991; 65:2682-2685.
25. Greene WC: The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:308-317.
26. Chiu IM, A Yaniv, JE Dahlberg, A Gazit, SF Skuntz, SR Tronick, SA Aaronson: Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* 1985; 317:366-368.
27. Dalglish AG, PC Beverley, PR Clapham, DH Crawford, MF Greaves, RA Weiss: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312:763-767.
28. Klatzmann D, E Champagne, S Chamaret, J Gruest, D Guetard, T Hercend, JC Gluckman, L Montagnier: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312:767-768.

29. Wyatt R, J Sodroski: The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280:1884-1888.
30. Groot F: 2006. Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. In *Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission*. PhD Thesis. p. 9-31.
31. Chesebro B, R Buller, J Portis, K Wehrly: Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J Virol* 1990; 64:215-221.
32. Clapham PR, D Blanc, RA Weiss: Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology* 1991; 181:703-715.
33. Feng Y, CC Broder, PE Kennedy, EA Berger: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272:872-877.
34. Choe H, M Farzan, Y Sun, N Sullivan, B Rollins, PD Ponath, L Wu, CR Mackay, G LaRosa, W Newman, N Gerard, C Gerard, J Sodroski: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85:1135-1148.
35. Deng H, R Liu, W Ellmeier, S Choe, D Unutmaz, M Burkhart, P Di Marzio, S Marmon, RE Sutton, CM Hill, CB Davis, SC Peiper, TJ Schall, DR Littman, NR Landau: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661-666.
36. Dragic T, V Litwin, GP Allaway, SR Martin, Y Huang, KA Nagashima, C Cayanan, PJ Maddon, RA Koup, JP Moore, WA Paxton: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381:667-673.
37. Doranz BJ, J Rucker, Y Yi, RJ Smyth, M Samson, SC Peiper, M Parmentier, RG Collman, RW Doms: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-1158.
38. Alkhatib G, C Combadiere, CC Broder, Y Feng, PE Kennedy, PM Murphy, EA Berger: CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1955-1958.
39. Trkola A, T Dragic, J Arthos, JM Binley, WC Olson, GP Allaway, C Cheng-Mayer, J Robinson, PJ Maddon, JP Moore: CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:184-187.
40. Wu L, NP Gerard, R Wyatt, H Choe, C Parolin, N Ruffing, A Borsetti, AA Cardoso, E Desjardin, W Newman, C Gerard, J Sodroski: CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:179-183.
41. Lapham CK, J Ouyang, B Chandrasekhar, NY Nguyen, DS Dimitrov, H Golding: Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 1996; 274:602-605.
42. Hill CM, H Deng, D Unutmaz, VN Kewalramani, L Bastiani, MK Gorny, S Zolla-Pazner, DR Littman: Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J Virol* 1997; 71:6296-6304.
43. Clapham PR, A McKnight: Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* 2002; 83:1809-1829.

44. Berger EA, RW Doms, EM Fenyo, BT Korber, DR Littman, JP Moore, QJ Sattentau, H Schuitemaker, J Sodroski, RA Weiss: A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391:240.
45. Brasseur R, B Cornet, A Burny, M Vandenbranden, JM Ruyschaert: Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1988; 4:83-90.
46. Chan DC, D Fass, JM Berger, PS Kim: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89:263-273.
47. Moniz-Pereira J, J Gonçalves: 2004. Biologia Molecular de VIH. In *Manual sobre SIDA*. F. Antunes, ed. Permanyer Portugal, Lisboa, p. 23-30.
48. Roebuck KA, M Saifuddin: Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr* 1999; 8:67-84.
49. Cullen BR: Regulation of human immunodeficiency virus replication. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45:219-250.
50. Nielsen MH, FS Pedersen, J Kjems: Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* 2005; 2:10.
51. Gelderblom HR: Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; 5:617-637.
52. Kohl NE, EA Emini, WA Schleif, LJ Davis, JC Heimbach, RA Dixon, EM Scolnick, IS Sigal: Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4686-4690.
53. Forsman A, RA Weiss: Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol* 2008; 16:555-560.
54. Cohen O, D Weissman, AS Fauci: 1999. The Immunopathogenesis of HIV Infection. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 1455-1509.
55. Haase AT: Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:783-792.
56. Wu L, VN KewalRamani: Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:859-868.
57. Donaghy H, J Wilkinson, AL Cunningham: HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? *J Leukoc Biol* 2006; 80:1001-1012.
58. Piguet V, RM Steinman: The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol* 2007; 28:503-510.
59. Brenchley JM, DA Price, DC Douek: HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006; 7:235-239.
60. Paiardini M, I Frank, I Pandrea, C Apetrei, G Silvestri: Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Rev* 2008; 10:36-46.
61. Tindall B, DA Cooper: Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991; 5:1-14.

62. Mellors JW, LA Kingsley, CR Rinaldo, Jr., JA Todd, BS Hoo, RP Kokka, P Gupta: Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122:573-579.
63. Mellors JW, CR Rinaldo, Jr., P Gupta, RM White, JA Todd, LA Kingsley: Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167-1170.
64. Weiss RA: Special anniversary review: twenty-five years of human immunodeficiency virus research: successes and challenges. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:201-210.
65. Heath SL, JG Tew, AK Szakal, GF Burton: Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature* 1995; 377:740-744.
66. Aasa-Chapman MM, S Holuigue, K Aubin, M Wong, NA Jones, D Cornforth, P Pellegrino, P Newton, I Williams, P Borrow, A McKnight: Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2005; 79:2823-2830.
67. Huber M, M Fischer, B Misselwitz, A Manrique, H Kuster, B Niederost, R Weber, V von Wyl, HF Gunthard, A Trkola: Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection. *PLoS Med* 2006; 3:e441.
68. Gaines H, MA von Sydow, LV von Stedingk, G Biberfeld, B Bottiger, LO Hansson, P Lundbergh, AB Sonnerborg, J Wasserman, OO Strannegaard: Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 1990; 4:995-999.
69. Tindall B, S Barker, B Donovan, T Barnes, J Roberts, C Kronenberg, J Gold, R Penny, D Cooper: Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1988; 148:945-949.
70. Shen L, RF Siliciano: Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:22-28.
71. Stevenson M: HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003; 9:853-860.
72. Pantaleo G, OJ Cohen, T Schacker, M Vaccarezza, C Graziosi, GP Rizzardì, J Kahn, CH Fox, SM Schnittman, DH Schwartz, L Corey, AS Fauci: Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4:341-345.
73. Tenner-Racz K, HJ Stellbrink, J van Lunzen, C Schneider, JP Jacobs, B Raschdorff, G Grosschupff, RM Steinman, P Racz: The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med* 1998; 187:949-959.
74. Pantaleo G, C Graziosi, JF Demarest, L Butini, M Montroni, CH Fox, JM Orenstein, DP Kotler, AS Fauci: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-358.
75. Lederman MM, L Margolis: The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin Immunol* 2008; 20:187-195.
76. Dybul M, AS Fauci, JG Bartlett, JE Kaplan, AK Pau: Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations of the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51:1-55.

77. Zuger A: Guideline watch. HIV treatment guidelines updated. *AIDS Clin Care* 2006; 18:57.
78. Wilkin TJ, RM Gulick: When to start antiretroviral therapy? *Clin Infect Dis* 2008; 47:1580-1586.
79. Schneider E, S Whitmore, KM Glynn, K Dominguez, A Mitsch, MT McKenna, CfDCaP (CDC). 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* 2008; 57:1-12.
80. Petrucci A, M Dorrucchi, MB Alliegro, P Pezzotti, G Rezza, A Sinicco, A Lazzarin, G Angarano: How many HIV-infected individuals may be defined as long-term nonprogressors? A report from the Italian Seroconversion Study. Italian Seroconversion Study Group (ISS). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14:243-248.
81. Paroli M, A Propato, D Accapezzato, V Francavilla, E Schiaffella, V Barnaba: The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett* 2001; 79:127-129.
82. Pantaleo G, S Menzo, M Vaccarezza, C Graziosi, OJ Cohen, JF Demarest, D Montefiori, JM Orenstein, C Fox, LK Schragger, et al.: Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332:209-216.
83. Klein MR, CA van Baalen, AM Holwerda, SR Kerkhof Garde, RJ Bende, IP Keet, JK Eeftinck-Schattenkerk, AD Osterhaus, H Schuitemaker, F Miedema: Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* 1995; 181:1365-1372.
84. Pantaleo G, AS Fauci: 1996. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In *Wei's Handbook of experimental immunology.*, Vol. IV - The integrated immune system. L. A. Herzenberg, D. M. Heir and C. Blackwell, eds, p. 177.171-177.122.
85. Appay V, D Sauce: Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008; 214:231-241.
86. Zack JA, SJ Arrigo, SR Weitsman, AS Go, A Haislip, IS Chen: HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990; 61:213-222.
87. Bukrinsky MI, TL Stanwick, MP Dempsey, M Stevenson: Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991; 254:423-427.
88. Kawakami K, C Scheidereit, RG Roeder: Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4700-4704.
89. Ostrowski MA, DC Krakauer, Y Li, SJ Justement, G Learn, LA Ehler, SK Stanley, M Nowak, AS Fauci: Effect of immune activation on the dynamics of human immunodeficiency virus replication and on the distribution of viral quasispecies. *J Virol* 1998; 72:7772-7784.
90. Sadowski I, P Lourenco, T Malcolm: Factors controlling chromatin organization and nucleosome positioning for establishment and maintenance of HIV latency. *Curr HIV Res* 2008; 6:286-295.
91. Bucy RP, RD Hockett, CA Derdeyn, MS Saag, K Squires, M Sillers, RT Mitsuyasu, JM Kilby: Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999; 103:1391-1398.

92. Giorgi JV, LE Hultin, JA McKeating, TD Johnson, B Owens, LP Jacobson, R Shih, J Lewis, DJ Wiley, JP Phair, SM Wolinsky, R Detels: Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-870.
93. Deeks SG, CM Kitchen, L Liu, H Guo, R Gascon, AB Narvaez, P Hunt, JN Martin, JO Kahn, J Levy, MS McGrath, FM Hecht: Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004; 104:942-947.
94. Sousa AE, J Carneiro, M Meier-Schellersheim, Z Grossman, RM Victorino: CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 2002; 169:3400-3406.
95. Grossman Z, M Meier-Schellersheim, AE Sousa, RM Victorino, WE Paul: CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319-323.
96. Pandrea I, DL Sodora, G Silvestri, C Apetrei: Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol* 2008; 29:419-428.
97. Silvestri G, DL Sodora, RA Koup, M Paiardini, SP O'Neil, HM McClure, SI Staprans, MB Feinberg: Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 2003; 18:441-452.
98. Kornfeld C, MJ Ploquin, I Pandrea, A Faye, R Onanga, C Apetrei, V Poaty-Mavoungou, P Rouquet, J Estaquier, L Mortara, JF Desoutter, C Butor, R Le Grand, P Roques, F Simon, F Barre-Sinoussi, OM Diop, MC Muller-Trutwin: Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest* 2005; 115:1082-1091.
99. Gardner MB: SIV infected rhesus macaques: an AIDS model for immunoprevention and immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* 1989; 251:279-293.
100. Silvestri G, M Paiardini, I Pandrea, MM Lederman, DL Sodora: Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *J Clin Invest* 2007; 117:3148-3154.
101. Giorgi JV, JL Fahey, DC Smith, LE Hultin, HL Cheng, RT Mitsuyasu, R Detels: Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1987; 138:3725-3730.
102. Miedema F, AJ Petit, FG Terpstra, JK Schattenkerk, F de Wolf, BJ Al, M Roos, JM Lange, SA Danner, J Goudsmit, et al.: Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; 82:1908-1914.
103. Lane HC, JM Depper, WC Greene, G Whalen, TA Waldmann, AS Fauci: Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985; 313:79-84.
104. Gurley RJ, K Ikeuchi, RA Byrn, K Anderson, JE Groopman: CD4+ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:1993-1997.
105. Bentin J, CD Tsoukas, JA McCutchan, SA Spector, DD Richman, JH Vaughan: Impairment in T-lymphocyte responses during early infection with the human immunodeficiency virus. *J Clin Immunol* 1989; 9:159-168.
106. Maria VA, LA Pinto, RM Victorino: Inhibition of lymphocyte proliferation induced in vitro by microbial antigens in HIV-infected subjects. *J Med Virol* 1991; 35:241-245.

107. Shearer GM, M Clerici: Early T-helper cell defects in HIV infection. *AIDS* 1991; 5:245-253.
108. Clerici M, NI Stocks, RA Zajac, RN Boswell, DR Lucey, CS Via, GM Shearer: Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989; 84:1892-1899.
109. Giorgi JV, Z Liu, LE Hultin, WG Cumberland, K Hennessey, R Detels: Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:904-912.
110. Moir S, J Ho, A Malaspina, W Wang, AC DiPoto, MA O'Shea, G Roby, S Kottlil, J Arthos, MA Proschan, TW Chun, AS Fauci: Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 2008; 205:1797-1805.
111. Alter G, M Altfeld: NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med* 2009; 265:29-42.
112. Noursadeghi M, DR Katz, RF Miller: HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:794-804.
113. Donaghy H, J Stebbing, S Patterson: Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:1-6.
114. Carter CA, LS Ehrlich: Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62:425-443.
115. Coleman CM, L Wu: HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 2009; 6:51.
116. Langerhans P: Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für Klinische Medicin.* 1868; 44:325-337.
117. Steinman RM, ZA Cohn: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-1162.
118. Steinman RM, ZA Cohn: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974; 139:380-397.
119. Steinman RM, DS Lustig, ZA Cohn: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 1974; 139:1431-1445.
120. Steinman RM, MD Witmer: Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:5132-5136.
121. Nussenzweig MC, RM Steinman, B Gutchinov, ZA Cohn: Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1980; 152:1070-1084.
122. Inaba K, RM Steinman, WC Van Voorhis, S Muramatsu: Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:6041-6045.
123. Schuler G, RM Steinman: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985; 161:526-546.

124. Romani N, S Koide, M Crowley, M Witmer-Pack, AM Livingstone, CG Fathman, K Inaba, RM Steinman: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989; 169:1169-1178.
125. Banchereau J, RM Steinman: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
126. Tan JK, HC O'Neill: Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 2005; 78:319-324.
127. Steinman RM, S Turley, I Mellman, K Inaba: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-416.
128. Reis e Sousa C: Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:21-25.
129. Shortman K, SH Naik: Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:19-30.
130. Sabatte J, J Maggini, K Nahmod, MM Amaral, D Martinez, G Salamone, A Ceballos, M Giordano, M Vermeulen, J Geffner: Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18:5-17.
131. Granucci F, I Zanoni, P Ricciardi-Castagnoli: Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:1683-1697.
132. van Kooyk Y: C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans* 2008; 36:1478-1481.
133. Stein D, S Roth, E Vogelsang, C Nusslein-Volhard: The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 1991; 65:725-735.
134. Lemaitre B, E Nicolas, L Michaut, JM Reichhart, JA Hoffmann: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-983.
135. Medzhitov R, P Preston-Hurlburt, CA Janeway, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-397.
136. Poltorak A, X He, I Smirnova, MY Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, B Beutler: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282:2085-2088.
137. Bowie AG, IR Haga: The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 2005; 42:859-867.
138. Kawai T, S Akira: TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19:24-32.
139. Zhang Z, HJ Schluesener: Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:2901-2907.
140. Takeda K, T Kaisho, S Akira: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376.

141. Vogel SN, M Fenton: Toll-like receptor 4 signalling: new perspectives on a complex signal-transduction problem. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:664-668.
142. Miyake K: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007; 19:3-10.
143. Niedergang F, A Didierlaurent, JP Kraehenbuhl, JC Sirard: Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? *Trends Microbiol* 2004; 12:79-88.
144. Ohl L, M Mohaupt, N Czeloth, G Hintzen, Z Kiafard, J Zwirner, T Blankenstein, G Henning, R Forster: CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004; 21:279-288.
145. McDyer JF, M Dybul, TJ Goletz, AL Kinter, EK Thomas, JA Berzofsky, AS Fauci, RA Seder: Differential effects of CD40 ligand/trimer stimulation on the ability of dendritic cells to replicate and transmit HIV infection: evidence for CC-chemokine-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 1999; 162:3711-3717.
146. Bakri Y, C Schiffer, V Zennou, P Charneau, E Kahn, A Benjouad, JC Gluckman, B Canque: The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J Immunol* 2001; 166:3780-3788.
147. Conti L, L Fantuzzi, M Del Corno, F Belardelli, S Gessani: Immunomodulatory effects of the HIV-1 gp120 protein on antigen presenting cells: implications for AIDS pathogenesis. *Immunobiology* 2004; 209:99-115.
148. Moser M, KM Murphy: Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1:199-205.
149. Pulendran B, J Banchereau, E Maraskovsky, C Maliszewski: Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 2001; 22:41-47.
150. de Jong EC, PL Vieira, P Kalinski, JH Schuitemaker, Y Tanaka, EA Wierenga, M Yazdanbakhsh, ML Kapsenberg: Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 2002; 168:1704-1709.
151. Kalinski P, CM Hilkens, EA Wierenga, ML Kapsenberg: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20:561-567.
152. Behrens G, M Li, CM Smith, GT Belz, J Mintern, FR Carbone, WR Heath: Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 2004; 82:84-90.
153. Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:476-483.
154. Batista FD, NE Harwood: The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:15-27.
155. Reschner A, P Hubert, P Delvenne, J Boniver, N Jacobs: Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:219-226.
156. Bleijs DA, TB Geijtenbeek, CG Figdor, Y van Kooyk: DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol* 2001; 22:457-463.

157. Lutz MB, G Schuler: Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23:445-449.
158. Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101:455-458.
159. Levings MK, R Bacchetta, U Schulz, MG Roncarolo: The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:263-276.
160. Belkaid Y, G Oldenhove: Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:362-371.
161. Smits HH, EC de Jong, EA Wierenga, ML Kapsenberg: Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2005; 26:123-129.
162. Shortman K, YJ Liu: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-161.
163. Barron MA, N Blyveis, BE Palmer, S MaWhinney, CC Wilson: Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003; 187:26-37.
164. Auffray C, MH Sieweke, F Geissmann: Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 2009.
165. Wu L, YJ Liu: Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007; 26:741-750.
166. Fitzgerald-Bocarsly P, J Dai, S Singh: Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:3-19.
167. Penna G, M Vulcano, S Sozzani, L Adorini: Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002; 63:1164-1171.
168. Yoneyama H, K Matsuno, Y Zhang, T Nishiwaki, M Kitabatake, S Ueha, S Narumi, S Morikawa, T Ezaki, B Lu, C Gerard, S Ishikawa, K Matsushima: Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004; 16:915-928.
169. Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:275-306.
170. Villadangos JA, L Young: Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:352-361.
171. Young LJ, NS Wilson, P Schnorrer, A Proietto, T ten Broeke, Y Matsuki, AM Mount, GT Belz, M O'Keefe, M Ohmura-Hoshino, S Ishido, W Stoorvogel, WR Heath, K Shortman, JA Villadangos: Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2008; 9:1244-1252.
172. Soumelis V, YJ Liu: From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol* 2006; 36:2286-2292.
173. Jaehn PS, KS Zaenker, J Schmitz, A Dzionek: Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur J Immunol* 2008; 38:1822-1832.

174. Ishikawa F, H Niiro, T Iino, S Yoshida, N Saito, S Onohara, T Miyamoto, H Minagawa, S Fujii, LD Shultz, M Harada, K Akashi: The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 2007; 110:3591-3660.
175. Colonna M, G Trinchieri, YJ Liu: Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:1219-1226.
176. Gilliet M, W Cao, YJ Liu: Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:594-606.
177. Jarrossay D, G Napolitani, M Colonna, F Sallusto, A Lanzavecchia: Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3388-3393.
178. Pulendran B, H Tang, TL Denning: Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:61-67.
179. Knight SC: Dendritic cells and HIV infection; immunity with viral transmission versus compromised cellular immunity? *Immunobiology* 2001; 204:614-621.
180. Teleshova N, I Frank, M Pope: Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection. *J Leukoc Biol* 2003; 74:683-690.
181. Chougnet C, S Gessani: Role of gp120 in dendritic cell dysfunction in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2006; 80:994-1000.
182. Lekkerkerker AN, Y van Kooyk, TB Geijtenbeek: Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr HIV Res* 2006; 4:169-176.
183. Collman RG, CF Perno, SM Crowe, M Stevenson, LJ Montaner: HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc Biol* 2003; 74:631-634.
184. Popov S, AL Chenine, A Gruber, PL Li, RM Ruprecht: Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *J Virol* 2005; 79:602-608.
185. Donaghy H, A Pozniak, B Gazzard, N Qazi, J Gilmour, F Gotch, S Patterson: Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001; 98:2574-2576.
186. Patterson S, A Rae, N Hockey, J Gilmour, F Gotch: Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 2001; 75:6710-6713.
187. Smed-Sorensen A, K Lore, J Vasudevan, MK Louder, J Andersson, JR Mascola, AL Spetz, RA Koup: Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 2005; 79:8861-8869.
188. Pope M, MG Betjes, N Romani, H Hirmand, PU Cameron, L Hoffman, S Gezelter, G Schuler, RM Steinman: Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; 78:389-398.
189. Pope M, S Gezelter, N Gallo, L Hoffman, RM Steinman: Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1995; 182:2045-2056.

190. Kawamura T, SS Cohen, DL Borris, EA Aquilino, S Glushakova, LB Margolis, JM Orenstein, RE Offord, AR Neurath, A Blauvelt: Candidate microbicides block HIV-1 infection of human immature Langerhans cells within epithelial tissue explants. *J Exp Med* 2000; 192:1491-1500.
191. Kawamura T, FO Gulden, M Sugaya, DT McNamara, DL Borris, MM Lederman, JM Orenstein, PA Zimmerman, A Blauvelt: R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8401-8406.
192. Hladik F, P Sakchalathorn, L Ballweber, G Lentz, M Fialkow, D Eschenbach, MJ McElrath: Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* 2007; 26:257-270.
193. Groot F, TM van Capel, ML Kapsenberg, B Berkhout, EC de Jong: Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* 2006; 108:1957-1964.
194. Granelli-Piperno A, I Shimeliovich, M Pack, C Trumfheller, RM Steinman: HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J Immunol* 2006; 176:991-998.
195. Granelli-Piperno A, E Delgado, V Finkel, W Paxton, RM Steinman: Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 1998; 72:2733-2737.
196. Cavrois M, J Neidleman, JF Kreisberg, D Fenard, C Callebaut, WC Greene: Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature. *J Virol* 2006; 80:1992-1999.
197. Pion M, JF Arrighi, J Jiang, CA Lundquist, O Hartley, C Aiken, V Piguet: Analysis of HIV-1-X4 fusion with immature dendritic cells identifies a specific restriction that is independent of CXCR4 levels. *J Invest Dermatol* 2007; 127:319-323.
198. Canque B, Y Bakri, S Camus, M Yagello, A Benjouad, JC Gluckman: The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 1999; 93:3866-3875.
199. de Witte L, A Nabatov, M Pion, D Fluitsma, MA de Jong, T de Gruijl, V Piguet, Y van Kooyk, TB Geijtenbeek: Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 2007; 13:367-371.
200. Reece JC, AJ Handley, EJ Anstee, WA Morrison, SM Crowe, PU Cameron: HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J Exp Med* 1998; 187:1623-1631.
201. Yonezawa A, R Morita, A Takaori-Kondo, N Kadowaki, T Kitawaki, T Hori, T Uchiyama: Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* 2003; 77:3777-3784.
202. Lore K, A Smed-Sorensen, J Vasudevan, JR Mascola, RA Koup: Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 2005; 201:2023-2033.
203. Cameron PU, AJ Handley, DC Baylis, AE Solomon, N Bernard, DF Purcell, SR Lewin: Preferential infection of dendritic cells during human immunodeficiency virus type 1 infection of blood leukocytes. *J Virol* 2007; 81:2297-2306.

204. Fong L, M Mengozzi, NW Abbey, BG Herndier, EG Engleman: Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 2002; 76:11033-11041.
205. Spira AI, PA Marx, BK Patterson, J Mahoney, RA Koup, SM Wolinsky, DD Ho: Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; 183:215-225.
206. Hu J, MB Gardner, CJ Miller: Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* 2000; 74:6087-6095.
207. Li Q, L Duan, JD Estes, ZM Ma, T Rourke, Y Wang, C Reilly, J Carlis, CJ Miller, AT Haase: Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005; 434:1148-1152.
208. Cavrois M, J Neidleman, WC Greene: The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000051.
209. de Witte L, A Nabatov, TB Geijtenbeek: Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med* 2008; 14:12-19.
210. Curtis BM, S Scharnowske, AJ Watson: Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:8356-8360.
211. Geijtenbeek TB, R Torensma, SJ van Vliet, GC van Duijnhoven, GJ Adema, Y van Kooyk, CG Figdor: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100:575-585.
212. Encabo A, P Solves, E Mateu, P Sepulveda, F Carbonell-Uberos, MD Minana: Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34+ cells by interleukin-6 and interleukin-3. *Stem Cells* 2004; 22:725-740.
213. Granelli-Piperno A, A Pritsker, M Pack, I Shimeliovich, JF Arrighi, CG Park, C Trumpfheller, V Piguet, TM Moran, RM Steinman: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* 2005; 175:4265-4273.
214. Soilleux EJ, LS Morris, G Leslie, J Chehimi, Q Luo, E Levroney, J Trowsdale, LJ Montaner, RW Doms, D Weissman, N Coleman, B Lee: Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 71:445-457.
215. Gurney KB, J Elliott, H Nassanian, C Song, E Soilleux, I McGowan, PA Anton, B Lee: Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN+ cells in human rectal mucosa. *J Virol* 2005; 79:5762-5773.
216. Jameson B, F Baribaud, S Pohlmann, D Ghavimi, F Mortari, RW Doms, A Iwasaki: Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002; 76:1866-1875.
217. Geijtenbeek TB, DS Kwon, R Torensma, SJ van Vliet, GC van Duijnhoven, J Middel, IL Cornelissen, HS Nottet, VN KewalRamani, DR Littman, CG Figdor, Y van Kooyk: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100:587-597.

218. Kwon DS, G Gregorio, N Bitton, WA Hendrickson, DR Littman: DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 2002; 16:135-144.
219. Arrighi JF, M Pion, M Wiznerowicz, TB Geijtenbeek, E Garcia, S Abraham, F Leuba, V Dutoit, O Ducrey-Rundquist, Y van Kooyk, D Trono, V Piguet: Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* 2004; 78:10848-10855.
220. Arrighi JF, M Pion, E Garcia, JM Escola, Y van Kooyk, TB Geijtenbeek, V Piguet: DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004; 200:1279-1288.
221. McDonald D, L Wu, SM Bohks, VN KewalRamani, D Unutmaz, TJ Hope: Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003; 300:1295-1297.
222. Wiley RD, S Gummuluru: Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:738-743.
223. Cavrois M, J Neidleman, JF Kreisberg, WC Greene: In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog* 2007; 3:e4.
224. Boggiano C, N Manel, DR Littman: Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN. *J Virol* 2007; 81:2519-2523.
225. Wu L, AA Bashirova, TD Martin, L Villamide, E Mehlhop, AO Chertov, D Unutmaz, M Pope, M Carrington, VN KewalRamani: Rhesus macaque dendritic cells efficiently transmit primate lentiviruses independently of DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:1568-1573.
226. Lore K, A Sonnerborg, C Brostrom, LE Goh, L Perrin, H McDade, HJ Stellbrink, B Gazzard, R Weber, LA Napolitano, Y van Kooyk, J Andersson: Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2002; 16:683-692.
227. Soilleux EJ, LS Morris, B Lee, S Pohlmann, J Trowsdale, RW Doms, N Coleman: Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001; 195:586-592.
228. Engering A, SJ van Vliet, K Hebeda, DG Jackson, R Prevo, SK Singh, TB Geijtenbeek, H van Krieken, Y van Kooyk: Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes. *Am J Pathol* 2004; 164:1587-1595.
229. Turville SG, J Arthos, KM Donald, G Lynch, H Naif, G Clark, D Hart, AL Cunningham: HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 2001; 98:2482-2488.
230. Turville SG, PU Cameron, A Handley, G Lin, S Pohlmann, RW Doms, AL Cunningham: Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002; 3:975-983.
231. Soilleux EJ, N Coleman: Langerhans cells and the cells of Langerhans cell histiocytosis do not express DC-SIGN. *Blood* 2001; 98:1987-1988.
232. Burleigh L, PY Lozach, C Schiffer, I Staropoli, V Pezo, F Porrot, B Canque, JL Virelizier, F Arenzana-Seisdedos, A Amara: Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of

- human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 2006; 80:2949-2957.
233. Turville SG, JJ Santos, I Frank, PU Cameron, J Wilkinson, M Miranda-Saksena, J Dable, H Stossel, N Romani, M Piatak, Jr., JD Lifson, M Pope, AL Cunningham: Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; 103:2170-2179.
234. Pacanowski J, S Kahi, M Baillet, P Lebon, C Deveau, C Goujard, L Meyer, E Oksenhendler, M Sinet, A Hosmalin: Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001; 98:3016-3021.
235. Pacanowski J, L Develioglu, I Kamga, M Sinet, M Desvarieux, PM Girard, A Hosmalin: Early plasmacytoid dendritic cell changes predict plasma HIV load rebound during primary infection. *J Infect Dis* 2004; 190:1889-1892.
236. Kamga I, S Kahi, L Develioglu, M Lichtner, C Maranon, C Deveau, L Meyer, C Goujard, P Lebon, M Sinet, A Hosmalin: Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 192:303-310.
237. Killian MS, SH Fujimura, FM Hecht, JA Levy: Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS* 2006; 20:1247-1252.
238. Feldman S, D Stein, S Amrute, T Denny, Z Garcia, P Kloser, Y Sun, N Megjugorac, P Fitzgerald-Bocarsly: Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 2001; 101:201-210.
239. Soumelis V, I Scott, F Gheyas, D Bouhour, G Cozon, L Cotte, L Huang, JA Levy, YJ Liu: Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001; 98:906-912.
240. Chehimi J, DE Campbell, L Azzoni, D Bacheller, E Papisavvas, G Jerandi, K Mounzer, J Kostman, G Trinchieri, LJ Montaner: Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002; 168:4796-4801.
241. Finke JS, M Shodell, K Shah, FP Siegal, RM Steinman: Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2004; 24:647-652.
242. Almeida M, M Cordero, J Almeida, A Orfao: Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS* 2005; 19:261-271.
243. Azzoni L, RM Rutstein, J Chehimi, MA Farabaugh, A Nowmos, LJ Montaner: Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4+ cell counts in treated HIV-1-infected children. *J Infect Dis* 2005; 191:1451-1459.
244. Zhang Z, J Fu, Q Zhao, Y He, L Jin, H Zhang, J Yao, L Zhang, FS Wang: Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol* 2006; 176:5644-5651.
245. Martinson JA, AR Tenorio, CJ Montoya, L Al-Harthi, CN Gichinga, AM Krieg, LL Baum, AL Landay: Impact of class A, B and C CpG-oligodeoxynucleotides on in vitro activation of innate immune cells in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. *Immunology* 2007; 120:526-535.

246. Schmidt B, SH Fujimura, JN Martin, JA Levy: Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2006; 26:55-64.
247. Martinson JA, A Roman-Gonzalez, AR Tenorio, CJ Montoya, CN Gichinga, MT Rugeles, M Tomai, AM Krieg, S Ghanekar, LL Baum, AL Landay: Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell Immunol* 2007; 250:75-84.
248. Dillon SM, KB Robertson, SC Pan, S Mawhinney, AL Meditz, JM Folkvord, E Connick, MD McCarter, CC Wilson: Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 48:1-12.
249. Foussat A, L Bouchet-Delbos, D Berrebi, I Durand-Gasselín, A Coulomb-L'Hermine, R Krzysiek, P Galanaud, Y Levy, D Emilie: Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood* 2001; 98:1678-1686.
250. Krathwohl MD, TW Schacker, JL Anderson: Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 2006; 193:494-504.
251. Nascimbeni M, L Perie, L Chorro, S Diocou, L Kreitmann, S Louis, L Garderet, B Fabiani, A Berger, J Schmitz, JP Marie, TJ Molina, J Pacanowski, JP Viard, E Oksenhendler, S Beq, O Abehsira-Amar, R Cheynier, A Hosmalin: Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients, but barely participate in interferon alpha expression. *Blood* 2009.
252. Malleret B, B Maneglier, I Karlsson, P Lebon, M Nascimbeni, L Perie, P Brochard, B Delache, J Calvo, T Andrieu, O Spreux-Varoquaux, A Hosmalin, R Le Grand, B Vaslin: Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 2008; 112:4598-4608.
253. Diop OM, MJ Ploquin, L Mortara, A Faye, B Jacquelin, D Kunkel, P Lebon, C Butor, A Hosmalin, F Barre-Sinoussi, MC Muller-Trutwin: Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 2008; 82:5145-5152.
254. Brown KN, A Trichel, SM Barratt-Boyes: Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol* 2007; 178:6958-6967.
255. Biancotto A, JC Grivel, SJ Iglehart, C Vanpouille, A Lisco, SF Sieg, R Debernardo, K Garate, B Rodriguez, LB Margolis, MM Lederman: Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* 2007; 109:4272-4279.
256. Tilton JC, MM Manion, MR Luskin, AJ Johnson, AA Patamawenu, CW Hallahan, NA Cogliano-Shutta, JM Mican, RT Davey, Jr., S Kottlilil, JD Lifson, JA Metcalf, RA Lempicki, M Connors: Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *J Virol* 2008; 82:3997-4006.
257. Meyers JH, JS Justement, CW Hallahan, ET Blair, YA Sun, MA O'Shea, G Roby, S Kottlilil, S Moir, CM Kovacs, TW Chun, AS Fauci: Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2007; 2:e458.
258. Moses A, J Nelson, GC Bagby, Jr.: The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* 1998; 91:1479-1495.

259. Koka PS, ST Reddy: Cytopenias in HIV infection: mechanisms and alleviation of hematopoietic inhibition. *Curr HIV Res* 2004; 2:275-282.
260. Hosmalin A, P Lebon: Type I interferon production in HIV-infected patients. *J Leukoc Biol* 2006; 80:984-993.
261. Donaghy H, B Gazzard, F Gotch, S Patterson: Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003; 101:4505-4511.
262. Hsieh SM, SC Pan, CC Hung, MY Chen, SC Chang: Differential impact of late-stage HIV-1 infection on in vitro and in vivo maturation of myeloid dendritic cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33:413-419.
263. Wang X, Z Zhang, S Zhang, J Fu, J Yao, Y Jiao, H Wu, FS Wang: B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 2008; 38:3226-3236.
264. Chen L: Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:336-347.
265. Petrovas C, JP Casazza, JM Brenchley, DA Price, E Gostick, WC Adams, ML Precopio, T Schacker, M Roederer, DC Douek, RA Koup: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203:2281-2292.
266. Day CL, DE Kaufmann, P Kiepiela, JA Brown, ES Moodley, S Reddy, EW Mackey, JD Miller, AJ Leslie, C DePierres, Z Mncube, J Duraiswamy, B Zhu, Q Eichbaum, M Altfeld, EJ Wherry, HM Coovadia, PJ Goulder, P Klenerman, R Ahmed, GJ Freeman, BD Walker: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443:350-354.
267. Trautmann L, L Janbazian, N Chomont, EA Said, S Gimmig, B Bessette, MR Boulassel, E Delwart, H Sepulveda, RS Balderas, JP Routy, EK Haddad, RP Sekaly: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12:1198-1202.
268. Zhang JY, Z Zhang, X Wang, JL Fu, J Yao, Y Jiao, L Chen, H Zhang, J Wei, L Jin, M Shi, GF Gao, H Wu, FS Wang: PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 2007; 109:4671-4678.
269. Fontaine J, F Coutlee, C Tremblay, JP Routy, J Poudrier, M Roger: HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* 2009; 199:1007-1018.
270. Lichtner M, R Rossi, MC Rizza, F Mengoni, I Sauzullo, AP Massetti, G Luzi, A Hosmalin, CM Mastroianni, V Vullo: Plasmacytoid dendritic cells count in antiretroviral-treated patients is predictive of HIV load control independent of CD4+ T-cell count. *Curr HIV Res* 2008; 6:19-27.
271. Fonteneau JF, M Larsson, AS Beignon, K McKenna, I Dasilva, A Amara, YJ Liu, JD Lifson, DR Littman, N Bhardwaj: Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004; 78:5223-5232.
272. Smed-Sorensen A, K Lore, L Walther-Jallow, J Andersson, AL Spetz: HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* 2004; 104:2810-2817.

273. Granelli-Piperno A, A Golebiowska, C Trumpfheller, FP Siegal, RM Steinman: HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:7669-7674.
274. Fernandez S, SF Stone, P Price, MA French: The number and function of circulating dendritic cells may limit effector memory CD4(+) T-cell responses in HIV patients responding to antiretroviral therapy. *Clin Immunol* 2008.
275. Serbina NV, T Jia, TM Hohl, EG Pamer: Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:421-452.
276. Gordon S, PR Taylor: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953-964.
277. Randolph GJ, S Beaulieu, S Lebecque, RM Steinman, WA Muller: Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282:480-483.
278. Varol C, L Landsman, DK Fogg, L Greenshtein, B Gildor, R Margalit, V Kalchenko, F Geissmann, S Jung: Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204:171-180.
279. Auffray C, D Fogg, M Garfa, G Elain, O Join-Lambert, S Kayal, S Sarnacki, A Cumanò, G Lauvau, F Geissmann: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; 317:666-670.
280. Grage-Griebenow E, R Zawatzky, H Kahlert, L Brade, H Flad, M Ernst: Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31:48-56.
281. Grage-Griebenow E, HD Flad, M Ernst: Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001; 69:11-20.
282. Passlick B, D Flieger, HW Ziegler-Heitbrock: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74:2527-2534.
283. Tanaka M, J Honda, Y Imamura, K Shiraishi, K Tanaka, K Oizumi: Surface phenotype analysis of CD16+ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:57-61.
284. Belge KU, F Dayyani, A Horelt, M Siedlar, M Frankenberger, B Frankenberger, T Espevik, L Ziegler-Heitbrock: The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168:3536-3542.
285. Skrzeczynska-Moncznik J, M Bzowska, S Loseke, E Grage-Griebenow, M Zembala, J Pryjma: Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008; 67:152-159.
286. Nockher WA, JE Scherberich: Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998; 66:2782-2790.
287. Saionji K, A Ohsaka: Expansion of CD4+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol* 2001; 105:21-26.

288. Blumenstein M, P Boekstegers, P Fraunberger, R Andreesen, HW Ziegler-Heitbrock, G Fingerle-Rowson: Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 1997; 8:73-75.
289. Tacke F, GJ Randolph: Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006; 211:609-618.
290. Randolph GJ, G Sanchez-Schmitz, RM Liebman, K Schakel: The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002; 196:517-527.
291. Schaerli P, K Willmann, LM Ebert, A Walz, B Moser: Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity* 2005; 23:331-342.
292. Sallusto F, A Lanzavecchia: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-1118.
293. Sanchez-Torres C, GS Garcia-Romo, MA Cornejo-Cortes, A Rivas-Carvalho, G Sanchez-Schmitz: CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol* 2001; 13:1571-1581.
294. Naif HM, S Li, M Alali, A Sloane, L Wu, M Kelly, G Lynch, A Lloyd, AL Cunningham: CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1998; 72:830-836.
295. Tuttle DL, JK Harrison, C Anders, JW Sleasman, MM Goodenow: Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72:4962-4969.
296. Gendelman HE, LM Baca, H Husayni, JA Turpin, D Skillman, DC Kalter, JM Orenstein, DL Hoover, MS Meltzer: Macrophage-HIV interaction: viral isolation and target cell tropism. *AIDS* 1990; 4:221-228.
297. McElrath MJ, JE Pruett, ZA Cohn: Mononuclear phagocytes of blood and bone marrow: comparative roles as viral reservoirs in human immunodeficiency virus type 1 infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:675-679.
298. Spear GT, CY Ou, HA Kessler, JL Moore, G Schochetman, AL Landay: Analysis of lymphocytes, monocytes, and neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons for HIV DNA. *J Infect Dis* 1990; 162:1239-1244.
299. Verani A, G Gras, G Pancino: Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol* 2005; 42:195-212.
300. Lambotte O, Y Taoufik, MG de Goer, C Wallon, C Goujard, JF Delfraissy: Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:114-119.
301. Harrold SM, G Wang, DK McMahon, SA Riddler, JW Mellors, JT Becker, R Caldararo, TA Reinhart, CL Achim, CA Wiley: Recovery of replication-competent HIV type 1-infected circulating monocytes from individuals receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:427-434.

302. Sonza S, HP Mutimer, R Oelrichs, D Jardine, K Harvey, A Dunne, DF Purcell, C Birch, SM Crowe: Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:17-22.
303. Nottet HS, L de Graaf, NM de Vos, LJ Bakker, JA van Strijp, MR Visser, J Verhoef: Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1993; 168:84-91.
304. Peters AM, FS Jager, A Warneke, K Muller, U Brunkhorst, I Schedel, M Gahr: Cytokine secretion by peripheral blood monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients is normal. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61:343-352.
305. Biggs BA, M Hewish, S Kent, K Hayes, SM Crowe: HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1995; 154:6132-6139.
306. Kedzierska K, R Azzam, P Ellery, J Mak, A Jaworowski, SM Crowe: Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol* 2003; 26:247-263.
307. Lunardi-Iskandar Y, V Georgoulas, D Vittecoq, MT Nugeyre, A Ammar, C Clemenceau, F Barre-Sinoussi, JC Chermann, L Schwartzberg, C Jasmin: Peripheral blood adherent cells from AIDS patients inhibit normal T-colony growth through decreased expression of interleukin 2-receptors and production of interleukin 2. *Leuk Res* 1987; 11:753-760.
308. Ennen J, I Seipp, SG Norley, R Kurth: Decreased accessory cell function of macrophages after infection with human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Eur J Immunol* 1990; 20:2451-2456.
309. Yoo J, H Chen, T Kraus, D Hirsch, S Polyak, I George, K Sperber: Altered cytokine production and accessory cell function after HIV-1 infection. *J Immunol* 1996; 157:1313-1320.
310. Polyak S, H Chen, D Hirsch, I George, R Hershberg, K Sperber: Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection. *J Immunol* 1997; 159:2177-2188.
311. Dudhane A, B Conti, T Orlikowsky, ZQ Wang, N Mangla, A Gupta, GP Wormser, MK Hoffmann: Monocytes in HIV type 1-infected individuals lose expression of costimulatory B7 molecules and acquire cytotoxic activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:885-892.
312. Kumar A, JB Angel, S Aucoin, WD Creery, MP Daftarian, DW Cameron, L Filion, F Diaz-Mitoma: Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:84-91.
313. Kedzierska K, SM Crowe: The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 2002; 9:1893-1903.
314. Jiang W, MM Lederman, JR Salkowitz, B Rodriguez, CV Harding, SF Sieg: Impaired monocyte maturation in response to CpG oligodeoxynucleotide is related to viral RNA levels in human immunodeficiency virus disease and is at least partially mediated by deficiencies in alpha/beta interferon responsiveness and production. *J Virol* 2005; 79:4109-4119.
315. Brenchley JM, DA Price, TW Schacker, TE Asher, G Silvestri, S Rao, Z Kazzaz, E Bornstein, O Lambotte, D Altmann, BR Blazar, B Rodriguez, L Teixeira-Johnson, A Landay, JN Martin, FM Hecht, LJ Picker, MM Lederman, SG Deeks, DC Douek: Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12:1365-1371.

316. Funderburg N, AA Luciano, W Jiang, B Rodriguez, SF Sieg, MM Lederman: Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE* 2008; 3:e1915.
317. Brechley JM, M Paiardini, KS Knox, AI Asher, B Cervasi, TE Asher, P Scheinberg, DA Price, CA Hage, LM Kholi, A Khoruts, I Frank, J Else, T Schacker, G Silvestri, DC Douek: Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 2008; 112:2826-2835.
318. Cecchinato V, CJ Trindade, A Laurence, JM Heraud, JM Brechley, MG Ferrari, L Zaffiri, E Tryniszewska, WP Tsai, M Vaccari, RW Parks, D Venzon, DC Douek, JJ O'Shea, G Franchini: Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol* 2008; 1:279-288.
319. Weaver CT, RD Hatton, PR Mangan, LE Harrington: IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-852.
320. Meier A, G Alter, N Frahm, H Sidhu, B Li, A Bagchi, N Teigen, H Streeck, HJ Stellbrink, J Hellman, J van Lunzen, M Altfeld: MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol* 2007; 81:8180-8191.
321. Beignon AS, K McKenna, M Skoberne, O Manches, I DaSilva, DG Kavanagh, M Larsson, RJ Gorelick, JD Lifson, N Bhardwaj: Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005; 115:3265-3275.
322. Baenziger S, M Heikenwalder, P Johansen, E Schlaepfer, U Hofer, RC Miller, S Diemand, K Honda, TM Kundig, A Aguzzi, RF Speck: Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 2009; 113:377-388.
323. Heikenwalder M, M Polymenidou, T Junt, C Sigurdson, H Wagner, S Akira, R Zinkernagel, A Aguzzi: Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 2004; 10:187-192.
324. Mandl JN, AP Barry, TH Vanderford, N Kozyr, R Chavan, S Klucking, FJ Barrat, RL Coffman, SI Staprans, MB Feinberg: Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* 2008; 14:1077-1087.
325. Benito JM: New insights into the mechanisms driving immune activation in HIV. *AIDS Rev* 2008; 10:254-255.
326. Chang JJ, M Altfeld: TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood* 2009; 113:269-270.
327. Chirmule N, S Pahwa: Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev* 1996; 60:386-406.
328. Williams MA, R Trout, SA Spector: HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:829-847.
329. Fantuzzi L, C Purificato, K Donato, F Belardelli, S Gessani: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004; 78:9763-9772.

330. He B, X Qiao, PJ Klasse, A Chiu, A Chadburn, DM Knowles, JP Moore, A Cerutti: HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 2006; 176:3931-3941.
331. Kottlilil S, K Shin, JO Jackson, KN Reitano, MA O'Shea, J Yang, CW Hallahan, R Lempicki, J Arthos, AS Fauci: Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *J Immunol* 2006; 176:1107-1114.
332. Boasso A, JP Herbeuval, AW Hardy, SA Anderson, MJ Dolan, D Fuchs, GM Shearer: HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2007; 109:3351-3359.
333. Martinelli E, C Cicala, D Van Ryk, DJ Goode, K Macleod, J Arthos, AS Fauci: HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:3396-3401.
334. Jones MV, JE Bell, A Nath: Immunolocalization of HIV envelope gp120 in HIV encephalitis with dementia. *AIDS* 2000; 14:2709-2713.
335. Oh SK, WW Cruikshank, J Raina, GC Blanchard, WH Adler, J Walker, H Kornfeld: Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:251-256.
336. Piatak M, Jr., MS Saag, LC Yang, SJ Clark, JC Kappes, KC Luk, BH Hahn, GM Shaw, JD Lifson: High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259:1749-1754.
337. Dimitrov DS, RL Willey, H Sato, LJ Chang, R Blumenthal, MA Martin: Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J Virol* 1993; 67:2182-2190.
338. Rossio JL, MT Esser, K Suryanarayana, DK Schneider, JW Bess, Jr., GM Vasquez, TA Wiltout, E Chertova, MK Grimes, Q Sattentau, LO Arthur, LE Henderson, JD Lifson: Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 1998; 72:7992-8001.
339. Harman AN, J Wilkinson, CR Bye, L Bosnjak, JL Stern, M Nicholle, J Lai, AL Cunningham: HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol* 2006; 177:7103-7113.
340. Del Corno M, MC Gauzzi, G Penna, F Belardelli, L Adorini, S Gessani: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells. *J Virol* 2005; 79:12597-12601.
341. Herbeuval JP, AW Hardy, A Boasso, SA Anderson, MJ Dolan, M Dy, GM Shearer: 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* 2005; 102:13974-13979.
342. van Kooten C, J Banchereau: CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67:2-17.
343. Zhang R, JD Lifson, C Chougnet: Failure of HIV-exposed CD4+ T cells to activate dendritic cells is reversed by restoration of CD40/CD154 interactions. *Blood* 2006; 107:1989-1995.

344. Chirmule N, TW McCloskey, R Hu, VS Kalyanaraman, S Pahwa: HIV gp120 inhibits T cell activation by interfering with expression of costimulatory molecules CD40 ligand and CD80 (B71). *J Immunol* 1995; 155:917-924.
345. Zhang R, CJ Fichtenbaum, DA Hildeman, JD Lifson, C Chougnet: CD40 ligand dysregulation in HIV infection: HIV glycoprotein 120 inhibits signaling cascades upstream of CD40 ligand transcription. *J Immunol* 2004; 172:2678-2686.
346. Chougnet C: Role of CD40 ligand dysregulation in HIV-associated dysfunction of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74:702-709.
347. Kawamura T, H Gatanaga, DL Borris, M Connors, H Mitsuya, A Blauvelt: Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170:4260-4266.
348. Borghi P, L Fantuzzi, B Varano, S Gessani, P Puddu, L Conti, MR Capobianchi, F Ameglio, F Belardelli: Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages. *J Virol* 1995; 69:1284-1287.
349. Gessani S, P Borghi, L Fantuzzi, B Varano, L Conti, P Puddu, F Belardelli: Induction of cytokines by HIV-1 and its gp120 protein in human peripheral blood monocyte/macrophages and modulation of cytokine response during differentiation. *J Leukoc Biol* 1997; 62:49-53.
350. Clouse KA, LM Cosentino, KA Weih, SW Pyle, PB Robbins, HD Hochstein, V Natarajan, WL Farrar: The HIV-1 gp120 envelope protein has the intrinsic capacity to stimulate monokine secretion. *J Immunol* 1991; 147:2892-2901.
351. Durrbaum-Landmann I, E Kaltenhauser, HD Flad, M Ernst: HIV-1 envelope protein gp120 affects phenotype and function of monocytes in vitro. *J Leukoc Biol* 1994; 55:545-551.
352. Ehrenreich H, P Rieckmann, F Sinowatz, KA Weih, LO Arthur, FD Goebel, PR Burd, JE Coligan, KA Clouse: Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J Immunol* 1993; 150:4601-4609.
353. Gessani S, P Puddu, B Varano, P Borghi, L Conti, L Fantuzzi, F Belardelli: Induction of beta interferon by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes-macrophages: role of beta interferon in restriction of virus replication. *J Virol* 1994; 68:1983-1986.
354. Merrill JE, Y Koyanagi, IS Chen: Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J Virol* 1989; 63:4404-4408.
355. Wahl LM, ML Corcoran, SW Pyle, LO Arthur, A Harel-Bellan, WL Farrar: Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:621-625.
356. Wahl SM, JB Allen, S Gartner, JM Orenstein, M Popovic, DE Chenoweth, LO Arthur, WL Farrar, LM Wahl: HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1989; 142:3553-3559.
357. Wang JM, H Ueda, OM Howard, MC Grimm, O Chertov, X Gong, W Gong, JH Resau, CC Broder, G Evans, LO Arthur, FW Ruscetti, JJ Oppenheim: HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *J Immunol* 1998; 161:4309-4317.

358. Pittis MG, G Sternik, L Sen, RA Diez, N Planes, D Pirola, ME Estevez: Impaired phagolysosomal fusion of peripheral blood monocytes from HIV-infected subjects. *Scand J Immunol* 1993; 38:423-427.
359. Moorjani H, BP Craddock, SA Morrison, RT Steigbigel: Impairment of phagosome-lysosome fusion in HIV-1-infected macrophages. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13:18-22.
360. Wagner RP, SM Levitz, A Tabuni, H Kornfeld: HIV-1 envelope protein (gp120) inhibits the activity of human bronchoalveolar macrophages against *Cryptococcus neoformans*. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:1434-1438.
361. Shiratsuchi H, JL Johnson, Z Toossi, JJ Ellner: Modulation of the effector function of human monocytes for *Mycobacterium avium* by human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein gp120. *J Clin Invest* 1994; 93:885-891.
362. Pietrella D, C Monari, C Retini, B Palazzetti, F Bistoni, A Vecchiarelli: Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 impairs intracellular antifungal mechanisms in human monocytes. *J Infect Dis* 1998; 177:347-354.
363. Zembala M, J Pryjma, A Plucienniczak, A Szczepanek, I Ruggiero, M Jasinski, V Colizzi: Modulation of antigen-presenting capacity of human monocytes by HIV-1 GP120 molecule fragments. *Immunol Invest* 1994; 23:189-199.
364. Pietrella D, C Monari, C Retini, B Palazzetti, TR Kozel, A Vecchiarelli: HIV type 1 envelope glycoprotein gp120 induces development of a T helper type 2 response to *Cryptococcus neoformans*. *AIDS* 1999; 13:2197-2207.
365. Zafiroopoulos A, S Baritaki, Z Vlata, DA Spandidos, E Krambovitis: Dys-regulation of effector CD4+ T cell function by the V3 domain of the HIV-1 gp120 during antigen presentation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:875-879.
366. Markovitz DM: Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Ann Intern Med* 1993; 118:211-218.
367. Marlink R, P Kanki, I Thior, K Travers, G Eisen, T Siby, I Traore, CC Hsieh, MC Dia, EH Gueye, et al.: Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265:1587-1590.
368. Whittle H, J Morris, J Todd, T Corrah, S Sabally, J Bangali, PT Ngom, M Rolfe, A Wilkins: HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS* 1994; 8:1617-1620.
369. Marlink R: Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS* 1996; 10:689-699.
370. Poulsen AG, P Aaby, O Larsen, H Jensen, A Naucner, IM Lisse, CB Christiansen, F Dias, M Melbye: 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997; 349:911-914.
371. Reeves JD, RW Doms: Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002; 83:1253-1265.
372. Rowland-Jones SL, HC Whittle: Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 2007; 8:329-331.
373. de Silva TI, M Cotten, SL Rowland-Jones: HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* 2008; 16:588-595.

374. Simon F, S Matheron, C Tamalet, I Loussert-Ajaka, S Bartczak, JM Pepin, C Dhiver, E Gamba, C Elbim, JA Gastaut, et al.: Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* 1993; 7:1411-1417.
375. Berry N, K Ariyoshi, S Jaffar, S Sabally, T Corrah, R Tedder, H Whittle: Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1998; 1:457-468.
376. Popper SJ, AD Sarr, KU Travers, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 1999; 180:1116-1121.
377. Andersson S, H Norrgren, Z da Silva, A Biague, S Bamba, S Kwok, C Christopherson, G Biberfeld, J Albert: Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 2000; 160:3286-3293.
378. Popper SJ, AD Sarr, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* 2000; 74:1554-1557.
379. Donnelly C, W Leisenring, P Kanki, T Awerbuch, S Sandberg: Comparison of transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in a cohort of prostitutes in Senegal. *Bull Math Biol* 1993; 55:731-743.
380. Kanki PJ, KU Travers, MB S, CC Hsieh, RG Marlink, NA Gueye, T Siby, I Thior, M Hernandez-Avila, JL Sankale, et al.: Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 1994; 343:943-946.
381. Most J, L Spotl, M Sarcletti, W Vogetseder, MP Dierich, R Zangerle: Differences in heterosexual transmission of HIV-1 and HIV-2. *Lancet* 1994; 344:1572-1573.
382. Del Mistro A, J Chotard, AJ Hall, H Whittle, A De Rossi, L Chieco-Bianchi: HIV-1 and HIV-2 seroprevalence rates in mother-child pairs living in The Gambia (west Africa). *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:19-24.
383. Poulsen AG, BB Kvinesdal, P Aaby, IM Lisse, A Gottschau, K Molbak, F Dias, E Lauritzen: Lack of evidence of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 2 in a sample of the general population in Bissau. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:25-30.
384. De Cock KM, G Adjorlolo, E Ekpini, T Sibailly, J Kouadio, M Maran, K Brattegaard, KM Vetter, R Doorly, HD Gayle: Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *Jama* 1993; 270:2083-2086.
385. De Cock KM, F Zadi, G Adjorlolo, MO Diallo, M Sassan-Morokro, E Ekpini, T Sibailly, R Doorly, V Batter, K Brattegaard, et al.: Retrospective study of maternal HIV-1 and HIV-2 infections and child survival in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Bmj* 1994; 308:441-443.
386. Andreasson PA, F Dias, A Naucier, S Andersson, G Biberfeld: A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *AIDS* 1993; 7:989-993.
387. Adjorlolo-Johnson G, KM De Cock, E Ekpini, KM Vetter, T Sibailly, K Brattegaard, D Yavo, R Doorly, JP Whitaker, L Kestens, et al.: Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *Jama* 1994; 272:462-466.
388. Faye A, M Burgard, H Crosnier, JM Retbi, S Blanche: Human immunodeficiency virus type 2 infection in children. *J Pediatr* 1997; 130:994-997.

389. Christiansen CB, J Albert, R Machuca, C Nielsen: Differential transmission of HIV-1 and HIV-2. *Lancet* 1997; 350:562.
390. Li Q, B Tsang, L Ding, W Ji-Hong: Infection with the human immunodeficiency virus type 2: epidemiology and transmission (Review). *Int J Mol Med* 1998; 2:573-576.
391. Poulsen AG, P Aaby, A Gottschau, BB Kvinesdal, F Dias, K Molbak, E Lauritzen: HIV-2 infection in Bissau, West Africa, 1987-1989: incidence, prevalences, and routes of transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:941-948.
392. Remy G: HIV-2 infection throughout the world. A geographical perspective. *Sante* 1998; 8:440-446.
393. da Silva ZJ, I Oliveira, A Andersen, F Dias, A Rodrigues, B Holmgren, S Andersson, P Aaby: Changes in prevalence and incidence of HIV-1, HIV-2 and dual infections in urban areas of Bissau, Guinea-Bissau: is HIV-2 disappearing? *AIDS* 2008; 22:1195-1202.
394. Guyader M, M Emerman, P Sonigo, F Clavel, L Montagnier, M Alizon: Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1987; 326:662-669.
395. Hirsch VM, RA Olmsted, M Murphey-Corb, RH Purcell, PR Johnson: An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989; 339:389-392.
396. Hahn BH, GM Shaw, KM De Cock, PM Sharp: AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287:607-614.
397. Damond F, M Worobey, P Campa, I Farfara, G Colin, S Matheron, F Brun-Vezinet, DL Robertson, F Simon: Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:666-672.
398. Schramm B, ML Penn, EH Palacios, RM Grant, F Kirchhoff, MA Goldsmith: Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J Virol* 2000; 74:9594-9600.
399. Azevedo-Pereira JM, Q Santos-Costa, J Moniz-Pereira: HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr HIV Res* 2005; 3:3-16.
400. Berry N, K Ariyoshi, O Jobe, PT Ngum, T Corrah, A Wilkins, H Whittle, R Tedder: HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1031-1037.
401. Ariyoshi K, N Berry, A Wilkins, D Ricard, P Aaby, A Naucler, PT Ngom, O Jobe, S Jaffar, F Dias, RS Tedder, H Whittle: A community-based study of human immunodeficiency virus type 2 provirus load in rural village in West Africa. *J Infect Dis* 1996; 173:245-248.
402. Gomes P, NC Taveira, JM Pereira, F Antunes, MO Ferreira, MH Lourenco: Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:453-456.
403. Jobe O, K Ariyoshi, A Marchant, S Sabally, T Corrah, N Berry, S Jaffar, H Whittle: Proviral load and immune function in blood and lymph node during HIV-1 and HIV-2 infection. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:474-478.

404. Soares R, R Foxall, A Albuquerque, C Cortesao, M Garcia, RM Victorino, AE Sousa: Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 2006; 80:12425-12429.
405. MacNeil A, AD Sarr, JL Sankale, ST Meloni, S Mboup, P Kanki: Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* 2007; 81:5325-5330.
406. MacNeil A, JL Sankale, ST Meloni, AD Sarr, S Mboup, P Kanki: Genomic sites of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) integration: similarities to HIV-1 in vitro and possible differences in vivo. *J Virol* 2006; 80:7316-7321.
407. Tong-Starksen SE, TM Welsh, BM Peterlin: Differences in transcriptional enhancers of HIV-1 and HIV-2. Response to T cell activation signals. *J Immunol* 1990; 145:4348-4354.
408. Markovitz DM, M Hannibal, VL Perez, C Gauntt, TM Folks, GJ Nabel: Differential regulation of human immunodeficiency viruses (HIVs): a specific regulatory element in HIV-2 responds to stimulation of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:9098-9102.
409. Arya SK: Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) gene expression: downmodulation by sequence elements downstream of the transcriptional initiation site. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7:1007-1014.
410. Hannibal MC, DM Markovitz, N Clark, GJ Nabel: Differential activation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 transcription by specific T-cell activation signals. *J Virol* 1993; 67:5035-5040.
411. Hilfinger JM, N Clark, M Smith, K Robinson, DM Markovitz: Differential regulation of the human immunodeficiency virus type 2 enhancer in monocytes at various stages of differentiation. *J Virol* 1993; 67:4448-4453.
412. MacNeil A, JL Sankale, ST Meloni, AD Sarr, S Mboup, P Kanki: Long-term inpatient viral evolution during HIV-2 infection. *J Infect Dis* 2007; 195:726-733.
413. Bjorling E, G Scarlatti, A von Gegerfelt, J Albert, G Biberfeld, F Chiodi, E Norrby, EM Fenyo: Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology* 1993; 193:528-530.
414. Rodriguez SK, AD Sarr, A MacNeil, S Thakore-Meloni, A Gueye-Ndiaye, I Traore, MC Dia, S Mboup, PJ Kanki: Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *J Virol* 2007; 81:5331-5338.
415. Shi Y, E Brandin, E Vincic, M Jansson, A Blaxhult, K Gyllensten, L Moberg, C Brostrom, EM Fenyo, J Albert: Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *J Gen Virol* 2005; 86:3385-3396.
416. Richman DD, T Wrin, SJ Little, CJ Petropoulos: Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:4144-4149.
417. Leligdowicz A, LM Yindom, C Onyango, R Sarge-Njie, A Alabi, M Cotten, T Vincent, C da Costa, P Aaby, A Jaye, T Dong, A McMichael, H Whittle, S Rowland-Jones: Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *J Clin Invest* 2007; 117:3067-3074.

418. Duvall MG, A Jaye, T Dong, JM Brenchley, AS Alabi, DJ Jeffries, M van der Sande, TO Togun, SJ McConkey, DC Douek, AJ McMichael, HC Whittle, RA Koup, SL Rowland-Jones: Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. *J Immunol* 2006; 176:6973-6981.
419. Duvall MG, ML Precopio, DA Ambrozak, A Jaye, AJ McMichael, HC Whittle, M Roederer, SL Rowland-Jones, RA Koup: Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol* 2008; 38:350-363.
420. Foxall RB, CS Cortesao, AS Albuquerque, RS Soares, RM Victorino, AE Sousa: Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immune activation in infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but not HIV-1. *J Virol* 2008; 82:9795-9799.
421. Jaye A, R Sarge-Njie, M Schim van der Loeff, J Todd, A Alabi, S Sabally, T Corrah, H Whittle: No differences in cellular immune responses between asymptomatic HIV type 1- and type 2-infected Gambian patients. *J Infect Dis* 2004; 189:498-505.
422. Zheng NN, NB Kiviat, PS Sow, SE Hawes, A Wilson, H Diallo-Agne, CW Critchlow, GS Gottlieb, L Musey, MJ McElrath: Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses in HIV-1- and HIV-2-infected individuals in Senegal. *J Virol* 2004; 78:13934-13942.
423. Nuvor SV, M van der Sande, S Rowland-Jones, H Whittle, A Jaye: Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall. *J Virol* 2006; 80:2529-2538.
424. Jaleco AC, MJ Covas, LA Pinto, RM Victorino: Distinct alterations in the distribution of CD45RO+ T-cell subsets in HIV-2 compared with HIV-1 infection. *AIDS* 1994; 8:1663-1668.
425. Jaleco AC, MJ Covas, RM Victorino: Analysis of lymphocyte cell death and apoptosis in HIV-2-infected patients. *Clin Exp Immunol* 1994; 98:185-189.
426. Cavaleiro R, AE Sousa, A Loureiro, RM Victorino: Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 2000; 14:2679-2686.
427. Sousa AE, AF Chaves, A Loureiro, RM Victorino: Comparison of the frequency of interleukin (IL)-2-, interferon-gamma-, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes. *J Infect Dis* 2001; 184:552-559.
428. Albuquerque AS, CS Cortesao, RB Foxall, RS Soares, RM Victorino, AE Sousa: Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7Ralpha expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol* 2007; 178:3252-3259.
429. Gautier D, S Beq, CS Cortesao, AE Sousa, R Cheynier: Efficient thymopoiesis contributes to the maintenance of peripheral CD4 T cells during chronic human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 2007; 81:12685-12688.
430. Foxall RB, RS Soares, AS Albuquerque, CS Cortesao, RM Victorino, AE Sousa: Increased frequency of CD25(dim)CD4(+) T-cells in HIV-2 infection, a naturally occurring attenuated form of HIV-1. *Clin Immunol* 2008.
431. Schluns KS, WC Kieper, SC Jameson, L Lefrancois: Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1:426-432.

432. Kondrack RM, J Harbertson, JT Tan, ME McBreen, CD Surh, LM Bradley: Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 2003; 198:1797-1806.
433. Fry TJ, CL Mackall: The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; 174:6571-6576.
434. Surh CD, J Sprent: Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2008; 29:848-862.
435. Kaneko H, LP Neoh, N Takeda, H Akimoto, T Hishikawa, H Hashimoto, S Hirose, S Karaki, M Takiguchi, H Nakauchi, Y Kaneko, N Yamamoto, I Sekigawa: Human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein binds to CD8 as well as to CD4 molecules on human T cells. *J Virol* 1997; 71:8918-8922.
436. Akimoto H, H Kaneko, I Sekigawa, H Hashimoto, Y Kaneko, N Yamamoto: Binding of HIV-2 envelope glycoprotein to CD8 molecules and related chemokine production. *Immunology* 1998; 95:214-218.
437. Neoh LP, H Akimoto, H Kaneko, T Hishikawa, H Hashimoto, S Hirose, Y Kaneko, N Yamamoto, I Sekigawa: The production of beta-chemokines induced by HIV-2 envelope glycoprotein. *AIDS* 1997; 11:1062-1063.
438. Duvall MG, K Lore, H Blaak, DA Ambrozak, WC Adams, K Santos, C Geldmacher, JR Mascola, AJ McMichael, A Jaye, HC Whittle, SL Rowland-Jones, RA Koup: Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *J Virol* 2007; 81:13486-13498.

CAPÍTULO 2:

Objectivos e plano de trabalho

A imunodeficiência associada ao HIV-2 é considerada um modelo de doença “atenuada”, uma vez que se caracteriza por um menor ritmo de perda de linfócitos T CD4⁺ e uma mais lenta progressão clínica do que a infecção pelo HIV-1. Neste trabalho pretendeu-se investigar possíveis mecanismos que possam contribuir para o melhor prognóstico da infecção pelo HIV-2, com vista à compreensão da imunopatogénese da infecção pelo HIV em geral e à melhor definição de estratégias para o desenvolvimento de terapêuticas de base imunológica.

Os monócitos/macrófagos e as células dendríticas (DC) actuam como “sentinelas” da imunidade inata e, através da sua função como APC, promovem a imunidade adquirida.

Quer os monócitos/macrófagos quer as DC desempenham um papel fundamental na infecção pelo HIV. Não só possuem os receptores necessários à entrada do vírus, constituindo reservatórios virais, como também contribuem para a transmissão da infecção para as células T. Têm sido consistentemente documentadas alterações significativas dos monócitos/macrófagos e DC em doentes infectados pelo HIV-1 que podem comprometer o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada, quer contra o HIV, quer contra outras infecções.

A investigação sobre o impacto do HIV-2 nos monócitos/macrófagos e nas DC tem sido muito limitada. Foi documentada uma menor susceptibilidade de DC à infecção *in vitro* por HIV-2 do que por HIV-1. No entanto, não existem dados na literatura sobre a caracterização dos monócitos/macrófagos e DC na infecção pelo HIV-2.

Assim, neste trabalho investigou-se a possível contribuição dos monócitos e das DC para o melhor prognóstico da imunodeficiência associada ao HIV-2 comparativamente à infecção pelo HIV-1. Foram por nós previamente documentadas propriedades imunossupressoras de proteínas do invólucro do HIV-2 nas respostas dos linfócitos T. Na sequência deste trabalho, foram realizados estudos *in vitro* com o objectivo de

investigar um possível envolvimento de monócitos/DC nas propriedades imunossupressoras de proteínas do invólucro do HIV-2. Além disso, foi efectuada a caracterização dos efeitos moduladores do invólucro de HIV-2 na diferenciação de DC a partir de monócitos e sua maturação. Por outro lado, beneficiando da possibilidade de se estudar em Portugal indivíduos infectados pelo HIV-2, foram caracterizadas quantitativamente e qualitativamente as principais subpopulações de DC no sangue periférico, DC mielóides (mDC) e plasmacitóides (pDC), de indivíduos infectados pelo HIV-1 e de indivíduos infectados pelo HIV-2, não previamente expostos a terapêutica anti-retroviral, em diferentes fases de evolução da doença.

1. Envolvimento dos monócitos na supressão das células T mediada pelas proteínas do invólucro de HIV-2.

Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a glicoproteína gp105 do invólucro do HIV-2 apresenta propriedades imunossupressoras *in vitro* mais acentuadas do que as da glicoproteína gp120 do invólucro de HIV-1 ou de SIV. Estas propriedades manifestam-se pela capacidade de inibir a activação e a proliferação de células T estimuladas através do TCR em culturas de PBMC.

Este fenómeno inibitório de uma proteína de um vírus menos patogénico, embora pareça paradoxal, pode contribuir para diminuir os processos de activação linfocitária e, dessa forma, minimizar a activação imunitária persistente característica da infecção pelo HIV, com concomitante limitação da replicação viral. Constatou-se também que a presença de anti-CD28 anula parcialmente o efeito inibitório da gp105, o que sugere um possível envolvimento das APC, através de, por exemplo, uma diminuição da expressão dos ligandos de CD28. Por outro lado, a gp105 de HIV-2 induz a produção de TNF- α pelos monócitos *in vitro*. Assim, foi estudado o papel dos monócitos, precursores de DC e macrófagos, na supressão linfocitária induzida por proteínas do invólucro de HIV-2. Para tal, os efeitos de proteínas do invólucro de HIV-2 foram avaliados em populações de células T purificadas e em PBMC depletados de monócitos de indivíduos seronegativos. Para além disso, para discriminar se os efeitos inibitórios da gp105 são dependentes de

contacto celular ou de factores solúveis, foram utilizados sistemas de *transwell* e bloqueadores de possíveis mediadores implicados.

2. Estudo dos efeitos das proteínas do invólucro do HIV-2 na diferenciação e maturação de células dendríticas geradas a partir de monócitos.

As DC, através da sua função como APC, desempenham um papel crucial no sistema imunitário, podendo ser alvo dos efeitos das proteínas do invólucro de HIV-2, independentemente da infecção. Esta possibilidade foi avaliada fazendo uso de DC obtidas a partir de monócitos de indivíduos seronegativos em meio suplementado com GM-CSF e IL-4, um modelo amplamente utilizado em vários estudos da biologia das DC. Os efeitos do invólucro do HIV-2 foram explorados utilizando proteínas recombinantes de diferentes isolados virais e o próprio vírus inactivado com 2,2'-ditiodipiridina (aldritiol-2, AT-2), um agente químico que modifica covalentemente as estruturas em “dedos de zinco” da nucleocápside viral, mantendo a conformação do invólucro. A utilização de vírus não infecciosos pode mimetizar o tipo mais frequente de interações HIV-CD4 *in vivo*, uma vez que somente 0,1% dos viriões em circulação são infecciosos.

Assim, foi estudado o impacto da presença do invólucro do HIV-2 durante a diferenciação de monócitos em DC e durante a maturação de DC, nomeadamente pela avaliação do seu fenótipo (expressão de moléculas de diferenciação) e da sua função (capacidade de estimulação da proliferação de células T em reacções leucocitárias mistas e de produção de citocinas).

3. Caracterização quantitativa e funcional de células dendríticas mielóides em indivíduos infectados pelo HIV-2

As mDC são consideradas as APC por excelência, sendo fundamentais na activação de células T *naive* e no desenvolvimento de uma resposta imune adquirida contra os agentes patogénicos. Pretendeu-se caracterizar quantitativamente e qualitativamente as mDC em circulação na infecção pelo HIV-2. Para tal, estudaram-se transversalmente populações de doentes infectados pelo HIV-1 e de doentes infectados pelo HIV-2, não previamente expostos a terapêutica anti-retroviral, em diferentes fases de evolução da doença, de acordo com o número de linfócitos T CD4⁺ em circulação, comparados com um grupo controlo constituído por indivíduos não infectados. As mDC foram quantificadas e caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo.

4. Caracterização quantitativa e funcional de células dendríticas plasmacitóides em indivíduos infectados pelo HIV-2

As pDC constituem células cuja importância no sistema imunitário tem vindo a ser realçada. Para além das suas propriedades como APC, estas células destacam-se por uma elevada capacidade de produção de IFN tipo I, citocinas com importante actividade antiviral, pelo que se torna fundamental o seu estudo na infecção pelo HIV. Pretendeu-se nesta secção comparar quantitativamente e qualitativamente as pDC dos grupos de indivíduos infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2 acima mencionados. As pDC foram quantificadas e caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo. A avaliação da sua função teve como base a capacidade de produzir citocinas, entre as quais IFN- α , em resposta a um estímulo mediado pelo TLR9.

De acordo com o previsto no Decreto-Lei 388/70, art. 8º, parágrafo 2, os resultados apresentados encontram-se publicados ou em processo de publicação nos seguintes artigos:

Rita Cavaleiro, Gregory J. Brunn, Adriana S. Albuquerque, Rui M. M. Victorino, Jeffrey L. Platt, Ana E. Sousa. Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins. *European Journal of Immunology*, 2007, 37: 3435-3444.

Rita Cavaleiro, António P. Baptista, Russell F. Foxall, Rui M. M. Victorino, Ana E. Sousa. Dendritic Cell Differentiation and Maturation in the Presence of HIV-2 Envelope. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2009, 25: 425-431.

Rita Cavaleiro, António P. Baptista, Rita Tendeiro, Russell Foxall, Rui S. Soares, Perpétua Gomes, Rui M. M. Victorino, Ana E. Sousa. Myeloid Dendritic Cells in HIV-2 infection, 2009, *em preparação para submissão*.

Rita Cavaleiro, António P. Baptista, Rui S. Soares, Rita Tendeiro, Russell Foxall, Perpétua Gomes, Rui M. M. Victorino, Ana E. Sousa. Major Depletion of Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-2 Infection, an Attenuated Form of HIV Disease, 2009, *submetido*.

CAPÍTULO 3:

Supressão de células T mediada pelas proteínas do invólucro de HIV-2 dependente de monócitos

Publicação:

Rita Cavaleiro¹, Gregory J. Brunn², Adriana S. Albuquerque¹, Rui M. M. Victorino¹, Jeffrey L. Platt³, Ana E. Sousa¹. **Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins.** *European Journal of Immunology*, 2007, 37: 3435-3444.

¹Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

²Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Mayo Clinic, Rochester, MN, EUA

³Departments of Immunology, Surgery and Pediatrics, Mayo Clinic, Rochester, MN, EUA

Abstract

HIV-2 is associated with an attenuated form of HIV disease. We investigate here the immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein, gp105. We found that gp105 suppresses activation of T cells through a monocyte-mediated mechanism. Suppression of T cell activation by gp105 depends on contact between monocytes and T cells, but not on CD4⁺CD25⁺ T cells. The TLR4 pathway is likely involved, since gp105 activates TLR4 signaling and induces TNF- α production by monocytes. Immunosuppression is viewed as the main pathophysiologic consequence of infection by HIV. However, the main immunologic defect caused by HIV, depletion of T cells, requires T cell activation. Our findings are consistent with a new concept that HIV-2 envelope proteins act on monocytes to suppress T cell activation and that this property may contribute to the benign course of HIV-2. We hypothesize that the HIV-2 envelope immunosuppressive properties limit bursts of T cell activation, thus reducing viremia and contributing to the slow rate of disease progression that characterizes HIV-2 disease.

Introduction

Besides promoting viral attachment and entry, HIV envelope (Env) proteins modify immune responses [1]. In parallel with its recognized immunogenicity, the HIV-1 Env modulates the function of T cells, B cells, NK cells and APC [1-7]. Several effects, such as suppression of proliferation, induction of anergy and apoptosis, and cytokine imbalances have been reported. Its relative importance varies according to the nature of Env used and the cell culture system studied. Although some of the effects of Env are thought to be mediated by CD4 binding, involvement of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 as well as C-type lectin receptors has been proposed [4-9].

The external domain of HIV-1 Env, gp120, is associated non-covalently with the transmembrane protein gp41, facilitating release of gp120 into the extracellular milieu, which can result in significant serum levels in infected patients [10]. Therefore, gp120, whether as part of the intact virus or in a soluble form, can be taken up by neighbouring uninfected cells, potentially modifying their function [1-9].

HIV-2 infection is considered a natural model of attenuated disease with limited impact on the survival of infected adults [11]. Although HIV-2 infection exhibits the same clinical spectrum as HIV-1 infection, viremia is at a much lower level, and peripheral blood CD4 T cell counts decline at a slower rate in HIV-2-infected patients [12, 13]. What attenuates HIV-2 relative to HIV-1 is unknown [14-20].

We explored whether and how HIV-2 Env might modify immune responses and in this way potentially account for the relatively benign course of infection. We compared HIV-1 gp120 with the external component of the HIV-2 Env, gp105. A more “open” structure of gp105 is thought to explain the broader range of co-receptor usage by HIV-2 than HIV-1 isolates [21] and the higher levels of neutralizing antibodies documented in HIV-2-infected patients [22]. Moreover, gp105_{ROD} was shown to bind to the CD8 molecule with high affinity, whereas HIV-1_{IIIB} gp120 was unable to [23]. We show here that HIV-2 Env markedly suppresses TCR-mediated responses through a mechanism dependent upon the contact between monocytes and T cells.

Results

Inhibitory properties of HIV-2 Env

To address the effects of HIV-2 Env on immune responsiveness, we measured proliferative responses of human T cells in the absence or presence of the whole external Env component from HIV-2_{ROD} (gp105), a laboratory-adapted strain that uses CXCR4 as its co-receptor, the 165 aa peptide covering the C2-V3-C3 region of the Env of the ALI strain, an HIV-2 primary isolate that uses CCR5 as a co-receptor [24], as well as the Env protein (gp120) from HIV-1_{IIIIB}, HIV-1_{MN} and SIV_{mac251}. Freshly isolated PBMC from healthy donors were stimulated with immobilized anti-CD3 or the recall antigens *Candida albicans* or Tetanus toxoid in the presence or absence of the HIV-2, HIV-1 or SIV Env proteins, and proliferative responses were tested. Both gp105 and the 165 aa peptide suppressed PBMC proliferation by more than 50%, without a statistically significant difference between them (Fig. 1). In contrast, HIV-1 or SIV Env only modestly suppressed the proliferation, and this suppression was significantly less than the one induced by HIV-2 Env ($p < 0,0001$; unpaired *t*-test) as shown in Fig. 1B. The gp105-associated impaired proliferation was only found in response to TCR-mediated stimuli and was not observed with PMA plus Ionomycin or PHA stimulation, as previously reported [25]. This impairment in proliferation was not due to increased apoptosis as measured by annexin/propidium iodide [25]. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were suppressed as assessed by flow cytometry using BrdU incorporation [25]. C2-V3-C3_{ALI} was also found to inhibit only the TCR-mediated stimuli and was not associated with an increase in cell death (data not shown). Although the significant inhibition of T cell proliferation by anti-CD4 mAb precludes its use to block CD4 interaction [25], T cell suppression is likely to be independent of Env interaction with the CD4 receptor, since the C2-V3-C3_{ALI} does not cover the CD4-binding region.

HIV-2 Env does not act directly on T cells

To determine whether HIV-2 Env acts directly on T cells, we purified T cells from PBMC and tested whether proliferation was suppressed by HIV-2 Env. As Fig. 2 shows,

neither gp105_{ROD} nor C2-V3-C3_{ALI} suppressed proliferation of purified T cells stimulated with anti-CD3. Moreover, there were also no suppressive effects when CD28 co-stimulation was added to the anti-CD3 stimulus. Thus, the suppression of T cell proliferation does not result from a direct effect of HIV-2 Env on T cells.

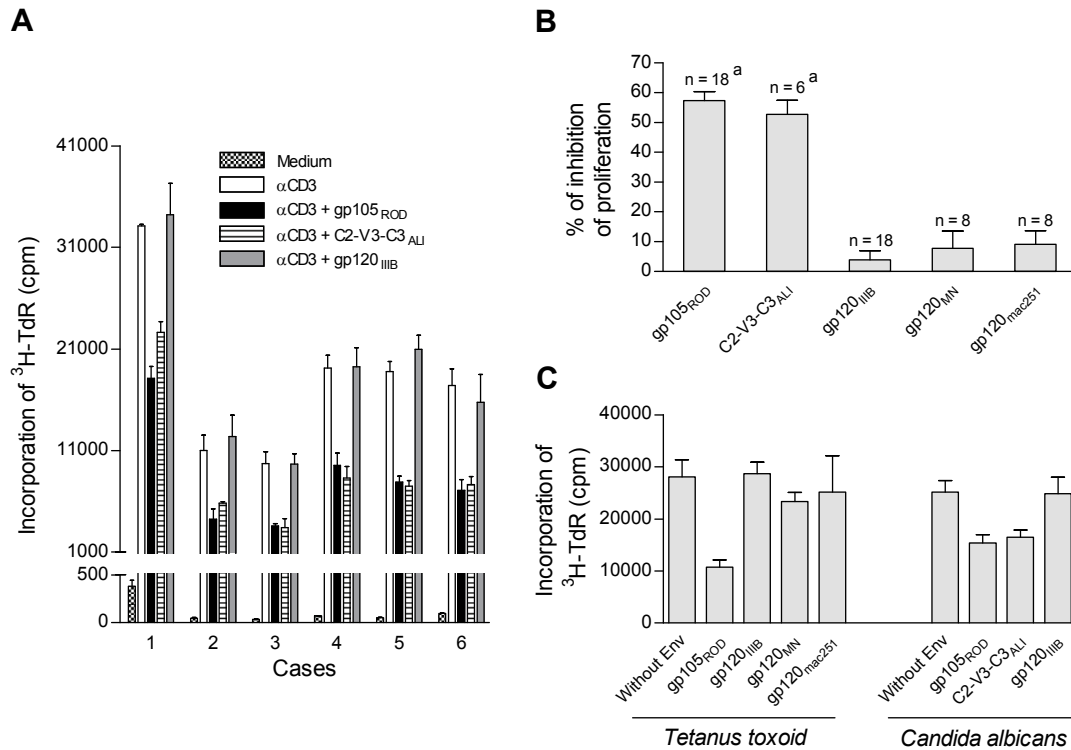


Figure 1. Effects of the HIV-1 and HIV-2 Env proteins on TCR-mediated lymphocyte proliferation. PBMC were cultured with different stimuli in the absence or presence of one of the following HIV Env proteins: HIV-2_{ROD} gp105, the large peptide covering C2-V3-C3 region of the HIV-2_{ALI}, HIV-1_{IIIIB} gp120, HIV-1_{MN} gp120 or SIV_{mac251} gp120. Lymphocyte proliferation was measured by ³H-TdR incorporation. (A) Results of 3-day proliferation in response to immobilized anti-CD3 mAb in six different healthy subjects. Bars represent the individual mean cpm ± SEM of triplicates. (B) Percentages of inhibition induced by each protein on anti-CD3-mediated proliferation, calculated as the fold reduction in cpm levels of cells cultured in the presence of Env protein *versus* cells cultured in its absence. Bars represent the mean ± SEM of all the subjects studied under the different conditions (^a*p*<0.0001 as compared to the percentage of inhibition of proliferation in the presence of gp120_{IIIIB}, gp120_{MN} or gp120_{mac251}, unpaired *t*-test). (C) Lymphocyte proliferation after 6-day culture in response to *Candida albicans* or Tetanus toxoid in the presence of different Env proteins in one individual. Bars represent the mean cpm ± SEM of quadruplicates.

HIV-2 Env immunosuppression does not require CD25⁺ T cells, IL-10 or TGF-β1,2,3

We next asked whether T cell proliferation might be suppressed by regulatory T cells. CD4⁺CD25⁺ T cells, a subset that expresses the highest level of the lineage

regulatory marker FoxP3, have been proposed to play a significant role in models of experimental chronic infections by contributing to the suppression of T cell responses [26]. Depletion of CD25⁺ cells using magnetic anti-CD25 mAb-coated microbeads did not abrogate the suppressive effects of the gp105_{ROD} (Fig. 3A), nor did the blocking of IL-10 and TGF- β , cytokines that are known to suppress T cell responses (Fig. 3B), with antibodies at a concentration (10 μ g/ml) known to exhibit neutralizing activity [27]. No statistically significant differences were found between the inhibition of proliferative responses observed in bulk PBMC *versus* CD25-depleted PBMC or between the inhibition observed in the presence *versus* in the absence of the neutralizing antibodies. These findings should not be taken to mean that regulatory T cells play no part in the response to HIV-2 but rather that whatever part they may play is probably not conditioned by gp105_{ROD}.

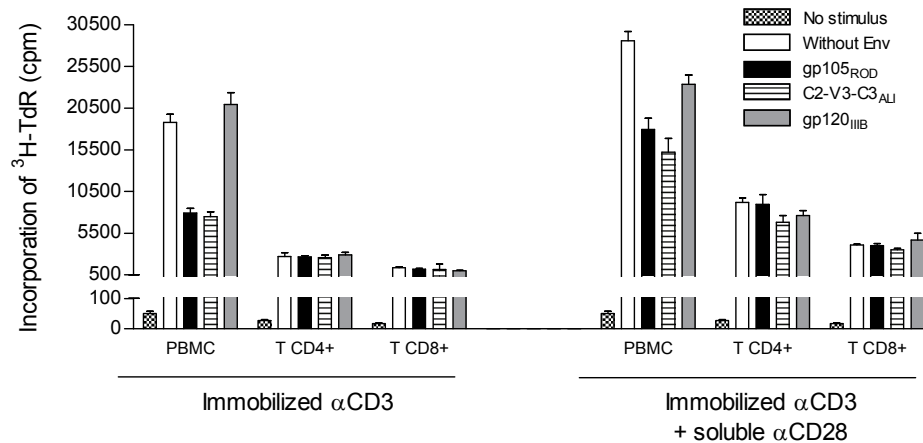


Figure 2. HIV-2 Env proteins do not act on purified T cells. PBMC and purified CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets were stimulated with immobilized anti-CD3 with or without anti-CD28 mAb in the absence or presence of HIV-2_{ROD} gp105, HIV-2_{ALI} C2-V3-C3 or HIV-1_{IIB} gp120. Proliferation was measured by ³H-TdR incorporation. Bars represent individual mean cpm \pm SEM of triplicates in a representative case out of four.

Immunosuppression by HIV-2 Env depends on monocytes

We next tested whether gp105 suppresses T cell responses by acting on monocytes. The suppression of T cell proliferation was completely abrogated by the depletion of

CD14⁺ cells (Fig. 4A) and was fully recovered when these cells were added back to purified T cells (Fig. 4B). Thus, the suppression of T cell proliferation mediated by HIV-2 Env requires the presence of monocytes.

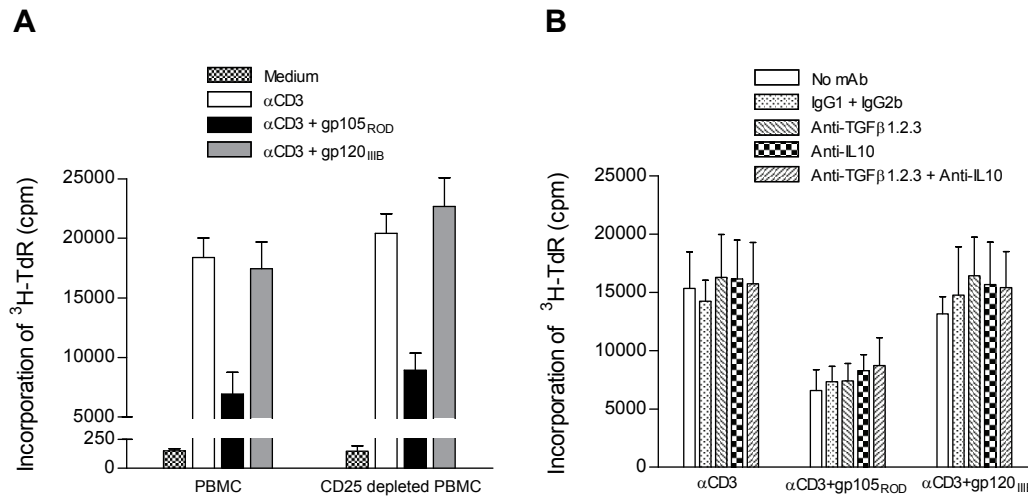


Figure 3. The anti-proliferative effect of HIV-2 Env proteins is independent of CD25⁺ cells or the immunosuppressive cytokines TGF- β or IL-10. (A) Bulk PBMC and PBMC depleted of CD25⁺ cells were stimulated in triplicate with immobilized anti-CD3 in the absence or presence of HIV-2_{ROD} gp105 and HIV-1_{III B} gp120, and proliferation was measured by ³H-TdR incorporation. Bars represent mean cpm \pm SEM of three different healthy subjects. (B) PBMC were cultured in triplicate with immobilized anti-CD3 mAb for 3 days in the absence or presence of HIV-2_{ROD} gp105 or HIV-1_{III B} gp120, with or without neutralizing mAb against IL-10 and/or against TGF- β 1,2,3 or the respective isotype controls IgG2b and IgG1. Bars represent mean cpm \pm SEM of three different healthy subjects.

Absence of an impact of HIV-2 Env on factors released from monocytes

Next, we asked whether the suppression of T cell proliferation by HIV-2 gp105 was associated with substances secreted by monocytes. To test whether prostaglandins produced by monocytes inhibit lymphocyte proliferation, we added indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthase, to the cultures and then asked whether T cell proliferation was modified. As can be seen in Fig. 4C, gp105 suppressed T cell proliferation in the presence of indomethacin, suggesting that PGE₂ or other prostaglandins were not involved. Nor was NO involved in the suppression of T cell proliferation by HIV-2 Env, as addition of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), an inhibitor of inducible NO synthase, to the cultures did not reverse immune suppression

(Fig. 4D). Moreover, suppression did not depend on IDO, the rate-limiting enzyme in the catabolism of tryptophan, as an IDO inhibitor (1-methyl-D-tryptophan, 1-MT) did not reverse gp105-mediated suppression (Fig. 4D). No statistically significant differences were found between the inhibition of proliferative responses observed in the presence *versus* in the absence of indomethacin, L-NMMA or 1-MT.

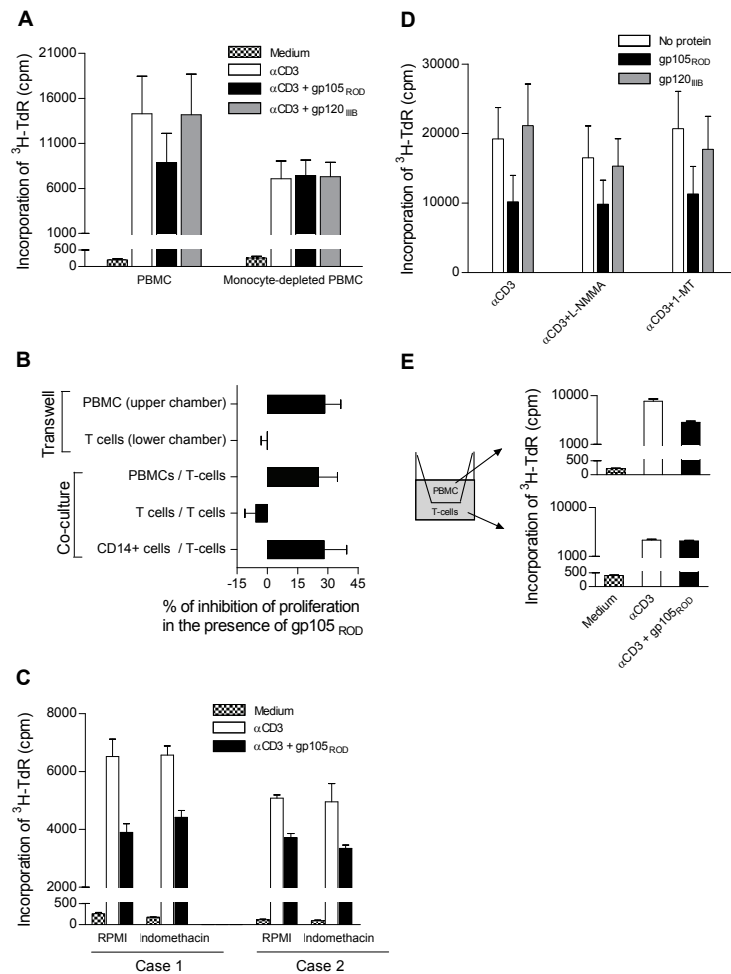


Figure 4. The anti-proliferative effect of HIV-2 Env proteins depends on the contact between monocytes and T cells. Cells were stimulated in triplicate with immobilized anti-CD3 for 3 days in the absence or presence of HIV-2_{ROD} gp105 or HIV-1_{IIB} gp120, and proliferation was measured by ³H-TdR incorporation under the following conditions: (A) Bulk PBMC and PBMC depleted of CD14⁺ cells; (B) purified T cells cultured alone and co-cultured with PBMC or CD14⁺ cells, as well as PBMC and purified T cells cultured in the upper and lower chamber, respectively, of a transwell system, as described in E; (C) PBMC in the presence of indomethacin; (D) PBMC in the presence of 1-MT or L-NMMA; (E) Cells cultured in a transwell system with PBMC in the upper chamber and purified T cells in the lower chamber, with both chambers coated with anti-CD3 mAb. Bars represent: (A and D) mean cpm ± SEM of three different healthy subjects; (B) mean percentage inhibition of proliferation ± SEM of three different donors, calculated as the fold reduction in cpm levels of cells cultured in the presence of gp105 *versus* in its absence; (C) individual mean cpm ± SEM of triplicate of two different donors; (E) individual mean cpm ± SEM of a representative case out of three.

T cell-monocyte interaction is required for suppression of T cell responses

We next asked whether contact between monocytes and T cells is required for the suppressive properties of gp105. Toward that end, we assessed the suppressive properties of gp105_{ROD} in a 0.4 μ m-transwell system that physically separated purified T cells from monocytes or bulk PBMC. As shown in Fig. 4E, gp105_{ROD} inhibited proliferation of PBMC in the upper chamber but not T cell proliferation in the lower chamber of the transwell system, suggesting that suppression depended on contact between T cells and APC. Furthermore, gp105_{ROD}-mediated suppression of T cell responses was recovered when PBMC or isolated monocytes were added back to purified T cells (Fig. 4B). These results suggest that inhibition of T cell activation by HIV-2 Env requires contact between monocytes and T cells and further support the exclusion of the soluble mediators tested.

HIV-2 env activates TLR4 signaling

HIV-2 Env from strains that use either CCR5 (ALI) or CXCR4 (ROD) induced marked TNF- α production by monocytes, while HIV-1 Env (IIIB) did not (Fig. 5A), raising the possibility that gp105 activates TLR4 signaling in those cells. The same findings were observed after stimulation of purified monocytes instead of PBMC (data not shown). To determine whether gp105 activates TLR4, HEK 293 cells stably transfected with TLR4, MD2 and CD14 were transiently transfected with an NF- κ B-luciferase reporter vector to reveal NF- κ B activation after TLR4 signaling [28]. As illustrated in Fig. 5B, gp105 stimulated TLR4 signaling in a dose-dependent manner, while gp120 had no effect on TLR4 activation. HIV-2 gp105 acted specifically on TLR4, because HEK 293 cells that lack TLR4 did not respond at any concentration of gp105 (Fig. 5C). Moreover, the addition of *Rhodobacter sphaeroides* diphosphoryl lipid A (RsDPLA), an LPS-like TLR4 antagonist, abrogated gp105-stimulated NF- κ B-luciferase activity (Fig. 5C). A 6-h exposure of HEK 293 cells that express TLR4 to HIV-2 gp105 did not suppress subsequent stimulation with LPS or heparan sulfate, another TLR4 agonist [29] (data not shown). These findings indicate that gp105 is not contaminated by LPS and that signaling through TLR4 is by a mechanism distinguishable from signaling by LPS. Thus, HIV-2 Env is able to activate

TLR4 signaling, suggesting a possible involvement of TLR4 on the immunosuppressive effects HIV-2 Env.

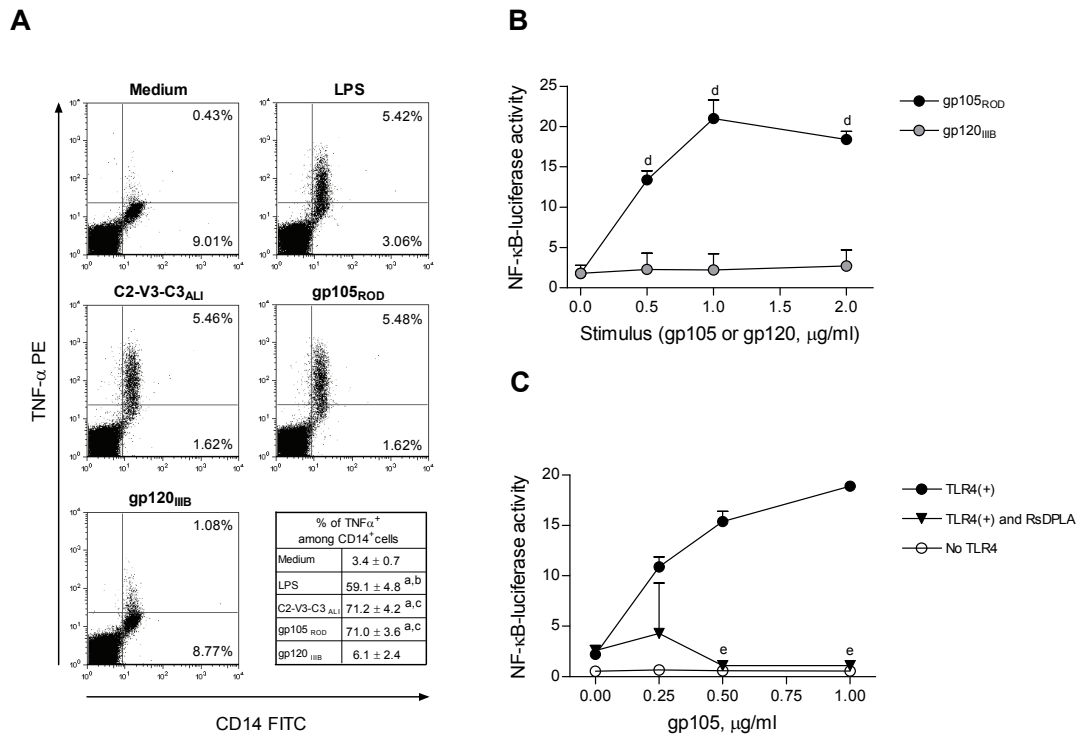


Figure 5. HIV-2 Env proteins activate TLR4 signaling. (A) PBMC were cultured for 6 h in the absence or presence of HIV-2_{ROD} gp105, HIV-2_{ALI} C2-V3-C3, HIV-1_{IIIIB} gp120 or LPS (positive control), with brefeldin A (last 5 h). After a surface staining for CD14, cells were intracellularly stained for TNF- α . Dot plots show a representative example (out of three) of the analysis done in a large gate including monocytes and lymphocytes. Values in the lower right table represent the proportion of monocytes induced to produce TNF- α in the presence of the Env proteins or LPS (mean \pm SEM of three different donors). There are no statistically significant differences between the TNF- α production induced by the two HIV-2 Env (^a $p < 0.006$ as compared to TNF- α production in medium alone, ^b $p < 0.005$ as compared to TNF- α production in the presence of gp120_{IIIIB}, ^c $p < 0.001$ as compared to TNF- α production in the presence of gp120_{IIIIB}; paired t test). (B, C) HEK 293 cell lines stably expressing the TLR4 signaling complex (filled/shaded symbols) or control cells lacking TLR4 expression (open symbols) were transfected with an NF- κ B-firefly luciferase reporter vector and the control pTK-*Renilla* luciferase vector. The cells were then incubated with various concentrations of HIV-2 gp105 or HIV-1 gp120 Env proteins (B) or with gp105 in the presence of 0.1 μ g/ml *Rhodobacter sphaeroides* diposphoryl lipid A (RsDPLA) (C) for 6h. Activation of TLR4 is reported as a ratio of the NF- κ B-stimulated firefly luciferase activity to the constitutively expressed *Renilla* luciferase internal control. gp105 activated TLR4 signaling in a dose-dependent manner (^d $p < 0.002$ as compared to the absence of protein), and TLR4 stimulation by gp105 was blocked by RsDPLA (^e $p < 0.002$ as compared to the absence of RsDPLA). Shown in the graphs are the mean \pm SEM of triplicate wells, which are representative of three independent experiments.

Discussion

Here we report that HIV-2 Env, acting on monocytes, suppresses TCR-mediated responses and that HIV-2 Env may do so by stimulating TLR4. One might expect that immunosuppression generated by Env proteins would make HIV-2 immunodeficiency worse, as it would add to the impact of CD4⁺ T cell depletion. Contrary to this concept, however, the Env of HIV-2 is more suppressive than Env of HIV-1, and subjects with HIV-2 infection do not suffer striking immunodeficiency, at least compared to those infected with HIV-1 [11-20]. Since it has limited impact on the survival of the majority of infected adults, HIV-2 infection is considered a natural model of attenuated HIV disease [11, 20]. Why the CD4 depletion and viremia of HIV-2 infection are less severe than in HIV-1 infection remains unknown [12-20]. We postulate that the HIV-2 Env may limit the bursts of T cell activation and therefore contribute significantly to the slower rate of disease progression that characterizes HIV-2 disease.

Chronic immune activation represents a main driving force for the progressive decline in CD4 counts and other manifestations of AIDS [16, 17, 30-34]. The plasma HIV RNA load predicts no more than 10% of the subsequent CD4 cell loss in untreated HIV-1-infected patients, suggesting that other factors, such as the persistent immune activation, determine this outcome [35]. Although specific responses against HIV may contribute, much and perhaps most T cell activation is thought to be driven by bystander processes. Among the bystander processes may be bacterial translocation at the altered gut mucosa and the subsequent increased levels of circulating bacterial products such as LPS [36]. In this context, it is plausible that monocytes/APC are important modulators of the state of activation. Interactions between HIV-1 components and those cells have been extensively reported [37].

Suppressor monocytes/macrophages have been found in several conditions associated with chronic inflammation, including leishmaniasis, tuberculosis and hepatitis C [38-41]. Our findings suggest that HIV-2, like other pathogens, may direct monocytes or DC to hamper T cell stimulation [38-42]. Suppression of T cell responses by these pathogens is thought to enable evasion of clearance and promote persistence of the microorganism. It is possible that suppression of T cell responses by HIV-2 Env also

promotes persistence of the virus; however, the dominant impact of suppression of cell-mediated immunity may be a reduction in the immunopathology associated with the immune response, thereby contributing to the more benign outcome of HIV-2 infection.

Several mechanisms have been proposed for monocyte-mediated suppressive effects [6, 38-41, 43, 44]. Prostaglandins, NO and induction of IDO have been classically implicated, but our studies using inhibitors of these pathways suggest that they contribute little to suppression of T cell proliferation in the presence of HIV-2 Env. Moreover, IL-10 and TGF- β , two cytokines frequently implicated in T cell suppressive responses, did not contribute appreciably to suppression of T cell responses. Recently, monocytes have been shown to express programmed death-L1 (PD-L1) and, through the PD-L1/PD-1 pathway, suppress TCR-mediated responses [45]. Our preliminary results clearly show that some recombinant HIV-2 and HIV-1 Env proteins up-regulate PD-L1 expression in monocytes *in vitro* as assessed by flow cytometry. However, this pathway is not implicated, since neutralization using anti-PD-L1 mAb did not reverse suppression of lymphocyte proliferation (data not shown). Another possibility that we tested was that the suppressive properties of HIV-2 Env are mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, which are known to be able to exert inhibitory effects on the activation and function of DC [46] and monocytes/macrophages [43], but depletion of CD25⁺ cells did not impact the suppressive effects of HIV-2 Env.

We found that the contact between monocytes and T cells is essential for the suppression of TCR-mediated proliferation by HIV-2 Env. A contact-dependent mechanism was also shown to be involved on the suppression of T cell mitogenesis by immunosuppressive macrophages in other persistent infections such as mycobacterial infection [40]. Continuous interplay between several receptors on the surface of monocytes and DC mediates a delicate balance of positive and negative signals that ultimately determines the fate of the T cell responses. Although TLR, which recognise pathogen-associated molecular patterns, trigger the functional maturation of APC leading to the initiation of antigen-specific adaptive immune responses, they have also been shown to induce immune suppression [47]. A switch from a pro-inflammatory to a suppressive cytokine profile in the response of DC to TLR agonists was clearly

documented during the establishment of the chronic murine infection by *Plasmodium yoelii* [48]. Recently, the HCV Core protein was found to hamper antiviral immunity through TLR2-mediated monocyte activation [41]. The mouse mammary tumor virus was also shown to interact with TLR4 on DC and macrophages, leading to suppression of cytotoxic immune responses [47].

Considering the previous reports of the interaction of mouse mammary tumor virus and murine leukemia retrovirus Env proteins with TLR4 [47, 49], we also investigated the possibility of HIV-2 Env signaling through TLR4. The HIV-2 Env induces TNF- α production by monocytes at levels similar to those found with TLR4 agonists. Indeed, we found that HIV-2 Env induces dose-dependent activation of NF- κ B in HEK 293 cells that express stable levels of TLR4. The HIV-1 Env recombinant protein produced using the same expression system did not induce NF- κ B. Corroborating the controls used for the exclusion of LPS contamination, we found that the same HIV-2 Env recombinant proteins were unable to induce maturation of monocyte-derived DC (data not shown). Others have shown that TLR4 can form a complex with CXCR4 inside lipid rafts [50] and that CXCR4 and its ligand SDF-1 may interfere with TLR4 signaling [51]. Thus, gp105 may activate TLR4, at least in part, by disrupting the interaction between CXCR4 and TLR4. Of note, anti-CXCR4 mAb has also been shown to activate TLR4 signaling [51], precluding its use to investigate this possibility. If gp105 activates TLR4 indirectly in this manner, it may explain how TLR4 on cells stimulated by gp105 remain responsive to LPS, since the receptor would be available for activation by ligand.

The differences between the biological properties of HIV-1 Env and HIV-2 Env may reflect differences in protein structure, as HIV-2 and HIV-1 Env proteins share only 40% homology [52]. It is plausible that the more “open” structural conformation of HIV-2 Env may allow the protein to act on the surface of monocytes and, through this interaction, modulate the observed suppression. Although the number of available HIV-2 Env proteins to study is small and assumptions regarding the *in vivo* relevance of their suppressive effects should be made cautiously, it is noteworthy that these effects were also observed using an Env protein from a primary viral isolate. Our studies were performed using a recombinant polypeptide to optimize the homogeneity of responses.

Clearly, the response of any given individual to a naturally expressed polypeptide might depart, in one direction or another, from what we report here. Nevertheless, if our contention about the impact of gp105 on the biology of HIV-2 is upheld, then the overall direction and dimension of responses to recombinant gp105 will faithfully represent what happens *in vivo*.

HIV-2 arose by cross-species transmission of SIV_{sm} found naturally in sooty mangabey monkeys [53]. Acute SIV_{sm} infection appears to induce suppressive cytokines in the natural hosts that limit the pro-inflammatory characteristics of SIV-associated immunodeficiency [54] and prevent subsequent CD4 depletion and progression to AIDS [33]. HIV-2 disease is characterized by a much slower rate of progressive immune activation and CD4 T cell decline than HIV-1 infection [12, 13, 17, 19]. Because HIV-2 strains are no less cytopathic than HIV-1 strains, host factors probably limit HIV-2 disease progression [55].

The DC/T cell microenvironment has been shown to be an ideal site for HIV-1 propagation through the transfer of the virus from DC to activated antigen-specific T cells [56]. Thus, the action of HIV-2 Env on monocytes/DC during antigen presentation may prevent the spread of the virus among T cells. Even a modest reduction in transmission might have a drastic effect on the virus produced in local infection bursts and contribute to reduce viremia [57]. Moreover, it might delay the progressive disruption of secondary lymphoid environments by immune activation, thus reducing the rate of CD4 decline [16].

These data point to a new line of research into the benign course of HIV-2 centered on monocytes and raise the possibility of using HIV-2 Env as an immunomodulatory tool.

Materials and Methods

Cell Isolation

PBMC were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) from healthy donor venous blood or from leukocyte-

enriched buffy coats (Portuguese Institute of Blood, Lisbon), and resuspended at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 100 U/ml penicillin/100 μ g/ml streptomycin (Gibco-Invitrogen) and 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen). T cells were isolated from PBMC by negative selection using a cocktail of biotin-conjugated mAb against CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 and Glycophorin A, followed by anti-biotin microbeads. The T cell purity was >99%, as assessed by flow cytometry as previously described [25]. T cells were further fractionated using CD4 microbeads into CD4⁺ T cells (>97% pure) and a CD4^{neg} fraction, corresponding to >94% CD8⁺ T cells. PBMC were depleted of monocytes using CD14⁺ microbeads and of CD25⁺ cells using CD25 microbeads (purity >95%). All the separations were performed in a VarioMACS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) using Miltenyi Biotec microbeads. Purified monocytes were shown to have levels of CCR5 and CXCR4 expression similar to those in bulk PBMC. This study was approved by the Ethical Board of the Faculty of Medicine of Lisbon.

Proliferation assays

Cells (1×10^5) were cultured in round-bottom 96-well plates (Costar, Corning Incorporation, NY) with immobilized anti-CD3 (1 μ g/ml, clone HIT3a; BD Biosciences, San Jose, CA) or the recall antigens *Candida albicans* (40 μ g/ml; Greer, Lenoir, NC) or tetanus toxoid (dilution 1:800; Connaught, Swiftwater, PA) in the presence or absence of the following Env proteins (1 μ g/ml): gp105 from HIV-2_{ROD} and gp120 from HIV-1_{IIB}, HIV-1_{MN} or SIV_{mac251} produced using a baculovirus expression system (EU program EVA, MRC, UK); or a 165-aa peptide covering the C2-V3-C3 Env region of the primary isolate HIV-2_{ALI}, provided by Nuno Taveira, produced in an *E. coli* expression system and negative for endotoxin by the *Limulus* ameobocyte assay (Pyrotell, East Falmouth, MA; detection limit 0.125 EU/ml). In some experiments, anti-TGF- β 1.2.3 or anti-IL-10 as well as their respective IgG1 or IgG2b isotype controls, alone or in combination (10 μ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), soluble anti-CD28 mAb (1 μ g/ml; BD Biosciences),

indomethacin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich), 1-MT (200 μM ; Sigma-Aldrich) or L-NMMA (1 mM; Sigma-Aldrich) were added to immobilized anti-CD3. All cultures were performed in triplicate for 3 days (anti-CD3 stimulation) or in quadruplicate for 6 days (antigen stimulation) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Lymphocyte proliferation was measured by [^3H]thymidine (^3H -TdR; Amersham Pharmacia Biotech) incorporation after a pulse of 1 μCi during the last 18 h of culture, counted in a gaseous scintillation β -counter (Packard, Meriden, CT). Results are expressed as mean cpm \pm SEM. Percentages of inhibition were calculated as the fold reduction in cpm levels of cells cultured in the presence of Env protein *versus* cells treated in its absence.

Transwell experiments

Flat-bottom 24-well plates with a 0.4 μm -transwell (BD Falcon, BD Biosciences) were used. Both the upper and lower chambers were coated with anti-CD3 mAb as described above. T cells (0.9×10^6) were added to the lower compartment, and PBMC or $\text{CD}14^+$ cells (0.9×10^6) were cultured in the upper chamber in the presence of medium alone, HIV-2 gp105_{ROD} or HIV-1 gp120_{IIIb}. To control for diffusion of the Env protein in the transwell system, experiments were performed in which PBMC were cultured in both chambers with the HIV-2 Env protein added to the upper chamber, and the proliferation levels were found to be similar in both chambers (data not shown). In parallel, 0.9×10^6 T cells were stimulated in a co-culture assay with the same quantity of PBMC, $\text{CD}14^+$ or T cells in the absence or presence of the Env protein.

Single-cell analysis of intracellular TNF- α

PBMC were cultured for 6 h at 5×10^5 cells/tube in the absence or presence of the HIV Env protein or LPS from *E coli* 0111:B4 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Brefeldin A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich) was present during the last 5 h of culture to block cytokine secretion. Intracellular cytokine staining was performed as previously described [25] using PE conjugated anti-TNF- α mAb (BD Biosciences) after surface staining with FITC-conjugated

anti-CD14 mAb (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). Briefly, cells were fixed with 2 % formaldehyde (Sigma-Aldrich) and permeabilized with PBS containing 1% BSA, 0.1% sodium azide and 0.5% saponin (all from Sigma-Aldrich). Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences), and analysis was conducted within a large manual setting gate including monocytes and lymphocytes defined on forward/side scatter, with thresholds set according to the isotype-matched negative controls. Results are expressed as the percentage of TNF- α ⁺ cells within CD14⁺-gated cells.

TLR4-stimulated NF- κ B activation

Activation of TLR4 was measured in HEK 293 cells stably expressing TLR4, MD2 and CD14 as previously described [28]. Briefly, HEK 293 cells expressing the TLR4 signaling complex or control cells were transfected with 0.1 μ g pTK-*Renilla* luciferase (Promega) and 0.1 μ g NF- κ B-firefly luciferase [58] using Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA). Following transfection, the cells were cultured for 24 h at 37 °C in medium with low (0.5%) FBS. After various treatments, the culture medium was aspirated, and expression of *Renilla* and firefly luciferase was assayed simultaneously using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA). Activation of NF- κ B is reported as a ratio of the firefly luciferase activity to the constitutively expressed *Renilla* luciferase internal control and is the mean of triplicate wells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Data were compared using paired *t*-test or Wilcoxon test and unpaired *t*-test. *p* values <0.05 were considered significant.

Acknowledgements: We thank Nuno Taveira, José Marcelino and Helena Barroso from the Faculty of Pharmacy, Lisbon for producing the peptide C2-V3-C3 HIV-2_{ALI} and for helpful scientific discussion of this work; the NIBSC Centralized Facility for AIDS Reagents supported by EU Programme EVA (contract QLK2-CT-1999-00609) and the UK Medical Research Council for providing recombinant HIV-1 gp120_{IIB} and HIV-2 gp105_{ROD}; and the Portuguese Institute of Blood for providing the buffy coats. This work was supported by grants from “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT) and “Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA” (PSIDA/ESP/49655/2003 to A. E. S.). R. C. received a scholarship from FCT.

References

- 1 **Chirmule, N. and Pahwa, S.,** Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol. Rev.* 1996. **60**: 386-406.
- 2 **Williams, M. A., Trout, R. and Spector, S. A.,** HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J. Hematother. Stem Cell. Res.* 2002. **11**: 829-847.
- 3 **Fantuzzi, L., Purificato, C., Donato, K., Belardelli, F. and Gessani, S.,** Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J. Virol.* 2004. **78**: 9763-9772.
- 4 **He, B., Qiao, X., Klasse, P. J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D. M., Moore, J. P. and Cerutti, A.,** HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J. Immunol.* 2006. **176**: 3931-3941.
- 5 **Kottlilil, S., Shin, K., Jackson, J. O., Reitano, K. N., O'Shea, M. A., Yang, J., Hallahan, C. W., Lempicki, R., Arthos, J. and Fauci, A. S.,** Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *J. Immunol.* 2006. **176**: 1107-1114.
- 6 **Boasso, A., Herbeuval, J. P., Hardy, A. W., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Fuchs, D. and Shearer, G. M.,** HIV inhibits CD4⁺ T cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2007. **109**: 3351-3359.
- 7 **Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D. J., Macleod, K., Arthos, J. and Fauci, A. S.,** HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2007. **104**: 3396-3401.
- 8 **Lee, C., Liu, Q. H., Tomkowicz, B., Yi, Y., Freedman, B. D. and Collman, R. G.,** Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 2003. **74**: 676-682.
- 9 **Cicala, C., Arthos, J., Martinelli, E., Censoplano, N., Cruz, C. C., Chung, E., Selig, S. M., Van Ryk, D., Yang, J., Jagannatha, S., Chun, T. W., Ren, P., Lempicki, R. A. and Fauci, A. S.,** R5 and X4 HIV envelopes

- induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006. **103**: 3746-3751.
- 10 **Oh, S. K., Cruikshank, W. W., Raina, J., Blanchard, G. C., Adler, W. H., Walker, J. and Kornfeld, H.**, Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1992. **5**: 251-256.
 - 11 **Poulsen, A. G., Aaby, P., Larsen, O., Jensen, H., Naucner, A., Lisse, I. M., Christiansen, C. B., Dias, F. and Melbye, M.**, 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997. **349**: 911-914.
 - 12 **Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C., Gueye, E. H., Hellinger, J., Guèye-Ndiaye, A., Sankalé, J-L., Ndoye, I., Mboup, S. and Essex, M.**, Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994. **265**: 1587-1590.
 - 13 **Jaffar, S., Wilkins, A., Ngom, P. T., Sabally, S., Corrah, T., Bangali, J. E., Rolfe, M. and Whittle, H. C.**, Rate of decline of percentage CD4⁺ cells is faster in HIV-1 than in HIV- 2 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1997. **16**: 327-332.
 - 14 **Sousa, A. E., Chaves, A. F., Loureiro, A. and Victorino, R. M.**, Comparison of the Frequency of Interleukin-2, Interferon-g and Interleukin-4 Producing T Cells in Two Diseases with Distinct Clinical Outcomes: the Human Immunodeficiency Virus type 1 and 2 Infections. *J. Infect. Dis.* 2001. **184**: 552-559.
 - 15 **Reeves, J. D. and Doms, R. W.**, Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* 2002. **83**: 1253-1265.
 - 16 **Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. and Paul, W. E.**, CD4 T cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med.* 2002. **8**: 319-323.
 - 17 **Sousa, A. E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z. and Victorino, R. M.**, CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol.* 2002. **169**: 3400-3406.
 - 18 **Soares, R., Foxall, R., Albuquerque, A., Cortesao, C., Garcia, M., Victorino, R. M. and Sousa, A. E.**, Increased frequency of circulating CCR5⁺ CD4⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J. Virol.* 2006. **80**: 12425-12429.
 - 19 **Albuquerque, A. S., Cortesao, C. S., Foxall, R. B., Soares, R. S., Victorino, R. M. and Sousa, A. E.**, Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7Ralpha expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol.* 2007. **178**: 3252-3259.
 - 20 **Rowland-Jones, S. L. and Whittle, H. C.**, Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 329-331.
 - 21 **Azevedo-Pereira, J. M., Santos-Costa, Q. and Moniz-Pereira, J.**, HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr. HIV Res.* 2005. **3**: 3-16.
 - 22 **Bjorling, E., Scarlatti, G., von Gegerfelt, A., Albert, J., Biberfeld, G., Chiodi, F., Norrby, E. and Fenyo, E. M.**, Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology* 1993. **193**: 528-530.
 - 23 **Kaneko, H., Neoh, L. P., Takeda, N., Akimoto, H., Hishikawa, T., Hashimoto, H., Hirose, S., Karaki, S., Takiguchi, M., Nakauchi, H., Kaneko, Y., Yamamoto, N. and Sekigawa, I.**, Human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein binds to CD8 as well as to CD4 molecules on human T cells. *J. Virol.* 1997. **71**: 8918-8922.

- 24 Taveira, N. C., Bex, F., Burny, A., Robertson, D., Ferreira, M. O. and Moniz-Pereira, J., Molecular characterization of the env gene from a non-syncytium- inducing HIV-2 isolate (HIV-2ALI). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1994. **10**: 223-224.
- 25 Cavaleiro, R., Sousa, A. E., Loureiro, A. and Victorino, R. M., Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 2000. **14**: 2679-2686.
- 26 Rouse, B. T., Sarangi, P. P. and Suvas, S., Regulatory T cells in virus infections. *Immunol. Rev.* 2006. **212**: 272-286.
- 27 Birdsall, H. H., Porter, W. J., Trial, J. and Rossen, R. D., Monocytes stimulated by 110-kDa fibronectin fragments suppress proliferation of anti-CD3-activated T cells. *J. Immunol.* 2005. **175**:3347-3353.
- 28 Brunn, G. J., Bungum, M. K., Johnson, G. B. and Platt, J. L., Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *Faseb J* 2005. **19**: 872-874.
- 29 Johnson, G. B., Brunn, G. J. and Platt, J. L., Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2004. **172**: 20-24.
- 30 Giorgi, J. V., Liu, Z., Hultin, L. E., Cumberland, W. G., Hennessey, K. and Detels, R., Elevated levels of CD38⁺ CD8⁺ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4⁺ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1993. **6**: 904-912.
- 31 Ostrowski, M. A., Krakauer, D. C., Li, Y., Justement, S. J., Learn, G., Ehler, L. A., Stanley, S. K., Nowak, M. and Fauci, A. S., Effect of immune activation on the dynamics of human immunodeficiency virus replication and on the distribution of viral quasispecies. *J. Virol.* 1998. **72**: 7772-7784.
- 32 Hazenberg, M. D., Otto, S. A., van Benthem, B. H., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Lange, J. M., Hamann, D., Prins, M. and Miedema, F., Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 2003. **17**: 1881-1888.
- 33 Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O'Neil, S. P., McClure, H. M., Staprans, S. I. and Feinberg, M. B., Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 2003. **18**: 441-452.
- 34 Deeks, S. G., Kitchen, C. M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narvaez, A. B., Hunt, P., Martin, J. N., Kahn, J. O., Levy, J., McGrath, M. S. and Hecht, F. M., Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T cell changes independent of viral load. *Blood* 2004. **104**: 942-947.
- 35 Rodriguez, B., Sethi, A. K., Cheruvu, V. K., Mackay, W., Bosch, R. J., Kitahata, M., Boswell, S. L., Mathews, W. C., Bangsberg, D. R., Martin, J., Whalen, C. C., Sieg, S., Yadavalli, S., Deeks, S. G. and Lederman, M. M., Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* 2006. **296**: 1498-1506.
- 36 Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G. and Douek, D. C., Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 2006. **12**: 1365-1371.
- 37 Noursadeghi, M., Katz, D. R. and Miller, R. F., HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect. Dis.* 2006. **6**: 794-804.
- 38 Bertholet, S., Dickensheets, H. L., Sheikh, F., Gam, A. A., Donnelly, R. P. and Kenney, R. T., Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect. Immun.* 2003. **71**: 2095-2101.

- 39 Nagabhushanam, V., Solache, A., Ting, L. M., Escaron, C. J., Zhang, J. Y. and Ernst, J. D., Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J. Immunol.* 2003. **171**: 4750-4757.
- 40 Shimizu, T., Sano, C. and Tomioka, H., The role of B7 molecules in the cell contact-mediated suppression of T cell mitogenesis by immunosuppressive macrophages induced with mycobacterial infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2004. **135**: 373-379.
- 41 Dolganiuc, A., Chang, S., Kodys, K., Mandrekar, P., Bakis, G., Cormier, M. and Szabo, G., Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J. Immunol.* 2006. **177**: 6758-6768.
- 42 Smits, H. H., de Jong, E. C., Wierenga, E. A. and Kapsenberg, M. L., Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2005. **26**: 123-129.
- 43 Taams, L. S., van Amelsfort, J. M., Tiemessen, M. M., Jacobs, K. M., de Jong, E. C., Akbar, A. N., Bijlsma, J. W. and Lafeber, F. P., Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 2005. **66**: 222-230.
- 44 Hoves, S., Krause, S. W., Schutz, C., Halbritter, D., Scholmerich, J., Herfarth, H. and Fleck, M., Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006. **177**: 2691-2698.
- 45 Petrovas, C., Casazza, J. P., Brenchley, J. M., Price, D. A., Gostick, E., Adams, W. C., Precopio, M. L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D. C. and Koup, R. A., PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med.* 2006. **203**: 2281-2292.
- 46 Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V., Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. **172**: 4676-4680.
- 47 Jude, B. A., Pobezinskaya, Y., Bishop, J., Parke, S., Medzhitov, R. M., Chervonsky, A. V. and Golovkina, T. V., Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 573-578.
- 48 Perry, J. A., Olver, C. S., Burnett, R. C. and Avery, A. C., Cutting Edge: The Acquisition of TLR Tolerance during Malaria Infection Impacts T Cell Activation. *J. Immunol.* 2005. **174**: 5921-5925.
- 49 Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudravalli, R. and Ross, S. R., Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002. **99**: 2281-2286.
- 50 Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T. and Triantafilou, K., Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 2002. **115**: 2603-2611.
- 51 Kishore, S. P., Bungum, M. K., Platt, J. L. and Brunn, G. J., Selective suppression of Toll-like receptor 4 activation by chemokine receptor 4. *FEBS Lett.* 2005. **579**: 699-704.
- 52 Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. and Alizon, M., Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1987. **326**: 662-669.
- 53 Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. and Johnson, P. R., An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989. **339**: 389-392.
- 54 Silvestri, G., Fedanov, A., Germon, S., Kozyr, N., Kaiser, W. J., Garber, D. A., McClure, H., Feinberg, M. B. and Staprans, S. I., Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm

- infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts. *J. Virol.* 2005. **79**: 4043-4054.
- 55 **Schramm, B., Penn, M. L., Palacios, E. H., Grant, R. M., Kirchhoff, F. and Goldsmith, M. A.,** Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J. Virol.* 2000. **74**: 9594-9600.
- 56 **Lore, K., Smed-Sorensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J. R. and Koup, R. A.,** Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 2023-2033.
- 57 **Grossman, Z., Polis, M., Feinberg, M. B., Levi, I., Jankelevich, S., Yarchoan, R., Boon, J., de Wolf, F., Lange, J. M., Goudsmit, J., Dimitrov, D. S. and Paul, W. E.,** Ongoing HIV dissemination during HAART. *Nat. Med.* 1999. **5**: 1099-1104.
- 58 **Paya, C. V., Ten, R. M., Bessia, C., Alcami, J., Hay, R. T. and Virelizier, J. L.,** NF-kappa B-dependent induction of the NF-kappa B p50 subunit gene promoter underlies self-perpetuation of human immunodeficiency virus transcription in monocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1992. **89**: 7826-7830.

Diferenciação e maturação de células dendríticas na presença do invólucro de HIV-2

Publicação:

Rita Cavaleiro, António P. Baptista, Russell B. Foxall, Rui M. M. Victorino, Ana E. Sousa. **Dendritic Cell Differentiation and Maturation in the Presence of HIV-2 Envelope.** *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2009, 25: 425-431.

Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

Abstract

Dendritic cells (DCs) are fundamental for the initiation of immune responses and are important players in AIDS immunopathogenesis. Impairment of DC function may result from bystander effects of HIV-1 envelope proteins independently of direct HIV-1 infection. HIV-2 envelope proteins are thought to interact with a broader range of receptors than those of HIV-1, and have been shown to have T cell immunosuppressive properties mediated by monocytes. The effects of HIV-2 envelope on DC differentiation and maturation were investigated. The modulatory properties of the HIV-2 envelope on DC generated from monocytes were assessed using both recombinant proteins (HIV-2_{ROD} and HIV-2_{ALI}) and whole chemically inactivated virus (aldrithiol-2 treated HIV-2_{ROD}). DC phenotype was assessed by flow cytometry and DC function by their ability to stimulate allogeneic T cells and to produce cytokines. We demonstrate that HIV-2 Env had no effects upon DC differentiation and maturation despite its broad receptor usage and ability to modulate monocyte function. It is plausible to speculate that a reduced ability of the HIV-2 Env to impair myeloid DC function could represent a contributory factor to the relatively benign course of HIV-2 disease.

Introduction

Dendritic cell (DC) disturbances are thought to significantly contribute to AIDS pathogenesis (recently reviewed^{1,2}). In addition to direct HIV-1 infection of these professional antigen-presenting cells, viral envelope (Env) proteins *per se* are able to induce a significant impairment of DC function.²⁻⁷ The HIV-1 surface glycoprotein, gp120, is readily shed from the cell surface due to its noncovalent association with the transmembrane Env gp41, exerting modulatory effects on bystander cells through binding to CD4, chemokine receptors, or other molecules expressed by DCs, such as lectins.⁸⁻¹⁰ HIV-1 Env proteins were shown to functionally impair isolated primary DCs,^{2,3,11} as well as the *in vitro* development and maturation of monocyte-derived DCs.⁴⁻⁷ HIV-2 is associated with an attenuated form of HIV/AIDS disease as compared to HIV-1.¹²⁻¹⁹ HIV-2 was shown to have a broader range of coreceptor usage²⁰⁻²² and to elicit higher levels of neutralizing antibodies,²³ suggesting that its Env has structurally distinct properties. Moreover, the external component of HIV2_{ROD} Env, gp105, unlike gp120 of HIV-1, was shown to bind to the CD8 molecule with high affinity²⁴ and to induce higher levels of beta-chemokines.²⁵

We have also shown that HIV2_{ROD} gp105, as well as a peptide covering the C2-V3-C3 Env region of the primary isolate HIV2_{ALI}, induced marked suppression of *in vitro* lymphoproliferation to both recall antigens and anti-CD3 through a monocyte contact-dependent mechanism as well as high levels of tumor necrosis factor (TNF)- α production.^{26,27} Thus, it is reasonable to hypothesize that these HIV2 Env proteins have a significant impact on DC differentiation and maturation *in vitro*. To our knowledge there are no data on the modulatory effects of HIV-2 Env on DC differentiation and maturation. Contrary to our expectations, we report here an absence of such effects by both these recombinant proteins and the whole chemically inactivated HIV2_{ROD}, leading us to speculate on the possibility that a preservation of DC function could contribute to the relatively benign outcome of HIV-2 disease.

Materials and Methods and Results

To evaluate the impact of the presence of HIV-2 Env during DC differentiation, a standard *in vitro* system was used. Briefly, monocytes were magnetically isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors' buffy coats (Portuguese Institute of Blood) with CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Immature DCs (iDCs) were generated by culturing monocytes (3×10^6) for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) containing 10% fetal calf or human AB serum (Sigma-Aldrich), penicillin/streptomycin (100U/100mg/ml; Gibco-Invitrogen), glutamine (2mM; Gibco-Invitrogen) plus GM-CSF (50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), and IL-4 (20 ng/ml; R&D Systems), in the absence or presence of recombinant gp105 from HIV-2_{ROD} (1 µg/ml; produced in a baculovirus expression system; EU Programme EVA, MRC, UK) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

As shown in Fig. 1A and Table 1, iDCs derived from monocytes in the presence of gp105_{ROD} (iDCs/gp105) exhibited expression levels of HLA-DR, CD80, CD86 and CD83 similar to those generated in its absence. DC phenotype was assessed by flow cytometry as previously described,²⁶ using monoclonal antibodies from BD Biosciences (San Jose, CA) and samples acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with CellQuest (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). The iDCs generated in the presence of gp105_{ROD} were fully competent to undergo subsequent lipopolysaccharide (LPS)-induced maturation (100 ng/ml; Sigma-Aldrich, 48 hours), as evaluated phenotypically by flow cytometry (Fig. 1A and Table 1), morphologically by optical microscopy (data not shown), and by their allostimulatory activity in a mixed-leukocyte reaction (Fig. 1B). DCs were cocultured with purified allogeneic T cells (1×10^5 cells; Pan T cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec) at different DC: T cell ratio and proliferation was measured after a 5-day culture by [³H]thymidine incorporation (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) using a gaseous scintillation β-counter (Packard, Meriden, CT).

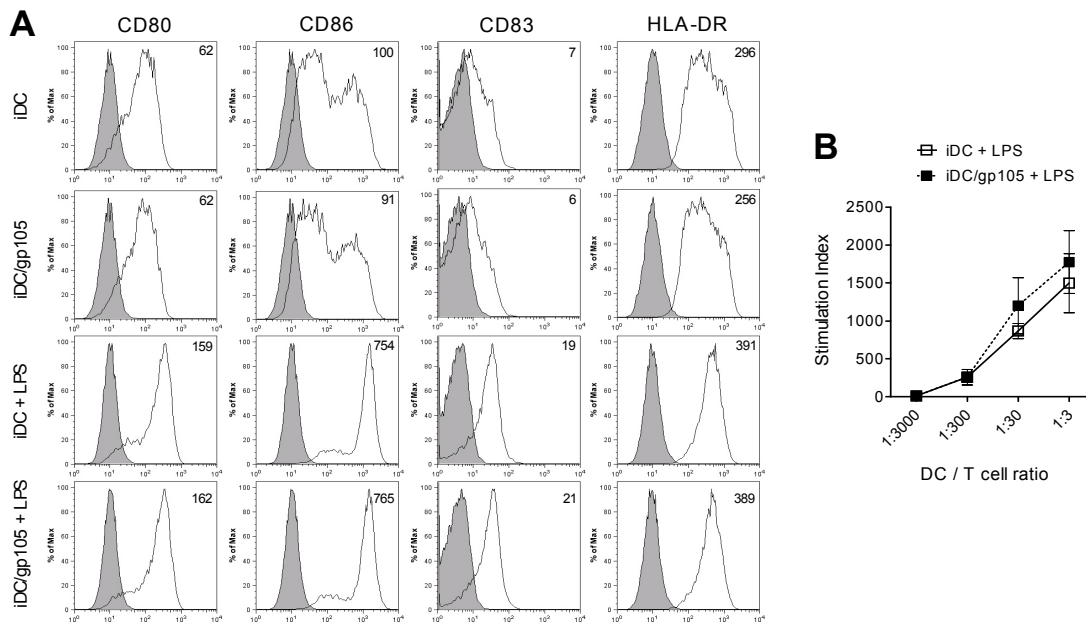


FIG. 1. Effects of HIV-2 Env recombinant protein (gp105_{ROD}) on DC differentiation. iDCs were generated from monocytes cultured in medium containing GM-CSF/IL-4 in the absence or presence of gp105_{ROD}. After 6 days, cells were cultured with or without LPS for 2 additional days. **(A)** Expression of costimulatory molecules assessed by flow cytometry. Filled histograms represent background staining of isotype-matched control antibody. Numbers in the histograms represent the geometric fluorescence intensity of the surface molecules expressed on DCs of one representative donor. **(B)** DC allostimulatory ability. DCs generated in the absence or presence of gp105_{ROD} and matured with LPS were cocultured with purified allogeneic T cells for 5 days. Lymphocyte proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation and stimulation indexes (SIs) were calculated by dividing the counts per minute (cpm) obtained in the DC:T cell cocultures by the cpm obtained in the cultures of T cells alone. Results are expressed as mean stimulation index \pm SEM of three donors.

TABLE 1. EFFECTS OF GP105_{ROD} ON DC DIFFERENTIATION AND MATURATION^a

| | DC differentiation ^b | | | | DC maturation ^c | | | |
|--------|--|---------------------------|--|---------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------|
| | iDCs generated in the absence of gp105 | | iDCs generated in the presence of gp105 ^d | | Medium | gp105 ^d | LPS | LPS/gp105 ^d |
| | Without LPS | With LPS | Without LPS | With LPS | | | | |
| CD80 | 31 \pm 10 | 60 \pm 24 ^e | 30 \pm 10 | 60 \pm 25 ^e | 47 \pm 12 | 45 \pm 12 | 123 \pm 38 | 136 \pm 50 |
| CD86 | 143 \pm 42 | 378 \pm 74 ^e | 141 \pm 40 | 348 \pm 71 ^e | 107 \pm 52 | 75 \pm 27 | 574 \pm 132 ^e | 526 \pm 197 |
| HLA-DR | 116 \pm 50 | 160 \pm 68 ^e | 108 \pm 46 | 159 \pm 68 | 203 \pm 54 | 184 \pm 54 | 302 \pm 86 ^e | 390 \pm 130 |

^aData are mean \pm SEM of the geometric fluorescence intensity of the costimulatory molecules assessed by flow cytometry. Statistical analysis was done using the Wilcoxon signed rank test. iDCs, immature dendritic cells.

^bn=7.

^cn=6 except for the marker CD80 where n=5 and for the maturation in the presence of LPS plus gp105 (LPS/gp105) where n=4.

^dThere are no statistical differences between DCs cultured in the presence of gp105 and in its absence in the same conditions.

^ep<0.05 when comparing the marker geometric FI of DCs cultured with LPS versus with medium in the same conditions.

In parallel, similar experiments were performed using whole inactivated HIV-2_{ROD} (HIV-2Tx). Inactivation is known to disrupt the nucleocapsid without changing the conformational and functional integrity of the surface Env glycoproteins²⁸. Given that only about 0,1% of circulating virions are infectious, it is believed that the exposure of host cells to inactivated HIV may more accurately mimic the most frequent type of *in vivo* cell-virion interaction². For the preparation of chemically inactivated whole virus, HIV-2_{ROD} grown on H9 cells was inactivated at 4 °C with 1 mM aldrithiol-2 (AT-2; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and purified and concentrated using a protocol kindly provided by J. Lifson and J. Bess²⁹. As illustrated in Fig. 2A, the treatment with AT-2 fully abrogated viral replication in activated PBMCs as documented by the absence of p26 in the supernatants as assessed by ELISA (INNOTEST HIV Antigen mAb; Immunogenetics, Ghent, Belgium; crossreactivity was confirmed using parallel standard curves of HIV-1 p24 and HIV-2_{ROD} p26). Microvesicles, prepared from supernatants of uninfected H9 cells using the same procedures used to prepare HIV-2Tx, were used as negative control in all the HIV-2Tx experiments and found to induce no effects (data not shown). Similar to gp105, the presence of HIV-2Tx (300 ng of p26 Ag equivalent/ml) during DC differentiation from monocytes did not alter DC phenotype (Fig. 2B), nor did it affect their ability to mature upon LPS stimulation as assessed by DC morphology (data not shown), expression of costimulatory molecules (Fig. 2B) or ability to stimulate allogeneic T cells (Fig. 2C). Programmed death-1 (PD-1) signaling mediates an inhibitory pathway of T cell responses and its overexpression is currently considered to contribute significantly to the impairment of specific T cell responses in HIV-1 infected individuals.³⁰⁻³² HIV-1 disease progression is also associated with an upregulation of PD-L1, a PD-1 ligand,³³ and, moreover, HIV-1-derived TLR-7/8 ligands were shown to induce PD-L1 expression on DCs and monocytes.³⁴ Therefore, we also assessed whether the expression of PD-1 ligands, PD-L1 and PD-L2 (antibodies from eBioscience, San Diego, CA), were up-regulated upon HIV-2Tx exposure. No significant alterations were induced by the presence of the whole inactivated virus (Fig. 2B).

In summary, our data showed that the HIV-2 Env tested does not affect monocyte differentiation into DCs.

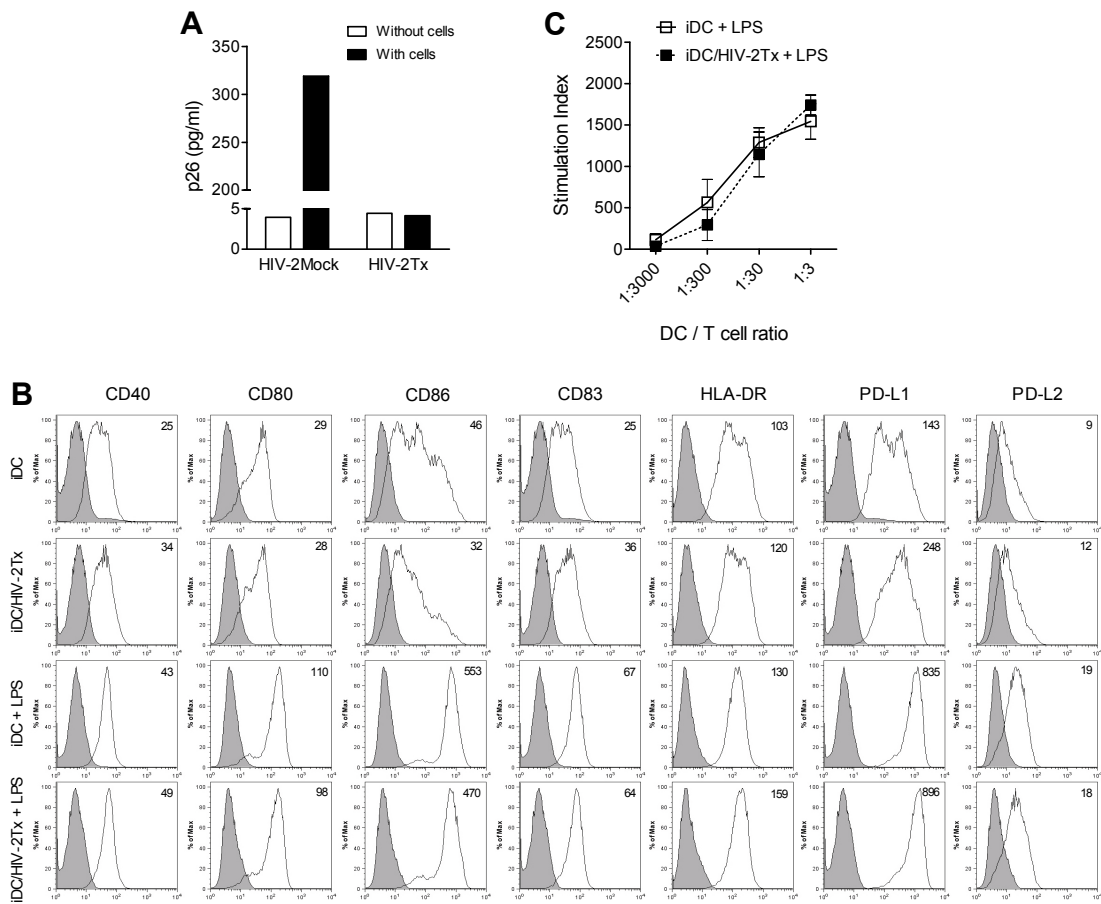


FIG. 2. Effects of chemically inactivated HIV-2 (HIV-2Tx) on DC differentiation. iDCs were generated from monocytes cultured in medium containing GM-CSF/IL-4 in the absence or presence of HIV-2Tx for 6 days, and subsequently cultured with or without LPS for 2 additional days. (A) Levels of p26 gag protein assessed by ELISA in supernatants collected after 7 day culture of phytohemagglutinin-stimulated PBMCs infected with HIV-2Tx or noninactivated HIV-2 (HIV-2Mock), illustrating the absence of viral replication after AT-2 treatment. (B) Expression of surface molecules assessed by flow cytometry in one representative donor (out of three). Filled histograms represent background staining of isotype-matched control antibody. Numbers in the histograms represent the geometric fluorescence intensity of the surface molecules expressed on DCs. (C) Allostimulatory ability of DCs generated in the absence or in the presence of HIV-2Tx and matured with LPS and cocultured with purified allogeneic T cells for 5 days. Lymphocyte proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation and results are expressed as mean stimulation index (SI) ± SEM of three donors, calculated by dividing the cpm obtained in the DC:T cell cocultures by the cpm obtained in the cultures of T cells alone.

Next we asked whether HIV-2_{ROD} Env *per se* was able to induce DC maturation and if the presence of HIV-2_{ROD} Env concomitantly with LPS might modulate this process. For this purpose, iDCs were cultured for 48h in the absence or presence of either gp105_{ROD} (Fig. 3A and Table 1) or HIV-2Tx (Fig. 3B) with or without LPS, and evaluated with respect to their morphology (data not shown), phenotype, and allostimulatory capacity. As illustrated in Fig. 3, iDCs exposed to gp105_{ROD} or HIV-2Tx did not exhibit differences in the expression of maturation markers as compared to unexposed iDCs. On the other hand, DC maturation induced by LPS was not affected by the presence of either gp105_{ROD} or HIV-2Tx during this process (Fig. 3). Thus, we conclude that the HIV-2 Env tested was unable to induce DC maturation *per se*, and, moreover, did not affect LPS-induced DC maturation.

We also assessed the effects of HIV2_{ALI}, a primary viral isolate from an AIDS patient that uses the CCR5 coreceptor,³⁵ in contrast to the laboratory-adapted strain HIV2_{ROD} that uses CXCR4. As illustrated in Fig. 3C, no changes in the DC phenotype were documented after culture of iDCs with a peptide covering the C2-V3-C3 Env region of HIV2_{ALI} (165 aa; produced in an *Escherichia coli* expression system, kindly provided by Nuno Taveira, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon). Of note, similar findings were obtained using higher concentrations of HIV2_{ROD} protein or whole inactivated virus (Fig. 3C).

We have previously reported that these same HIV-2_{ROD} and HIV-2_{ALI} Env proteins induce high levels of TNF- α production by monocytes.²⁶ Therefore, we investigated whether DC exposure to either gp105_{ROD} or HIV-2Tx could modify their ability to secrete TNF- α or IL-10, an immunosuppressive cytokine shown to be induced by HIV-1 Env.⁸ Cytokines were measured by ELISA according to manufacturer's instructions (eBioscience) in supernatants post-48 h culture. As shown in Fig. 3D, secretion of both cytokines in the absence or the presence of LPS was not significantly altered by the presence of either gp105_{ROD} or HIV-2Tx, as compared to unexposed DCs.

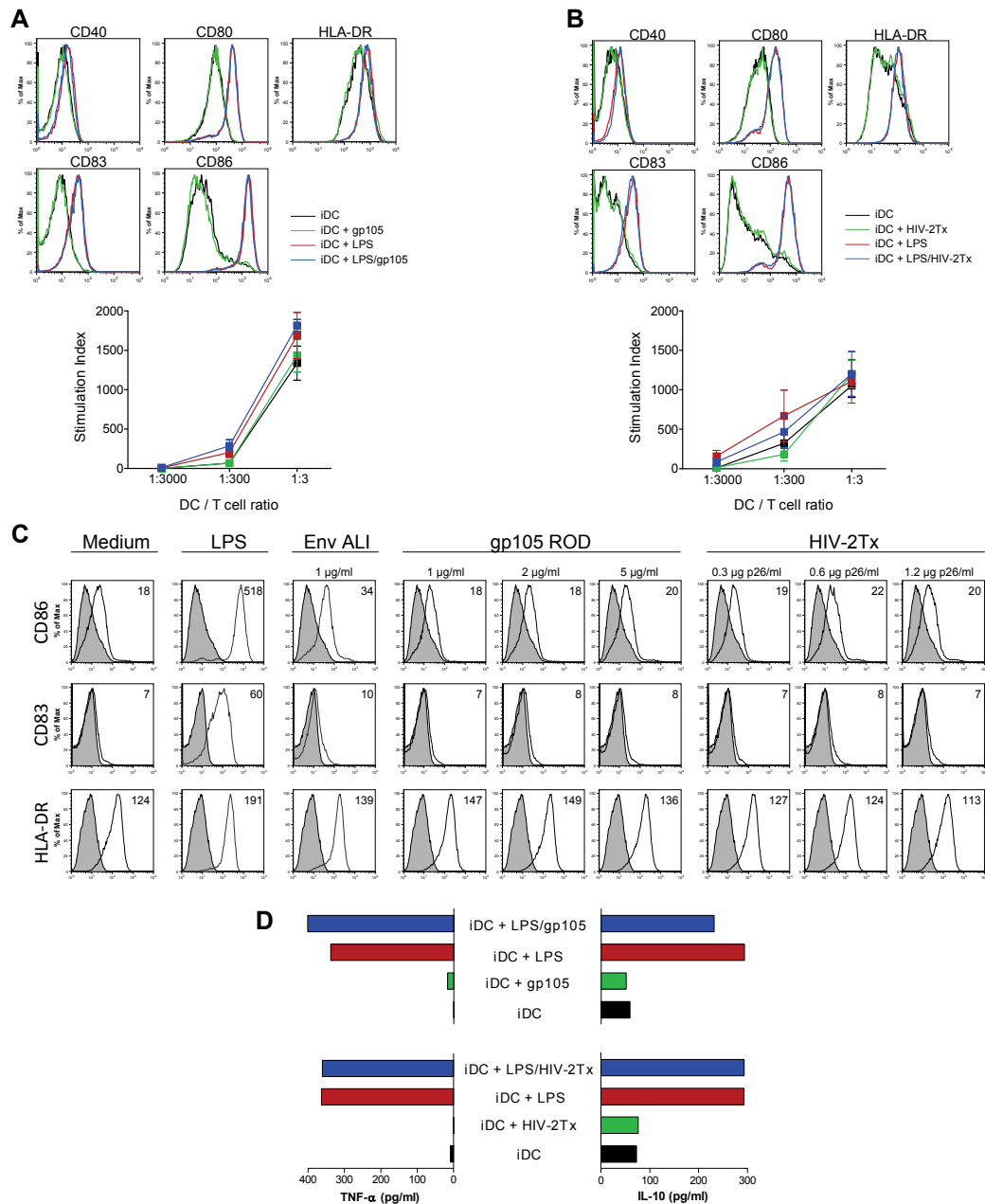


FIG. 3. Impact of HIV-2 Env recombinant proteins or inactivated virus on DC maturation. iDCs were generated from monocytes cultured in medium containing GM-CSF/IL-4 in the absence of HIV-2 Env. After 6 days, iDCs were treated with gp105_{ROD}, HIV-2_{ALI} Env peptide covering the C2-V3-C3 region, HIV-2Tx, or with LPS for an additional 2 days. In parallel, cells were induced to mature with LPS in the presence of gp105_{ROD} or HIV-2Tx. DC phenotype was assessed by flow cytometry and the numbers shown in the histograms represent the geometric fluorescence intensity of the surface molecules expressed on DCs of one representative donor. The DC allostimulatory ability was evaluated after coculture of DCs exposed to gp105_{ROD} (**A**) or to HIV-2Tx (**B**) with purified allogeneic T cells for 5 days. Lymphocyte proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation and results are expressed as mean stimulation index (SI) ± SEM of three donors, calculated by dividing the cpm obtained in the DC:T cell cocultures by the cpm obtained in the cultures of T cells alone. (**C**) Effects of HIV-2_{ALI} Env protein (1 µg/ml) and increasing concentrations of gp105_{ROD} (1, 2 and 5 µg/ml) or HIV-2Tx (0.3, 0.6 and 1.2 µg p26/ml) on DC maturation. Filled histograms represent background staining of isotype-matched control antibody. (**D**) TNF-α and IL-10 levels quantified by ELISA in the culture supernatants of one representative case of the three different individuals tested for the effects of gp105_{ROD} (top) and HIV-2Tx (bottom).

Discussion

To our knowledge, there are no previous studies on the effects of HIV-2 Env on DC differentiation and maturation. We report here no significant alterations induced by the presence of HIV-2 Env on DC differentiation from monocytes or in their maturation upon LPS stimulation, as assessed by morphology, expression of costimulatory molecules, cytokine production, and allostimulatory ability, using both recombinant proteins from HIV-2_{ROD} and HIV-2_{ALI} or the whole chemically inactivated HIV-2_{ROD}.

Of note, the same batches of recombinant proteins were previously shown to significantly alter monocyte and T cell function.^{26,27} Our discrepant results on the effect of HIV-2 Env on monocytes and monocyte-derived DCs are interesting in light of the ongoing debate on the origin and the developmental signatures of antigen-presenting cells. It has been proposed that DCs do not represent a separate cell type, but rather a heterogeneous subset of the mononuclear phagocyte system with a continuum of functional activities ultimately able to present antigens to *naive* T cells.^{36,37} Our data support the idea that monocytes would lose susceptibility to HIV-2 Env effects upon initiation of the DC differentiation program.

Despite some discrepant strain-related results, it is widely accepted that HIV-1 Env triggers signaling events that result in abnormal monocyte-derived DC differentiation and maturation *in vitro* and induces significant disturbances of primary DC function.² Circulating DCs from HIV-1-infected patients exhibit quantitative and qualitative abnormalities³⁸⁻⁴¹ and Env has been implicated in these impairments.^{2,3,11} In agreement with a distinct impact of HIV-2 and HIV-1 on DCs, it was recently shown that primary DCs are less susceptible to HIV-2 than HIV-1 infection *in vitro* using both HIV-2 CCR5 primary isolates and a CXCR4 laboratory-adapted virus.⁴² Although more HIV-2 strains should be studied to complement our data, HIV-2 Env proteins do not appear to significantly affect monocyte-derived DCs, raising the possibility of a diminished impairment of myeloid DCs in HIV-2 infection.

HIV-2 is associated with slow rate of AIDS progression and low viremia.^{15-19,22,42-44} DCs play a central role in the generation of immune responses against HIV and opportunistic infections. Moreover, DCs may be important in the modulation of HIV-

associated immunopathology.^{1,2} Our data are consistent with the hypothesis that a preservation of DC function could contribute to the relatively benign nature of HIV-2 immunodeficiency. The identification of possible factors that prevent HIV-2 from impairing DC function may significantly increase our understanding of AIDS pathogenesis and provide new therapeutic targets.

Acknowledgements

We would like to thank J. Lifson and J. Bess (NIH, Bethesda) for technical advice in the preparation of the inactivated HIV-2; Nuno Taveira, José Marcelino, and Helena Barroso for producing the HIV-2_{ALI} peptide as well as João Gonçalves for sharing reagents (all from Faculty of Pharmacy, University of Lisbon); the Portuguese Institute of Blood for providing the buffy coats; and the NIBSC Centralized facility for AIDS Reagents supported by EU Programme EVA (contract QLK2-CT-1999-00609) and the UK Medical Research Council for providing recombinant HIV-2 gp105_{ROD}. This work was supported by grants from “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT) and by “Programa Operacional Ciência e Inovação 2010” (POCI2010) to AES. RC and RBF received scholarships from FCT cofinanced by POCI 2010 and FSE, and AB from GlaxoSmithKline.

References

1. Piguet V and Steinman RM: The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol* 2007;28:503-510.
2. Chougnat C and Gessani S: Role of gp120 in dendritic cell dysfunction in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2006;80:994-1000.
3. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, *et al.*: HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3396-3401.
4. Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, and Gessani S: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004;78:9763-9772.
5. Williams MA, Trout R, and Spector SA: HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:829-847.

6. Harman AN, Wilkinson J, Bye CR, *et al.*: HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol* 2006;177:7103-7113.
7. Zhang R, Lifson JD, and Choungnet C: Failure of HIV-exposed CD4+ T cells to activate dendritic cells is reversed by restoration of CD40/CD154 interactions. *Blood* 2006;107:1989-1995.
8. Chirmule N and Pahwa S: Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev* 1996;60:386-406.
9. He B, Qiao X, Klasse PJ, *et al.*: HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 2006;176:3931-3941.
10. Lee C, Liu QH, Tomkowicz B, *et al.*: Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol* 2003;74:676-682.
11. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004;78:5223-5232.
12. Poulsen AG, Aaby P, Larsen O, *et al.*: 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997;349:911-914.
13. Marlink R, Kanki P, Thior I, *et al.*: Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994;265:1587-1590.
14. Jaffar S, Wilkins A, Ngom PT, *et al.*: Rate of decline of percentage CD4+ cells is faster in HIV-1 than in HIV-2 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;16:327-332.
15. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, and Victorino RM: CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 2002;169:3400-3406.
16. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, and Paul WE: CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002;8:319-323.
17. Albuquerque AS, Cortesao CS, Foxall RB, *et al.*: Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol* 2007;178:3252-3259.
18. Rowland-Jones SL, and Whittle HC: Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 2007;8:329-331.
19. Drylewicz J, Matheron S, Lazaro E, *et al.*: Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *AIDS* 2008;22:457-468.
20. Azevedo-Pereira JM, Santos-Costa Q, and Moniz-Pereira J: HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr HIV Res* 2005;3:3-16.
21. McKnight A, Dittmar MT, Moniz-Pereira J, *et al.*: A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol* 1998;72:4065-4071.
22. Soares R, Foxall R, Albuquerque A, *et al.*: Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 2006;80:12425-12429.
23. Bjorling E, Scarlatti G, von Gegerfelt A, *et al.*: Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology* 1993;193:528-530.

24. Kaneko H, Neoh LP, Takeda N, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein binds to CD8 as well as to CD4 molecules on human T cells. *J Virol* 1997;71:8918-8922.
25. Neoh LP, Akimoto H, Kaneko H, *et al.*: The production of beta-chemokines induced by HIV-2 envelope glycoprotein. *AIDS* 1997;11:1062-1063.
26. Cavaleiro R, Sousa AE, Loureiro A, and Victorino RM: Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 2000;14:2679-2686.
27. Cavaleiro R, Brunn GJ, Albuquerque AS, *et al.*: Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins. *Eur J Immunol* 2007;37:3435-3444.
28. Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, *et al.*: Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol* 1998;72:7992-8001.
29. Frank I, Piatak M Jr, Stoessel H, *et al.*: Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol* 2002;76:2936-2951.
30. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, *et al.*: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;443:350-354.
31. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, *et al.*: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006;203:2281-2292.
32. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, *et al.*: Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006;12:1198-1202.
33. Trabattoni D, Saresella M, Biasin M, *et al.*: B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood* 2003;101:2514-2520.
34. Meier A, Bagchi A, Sidhu HK, *et al.*: Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* 2008;22:655-658.
35. Taveira NC, Bex F, Burny A, *et al.*: Molecular characterization of the env gene from a non-syncytium-inducing HIV-2 isolate (HIV-2ALI). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:223-224.
36. Hume DA: Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008;181:5829-5835.
37. Ishikawa F, Niino H, Iino T, *et al.*: The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 2007;110:3591-3660.
38. Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, and Koup RA: Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 2005;201:2023-2033.
39. Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, and Patterson S: Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003;101:4505-4511.
40. Hsieh SM, Pan SC, Hung CC, Chen MY, and Chang SC: Differential impact of late-stage HIV-1 infection on in vitro and in vivo maturation of myeloid dendritic cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:413-419.
41. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, *et al.*: Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001;98:3016-3021.
42. Duvall MG, Lore K, Blaak H, *et al.*: Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *J Virol* 2007;81:13486-13498.

43. Foxall RB, Soares RS, Albuquerque AS, *et al.*: Increased frequency of CD25dimCD4+ T-cells in HIV-2 infection, a naturally occurring attenuated form of HIV-1. *Clin Immunol* 2008;127:158-167.
44. Gautier D, Beq S, Cortesao CS, Sousa AE, and Cheynier R: Efficient thymopoiesis contributes to the maintenance of peripheral CD4 T cells during chronic human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 2007;81:12685-12688.

Células dendríticas mielóides na infecção pelo HIV-2

Em preparação para submissão:

Rita Cavaleiro¹, António P. Baptista¹, Rita Tendeiro¹, Russell B. Foxall¹, Rui S. Soares¹, Perpétua Gomes², Rui M. M. Victorino¹, Ana E. Sousa¹. **Myeloid dendritic cells in HIV-2 infection.** 2009

¹Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

²Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Medicina Transfusional, Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal

Abstract

Myeloid dendritic cells (mDC) are professional antigen-presenting cells with a pivotal role in initiating and maintaining adaptive immune responses and thought to play a major role in AIDS immunopathogenesis. HIV-2 infection is considered a natural model of “attenuated” disease, given its relatively more benign course than HIV-1 infection and low to undetectable levels of viremia. Here we report a significant decrease in circulating mDC in HIV-2 infected patients, particularly those in advanced stage and/or with detectable viremia. Moreover, no major differences were found between HIV-2 and HIV-1 cohorts when paired for the degree of CD4⁺ T cell depletion. The decrease in mDC levels was accompanied by an upregulation of CD80, CD86 and PD-L1 expression within circulating mDC of both HIV-infected cohorts relative to seronegative controls. Moreover, we documented an association between T cell activation and mDC disturbances in both HIV-1 and HIV-2 infections. To our knowledge, this is the first study characterizing mDC in HIV-2 infection. Our data suggest that differences in circulating mDC do not represent a major determinant for the more favourable outcome associated with HIV-2 infection.

Introduction

Myeloid dendritic cells (mDC) are professional antigen-presenting cells with a pivotal role in initiating and maintaining adaptive immune responses¹. While in peripheral non-lymphoid tissues, immature mDC sense their surrounding environment for the presence of infection signals. The recognition of pathogen-associated molecular patterns or inflammatory signals leads to mDC maturation. This is characterized by several coordinated events, including upregulation of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86, fundamental for antigen presentation and T cell priming¹.

mDC are considered to play a major role in AIDS immunopathogenesis. They represent potential targets for HIV infection, since they express CD4 in addition to the two main HIV co-receptors, CCR5 and CXCR4^{2,3}. Moreover, mDC are actively involved in HIV spreading through viral capture and subsequent transfer to T cells^{4,5}.

HIV-1 infection has been consistently associated with a reduction of mDC number in the peripheral blood and with defects in their function that may disturb the development of adequate HIV-specific responses^{2,6-13}. mDC impairment has been found to be more pronounced in individuals with higher levels of viremia and/or lower CD4⁺ T cell counts^{2,7,8,10,12}.

There are no data on mDC during HIV-2 infection. HIV-2 is associated with an “attenuated” form of HIV disease, with reduced rates of CD4⁺ T cell depletion^{14,15} and with limited impact on the survival¹⁶. Moreover, HIV-2 infected patients usually exhibit very low to undetectable levels of viremia in all disease stages¹⁷⁻²¹, which explain the lower rates of horizontal and vertical transmission and the confinement of this infection to West Africa^{22,23}. However, despite the lower levels of plasma viral RNA copies associated with HIV-2, the levels of proviral DNA are not significantly different between the HIV-1 and HIV-2²⁴⁻²⁷, indicating that the estimated number of infected cells is similar in the two infections. The reasons for the apparent better prognosis associated with HIV-2 infection remain elusive. HIV-1 and HIV-2 have been shown to exhibit similar destructive impact when tested in a human lymphoid tissue culture model²⁸. Moreover, as previously reported for HIV-1²⁹⁻³¹, we have shown that chronic immune activation is also a major driving force for CD4⁺ T cell depletion in HIV-2 infection^{32,33}. However, it is

important to emphasize that the rate of progression of immune activation and CD4⁺ T cell decline is much slower in HIV-2 than in HIV-1 disease^{32,33}.

Part of the mDC disturbances have been attributed to direct effects of HIV envelope proteins *per se*³⁴. Contrary to what has been described for HIV-1³⁴, we had shown that the HIV-2 envelope protein did not alter the capacity of monocytes to differentiate into DC and the subsequent DC maturation³⁵. This is despite our previous data showing that the HIV-2 envelope protein is able to induce TNF- α production by monocytes³⁶ and to suppress T cell proliferation through a monocyte-mediated mechanism³⁷. Moreover, mDC were shown to be less susceptible to HIV-2 than to HIV-1 infection *in vitro*, as reported by Duvall *et al*³⁸.

We test here the possibility that a better preserved mDC compartment may contribute to the favorable host-virus balance associated with HIV-2 infection. We report, for the first time, a significant decrease in mDC frequency in the blood of HIV-2 infected patients, particularly in those in advanced stage and/or with detectable viremia. The decrease in mDC levels was accompanied by an upregulation of CD80 and CD86 expression, and these alterations were tightly correlated with markers of T cell activation, emphasizing the relationship between generalized immune activation and mDC disturbances. The inhibitory molecule PD-L1 was also found to be up-regulated, although without correlation with parameters of disease progression. Importantly, we found no significant differences in mDC levels and phenotype between HIV-1 and HIV-2 infected individuals, in spite of the distinct outcome of the two infections.

Results

HIV-2 infected patients exhibit a reduction in circulating mDC

In order to evaluate the possibility that preserved mDC contributed to the more favorable outcome associated to HIV-2 relative to HIV-1 infection, we characterized circulating mDC in untreated HIV-1 and HIV-2 infected individuals. As shown in Table 1, the two HIV-infected cohorts were selected to enclose comparable degrees of CD4⁺ T

cell depletion, despite being expected that HIV-2 infected individuals were infected for significantly more years than the HIV-1 patients¹⁵. As previously reported³², the two cohorts exhibited a similar up-regulation of activation markers within CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Of note, 20 out of the 28 HIV-2 infected patients had undetectable viremia, the highest level documented being 26,263 RNA copies/ml, which is significantly lower than the levels observed in the HIV-1 cohort.

Table 1. *Characteristics of the cohorts studied*

| | Healthy controls | HIV-1- infected patients | HIV-2 –infected patients |
|---|-----------------------------------|--|---|
| Number (male/female) | 17 (6/11) | 22 (17/5) | 28 (9/19) |
| Age, years | 43 ± 2 (27-57) | 39 ± 2 (23-61) [#] | 48 ± 3 (19-78) |
| Ethnicity: Caucasian/Black | 15/2 | 16/6 | 14/14 |
| CD4 count, cells/ μ l | 935 ± 63 (518-1397) | 569 ± 105 (18-1848) ^{**} | 666 ± 80 (52-1511) [*] |
| % CD4 ⁺ T cells | 44.9 ± 2.0 (34.4-61.1) | 22.8 ± 3.3 (1.3-47.2) ^{***} | 28.5 ± 2.6 (7.1-54.1) ^{***} |
| Viremia, HIV RNA copies/ml | NA | 672,310 ± 294,026 (40-4,470,000) ^{3; #} | 3,035 ± 1,125 (200-26,263) ^a |
| % HLA-DR ⁺ within CD4 ⁺ T cells | 4.1 ± 0.4 (1.9-7.6) ^b | 17.1 ± 3.0 (1.7-54.5) ^{***} | 11.3 ± 1.7 (1.9-36.3) ^{**} |
| % HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ within CD8 ⁺ T cells | 4.4 ± 1.4 (1.3-22.7) ^b | 29.2 ± 4.0 (1.4-62.2) ^{***} | 20.6 ± 3.6 (0.6-69.5) ^{***} |

NA, not applicable. Data are mean±SEM with limits in brackets. [#] p<0.05 when comparing HIV-1 with HIV-2 infected patients ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 when comparing infected cohorts with healthy individuals.

^a 4 of 22 HIV-1 patients and 20 out of 28 HIV-2 patients had undetectable viremia. In these cases, the cut-off value of the test was used to calculate the mean (40 and 200 RNA copies/ml for HIV-1 and HIV-2, respectively); ^b n=16.

mDC were identified as CD11c⁺CD123⁻ cells after successive gating on lineage marker negative and HLA-DR⁺ cells (Fig. 1A). HIV-1 and HIV-2 patients exhibited a statistically significant decrease in mDC levels both in terms of percentage within total PBMC (Fig. 1B) and absolute numbers (Fig. 1C) in comparison with healthy controls. This decrease tended to be less marked in HIV-2 than in HIV-1 patients, although no statistically significant difference was observed between the two HIV-infected cohorts (Fig. 1B and 1C).

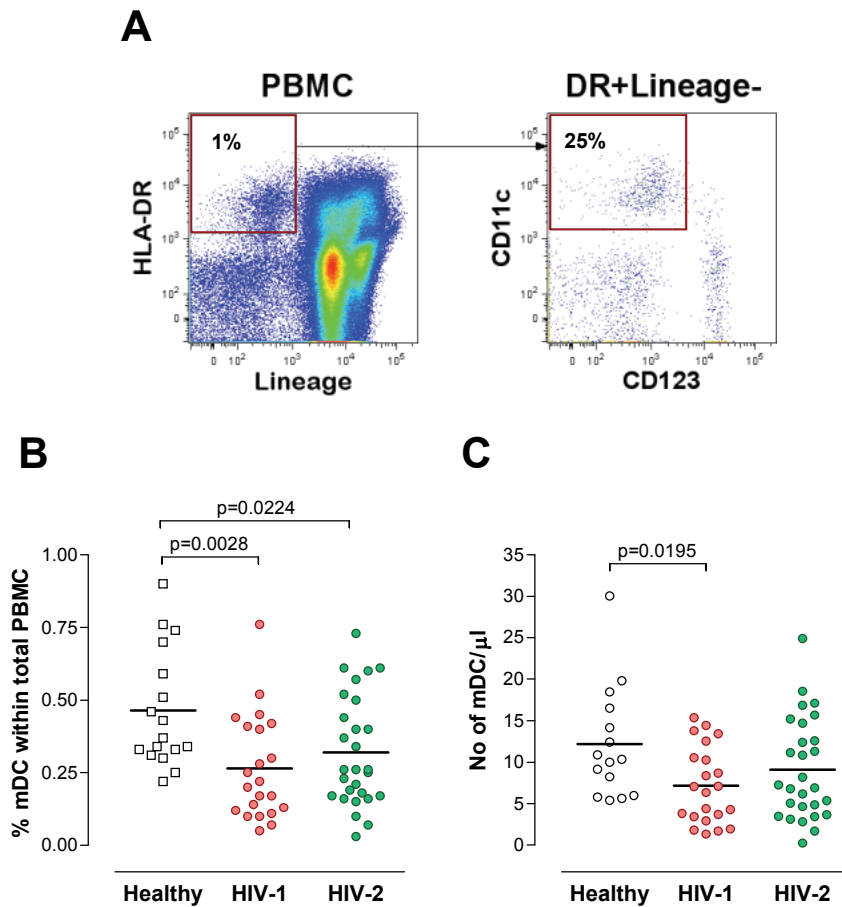


Figure 1. Circulating mDC levels in HIV-1 and HIV-2 infections. **(A)** Representative flow cytometric mDC analysis. After a large gate including lymphocytes and monocytes defined by forward and side scatter, cells were further gated in HLA-DR⁺ cells that do not express lineage markers (left dot-plot). mDC were subsequently identified as CD11c⁺CD123⁻ cells (right dot-plot). Numbers represent the percentage of cells within the illustrated gates from an HIV-2-infected patient with 523 CD4⁺ T cells/ μ l and undetectable viremia. The proportion of mDC within PBMC is 0.25% corresponding to 7 mDC/ μ l. **(B)** and **(C)** Graphs show circulating mDC levels in HIV-1 and HIV-2 infected cohorts and healthy controls expressed as percentage within PBMC and absolute numbers, respectively. Each dot represents one individual and bars represent mean.

The decrease in mDC levels is only significant in patients with major CD4⁺ T cell depletion

In order to assess the mDC levels during disease progression, HIV-1 and HIV-2 infected individuals were stratified into two groups according to CD4⁺ T cell counts: >350 and <350 CD4⁺ T cells/ μ l. As depicted in Fig. 2A, the decrease in absolute mDC levels was statistical significant only in those individuals with lower levels of CD4⁺ T cells in both

cohorts. Moreover, the HIV-2 patients with lower CD4⁺ T cell counts exhibited significant lower levels of mDC than the ones with better preservation of CD4⁺ T cells (Fig. 2A). Of note, no statistically significant differences were found in mDC levels between HIV-1 and HIV-2-infected patients paired for the degree of CD4⁺ T cell depletion (Fig. 2A). Additionally, mDC absolute numbers directly correlated with the percentage of CD4⁺ T cells in both infections (Fig. 2B). Similar results were obtained when mDC percentage was analysed (data not shown). In summary, a similar decline in circulating mDC in parallel with CD4⁺ T cell depletion was documented in both infections.

The decrease in mDC levels is only significant in patients with detectable viremia

As mentioned above, the majority of HIV-2 infected patients had undetectable viremia. Therefore, we asked whether the presence of measurable plasma viremia in the 8 viremic HIV-2 patients could impact on mDC levels. Infected cohorts were divided into two groups, those with detectable plasma HIV RNA levels and those with viremia below the detection limit of the test (40 copies of HIV-1 RNA and 200 copies of HIV-2 RNA). As depicted in Fig. 2C, the HIV-1 and HIV-2 infected patients with undetectable viremia showed no decrease in mDC levels. It is worth to emphasize that the four HIV-1 patients who were able to control viral replication in the absence of antiretroviral therapy represent exceptional individuals, usually named “Elite controllers”, that are considered to be less than 1% of HIV-1 infected patients³⁹. In the present cohort, these subjects had undetectable viremia from 2 to 10 years and well preserved CD4⁺ T cell counts (814±242 cell/μl; range 344-1425). In contrast to “aviremic” patients, significant mDC depletion was observed in HIV-infected individuals with detectable viremia (Fig.2C). However, despite the much lower viremia observed in the HIV-2 than in the HIV-1 cohort, no significant differences in mDC levels were found between the two viremic cohorts. The same trend was documented when the analysis was done using percentage of mDC within total PBMC (data not shown). Moreover, a statistically significant negative correlation between viremia and mDC levels was found in both infections (HIV-1: mDC absolute numbers $r=-0.7073$, $p=0.0002$, $n=22$ and percentage of mDC within PBMC $r=-$

0.7173, $p=0.0002$, $n=22$; HIV-2: mDC absolute numbers $r=-0.5436$, $p=0.0028$, $n=28$ and percentage of mDC within PBMC $r=-0.5656$, $p=0.0017$, $n=28$). Overall, viremia is strongly associated with mDC depletion in both infections.

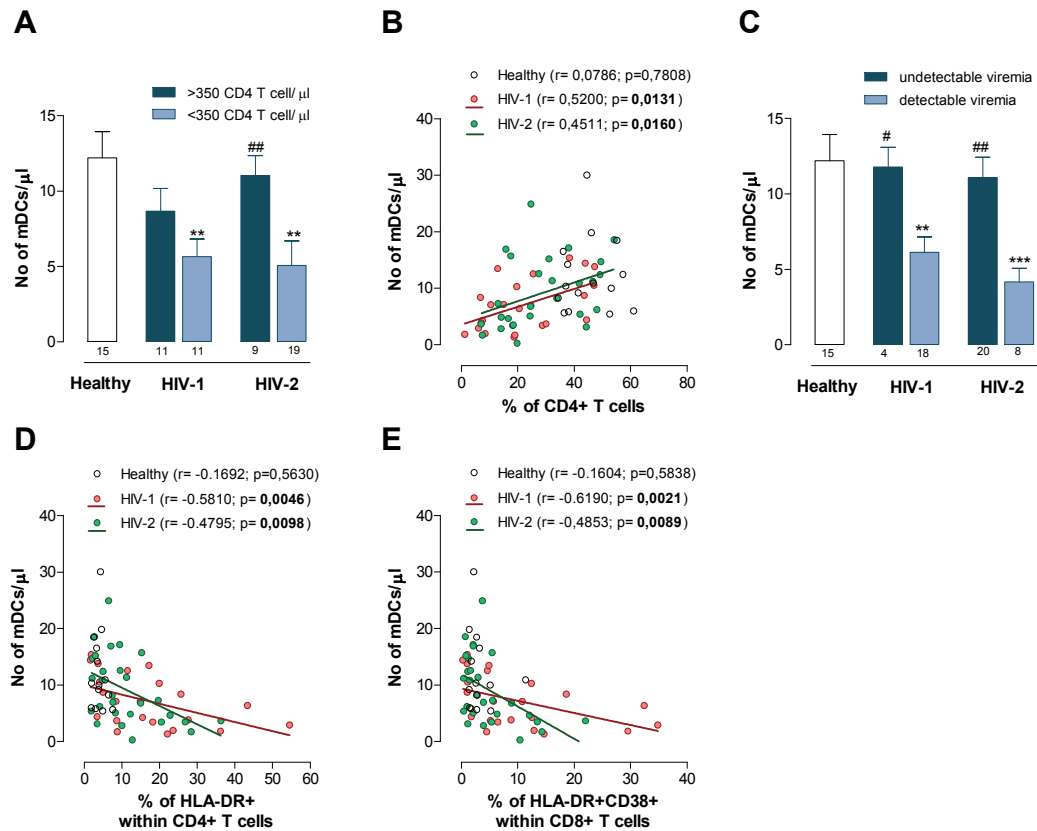


Figure 2. Relationship between absolute mDC numbers and parameters of disease progression in HIV-1 and HIV-2 infections. **(A)** The infected cohorts were stratified according to CD4^+ T cell counts (> 350 and < 350 cells/ μl) and absolute mDC numbers compared. Bars represent mean \pm SEM. Numbers under the bars represent the total individuals analyzed. **(B)** Correlation between the number of mDC/ μl and the percentage of CD4^+ T cells within PBMC. **(C)** Comparison of the number of mDC/ μl between the viremic and “aviremic” (below test cut-off) infected cohorts. **(D)** and **(E)** Correlation between the number of mDC/ μl and the percentage of HLA-DR within CD4^+ T cells or the percentage of HLA-DR $^+$ CD38 $^+$ within CD8^+ T cells, respectively. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ as compared to mDC levels in controls. # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ between different groups of the same HIV-1 or HIV-2 infected cohort.

The decrease in circulating mDC correlated with T cell activation in both infected cohorts.

As in HIV-1 infection, HIV-2 is associated with a generalized chronic immune activation that is considered one of the main determinants of disease progression^{32, 33}. We have previously shown that, for the same degree of CD4⁺ T cell depletion, HIV-1 and HIV-2 infected cohorts exhibited a comparable up-regulation of the MHC class II molecule HLA-DR within CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations and a similar increase in the expression of the molecule CD38 within CD8⁺ T cells, relative to healthy controls^{32, 33}. Therefore, we asked whether the levels of activation markers within T cells correlated with mDC levels. As illustrated in Fig. 2D and 2E, there was a significant inverse correlation between the absolute number of circulating mDC and the proportion of CD4⁺ T cells that express HLA-DR as well as of CD8⁺ T cells that simultaneously express HLA-DR and CD38, in both infections. Regarding the percentage of mDC within PBMC, it also inversely correlated with the proportion of CD8⁺ T cells co-expressing HLA-DR and CD38 in both infections (HIV-1: $r=-0.4814$, $p=0.0233$, $n=22$; HIV-2: $r=-0.4816$, $p=0.0095$, $n=28$), and with the proportion of CD4⁺ T cells expressing HLA-DR in the case of HIV-2 infection (HIV-1: $r=-0.3780$, $p=0.0829$, $n=22$; HIV-2: $r=-0.4808$, $p=0.0096$, $n=28$).

mDC from both infected cohorts exhibited an activated phenotype

We next assessed the expression levels of several molecules that define the state of mDC maturation and regulate the ability of the DC to prime T cells, namely the co-stimulatory molecules CD40 and the members of B7:CD28 family, CD80 and CD86, and the co-inhibitory molecules PD-1 ligands, PD-L1 and PD-L2⁴⁰. CD40 and PD-L2 were almost absent within mDC in the three cohorts studied (data not shown). CD80, CD86 and PD-L1 expression, assessed both as percentage within mDC or geometric fluorescence intensity (FI), was significantly higher in the HIV-infected cohorts than in healthy individuals (Fig. 3).

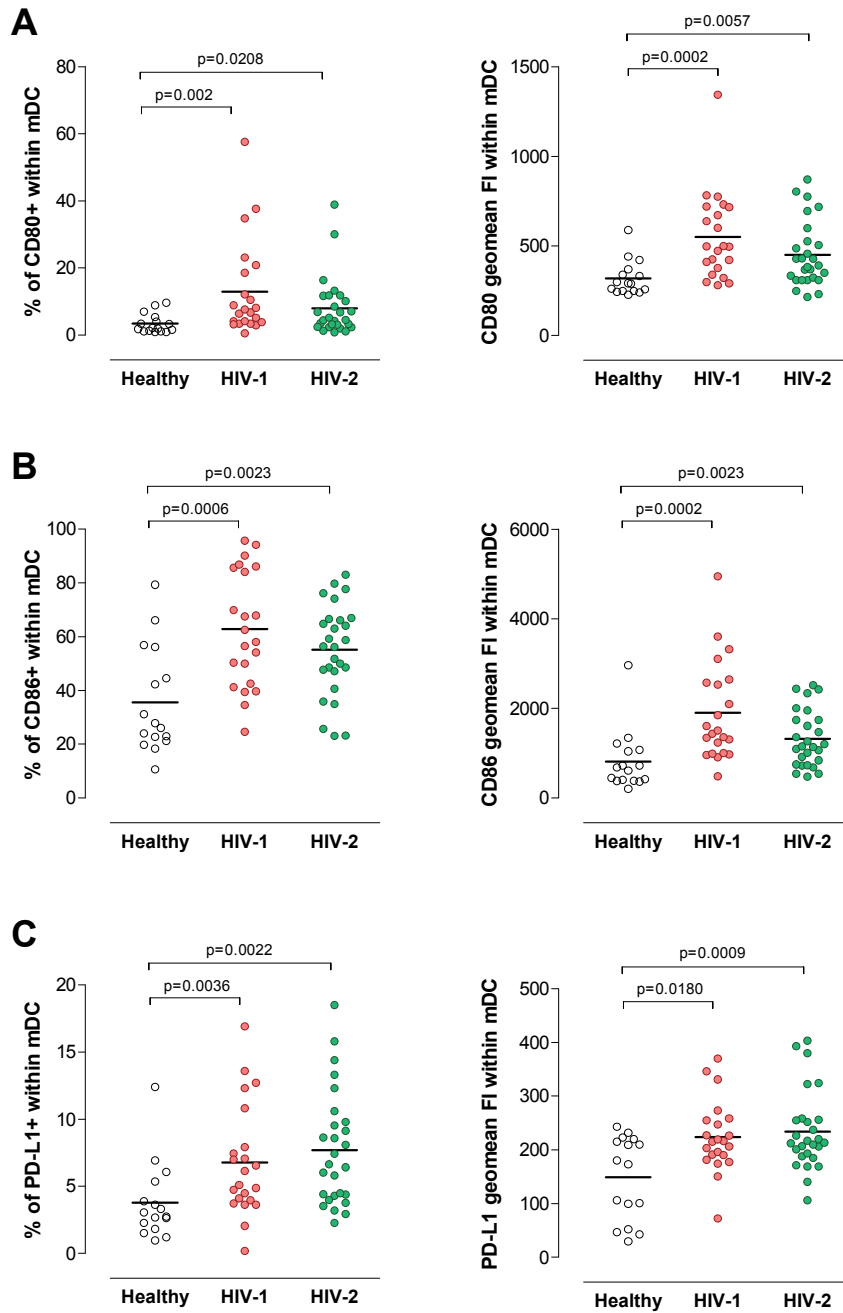


Figure 3. Phenotype of circulating mDC in HIV-1 and HIV-2 infections. Levels of expression of **(A)** CD80, **(B)** CD86 and **(C)** PD-L1 on mDC, assessed as proportion within mDC (left graphs) and as geomean FI (right graphs) within total mDC measured by flow cytometry. Each dot represents one individual and bars represent mean.

We then asked if mDC phenotype could be influenced by the parameters of disease progression assessed, namely degree of CD4⁺ T cell depletion, viremia and T cell activation. Infected cohorts were stratified according to the degree of CD4 depletion (>350 CD4⁺ T cells and <350 CD4⁺ T cells), as well as the viremia status (those with undetectable and detectable viremia). As illustrated in Fig. 4A, only the patients with lower CD4⁺ T cell counts and/or detectable viremia showed a statistically significant increase in the proportion of CD80⁺ cells within total mDC as compared to healthy controls. Moreover, the frequency of CD80⁺ cells within mDC inversely correlated with the percentage of CD4⁺ T cells and directly correlated with viremia (Table 2). The extent of T cell activation is also associated with the more differentiated mDC phenotype in HIV-infected cohorts, as illustrated by the significant positive correlations depicted in Table 2.

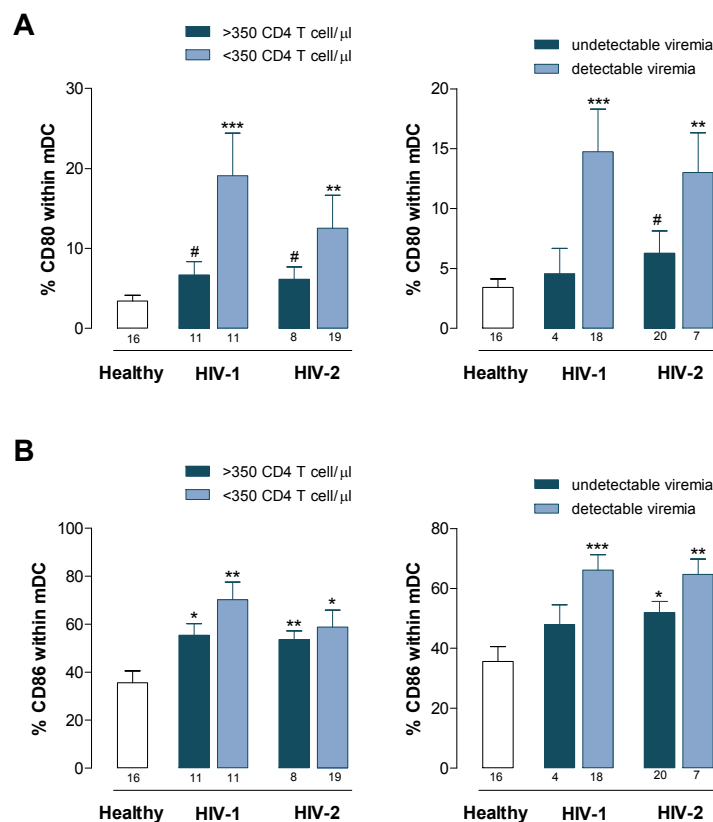


Figure 4. Comparison of percentage of mDC expressing CD80 (**A**) or CD86 (**B**) in HIV-1 and HIV-2 infected cohorts stratified according to CD4⁺ T cell counts (>350 and <350 cells/μl) (left graphs) and divided into “aviremic” and viremic (right graphs) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared to molecule expression in healthy controls. #p<0.05 between different groups of the same HIV-1 or HIV-2 infected cohort.

The same trend was observed for CD86 but, in contrast to CD80, this co-stimulatory molecule was already significantly up-regulated in the early stages of disease, as well as in “aviremic” HIV-2 infected individuals (Fig. 4B). The absence of significant differences in CD86 expression between early and late stage patients translated into the absence of significant correlations between the frequency of CD86⁺ cells within mDC and the percentage of CD4⁺ T cells both in HIV-1 and HIV-2 infections. Moreover, a statistically significant direct correlation between CD86 expression within mDC and viremia was only found for the HIV-1 cohort. Thus, although CD80 and CD86 provide co-stimulatory signals to T cells and share the majority of their known ligands, our results support a distinct regulation of these molecules during HIV disease. Nevertheless, significant positive correlations were found between the percentage of CD86⁺ cells within mDC and the proportion of CD4⁺ T cells expressing HLA-DR, as well as the proportion of CD8⁺ T cells expressing HLA-DR and CD38 (Table 2).

Table 2. Correlations between the percentage of mDC expressing a particular molecule and parameters of disease progression

| | Cohort | % CD4 ⁺ T cells within PBMC | Viremia, HIV RNA copies/ml | % HLA-DR ⁺ within CD4 ⁺ T cells | % HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ within CD8 ⁺ T cells |
|--------------------------------|----------------------|--|----------------------------|---|---|
| | Healthy ^a | r=0.0147; p=0.9569 | NA | r=0.1941; p=0.4713 | r=-0.0882; p=0.7452 |
| % CD80 ⁺ within mDC | HIV-1 ^b | r=-0.4778; p=0.0245 | r=0.6029; p=0.0030 | r=-0.3954; p=0.0686 | r=0.5784; p=0.0048 |
| | HIV-2 ^c | r=-0.5485; p=0.003 | r=0.4427; p=0.0208 | r=0.6014; p=0.0009 | r=0.5614; p=0.0023 |
| | All | r=-0.5672; p<0.0001 | r=0.4819; p=0.0005 | r=0.5742; p<0.0001 | r=0.5760; p<0.0001 |
| | Healthy ^a | r=-0.0794; p=0.770 | NA | r=0.0500; p=0.8541 | r=-0.0823; p=0.7617 |
| %CD86 ⁺ within mDC | HIV-1 ^b | r=-0.2874; p=0.1947 | r=0.4258; p=0.0482 | r=0.4591; p=0.0316 | r=0.5144; p=0.0143 |
| | HIV-2 ^c | r=-0.2519; p=0.2049 | r=0.2971; p=0.1324 | r=0.4198; p=0.0293 | r=0.4302; p=0.0251 |
| | All | r=-0.4293; p=0.0004 | r=0.3968; p=0.0048 | r=0.4886; p<0.0001 | r=0.5468; p<0.0001 |
| | Healthy ^a | r=0.0029; p=0.9914 | NA | r=-0.0529; p=0.8456 | r=-0.1618; p=0.5495 |
| %PD-L1 ⁺ within mDC | HIV-1 ^b | r=-0.1706; p=0.4479 | r=0.0045; p=0.9840 | r=0.2790; p=0.2086 | r=-0.0056; p=0.9801 |
| | HIV-2 ^c | r=-0.0076; p=0.9699 | r=-0.2947; p=0.1357 | r=-0.0354; p=0.8608 | r=-0.2033; p=0.3091 |
| | All | r=-0.2316; p=0.0634 | r=-0.0716; p=0.6252 | r=0.1990; p=0.1120 | r=0.1747; p=0.1640 |

^an=16; ^bn=22; ^cn=27; Spearman's correlation coefficient was used to assess the correlation between two variables; NA, not applicable.

On the other hand, the analysis of the co-inhibitory molecule PD-L1 revealed no significant correlations with parameters of disease progression, in agreement with an up-regulation of this molecule independently of disease stage and viremia status in both HIV-2 and HIV-1 infections.

Discussion

The loss of mDC is thought to be an important contributor for the progressive impairment of the immune system in HIV disease, given their role in linking innate and adaptive immunity^{2, 6-13}. HIV-2 infection is considered a natural model of “attenuated” disease, with a relatively more benign course than HIV-1 infection^{14, 15}, with limited impact on the patient survival¹⁶. We documented here a significant decrease in circulating mDC in HIV-2 infected patients, particularly those in advanced stage and/or with detectable viremia. Moreover, no major differences were found between the HIV-2 and HIV-1 cohorts when paired for the degree of CD4⁺ T cell depletion. Both infections were associated with a more differentiated mDC phenotype, with upregulation of the expression of CD80, CD86 and PD-L1 in comparison with seronegative controls. Therefore, our data suggest that differences in circulating mDC do not represent a major determinant for the more favourable outcome associated with HIV-2 infection.

Several factors could contribute for the reduction of circulating mDC levels in HIV-2 infection. One possibility could be a destruction of mDC by the virus itself. As previously reported, DC express CD4 and the HIV co-receptors CXCR4 and CCR5 and, thus, constitute potential targets for HIV infection^{2, 3}. However, mDC were shown to be less susceptible to HIV-2 than to HIV-1 infection *in vitro*³⁸. We showed here that viremic HIV-2 infected individuals exhibited a decrease in mDC levels as marked as that observed in viremic HIV-1 infected individuals, although presenting lower levels of viremia. This suggests that factors other than the direct viral infection could be associated with the mDC decrease. In this case, viremia could indirectly impact on mDC numbers through other alterations that can lead to mDC loss. For instance, we found in HIV-2 infection a significantly higher up-regulation of activation T cell markers in the patients with

detectable viremia than in the patients with undetectable viremia (Tendeiro *et al.* scientific communication, “25 years of HIV” Meeting, Institut Pasteur, Paris, 2008). In addition, our present study supports an association between immune activation and mDC loss, since we found significant inverse correlations between mDC levels and the percentage of activation molecules within CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both HIV-infected cohorts. Therefore, either directly or indirectly, viremia seems to be associated with mDC loss. Of note, the large majority of HIV-2 infected patients exhibit undetectable viremia, which could account for the lower extent of mDC depletion in HIV-2 as compared to HIV-1 infected individuals, when analysed as a whole.

Another hypothesis for the loss of mDC in the circulation of HIV-2 infected patients could be a decrease in mDC production from bone marrow CD34⁺ or blood monocyte precursors. This is corroborated by our previous observation of a marked leukopenia with neutropenia in HIV-2 infected patients (AE Sousa, unpublished data). Moreover, despite some discrepant results, it is widely accepted that HIV-1 Envelope (Env) may contribute to induce abnormal monocyte-derived DC *in vitro*³⁴. However, our recent findings showing that HIV-2 envelope glycoprotein gp105 does not affect the capacity of *in vitro* differentiation of DC from monocytes³⁵ do not support this possibility as a major factor contributing to the depletion of circulating mDC in HIV-2 patients.

Several studies on mDC in the context of HIV-1 infection have been establishing a causal relationship between cell traffic alterations and the decrease in mDC levels⁴¹⁻⁴³. The more differentiated mDC phenotype exhibited by both HIV-infected cohorts than by healthy controls support the possibility that mDC are more prone to migrate to the lymph nodes. However, this should be demonstrated by comparative measurement of mDC in the blood and lymph nodes. CD80 and CD86 are co-stimulatory molecules belonging to B7 family that are up-regulated during DC maturation⁴⁰. The increase in the *ex vivo* expression of these molecules could reflect the generalized state of chronic immune activation exhibited by HIV-1 and HIV-2 infected patients. PD-L1 also belongs to the B7 family and its interaction with PD-1 mediates an inhibitory pathway of T cell responses that seems to contribute to HIV-1-specific T cell exhaustion and poor control of viral replication⁴⁴. Moreover, a recent study suggested a contribution of PD-L1 up-

regulation in the impairment of mDC function and disease progression in chronic HIV-1 infection⁴⁵. On the other hand, the interaction PD-L1/PD-1 could be beneficial to the host by contributing to suppress inflammatory responses and, thus, to inhibit the chronic pan-immune activation. Of note, we reported here an increase in PD-L1 expression both in HIV-1 and HIV-2 patients, without apparent relationship with disease stage and viremia.

Importantly, although CD80 and CD86 can provide co-stimulatory signals to T cells through the same ligands, the expression of CD80 and CD86 is differently regulated by parameters of disease progression in both HIV-1 and HIV-2 infections. While the frequency of mDC expressing CD80 was found to inversely correlate with the percentage of CD4⁺ T cells and directly with viremia and T cell activation in both HIV-1 and HIV-2 infections, no such correlations were documented for CD86. Thus, the significant increase in the percentage of CD80 expression within mDC only occurred in advanced stage and/or viremic patients, whereas the up-regulation of CD86 or PD-L1 expression occurred even in the early stages and in HIV-2 individuals with undetectable levels of viremia.

In conclusion, this is the first study characterizing circulating mDC during HIV-2 infection. Despite the slower HIV-2 course, we reported here a progressive mDC loss associated with a more differentiated phenotype remarkably similar to the one found during HIV-1 disease. Considering that pan-immune activation characterizes both progressive HIV-1 and HIV-2 diseases in spite of their distinct viral load, our data support a direct association between mDC disturbances and immune activation in HIV/AIDS pathogenesis.

Materials and Methods

Studied cohorts

A cross-sectional study was performed involving 22 HIV-1 and 28 HIV-2 infected untreated individuals, followed at the Hospital de Santa Maria, Lisbon, without any

known ongoing opportunistic infections or tumors. 17 HIV-seronegative control subjects were also included in the study. The clinical and epidemiological characterization of the cohorts is described in Table 1. The study was approved by the Ethical Board of the Faculty of Medicine, University of Lisbon.

mDC quantification and phenotype

PBMC were isolated from heparinized blood immediately after venopuncture by Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) density gradient centrifugation. Freshly isolated PBMC were surface stained as previously described³⁶. Briefly, cells were washed with PBS/BSA/AZ and stained for 20 min at room temperature with the following anti-human mAb (clones specified in brackets): FITC-conjugated lineage (lin) cocktail consisting of CD16 (NKP15, BD Biosciences, San Jose, CA), CD20 (2H7, eBioscience, San Diego, CA), CD3 (CLB-T3/2) and CD14 (CLB-mon/1), both from Sanquin, Amsterdam, The Netherlands; PE-conjugated CD80 (L307.4, BD Biosciences), CD40 (5C3) and PD-L2 (MIH18), both from eBioscience; PerCP-conjugated HLA-DR (L243, BD Biosciences); PE-Cy7-conjugated CD123 (6H6, eBioscience); APC-conjugated CD11c (B-ly6) and CD86 (FUN-1), both from BD Biosciences, and PD-L1 (MIH1, eBioscience). After two washes in PBS/BSA/AZ, cells were resuspended in 1% formaldehyde. At least 400,000 events were acquired in a large gate including lymphocytes and monocytes, defined according to forward/side scatter characteristics. Within this gate, mDC were defined as $lin^-HLA-DR^+CD11c^+CD123^-$. Gated mDC were further analysed for the expression of PD-L1, PD-L2 and the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86. Cells were acquired using CANTO flow cytometer (BD Biosciences) and analysis was performed with FlowJo software (version 8.5.3, Tree Star, Inc., Ashland, OR). The absolute numbers of mDC per microlitre of blood were calculated by multiplying their representation by the sum of the absolute lymphocyte and monocyte counts obtained at the clinical laboratory. The expression of mDC surface markers was evaluated both in terms of percentage and of geomean fluorescence intensity (FI) within gated mDC.

Plasma viral load assessment

Plasma viral loads were assessed using RT-PCR-based assays, with a 40 RNA copies/ml threshold for HIV-1 detection (Roche, Basel, Switzerland) and a 200 RNA copies/ml detection limit for HIV-2²¹. In cases where detection was below the aforementioned levels, the cut-off values of the tests were considered for statistical analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with Mann-Whitney *t* tests and Spearman's correlations using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA. *p*-values <0.05 were considered to be significant.

Acknowledgements

We would like to thank Emília Valadas, Manuela Doroana, Sara Sousa, Luis França, and Francisco Antunes from the Infectious Disease Department as well as Margarida Lucas and Luis Pinheiro from the Internal Medicine 2 Department of the University Hospital of Santa Maria, Faculty of Medicine of the University of Lisbon for the collaboration in the follow-up of the cohorts and collection of clinical data.

References

1. Banchereau J, RM Steinman: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
2. Donaghy H, A Pozniak, B Gazzard, N Qazi, J Gilmour, F Gotch, S Patterson: Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001; 98:2574-2576.
3. Smed-Sorensen A, K Lore, J Vasudevan, MK Louder, J Andersson, JR Mascola, AL Spetz, RA Koup: Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 2005; 79:8861-8869.

4. Geijtenbeek TB, DS Kwon, R Torensma, SJ van Vliet, GC van Duijnhoven, J Middel, IL Cornelissen, HS Nottet, VN KewalRamani, DR Littman, CG Figdor, Y van Kooyk: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100:587-597.
5. Cavrois M, J Neidleman, WC Greene: The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000051.
6. Pacanowski J, S Kahi, M Baillet, P Lebon, C Deveau, C Goujard, L Meyer, E Oksenhendler, M Sinet, A Hosmalin: Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001; 98:3016-3021.
7. Barron MA, N Blyveis, BE Palmer, S MaWhinney, CC Wilson: Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003; 187:26-37.
8. Finke JS, M Shodell, K Shah, FP Siegal, RM Steinman: Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2004; 24:647-652.
9. Almeida M, M Cordero, J Almeida, A Orfao: Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS* 2005; 19:261-271.
10. Azzoni L, RM Rutstein, J Chehimi, MA Farabaugh, A Nowmos, LJ Montaner: Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4+ cell counts in treated HIV-1-infected children. *J Infect Dis* 2005; 191:1451-1459.
11. Zhang Z, J Fu, Q Zhao, Y He, L Jin, H Zhang, J Yao, L Zhang, FS Wang: Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol* 2006; 176:5644-5651.
12. Schmidt B, SH Fujimura, JN Martin, JA Levy: Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2006; 26:55-64.
13. Fontaine J, F Coutlee, C Tremblay, JP Routy, J Poudrier, M Roger: HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* 2009; 199:1007-1018.
14. Marlink R, P Kanki, I Thior, K Travers, G Eisen, T Siby, I Traore, CC Hsieh, MC Dia, EH Gueye, et al.: Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265:1587-1590.
15. Drylewicz J, S Matheron, E Lazaro, F Damond, F Bonnet, F Simon, F Dabis, F Brun-Vezinet, G Chene, R Thiebaut: Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *AIDS* 2008; 22:457-468.
16. Poulsen AG, P Aaby, O Larsen, H Jensen, A Naucler, IM Lisse, CB Christiansen, F Dias, M Melbye: 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997; 349:911-914.
17. Simon F, S Matheron, C Tamalet, I Loussert-Ajaka, S Bartczak, JM Pepin, C Dhiver, E Gamba, C Elbim, JA Gastaut, et al.: Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* 1993; 7:1411-1417.

18. Berry N, K Ariyoshi, S Jaffar, S Sabally, T Corrah, R Tedder, H Whittle: Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1998; 1:457-468.
19. Popper SJ, AD Sarr, KU Travers, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 1999; 180:1116-1121.
20. Andersson S, H Norrgren, Z da Silva, A Biague, S Bamba, S Kwok, C Christopherson, G Biberfeld, J Albert: Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 2000; 160:3286-3293.
21. Soriano V, P Gomes, W Heneine, A Holguin, M Doruana, R Antunes, K Mansinho, WM Switzer, C Araujo, V Shanmugam, H Lourenco, J Gonzalez-Lahoz, F Antunes: Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 2000; 61:111-116.
22. Marlink R: Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS* 1996; 10:689-699.
23. Rowland-Jones SL, HC Whittle: Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 2007; 8:329-331.
24. Berry N, K Ariyoshi, O Jobe, PT Ngum, T Corrah, A Wilkins, H Whittle, R Tedder: HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1031-1037.
25. Gomes P, NC Taveira, JM Pereira, F Antunes, MO Ferreira, MH Lourenco: Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:453-456.
26. Popper SJ, AD Sarr, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* 2000; 74:1554-1557.
27. Soares R, R Foxall, A Albuquerque, C Cortesao, M Garcia, RM Victorino, AE Sousa: Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 2006; 80:12425-12429.
28. Schramm B, ML Penn, EH Palacios, RM Grant, F Kirchhoff, MA Goldsmith: Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J Virol* 2000; 74:9594-9600.
29. Giorgi JV, LE Hultin, JA McKeating, TD Johnson, B Owens, LP Jacobson, R Shih, J Lewis, DJ Wiley, JP Phair, SM Wolinsky, R Detels: Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-870.
30. Giorgi JV, Z Liu, LE Hultin, WG Cumberland, K Hennessey, R Detels: Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:904-912.

31. Deeks SG, CM Kitchen, L Liu, H Guo, R Gascon, AB Narvaez, P Hunt, JN Martin, JO Kahn, J Levy, MS McGrath, FM Hecht: Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004; 104:942-947.
32. Sousa AE, J Carneiro, M Meier-Schellersheim, Z Grossman, RM Victorino: CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 2002; 169:3400-3406.
33. Grossman Z, M Meier-Schellersheim, AE Sousa, RM Victorino, WE Paul: CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319-323.
34. Chougnet C, S Gessani: Role of gp120 in dendritic cell dysfunction in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2006; 80:994-1000.
35. Cavaleiro R, AP Baptista, RB Foxall, RM Victorino, AE Sousa: Dendritic cell differentiation and maturation in the presence of HIV type 2 envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25:425-431.
36. Cavaleiro R, AE Sousa, A Loureiro, RM Victorino: Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 2000; 14:2679-2686.
37. Cavaleiro R, GJ Brunn, AS Albuquerque, RM Victorino, JL Platt, AE Sousa: Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins. *Eur J Immunol* 2007; 37:3435-3444.
38. Duvall MG, K Lore, H Blaak, DA Ambrozak, WC Adams, K Santos, C Geldmacher, JR Mascola, AJ McMichael, A Jaye, HC Whittle, SL Rowland-Jones, RA Koup: Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *J Virol* 2007; 81:13486-13498.
39. Walker BD: Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 2007; 15:134-136.
40. Greenwald RJ, GJ Freeman, AH Sharpe: The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:515-548.
41. Lore K, A Sonnerborg, C Brostrom, LE Goh, L Perrin, H McDade, HJ Stellbrink, B Gazzard, R Weber, LA Napolitano, Y van Kooyk, J Andersson: Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2002; 16:683-692.
42. Dillon SM, KB Robertson, SC Pan, S Mawhinney, AL Meditz, JM Folkvord, E Connick, MD McCarter, CC Wilson: Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 48:1-12.
43. Krathwohl MD, TW Schacker, JL Anderson: Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 2006; 193:494-504.
44. Freeman GJ, EJ Wherry, R Ahmed, AH Sharpe: Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 2006; 203:2223-2227.
45. Wang X, Z Zhang, S Zhang, J Fu, J Yao, Y Jiao, H Wu, FS Wang: B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 2008; 38:3226-3236.

Depleção marcada de células dendríticas plasmacitóides na infecção pelo HIV-2

Submetido para publicação:

Rita Cavaleiro¹, António P. Baptista¹, Rui S. Soares¹, Rita Tendeiro¹, Russell B. Foxall¹, Perpétua Gomes², Rui M. M. Victorino¹, Ana E. Sousa¹. **Major Depletion of Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-2 Infection, an Attenuated Form of HIV Disease.** 2009

¹Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

²Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Medicina Transfusional, Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) provide an important link between innate and acquired immunity, mediating their action mainly through the production of interferon- α (IFN- α). Although pDC are able to suppress HIV-1 replication, there is increasing evidence suggesting they may also contribute to the increased levels of cell apoptosis and generalized pan-immune activation associated with disease progression. HIV-2 infection is characterized by low levels of circulating virus and, despite having a clinical spectrum similar to HIV-1, the rate of CD4 decline and AIDS progression is much slower irrespective of disease stage. In the present study we aim to characterize circulating pDC during HIV-2 infection. A similar marked reduction in circulating pDC levels was found in untreated HIV-1 and HIV-2 infections in association with CD4 depletion and T cell activation, in spite of the undetectable viremia found in the majority of HIV-2 patients. Moreover, the same over-expression of CD86 and PD-L1 on circulating pDC was found in both infections irrespective of disease stage or viremia status. Our observation that pDC depletion occurs in HIV-2 infected patients with undetectable viremia indicates that mechanisms other than direct viral infection determine the pDC depletion during persistent infections. However, viremia was associated with an impairment of IFN- α production on a per pDC basis upon TLR9 stimulation. These data support the possibility that diminished function *in vitro* may relate to prior activation by HIV virions *in vivo*. Importantly, serum IFN- α levels were not elevated in HIV-2 infected individuals. In conclusion, our data in this unique natural model of “attenuated” HIV immunodeficiency contribute to the understanding of pDC biology in HIV/AIDS pathogenesis, showing that in the absence of detectable viremia, typical for the majority of HIV-2 patients, a major depletion of circulating pDC in association with a relatively preserved IFN- α production does occur.

Introduction

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are one of the two main subtypes of human dendritic cells. pDC, like the classical myeloid dendritic cells (mDC), are able to present antigens to T cells [1], but have a distinctive feature of producing type I interferons (IFN) [2]. pDC are able to secrete IFN- α at levels up to 1000 fold higher than any other blood cell following viral infection [2]. They recognize pathogens mainly via two pattern recognition receptors: Toll-like receptor 7 (TLR7), which recognizes single-strand RNA, and TLR9, which recognizes unmethylated DNA. The triggering of these receptors induces pDC activation and IFN- α production [3]. IFN- α is a potent stimulator of other immune cells, like mDC and NK cells, playing a central role in the development of immune responses, in addition to its well-documented antiviral effects [2].

pDC are thought to be particularly important in immune responses against viral infections, including HIV. Accordingly, IFN- α is one of the most important cytokines able to suppress HIV replication [4,5]. However, increasing evidence suggests that IFN- α contributes to the generalized pan-immune activation and increased levels of cell apoptosis associated with AIDS progression, and thus the exact role of pDC in HIV/AIDS pathogenesis remains debatable [6-10].

HIV-2 infection is associated with low levels of circulating virus at all disease stages [11-15]. This is thought to be the main reason for the reduced HIV-2 transmission and its geographical confinement to West Africa and a few related European countries, in particular Portugal [16,17]. Despite being associated with a clinical spectrum similar to HIV-1 [18], the rate of disease progression and CD4 decline is much slower irrespective of the disease stage [19,20], leading to a limited impact on the survival of the majority of infected adults [21]. The reasons for the relatively benign course of HIV-2 infection remain poorly understood, and its potential to generate valuable insights into HIV immunopathogenesis has been little explored [16,17,22,23]. Importantly, we have previously shown that in HIV-2 infected patients, as in HIV-1 infection, CD4 depletion is directly linked to immune activation [22,24]. HIV-2 is closely related to HIV-1, sharing ~60% homology at the amino acid level in the group antigens (GAG) and polymerase (POL) and 30-40% in the regions encoding the envelope protein (ENV) [23], and has been

shown to be equally cytopathic *in vitro* [25]. Moreover, despite plasma viremia remaining low or undetectable throughout HIV-2 infection, the levels of proviral DNA do not significantly differ from those found in HIV-1 infected individuals [26-29]. These data suggest that HIV-2, like HIV-1, is able to disseminate and establishes a similar pool of infected cells. The reduced productive viral replication and the slow rate of the progressive immune activation and CD4 decline through the natural history of the disease are in agreement with distinct viral-host equilibrium during HIV-2 infection. Evidence exists to support preserved polyfunctional cellular specific responses [30-32], and broad neutralizing antibodies are found in HIV-2 infected patients [33,34]. However, the debate continues as to whether these are the cause or the consequence of the control of viral replication and/or of a better preserved immune system [23]. Given the importance of the innate immunity in defining host-pathogen interactions, it is plausible that DC and other components of the innate response play a role. Accordingly, NK numbers and cytolytic activity have been shown to be better maintained in HIV-2 than in HIV-1 infection [35].

Importantly, a recent study showed that pDC are less susceptible to HIV-2 than to HIV-1 infection *in vitro* [36]. pDC express CD4 and both the HIV co-receptors CXCR4 and CCR5, and may be infected by HIV-1 *in vitro* and *in vivo* [37,38]. Moreover, pDC apoptosis may be triggered by the binding of HIV-1 envelope protein gp120 in the absence of direct infection [39].

In this study we characterized for the first time circulating pDC in HIV-2 infected patients in order to generate insights into their role in HIV/AIDS pathogenesis. A similar marked reduction in the frequency of circulating pDC was found in untreated HIV-1 and HIV-2 infections that correlated with the degree of CD4 depletion and T cell activation, in spite of the absence of detectable viremia documented in the majority of HIV-2 patients. However, in contrast with HIV-1, IFN- α production upon TLR9 stimulation was relatively preserved in HIV-2 infection, except in the few HIV-2 patients with detectable viremia in whom major impairments were found.

Results

HIV-2 infection is associated with a marked reduction of circulating pDC that correlates with CD4 depletion

HIV-2 infection is characterized by reduced to undetectable viremia [11-15] and a much slower rate of CD4 decline as compared to HIV-1 [19,20]. We first asked whether this “favourable” outcome is associated with the preservation of circulating pDC. For this purpose, pDC were defined within freshly isolated PBMC as HLA-DR⁺CD123⁺CD11c⁻ after the exclusion of cell-lineage markers, as illustrated in Fig. 1A. Cohorts of untreated HIV-2 and HIV-1 individuals with similar degrees of CD4⁺ T cell depletion but distinct viremia were evaluated (Table 1).

Table 1. *Characteristics of the cohorts studied*

| | Healthy controls | HIV-1- infected patients | HIV-2 –infected patients |
|---|-------------------------------------|---|---|
| Number (male/female) | 18 (7/11) | 22 (17/5) | 28 (9/19) |
| Age, years | 42 ± 2 [25-57] | 39 ± 2 [23-61] [#] | 48 ± 3 [19-78] |
| Ethnicity: Caucasian/ Black | 16/2 | 16/6 | 14/14 |
| CD4 ⁺ T cell count , cells/μl | 935 ± 63 [518-1397] ^a | 569 ± 105 [18-1848] ^{**} | 666 ± 80 [52-1511] [*] |
| % CD4 ⁺ T cells | 44.9 ± 2.0 [34.4-61.1] ^a | 22.8 ± 3.3 [1.3-47.2] ^{***} | 28.5 ± 2.6 [7.1-54.1] ^{***} |
| Viremia, HIV RNA copies/ml | NA | 672,310 ± 294,026 [40-4,470,000] ^{b;#} | 3,035 ± 1,125 [200-26,263] ^b |
| % HLA-DR ⁺ within CD4 ⁺ T cells | 4.1 ± 0.4 [1.9-7.6] ^c | 17.8 ± 3.1 [1.7-54.5] ^{d;***} | 11.3 ± 1.7 [1.9-36.3] ^{**} |
| % HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ within CD8 ⁺ T cells | 4.4 ± 1.4 [1.3-22.7] ^c | 29.7 ± 4.2[1.4-62.2] ^{d;***} | 20.6 ± 3.6 [0.6-69.5] ^{**} |

NA, not applicable. Data are mean±SEM with limits in brackets. [#] p<0.05 in comparison with HIV-2 infected patients; ^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001 in comparison with healthy individuals.

^a n=17; ^b 4 out of 22 HIV-1 patients and 20 out of 28 HIV-2 patients had undetectable viremia. In these cases, the cut-off value of the test (40 and 200 RNA copies/ml for HIV-1 and HIV-2, respectively) was used to calculate the mean; ^c n=16; ^d n=21.

HIV-1 and HIV-2 infected patients exhibited a similar marked reduction in blood pDC as compared to seronegative controls, assessed both as percentage of total PBMC, and as absolute numbers (Fig. 1B).

In order to evaluate whether the two infections also have similar levels of pDC depletion in early and advanced HIV disease, we stratified the HIV-1 and HIV-2 cohorts according to CD4⁺ T cell counts (>350 and <350 CD4⁺ T cells/μl). As previously reported [40-43], in HIV-1 infection pDC depletion was more marked in the advanced disease stage (Fig. 1C). Of note, we found comparable pDC levels in advanced HIV-2 infected

patients (Fig. 1C). Moreover, a similar significant depletion was also documented in early disease in both infections as compared to seronegative subjects (Fig. 1C).

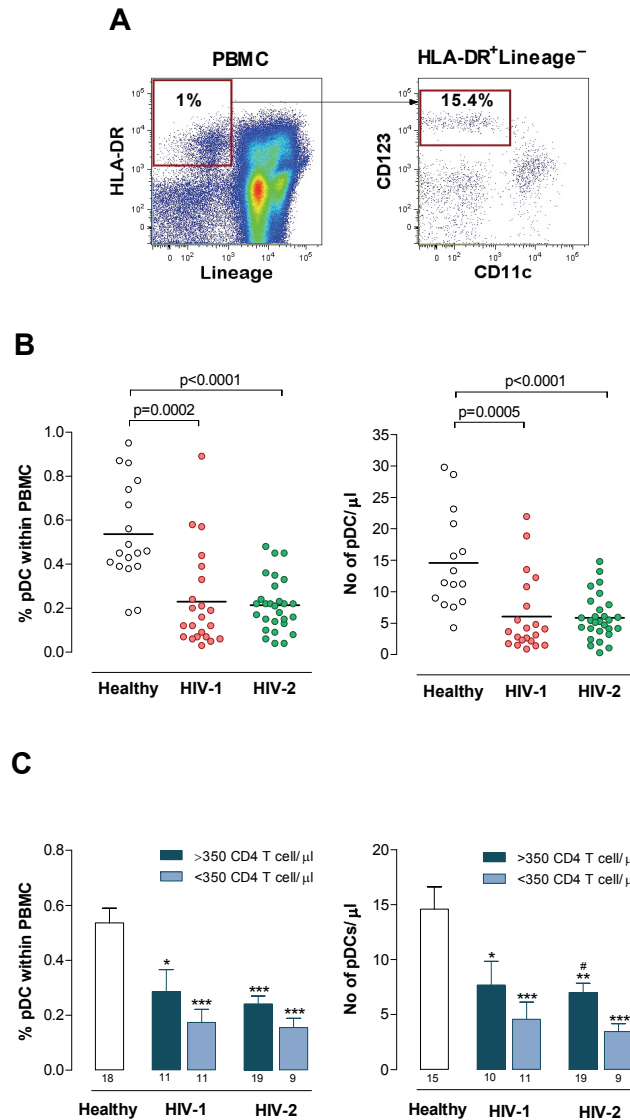


Figure 1. Similar reduction of circulating pDC in HIV-1 and HIV-2 infections. A representative flow cytometric pDC analysis is shown in (A). After a large gate including lymphocytes and monocytes defined by forward and side scatter, cells were further gated on HLA DR⁺ cells that do not express lineage markers (left dot-plot). pDC were subsequently identified as CD123⁺CD11c⁻ cells (right dot-plot). Numbers represent the percentage of cells within the illustrated gates from an HIV-2-infected patient with 523 CD4⁺ T cells/μl and undetectable viremia. The proportion of pDC within PBMC is 0.15% corresponding to 4 pDC/μl. (B) Graphs show circulating pDC levels in HIV-1 and HIV-2 infected cohorts and healthy controls expressed as percentage within PBMC and absolute numbers. Each dot represents one individual and bars represent mean. (C) The infected cohorts were stratified according to CD4⁺ T cell counts (> 350 and < 350 cells/μl) and pDC levels compared as percentages and absolute numbers. Bars represent mean±SEM. Numbers under the bars represent the total individuals analyzed. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared to pDC levels in controls. #p<0.05 between early and advanced HIV-2 cohorts.

The association of pDC levels with disease progression in HIV-2 infection is further demonstrated by the statistically significant positive correlation found between the frequencies of pDC and circulating CD4⁺ T cells (Fig. 2A).

Hence, HIV-1 and HIV-2 diseases are associated with similar extent of pDC depletion in spite of the slower rate of CD4 decline and the better prognosis that characterize HIV-2 infection.

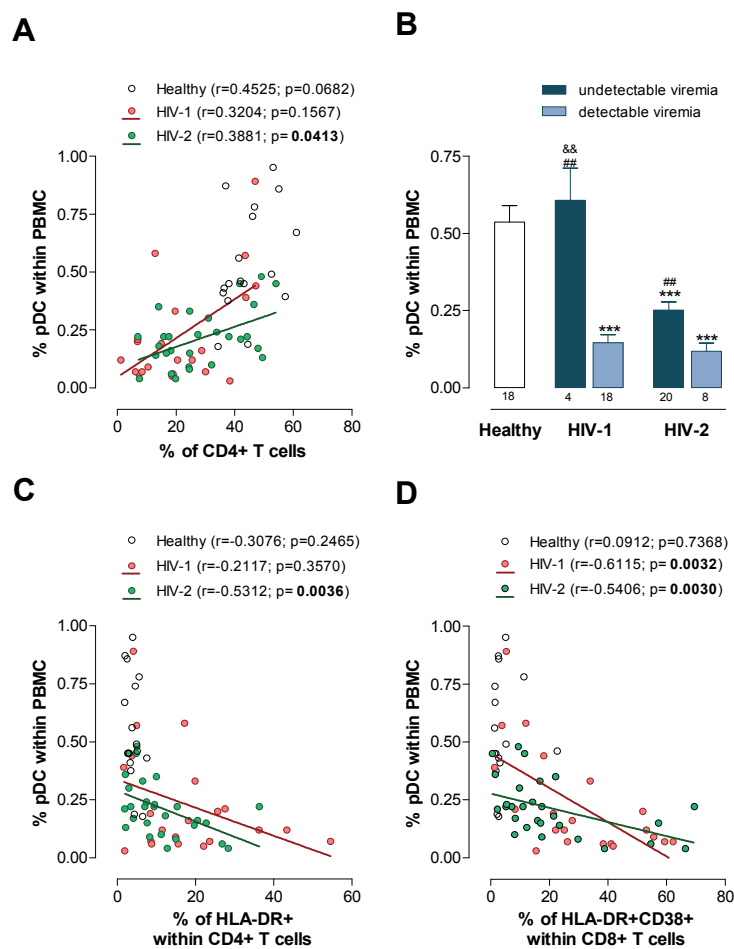


Figure 2. Relationship of pDC levels with CD4⁺ T cells, T cell activation and viremia. Correlation between percentage of pDC within PBMC and percentage of CD4⁺ T cells (A), percentage of HLA-DR within CD4⁺ T cells (C), as well as percentage of HLA-DR⁺CD38⁺ within CD8⁺ T cells (D), in HIV-2 and HIV-1 infections. Comparison of the pDC frequencies in the infected cohorts divided into viremic and “aviremic” (below test cut-off) groups (B). Bars represent mean±SEM. Numbers under the bars represent the total individuals analyzed. *** $p<0.001$ as compared to controls. ## $p<0.01$ between aviremic and viremic patients of the same cohort. && $p<0.01$ between HIV-1 and HIV-2 “aviremic” patients.

HIV-2 infected patients with undetectable viremia showed a marked decrease of circulating pDC

Plasma viremia is thought to be a major determinant of pDC depletion in HIV-1 infection [7,40,42-45]. HIV-1 and HIV-2 infections are associated with markedly distinct plasma viral loads [11-15]. As shown in Table 1, 20 out of 28 HIV-2 infected patients had undetectable viremia and those with detectable viremia showed levels significantly lower than the ones found in HIV-1 patients. Of note, the highest viremia documented in the HIV-2 cohort was 26,263 RNA copies/ml.

In order to address the impact of viremia on the levels of circulating pDC, we divided the patients into two groups, viremic and “aviremic” (levels below the test cut-off). As shown in Fig. 2B, the HIV-2 group with undetectable viremia exhibited significantly lower pDC levels than the seronegative cohort. In addition, HIV-2 infected patients with detectable viremia had significantly lower pDC levels than the “aviremic” HIV-2 patients (Fig. 2B). However, it is important to stress that HIV-2 viremic individuals had significantly lower CD4⁺ T cell counts than HIV-2 “aviremic” (356±60 cells/μl, n=8, and 790±97 cells/μl, n=20, respectively, p=0.0112).

Nevertheless, a significant inverse correlation between the frequency of pDC within PBMC and viremia was observed in both HIV-2 ($r=-0.4485$; $p=0.0089$; $n=28$) and HIV-1 ($r=-0.7684$; $p<0.0001$; $n=22$) cohorts.

As shown in Fig. 2B, HIV-1 individuals with undetectable viremia do not exhibit pDC depletion. The HIV-1 patients able to control viral replication in the absence of antiretroviral drugs are considered to represent less than 1% of HIV-1 infected individuals [46]. Our small group of 4 HIV-1 “aviremic” individuals had follow-ups with undetectable viremia ranging from 2 to 10 years and showed relatively well preserved CD4⁺ T cell counts (814±242 cells/μl; range 344-1425). Similar findings were obtained when circulating pDC numbers were analysed instead of pDC frequency (data not shown).

In summary, in agreement with previous reports [40,42,43,45], we found a significant negative correlation between viremia and pDC levels in HIV-1 infection. However, a major reduction of circulating pDC levels was found in HIV-2 infected

patients with undetectable viremia, showing that HIV-2 infected patients exhibited a major reduction in circulating pDC irrespective of the presence of detectable plasma viral load.

The decrease in circulating pDC correlates with T cell activation in both infected cohorts

Both HIV-1 and HIV-2 infections are associated with a persistent generalized immune-activation, which is considered a main determinant of the immunodeficiency and that inversely correlates with CD4⁺ T cell counts [22,24,47]. We assessed the relationship between pDC levels and expression of activation markers on T cells. HIV-2 infected cohort exhibited a significant inverse correlation between the frequency of pDC and the proportion of CD4⁺ T cells expressing HLA-DR as well as of CD8⁺ T cells that simultaneously expressed HLA-DR and CD38 (Fig. 2C and 2D). In the case of HIV-1 infection, a significant inverse correlation was only found with CD8⁺ T cell activation, as shown in Fig. 2C and 2D. Similar findings were obtained in relation to the absolute number of circulating pDC as well as in relation to other parameters of CD8⁺ T cell activation, namely the percentage and mean fluorescence intensity (FI) of CD38 expression (data not shown).

Overall, pDC depletion directly correlates with T cell activation in both infections.

Phenotype of circulating pDC

We next asked whether the phenotype of circulating pDC differ in the two infections. The co-stimulatory molecule CD86 was similarly over-expressed on pDC in the HIV-1 and HIV-2 infected cohorts and this increase was statistically significant as compared to healthy controls (Fig. 3A). No significant correlation was found between the CD86 expression, as assessed by percentage or geomean FI, and percentage of CD4⁺ T cells ($r=-0.0699$ for HIV-1; $r=-0.08539$ for HIV-2, in the case of CD86 geomean FI) or viremia ($r=-0.01922$ for HIV-1; $r=0.1975$ for HIV-2, in the case of CD86 geomean FI) in

both infections. Moreover, we also found no correlation with the different parameters of CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation evaluated. The *ex vivo* expression of the co-stimulatory molecules CD40 and CD80 within pDC was minimal in all individuals (data not shown).

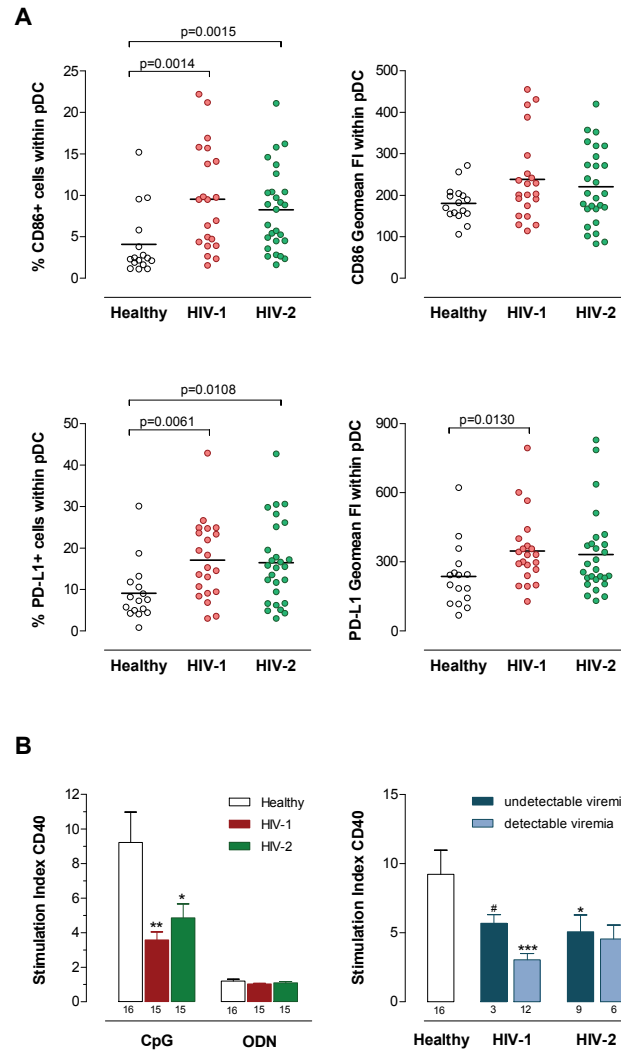


Figure 3. pDC Phenotype. (A) Phenotype of circulating pDC in HIV-1 and HIV-2 infections. Levels of expression of CD86 and PD-L1 on pDC from freshly isolated PBMC assessed as proportion within pDC and as geomean FI within total pDC measured by flow cytometry. Each dot represents one individual and bars represent mean. **(B)** pDC phenotype upon CpG stimulation. Freshly isolated PBMC were stimulated with CpG or the non-CpG ODN control and the pDC phenotype was assessed by flow cytometry after 22 hours. The up-regulation of CD40 expression on pDC is showed as stimulation index defined as ratio between the geomean FI in the presence of CpG or ODN and in its absence (medium). Data are presented within total HIV-1 and HIV-2 cohorts (left graph) and within the infected cohorts grouped according to viremia status (right graph). Bars represent mean±SEM. Numbers under the bars represent the total HIV-1 and HIV-2 infected individuals as well as healthy controls analyzed. The subgroups of patients analyzed are representative of their respective patient population described in Table 1 with respect to CD4 counts and viral load. There is no significant differences between HIV-1 and HIV-2 cohorts. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared to controls. #p<0.05 between aviremic and viremic patients of the HIV-1 cohort.

Programmed death-1 (PD-1) signaling mediates an inhibitory pathway of T cell response and its over-expression is considered to contribute significantly to the impairment of specific T cell responses in HIV-1 infected individuals [48]. We compared the expression of PD-1 ligands on pDC and found a statistically significant increase in the percentage of PD-L1⁺ pDC in both infections as compared to healthy controls (Fig. 3A). In addition, the increase in the PD-L1 geomean FI within total pDC also reached statistical significance in HIV-1 infected individuals in comparison with healthy controls (Fig. 3A). Again, no significant correlation was found between PD-L1 expression and percentage of CD4⁺ T cells ($r=0.1200$ for HIV-1; $r=-0.02762$ for HIV-2, in the case of PD-L1 geomean FI), or viremia ($r=-0.02476$ for HIV-1; $r=-0.2501$ for HIV-2, in the case of PD-L1 geomean FI), or the T cell activation markers assessed in both infections. pDC expression of PD-L2 was minimal in all the three cohorts (data not shown).

In summary, both CD86 and PD-L1 were similarly up-regulated on pDC of both HIV-2 and HIV-1 cohorts, irrespective of disease stage.

Modulation of pDC phenotype by TLR9 stimulation *in vitro*

pDC are known to express TLR9, which binds to unmethylated CpG motifs, and to mature upon TLR9 signaling [3,49]. We assessed the modulation of pDC phenotype upon TLR9 stimulation by stimulating freshly isolated PBMC with a TLR9 ligand (CpG type A) or a non-CpG oligodeoxynucleotide (ODN) as a negative control. After 22h, cells were harvested and analysed within a pDC gate as described above.

CD86 and PD-L1 were also found to be up-regulated by the control non-CpG ODN (data not shown), precluding their use to evaluate pDC maturation induced by CpG. Therefore, we focused our analysis on the CD40 and CD80 molecules that, although exhibiting reduced *ex vivo* expression, were specifically up-regulated upon CpG stimulation. Results are shown as stimulation index (SI) calculated as the ratio of the geomean FI measured in the presence of CpG and medium alone. The capacity of pDC to up-regulate CD40 after CpG stimulation was significantly decreased both in HIV-1 and in HIV-2 individuals relative to healthy controls (Fig. 3B). An impairment of CD80 up-

regulation was also documented in both infections, though without reaching statistical significance in comparison with controls (CD80 SI: 2.4 ± 0.3 for seronegatives, 1.9 ± 0.1 for HIV-1, 1.9 ± 0.1 for HIV-2).

The stimulation index for CD40 geometric FI was found to have a significant positive correlation with the percentage of CD4⁺ T cells ($r=0.8451$; $p<0.0001$) and a negative correlation with viremia ($r=-0.7312$; $p=0.002$) in the HIV-1 cohort, but no significant correlations were found in the HIV-2 cohort ($r=-0.065$ with percentage of CD4⁺ T cells; and $r=0.0846$ with viremia). Moreover, in contrast to the HIV-1 cohort, similar levels were found in HIV-2 patients with detectable and undetectable viremia (Fig. 3B).

Overall, the circulating pDC of HIV-infected individuals showed a reduced ability to further differentiate upon CpG-A stimulation as compared to seronegative controls.

Assessment of IFN- α production upon TLR9 stimulation

IFN- α production is mainly triggered through TLR7 and TLR9 [3]. CpG-A has been shown to preferentially act on pDC [49] and was used here to assess pDC ability to secrete IFN- α upon TLR9 stimulation.

Both HIV-1 and HIV-2 infected cohorts exhibited a significantly lower IFN- α production upon CpG stimulation as compared to healthy controls (Fig. 4A). Patients with less than 350 CD4⁺ T cells/ μ l tended to produce lower IFN- α levels than the patients with higher CD4 counts (Fig. 4B). The ability to produce IFN- α was also significantly lower in viremic than “aviremic” cohorts in both infections (Fig. 4C).

We estimated the IFN- α production on a per cell basis, by dividing the concentration of IFN- α produced upon CpG stimulation by the absolute number of pDC in the culture. Although there was a decrease in the ability of pDC to produce IFN- α in both infections, significantly higher estimated IFN- α levels per pDC were found in HIV-2 than in HIV-1 infected patients (Fig. 4D). Patients with less than 350 CD4⁺ T cells/ μ l had lower levels of IFN- α production per pDC (Fig. 4E), but no significant correlation was found between IFN- α production per pDC and the degree of CD4 depletion in either infection. Importantly, when the cohorts were divided according to the viremia status, the HIV-2

patients with undetectable viremia exhibited preserved levels of IFN- α production per pDC (Fig. 4F). Moreover, detectable HIV-2 viremia was associated with a significant decrease in the levels of IFN- α per pDC, reaching levels similar to the ones documented in HIV-1 viremic patients (Fig. 4F). In agreement, a significant correlation was documented between IFN- α production per pDC and viremia in the HIV-2 cohort ($r=-0.5849$; $p=0.0054$; $n=21$) that was not observed in the HIV-1 cohort ($r=-0.3298$; $p=0.23$; $n=16$). These data suggest a major role of plasma viral load, even at low levels such as those found in HIV-2 patients, in the impairment of IFN- α production.

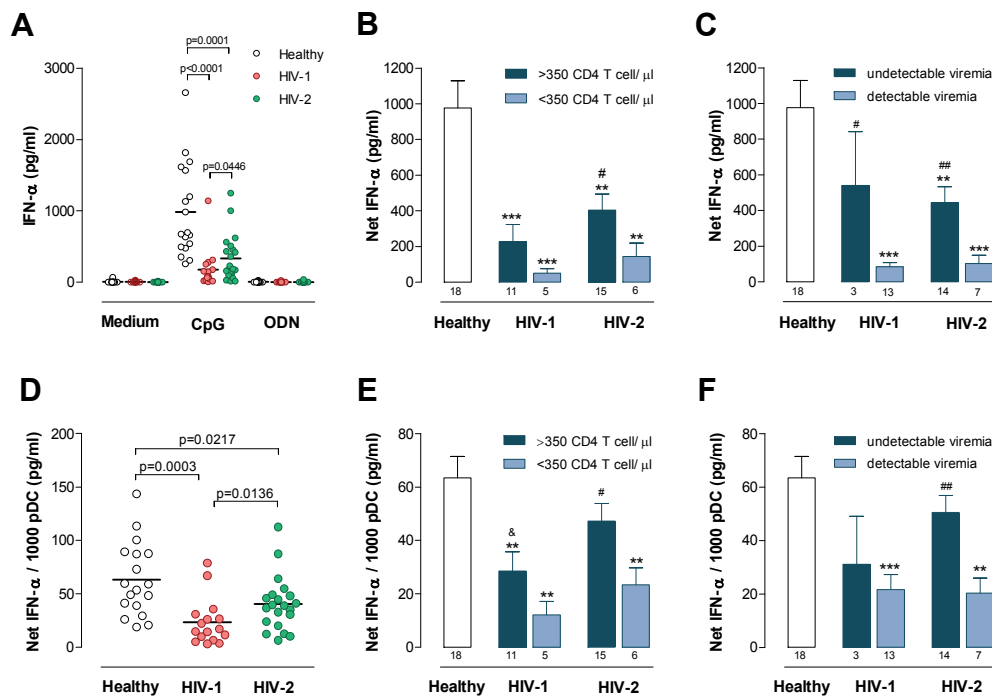


Figure 4. IFN- α production upon CpG stimulation. Freshly isolated PBMC were stimulated with CpG or the non-CpG ODN control. After 22 hours IFN- α was quantified in culture supernatants by ELISA. **(A)** Levels of IFN- α upon CpG or the non-CpG ODN control in healthy, HIV-1 and HIV-2 cohorts. The infected cohorts were further stratified according to CD4⁺ T cell counts **(B)** or the presence or absence of detectable viremia **(C)** and the levels of IFN- α upon CpG stimulation are shown. Results expressed as “net IFN- α ” refer to the amount of IFN- α produced upon CpG stimulation subtracted by the IFN- α measured with medium alone. The “net IFN- α ” was divided by the total number of pDC in the culture and results are shown for the healthy, HIV-1 and HIV-2 cohorts **(D)**, as well as for the infected cohorts stratified according to CD4⁺ T cell counts **(E)** or the presence or absence of detectable viremia **(F)**. Each dot represents one individual. Bars represent mean \pm SEM. Numbers under the bars represent the total individuals analyzed. The subgroups of patients analyzed are representative of their respective patient population described in Table 1 with respect to CD4 counts and viral load. $**$ $p<0.01$ and $***$ $p<0.001$ as compared to controls. $\#$ $p<0.05$ and $###$ $p<0.01$ between the two groups of the same HIV-1 or HIV-2 cohort. $\&$ $p<0.05$ between HIV-1 and HIV-2 patients with >350 CD4⁺ T cells.

CpG has been suggested to modulate the production of other cytokines both directly and indirectly through effects mediated by CpG-induced IFN- α [2]. We investigated the effect of CpG stimulation on the production of IL-10, IL-12p40, TNF- α and the β -chemokine MIP-1 β by measuring their levels in the culture supernatants using a Luminex-based multiplex assay. Of note, the analysis of the combined cohorts revealed a direct correlation between the levels of IFN- α production upon CpG stimulation and the levels of TNF- α ($r=0.4033$, $p=0.0027$ for net IFN- α and $r=0.4207$, $p=0.0017$ for net IFN- α /1000pDC; $n=53$) and MIP-1 β ($r=0.3978$, $p=0.0035$ for net IFN- α and $r=0.4272$, $p=0.0016$ for net IFN- α /1000pDC; $n=52$). No such correlations were found in the case of IL-10 or IL-12p40. As illustrated in Fig. 5A the most striking finding was a reduced ability of HIV-1 infected individuals to produce MIP-1 β and TNF- α , as compared to healthy and HIV-2 infected cohorts upon CpG stimulation. These decreases were clearer when the stimulation index was analysed as illustrated in Fig. 5B. Of note, when the HIV-2 cohort was split accordingly to viremia status, the individuals with undetectable viremia exhibited a preserved ability to produce TNF- α (Fig. 5C) and MIP-1 β (data not shown) in response to CpG stimulation, whereas the patients with detectable viremia showed a decrease in stimulation indexes similar to HIV-1 infected patients. However, despite the clear trends ($p=0.07$ in the case of the viremic cohorts as compared to healthy controls), none of these differences reached statistical significance (Fig. 5C). These data suggest that viremia impacts on the ability to produce pro-inflammatory cytokines upon TLR9 stimulation *ex vivo* in HIV-2 infected individuals, as documented for IFN- α .

Despite the consensual data regarding the decreased ability of pDC to produce IFN- α upon *in vitro* stimulation in HIV-1 infected patients [40,41,45,50], there are conflicting results regarding circulating IFN- α levels [43,51-53]. To our knowledge, there are no reports of serum IFN- α levels in chronic HIV-2 infection. We assessed serum IFN- α by ELISA and found that, similarly to seronegative donors, all HIV-2 and the majority of HIV-1 infected patients had undetectable levels ($< 12,5$ pg/ml). The only exceptions were two advanced HIV-1 infected patients with 13,18 pg/ml and 22,16 pg/ml of IFN- α (patients with 6.5 and 5.7 log₁₀ RNA copies/ml, and with 18 and 290 CD4⁺ T cells/ μ l, respectively).

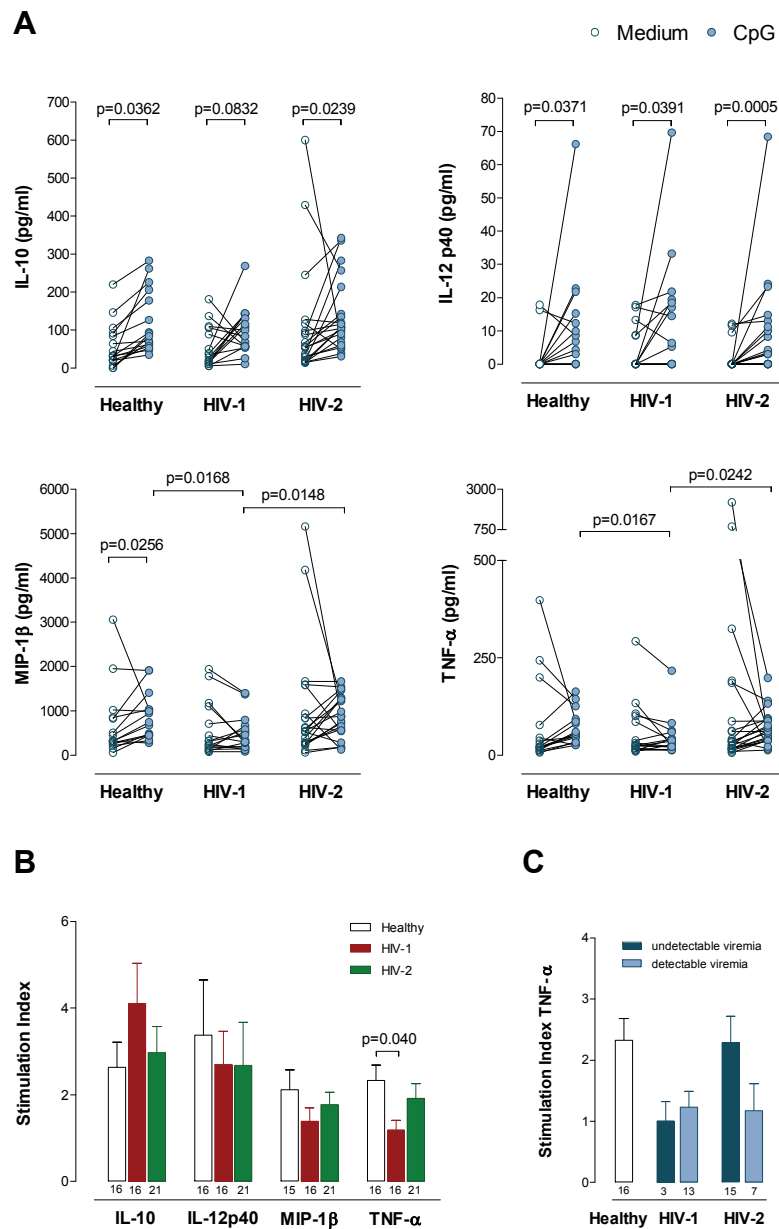


Figure 5. IL-10, IL-12p40, MIP-1 β and TNF- α levels upon CpG stimulation in Healthy, HIV-1 and HIV-2 cohorts. Freshly isolated PBMC were cultured in the absence or in the presence of CpG. After 22 hours, culture supernatants were harvested and analyzed for the secretion of IL-10, IL-12, MIP-1 β and TNF- α using the Luminex multiplex assay. **(A)** Cytokine levels. Each dot represents one individual. The levels observed in non-stimulated cultures (open symbols) are connected with those documented in the presence of CpG (closed symbols), and were compared using Wilcoxon test. **(B)** Stimulation indexes defined as ratio between the level of cytokine in the supernatant of the culture in the presence of CpG and in its absence (medium) in the three cohorts. **(C)** The HIV-2 and the HIV-1 cohorts were split accordingly to the presence of detectable and undetectable viremia and the stimulation indexes for TNF- α are shown. Bars represent mean \pm SEM. Numbers under the bars represent the total individuals analyzed. The subgroups of patients analyzed are representative of their respective patient population described in Table 1 with respect to CD4 counts and viral load. The Mann-Whitney test was used to compare the data of the HIV-2, HIV-1 and healthy cohorts, and the significant p values (<0.05) are shown.

In summary, despite the similar decrease of pDC in both infections, pDC from HIV-2-infected patients appear to better preserve their ability to produce IFN- α upon CpG stimulation. Of note, no increase in the *ex vivo* levels of serum IFN- α was documented in HIV-2 infection. However, detectable viremia was associated with a similar impairment of IFN- α production in both infections, suggesting a major role of circulating virus in the pDC functional impairment *in vitro*.

Discussion

This study characterized for the first time circulating pDC in individuals with HIV-2 infection. A similar decrease in pDC levels was found in untreated HIV-2 and HIV-1 infections in spite of the much lower viremia and slower rate of disease progression that distinguishes HIV-2 disease. Importantly, a significant depletion of circulating pDC was documented even in HIV-2 infected individuals with undetectable viremia. The pDC levels were directly correlated with the degree of CD4⁺ T cell depletion and T cell activation in both infections. Conversely, viremia appears to have a major impact on the ability of the remaining pDC to produce IFN- α upon TLR9 stimulation *in vitro* in HIV-2 infected patients.

HIV-1 infection has been consistently shown to be associated with reduced frequency and impaired function of circulating pDC, both during primary and chronic infection [40-45,50,51]. These defects have been found to be more pronounced in individuals with higher viremia [40,42-45] and/or lower CD4⁺ T cell counts [42-44] and to be associated with the development of opportunistic infections and tumors [40]. Viral infection and induction of pDC apoptosis are thought to significantly contribute to the pDC depletion during both HIV-1 and SIV disease [39]. However, HIV-2 was shown to be less able than HIV-1 to infect pDC *in vitro* [36] and reduced levels of viral replication are documented in HIV-2 infected patients [11-15]. Therefore, the finding of a similar reduction of pDC levels was unexpected and suggests that it may be related to other mechanisms than direct viral effects. This possibility is further supported by the delayed

and frequently incomplete recovery of pDC numbers and function following long-term successful antiretroviral treatment in HIV-1 seropositive patients [44,45,51].

Traffic alterations have also been suggested to contribute to the reduced levels of circulating pDC in HIV-1 infection. Several *in vitro* studies have documented a viral-associated up-regulation of molecules, such as CCR7 on pDC, that may contribute for their preferential homing to lymphoid tissues [54]. However, the changes in cell redistribution have not been consistently confirmed either in HIV-1 infected patients [7,55-57] or in non-human primates infected with SIV [58-61]. Although there are studies that demonstrated an increase in pDC counts in lymph nodes and spleen during HIV-1 and SIV infections [55-57,59,60], other studies reported a parallel pDC decrease in the peripheral blood and lymphoid tissues [58] and an increase in pDC primed to apoptosis in the lymph nodes [61]. There are no data available on lymphoid tissues during HIV-2 disease. Of note, the establishment of HIV-2 infection is associated with levels of proviral DNA similar to those found in HIV-1, suggesting an equivalent viral dissemination despite the reduced HIV-2 viremia [26-29,62]. Therefore, it is plausible that HIV-2 RNA and/or HIV-2 proteins may induce pDC maturation and migration. In agreement, we found the same alterations in the phenotype of circulating pDC in the two infections, and these changes were not associated with disease stage or viremia status. Of note, PD-L1 has been shown to be up-regulated in pDC upon TLR stimulation by HIV-1 products [63].

Strong correlations between pDC decline and up-regulation of markers of T cell activation both in HIV-2 and HIV-1 infections represent another important finding of our study. We have previously shown that generalized immune activation is likely to be a main determinant of HIV-2 disease progression [22,24], as has been demonstrated in HIV-1 infection [22,24,53,64]. Persistent HIV-2 infection is thought to induce a chronic stimulation of the immune system leading to a progressive T cell impairment and CD4 depletion, though at much slower rates than in HIV-1 infection [22,24,47]. The generalized pro-inflammatory state is likely to contribute to pDC depletion both by altered cell traffic and apoptosis susceptibility, as well as through the impairment of the ability of DC precursors to differentiate. On the other hand, besides their antiviral

properties, pDC are increasingly viewed as conductors of the immune activation associated with HIV/AIDS pathogenesis [6]. In this respect, a dual role has been suggested. A deleterious contribution of the pDC-mediated activation of other cells of the immune system [9] was further supported by the recently documented impairment of pDC activation and IFN- α production in sooty mangabeys, a natural host of SIV infection that are known to exhibit reduced levels of immune activation and do not progress to AIDS [8]. Additionally, pDC were shown to be able to induce regulatory T cells upon activation by HIV-1 through an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-mediated mechanism [65] and, in this way, modulate immune activation and limit HIV specific responses [65,66].

Despite some discrepant results, there is usually no significant increase in circulating IFN- α levels until advanced HIV-1 disease stages [43,51-53]. In agreement, we were unable to detect increased serum IFN- α in the large majority of HIV-1 infected patients. We also found no detectable serum levels of IFN- α during HIV-2 infection.

Importantly, although a decrease in the pDC ability to produce IFN- α *in vitro* has been consistently observed during HIV-1 infection [40,41,45,50], several lines of evidence suggest that there is increased production of IFN- α *in vivo*. HIV-1 infected patients have been shown to exhibit increased transcriptional levels of IFN- α and of several genes that are known to be induced by IFN- α [7,39,67]. There are no data on HIV-2 infected patients.

This paradox between reduced *in vitro* production and indirect evidence of increased production *in vivo* has been interpreted as a result of continuous pDC stimulation by TLR ligands *in vivo* leading to a refractory state of the pDC [7]. HIV-1 itself has been shown to modulate pDC function, particularly through the binding of viral RNA to TLR7 [68], as well as through the impairment of TLR9 signaling by the envelope protein gp120 [69]. The corresponding HIV-2 envelope protein, gp105, was shown to exhibit distinct impacts in several immunological systems [70-73], but there are no data on its effects on TLR9 signaling.

We tested here the IFN- α production upon TLR9 stimulation *in vitro* and found it to be significantly impaired in HIV-2 infected individuals. Given the limited volume of

patient samples, we selected CpG type A as a standard TLR9 ligand thought to target mainly pDC [49]. A similar decrease in IFN- α production upon CpG stimulation of whole blood cultures was also recently reported in HIV-2 and HIV-1 infected cohorts in Guinea-Bissau, West Africa, as compared to non-infected individuals [74].

As discussed above, HIV-2 infected individuals are thought to have reduced levels of viral replication and, therefore, it is expected that their pDC would be exposed to much less HIV-related molecules able to signal through TLR. Importantly, when we split the HIV-2 cohort according to viremia status, we found that the individuals with undetectable viremia exhibited a preserved IFN- α production on a per pDC basis. These data suggested that despite their reduced number, pDC function was preserved in HIV-2 infected patients without detectable circulating virus. In contrast, a similar impairment in IFN- α production was found in viremic HIV-2 and HIV-1 infected patients despite the average 2 log₁₀ difference in the number of plasma viral RNA copy numbers. These results suggest that even low levels of circulating virus are sufficient to intrinsically impair IFN- α production by pDC or to induce a pDC refractory state that prevents their subsequent response to further TLR9 stimulation.

In conclusion, we reported here for the first time a major depletion of circulating pDC during HIV-2 infection, a unique natural model of “attenuated” HIV immunodeficiency. This decrease was observed early in disease and also in HIV-2 infected patients with undetectable viremia, suggesting that mechanisms other than pDC direct viral infection play major roles in their depletion during persistent infections. On the other hand, viremia was associated with an impairment of IFN- α production on a per pDC basis upon TLR9 stimulation, in agreement with the possibility that diminished function *in vitro* is likely a consequence of prior activation by HIV virions *in vivo*.

Materials and Methods

Ethics statement

The study was approved by the Ethical Board of the Faculty of Medicine, University of Lisbon. All subjects gave informed consent to blood sampling and processing.

Studied cohorts

A cross-sectional study was performed involving 28 HIV-2 and 22 HIV-1 infected patients without ongoing opportunistic infections or tumours, followed at Hospital de Santa Maria in Lisbon, Portugal. 18 HIV-seronegative age-matched control subjects were studied. Cohort characterization is summarized in Table 1.

Cell isolation and culture

PBMC were isolated from heparinized blood immediately after venopuncture by Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) density gradient centrifugation. PBMC were cultured at 2×10^6 cells/ml in 24-well plates in 1.5ml of RPMI1640 supplemented with 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine (all from Gibco-Invitrogen, Paisley, U.K.) and 10% human AB serum (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 37 °C with 5% CO₂, in the absence or presence of 10 µg/ml class A CpG-ODN 2336 (5'-ggGACGACGTCGTGgggggG-3') or the non-CpG-ODN 2243 control (5'-ggGGGAGCATGCTGGggggG-3') provided by Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA). After 22h, cells were harvested for phenotypic analysis and culture supernatants stored at -80 °C for subsequent cytokine evaluation.

Cell surface staining by flow cytometry

PBMC surface staining was performed as previously described [75], and analysed for pDC frequency *ex vivo* with the following anti-human conjugated antibodies: FITC

conjugated lineage (Lin) markers (CD3 and CD14 from Sanquin, Amsterdam, Netherlands; CD16 from BD Biosciences, San Jose, CA; and CD20 from eBioscience, San Diego, CA); HLA-DR PerCP (L243, BD Biosciences); CD123 PE-Cy7 (6H6, eBioscience), and CD11c-*Allophycocyanin* (B-ly6, BD Biosciences). Analysis was done within a large gate including lymphocytes and monocytes, defined according to their forward/side scatter characteristics. pDC were defined as Lin⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD11c⁻. Gated pDC were further analysed using PE-conjugated mAbs against CD40 (5C3) and PD-L2 (MIH18) from eBioscience, CD80 (L307.4, BD Biosciences) and *Allophycocyanin*-conjugated mAbs against CD86 (FUN-1, BD Biosciences) and PD-L1 (MIH1, eBioscience). The same strategy was applied to evaluate the phenotype of pDC after *in vitro* culture of PBMC with CpG-ODN. At least 400,000 events were acquired within a lymphocyte+monocyte gate, using a CANTO flow cytometer (BD Biosciences), and analysed using FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). The absolute numbers of pDC/ μ l of blood were calculated by multiplying their representation by the sum of the absolute lymphocyte and monocyte counts obtained at the clinical laboratory. The expression of pDC surface markers was evaluated both in terms of percentage and of geomean FI.

Quantification of cytokines

IFN- α was quantified in serum samples and in culture supernatants using the VeriKineTM Human IFN-Alpha Serum Sample ELISA and Human IFN-Alpha ELISA Kit, respectively (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ), according to manufacturer's instructions. IL-10, IL-12p40, MIP-1- β and TNF- α were quantified in the supernatants of PBMC cultured as described above using the Human Cytokine LINCOplex Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA) and the Luminex LX100 (Luminex Corporation, Austin, TX) according to manufacturer's instructions. Samples were assayed in duplicate.

Plasma viral load assessment

HIV-1 viremia was quantified by RT-PCR (detection threshold of 40 RNA copies/ml, Roche, Basel, Switzerland). HIV-2 viremia was quantified using a RT-PCR-based assay [15] with a detection limit of 200 RNA copies/ml. The cut-off values of the tests were considered for the purpose of the analysis in the cases where detection was below this level.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). The data are presented as arithmetic mean \pm SEM and were compared using Mann-Whitney test and Wilcoxon matched pairs test as appropriate. Spearman's correlation coefficient was used to assess the correlation between two variables. *p*-values <0.05 were considered to be significant.

Acknowledgements

We would like to thank Emília Valadas, Manuela Doroana, Sara Sousa, Luis França, and Francisco Antunes from the Infectious Disease Department as well as Margarida Lucas and Luis Pinheiro from the Internal Medicine Department of the University Hospital of Santa Maria, Faculty of Medicine of the University of Lisbon for the collaboration in the follow-up of the cohorts and collection of clinical data.

References

1. Villadangos JA, Young L (2008) Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29: 352-361.
2. Liu YJ (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306.

3. Gilliet M, Cao W, Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8: 594-606.
4. Poli G, Orenstein JM, Kinter A, Folks TM, Fauci AS (1989) Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 244: 575-577.
5. Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB, Pitha PM (1989) Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-trans-activated alpha 2-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4958-4962.
6. Herbeuval JP, Shearer GM (2007) HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123: 121-128.
7. Tilton JC, Manion MM, Luskin MR, Johnson AJ, Patamawenu AA, et al. (2008) Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *J Virol* 82: 3997-4006.
8. Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, Kozyr N, Chavan R, et al. (2008) Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* 14: 1077-1087.
9. Boasso A, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Shearer GM (2008) HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation. *PLoS ONE* 3: e2961.
10. Sedaghat AR, German J, Teslovich TM, Cofrancesco J, Jr., Jie CC, et al. (2008) Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J Virol* 82: 1870-1883.
11. Simon F, Matheron S, Tamalet C, Loussert-Ajaka I, Bartczak S, et al. (1993) Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* 7: 1411-1417.
12. Berry N, Ariyoshi K, Jaffar S, Sabally S, Corrah T, et al. (1998) Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1: 457-468.
13. Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, et al. (1999) Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 180: 1116-1121.
14. Andersson S, Norrgren H, da Silva Z, Biague A, Bamba S, et al. (2000) Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 160: 3286-3293.
15. Soriano V, Gomes P, Heneine W, Holguin A, Doruana M, et al. (2000) Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 61: 111-116.
16. Marlink R (1996) Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS* 10: 689-699.
17. Rowland-Jones SL, Whittle HC (2007) Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 8: 329-331.
18. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, Guetard D, Favier V, et al. (1987) Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* 316: 1180-1185.
19. Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, et al. (1994) Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265: 1587-1590.

20. Drylewicz J, Matheron S, Lazaro E, Damond F, Bonnet F, et al. (2008) Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *AIDS* 22: 457-468.
21. Poulsen AG, Aaby P, Larsen O, Jensen H, Naucner A, et al. (1997) 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 349: 911-914.
22. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE (2002) CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 8: 319-323.
23. de Silva TI, Cotten M, Rowland-Jones SL (2008) HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* 16: 588-595.
24. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM (2002) CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 169: 3400-3406.
25. Schramm B, Penn ML, Palacios EH, Grant RM, Kirchhoff F, et al. (2000) Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J Virol* 74: 9594-9600.
26. Berry N, Ariyoshi K, Jobe O, Ngum PT, Corrah T, et al. (1994) HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1031-1037.
27. Gomes P, Taveira NC, Pereira JM, Antunes F, Ferreira MO, et al. (1999) Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* 37: 453-456.
28. Popper SJ, Sarr AD, Gueye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, et al. (2000) Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* 74: 1554-1557.
29. Soares R, Foxall R, Albuquerque A, Cortesao C, Garcia M, et al. (2006) Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 80: 12425-12429.
30. Zheng NN, Kiviat NB, Sow PS, Hawes SE, Wilson A, et al. (2004) Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses in HIV-1- and HIV-2-infected individuals in Senegal. *J Virol* 78: 13934-13942.
31. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, et al. (2008) Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol* 38: 350-363.
32. Foxall RB, Cortesao CS, Albuquerque AS, Soares RS, Victorino RM, et al. (2008) Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immune activation in infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but not HIV-1. *J Virol* 82: 9795-9799.
33. Bjorling E, Scarlatti G, von Gegerfelt A, Albert J, Biberfeld G, et al. (1993) Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology* 193: 528-530.
34. Rodriguez SK, Sarr AD, MacNeil A, Thakore-Meloni S, Gueye-Ndiaye A, et al. (2007) Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *J Virol* 81: 5331-5338.

35. Nuvor SV, van der Sande M, Rowland-Jones S, Whittle H, Jaye A (2006) Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall. *J Virol* 80: 2529-2538.
36. Duvall MG, Lore K, Blaak H, Ambrozak DA, Adams WC, et al. (2007) Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *J Virol* 81: 13486-13498.
37. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F (2001) Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 75: 6710-6713.
38. Smed-Sorensen A, Lore K, Vasudevan J, Louder MK, Andersson J, et al. (2005) Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 79: 8861-8869.
39. Meyers JH, Justement JS, Hallahan CW, Blair ET, Sun YA, et al. (2007) Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2: e458.
40. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, et al. (2001) Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98: 906-912.
41. Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, et al. (2001) Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 101: 201-210.
42. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, et al. (2001) Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98: 2574-2576.
43. Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, Levy JA (2006) Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS* 20: 1247-1252.
44. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC (2003) Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 187: 26-37.
45. Finke JS, Shodell M, Shah K, Siegal FP, Steinman RM (2004) Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 24: 647-652.
46. Walker BD (2007) Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 15: 134-136.
47. Foxall RB, Soares RS, Albuquerque AS, Cortesao CS, Victorino RM, et al. (2008) Increased frequency of CD25(dim)CD4(+) T-cells in HIV-2 infection, a naturally occurring attenuated form of HIV-1. *Clin Immunol*.
48. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH (2006) Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203: 2223-2227.
49. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, et al. (2004) Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34: 251-262.
50. Kamga I, Kahi S, Develioglu L, Lichtner M, Maranon C, et al. (2005) Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* 192: 303-310.

51. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, et al. (2001) Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 98: 3016-3021.
52. Francis ML, Meltzer MS, Gendelman HE (1992) Interferons in the persistence, pathogenesis, and treatment of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 199-207.
53. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.
54. Fiorentini S, Riboldi E, Facchetti F, Avolio M, Fabbri M, et al. (2008) HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3867-3872.
55. Lore K, Sonnerborg A, Brostrom C, Goh LE, Perrin L, et al. (2002) Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 16: 683-692.
56. Dillon SM, Robertson KB, Pan SC, Mawhinney S, Meditz AL, et al. (2008) Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 1-12.
57. Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, Diocou S, Kreitmann L, et al. (2009) Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients, but barely participate in interferon alpha expression. *Blood*. doi:10.1182/blood-2008-07-170803.
58. Brown KN, Trichel A, Barratt-Boyes SM (2007) Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol* 178: 6958-6967.
59. Diop OM, Ploquin MJ, Mortara L, Faye A, Jacquelin B, et al. (2008) Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 82: 5145-5152.
60. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbeni M, et al. (2008) Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 112: 4598-4608.
61. Brown KN, Wijewardana V, Liu X, Barratt-Boyes SM (2009) Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* 5: e1000413.
62. Jobe O, Ariyoshi K, Marchant A, Sabally S, Corrah T, et al. (1999) Proviral load and immune function in blood and lymph node during HIV-1 and HIV-2 infection. *Clin Exp Immunol* 116: 474-478.
63. Meier A, Bagchi A, Sidhu HK, Alter G, Suscovich TJ, et al. (2008) Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* 22: 655-658.
64. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, et al. (1993) Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6: 904-912.
65. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, et al. (2008) HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 118: 3431-3439.
66. Boasso A, Herbeval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. (2007) HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109: 3351-3359.

67. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, et al. (2006) Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7000-7005.
68. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, et al. (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115: 3265-3275.
69. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, et al. (2007) HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3396-3401.
70. Cavaleiro R, Brunn GJ, Albuquerque AS, Victorino RM, Platt JL, et al. (2007) Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins. *Eur J Immunol* 37: 3435-3444.
71. Cavaleiro R, Baptista AP, Foxall RB, Victorino RM, Sousa AE (2009) Dendritic cell differentiation and maturation in the presence of HIV type 2 envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 425-431.
72. Kaneko H, Neoh LP, Takeda N, Akimoto H, Hishikawa T, et al. (1997) Human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein binds to CD8 as well as to CD4 molecules on human T cells. *J Virol* 71: 8918-8922.
73. Neoh LP, Akimoto H, Kaneko H, Hishikawa T, Hashimoto H, et al. (1997) The production of beta-chemokines induced by HIV-2 envelope glycoprotein. *AIDS* 11: 1062-1063.
74. Nowroozalizadeh S, Mansson F, Silva ZD, Repits J, Dabo B, et al. (2009) Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections. *Cytokine* 46: 325-331.
75. Cavaleiro R, Sousa AE, Loureiro A, Victorino RM (2000) Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 14: 2679-2686.

Conclusões e Perspectivas Futuras

A infecção pelo HIV tipo 2 (HIV-2) caracteriza-se por uma virémia reduzida e um declínio mais lento do número de linfócitos T CD4⁺ do que a infecção pelo HIV-1¹⁻¹³. O menor ritmo de progressão de doença configura a infecção pelo HIV-2 como um modelo de doença “atenuada”, cuja investigação pode ajudar a compreender muitas das questões centrais na patogénese da SIDA. Apesar disso, em virtude da menor frequência de indivíduos infectados pelo HIV-2 do que pelo HIV-1 à escala mundial, os estudos realizados sobre a infecção pelo HIV-2 têm sido muito mais limitados. Portugal é o único país não-Africano com uma prevalência significativa de HIV-2¹⁴ devido às suas conexões com África Ocidental¹⁵⁻¹⁸, onde o HIV-2 é endémico, constituindo um local privilegiado para o estudo desta infecção.

As DC e os monócitos/macrófagos constituem componentes essenciais na resposta imunitária contra microrganismos e podem desempenhar um importante papel na infecção pelo HIV-1¹⁹⁻²³, mas os dados na literatura sobre estas células na infecção pelo HIV-2 são muito escassos. Assim, com o intuito de investigar possíveis mecanismos que contribuam para a menor patogenicidade do HIV-2 comparativamente à do HIV-1, este trabalho incidiu no estudo de DC e monócitos no contexto da infecção pelo HIV-2.

Na primeira parte desta tese (capítulos 3 e 4), foram investigadas as propriedades imunomoduladoras *in vitro* do invólucro do HIV-2. Concluímos que o invólucro de HIV-2 apresenta propriedades supressoras das células T que dependem do contacto entre células T e monócitos. Os efeitos das proteínas do invólucro do HIV-2 mediados por monócitos levaram-nos a investigar o eventual papel modulador destas proteínas na diferenciação de DC a partir de monócitos. Desta forma, demonstrámos que as proteínas do invólucro de HIV-2 testadas não afectam significativamente o fenótipo e a função de DC derivadas de monócitos.

Na segunda parte desta tese (capítulos 5 e 6), foram realizados estudos *ex vivo* em PBMC de indivíduos infectados pelo HIV-1 e de indivíduos infectados pelo HIV-2 com

vista à caracterização das duas principais subpopulações de DC no sangue periférico, mDC e pDC. Os resultados permitiram concluir que, apesar de se associar a um melhor prognóstico e a menores níveis de virémia, a infecção pelo HIV-2 apresenta, tal como a infecção pelo HIV-1, alterações quantitativas e qualitativas significativas destas células, em comparação com indivíduos saudáveis. Relativamente aos níveis de mDC, observou-se um decréscimo menos marcado nos indivíduos infectados pelo HIV-2 do que nos infectados pelo HIV-1 em comparação com o grupo controlo de seronegativos. Em ambas as infecções, esse decréscimo só foi significativo nos doentes em estádios avançados e/ou virémia detectável. No que se refere aos níveis de pDC, observou-se um decréscimo semelhante em ambas as infecções, em todos os estádios de doença e, no caso da infecção pelo HIV-2, mesmo nos indivíduos com virémia indetectável. Em termos funcionais, apesar de se ter documentado um decréscimo na capacidade de produção de IFN- α após estimulação de PBMC via TLR9 em ambos os grupos de doentes, a infecção pelo HIV-2 pareceu associar-se a uma melhor capacidade de produção de IFN- α por pDC. Para além disso, na infecção pelo HIV-2, a diminuição da produção de IFN- α por pDC só foi significativa nos indivíduos com virémia detectável.

É actualmente reconhecido que a activação persistente do sistema imunitário constitui um factor determinante da depleção de células T CD4⁺ e da progressão para SIDA ²⁴⁻²⁷ e é fundamental para a replicação do HIV ^{28, 29}. Assim, embora pareça paradoxal que uma proteína de um vírus menos patogénico seja mais imunossupressora, é plausível admitir que, ao limitar os processos de activação linfocitária, a gp105 de HIV-2 contribua para reduzir a produção de vírus e o ritmo de progressão da doença ³⁰.

Os resultados descritos no capítulo 3 desta tese sugerem que na base dessa supressão poderá estar um mecanismo mediado pelos monócitos. Assim, as proteínas do invólucro do HIV-2, actuando nos monócitos, poderão limitar a activação linfocitária e, desta forma, contribuir para o curso mais benigno da doença. Os nossos estudos permitiram excluir a contribuição de vários mediadores classicamente implicados nos efeitos imunossupressores mediados por monócitos, tais como prostaglandinas, óxido nítrico e a enzima catabolizadora do triptofano IDO ³¹, bem como a via de PD-L1/PD-1

recentemente caracterizada ^{32, 33}. Para além disso, apesar das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ exercerem efeitos inibitórios na activação e função de células T ^{34, 35}, DC ^{36, 37} e monócitos/macrófagos ³⁸, não parecem estar implicadas na supressão da activação das células T pela gp105 de HIV-2.

Demonstrámos num estudo anterior ³⁰ e no decorrer desta tese (capítulo 3) que as proteínas do invólucro de HIV-2 têm capacidade de estimular a produção de TNF- α pelos monócitos a níveis semelhantes aos induzidos por LPS, um ligando da molécula TLR4 expressa em células da linhagem monocítica. Assim, no presente trabalho investigámos a capacidade do invólucro de HIV-2 de modular as vias de sinalização de TLR4, hipótese que é particularmente interessante tendo em conta estudos anteriores que documentaram uma supressão da imunidade por proteínas virais através de mecanismos mediados por TLR ^{39, 40}. Os nossos dados sugerem que a proteína do invólucro de HIV-2 estimula a via de sinalização de TLR4, sendo relevante no futuro definir o seu contributo na supressão das respostas de células T pela actuação do invólucro do HIV-2 nos monócitos.

A supressão da activação linfocitária foi também observada na presença de um péptido derivado de um isolado primário (HIV-2_{ALI}) que corresponde à região C2-V3-C3 da gp105. No entanto, uma análise detalhada das regiões da gp105 implicadas nos efeitos imunossupressores do invólucro de HIV-2 será fundamental no seguimento deste trabalho. Tendo em conta a patogenicidade atenuada associada à infecção pelo HIV-2, esta nova linha de investigação do curso benigno do HIV-2 centrada nos monócitos poderá conduzir à identificação de novos alvos terapêuticos baseados nas propriedades imunomoduladoras do invólucro do HIV-2.

Ao contrário dos efeitos documentados nos monócitos, não se observaram alterações significativas nas DC derivadas de monócitos na presença do invólucro de HIV-2. Tal como descrito no capítulo 4 desta tese, o invólucro de HIV-2 (proteínas recombinantes ou vírus inactivado) não induziu alterações morfológicas, fenotípicas ou funcionais na diferenciação de DC a partir de monócitos nem na maturação de DC após estimulação pelo LPS. Além disso, ao contrário do documentado em alguns estudos para

a proteína gp120 do HIV-1^{41,42}, a presença do invólucro de HIV-2 na ausência de LPS não induziu maturação das DC.

A discordância observada entre a presença de efeitos nos monócitos e a ausência de efeitos nas DC derivadas de monócitos é particularmente interessante no contexto da recente visão de que as DC/APC não constituem um tipo de células distinto dos monócitos/macrófagos, mas sim uma subpopulação heterogênea de células do sistema mononuclear fagocítico que representa um contínuo de diferentes estádios de diferenciação e de actividades funcionais⁴³. Assim, os dados obtidos neste trabalho sugerem que os monócitos são susceptíveis aos efeitos do invólucro do HIV-2 antes do início do seu programa de desenvolvimento em APC especializadas. No seguimento deste trabalho, será interessante investigar quais as vias de sinalização que são afectadas pelo invólucro de HIV-2 e relacioná-las com o estádio de diferenciação celular.

Apesar do potencial de diferenciação dos monócitos em DC não ser afectado pela presença do invólucro do HIV-2, observou-se um decréscimo significativo dos níveis de mDC nos indivíduos infectados pelo HIV-2 (capítulo 5). No entanto, comparativamente aos indivíduos infectados pelo HIV-1, documentou-se na infecção pelo HIV-2 uma maior preservação desta subpopulação de DC. Em ambas as infecções, o decréscimo quantitativo das mDC só foi significativo nos indivíduos em fases avançadas da doença e com virémia detectável. Destaca-se a correlação negativa documentada entre os níveis de mDC e a expressão de marcadores de activação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, sugerindo uma associação entre a activação imunitária generalizada presente na infecção pelo HIV e os distúrbios das mDC.

Relativamente às pDC (capítulo 6), é interessante notar que ambas as infecções apresentaram uma depleção significativa muito semelhante desta subpopulação. Ao contrário do que se observou para as mDC, a depleção das pDC parece ocorrer muito precocemente, uma vez que mesmo indivíduos com níveis relativamente preservados de células T CD4⁺ apresentaram uma depleção significativa desta subpopulação. Apesar disso, o decréscimo dos níveis de pDC foi mais acentuado nos estádios mais avançados. No caso da infecção pelo HIV-2, este decréscimo foi observado mesmo nos indivíduos com virémia indetectável e que constituem a maioria dos indivíduos infectados por este

vírus. Tendo em conta a correlação negativa observada entre as pDC e os níveis de activação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, os nossos dados sugerem a existência de uma associação entre a activação de células T e o decréscimo de pDC.

Dado que as pDC são as principais células produtoras de IFN-tipo I^{44, 45}, a avaliação da produção de IFN- α em PBMC estimuladas *in vitro* via TLR constitui um marcador funcional das pDC. Neste trabalho foi utilizado como estímulo um ligando de TLR9, a molécula CpG de classe A. Apesar das células B também expressarem TLR9, são sobretudo as pDC que respondem ao CpG de classe A^{46, 47}. Assim, observou-se nas duas infecções uma diminuição significativa da capacidade das pDC maturarem e de produzirem IFN- α após estimulação via TLR9, em comparação com o grupo controlo de seronegativos. Um estudo muito recente documentou também um decréscimo da produção de IFN- α após estimulação com CpG em culturas de sangue total de doentes infectados pelo HIV-1 e de doentes infectados pelo HIV-2, na Guiné-Bissau⁴⁸. Contudo, constatámos que a produção de IFN- α por pDC foi significativamente superior nos indivíduos infectados pelo HIV-2 do que nos infectados pelo HIV-1. Tendo em conta o papel do IFN- α na promoção da imunidade inata e adquirida⁴⁴ e na diminuição da replicação viral⁴⁹, é plausível admitir que a melhor preservação da produção de IFN- α por pDC possa contribuir para o melhor prognóstico associado à infecção pelo HIV-2.

Ao contrário do que se verifica em relação aos níveis de pDC, só se observou diminuição da produção de IFN- α por pDC na infecção pelo HIV-2 nos indivíduos com virémia detectável. Assim, a virémia parece ser um factor fundamental para o decréscimo da capacidade de produção de IFN- α pelas pDC. Os nossos dados estão de acordo com os de Tilton e colaboradores que documentaram uma diminuição da produção de IFN- α pelas pDC, sem alteração dos níveis de pDC, em indivíduos infectados pelo HIV-1 durante períodos de interrupção de HAART na presença de replicação viral activa⁵⁰.

Apesar dos reconhecidos efeitos antivirais do IFN- α ^{44, 51}, a literatura apresenta dados controversos sobre o papel desta citocina na infecção pelo HIV, tendo sido descritos quer efeitos benéficos quer prejudiciais para o hospedeiro^{44, 51-53}. Vários estudos documentaram uma produção aumentada de IFN- α *in vivo* na infecção pelo

HIV-1, traduzindo-se num aumento dos níveis da proteína no soro ⁵⁴ e de mRNA em tecidos linfóides ⁵⁵, bem como da expressão de genes induzidos por IFN ^{56, 57}, associando-se em alguns casos a elevados níveis de virémia ⁵⁰. Estudos recentes sugeriram que, em indivíduos infectados pelo HIV-1 virémicos, a activação crónica das pDC, quer por exposição ao IFN- α , quer por activação dos seus TLR pelo RNA viral, pode conduzir a um estado refractário das células traduzido numa diminuição da sua capacidade de produzir IFN- α em resposta a estimulação via TLR *in vitro* ⁵⁰. Assim, no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-2 estudados neste trabalho, pode observar-se dois padrões distintos quanto à capacidade das pDC produzirem IFN- α após estimulação via TLR9 *in vitro*: a) os indivíduos com níveis indetectáveis de virémia apresentam uma relativa preservação da capacidade de produção de IFN- α em comparação com indivíduos seronegativos; b) por seu turno, os poucos indivíduos estudados com níveis detectáveis de virémia exibem uma diminuição da capacidade de resposta das pDC à estimulação via TLR9 *in vitro*, sendo plausível especular que a activação crónica destas células tem um papel nestes efeitos. De notar que, mesmo com níveis de virémia significativamente inferiores aos apresentados pelos indivíduos infectados pelo HIV-1, os doentes HIV-2 seropositivos virémicos apresentam uma disfunção semelhante das pDC. Assim, estes dados sugerem que a virémia, por si só e mesmo em reduzidos níveis, tem um impacto importante na produção *in vitro* de IFN- α pelas pDC.

A análise da produção de outras citocinas por PBMC estimuladas com CpG-classe A demonstrou uma diminuição significativa da capacidade de aumentar a produção de TNF- α após estimulação nos indivíduos infectados pelo HIV-1, comparativamente ao grupo controlo de seronegativos. Os indivíduos infectados pelo HIV-2 também apresentaram um decréscimo da capacidade de aumentar a produção de TNF- α , sem, contudo, se verificar uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controlo. Estes resultados são interessantes tendo em conta um estudo recente onde foi descrita uma diminuição da produção espontânea de TNF- α por monócitos em associação com replicação viral activa e em correlação com elevados níveis de transcritos de genes que se sabe serem induzidos pelo IFN- α ⁵⁸.

Neste trabalho as DC foram caracterizadas apenas no sangue periférico. Assim, não foi possível discriminar se o decréscimo dos níveis de DC em circulação é resultante da diminuição da sobrevivência destas células por destruição directa ou indirecta pelo vírus, ou se é devido à sua activação e migração para os tecidos linfóides ou a um compromisso da sua produção *de novo*. Estão actualmente a ser desenvolvidas as condições no nosso laboratório para que estas possibilidades sejam investigadas.

A compreensão da imunopatogénese da SIDA tem beneficiado do estudo de modelos com cursos clínicos particulares que têm sido fundamentais para a definição de uma possível resposta protectora. Tal como referido no capítulo 1, o estudo de modelos animais hospedeiros naturais de SIV que, apesar de apresentarem elevados níveis de virémia, não desenvolvem SIDA, tem dado um importante contributo⁵⁹. A sua comparação com modelos patogénicos de infecção pelo SIV permitiu concluir que a não progressão para SIDA está dependente do controlo da imunopatologia associada à infecção, não sendo a virémia, por si só, um factor determinante⁶⁰.

Neste trabalho foi estudada a infecção pelo HIV-2 que se distingue da infecção pelo HIV-1 pelos reduzidos/indetectáveis níveis de virémia e pelo menor ritmo de perda de linfócitos T CD4⁺, o que a configura como um modelo natural único de imunodeficiência “atenuada”¹⁻¹³. Dada a evidência de que o HIV-2 é igualmente citopático *in vitro*⁶¹, as diferenças na história natural têm sido atribuídas a interacções vírus/hospedeiro distintas. Este modelo tem ainda a vantagem de permitir comparar as duas infecções utilizando indivíduos estratificados de acordo com o grau de depleção de células T CD4⁺. A maioria dos estudos envolvendo doentes infectados pelo HIV-1 com diferentes ritmos de progressão da doença não permite este emparelhamento, tal como ilustrado pelos *Long Term Non Progressors* que, por definição, mantêm um número elevado de células T CD4⁺ na ausência de terapêutica anti-retroviral^{62, 63}.

Os nossos resultados salientam a importância da modulação das células do hospedeiro pelo invólucro viral, independentemente da infecção celular. As propriedades imunossupressoras do invólucro do HIV-2 suportam o papel da activação crónica do sistema imunitário na patogénese associada à infecção pelo HIV. Os nossos dados permitiram também clarificar os contributos relativos da activação do sistema

imunitário, da depleção de células T CD4⁺ e da carga viral circulante para os níveis e função das células dendríticas.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados enfatizam a importância dos contributos únicos que a infecção pelo HIV-2 pode dar ao estudo da modulação de DC/monócitos pelo vírus, uma área absolutamente crítica para a compreensão de questões fundamentais na patogênese da SIDA e para o desenvolvimento de uma vacina.

Referências

1. Markovitz DM: Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Ann Intern Med* 1993; 118:211-218.
2. Marlink R, P Kanki, I Thior, K Travers, G Eisen, T Siby, I Traore, CC Hsieh, MC Dia, EH Gueye, et al.: Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265:1587-1590.
3. Whittle H, J Morris, J Todd, T Corrah, S Sabally, J Bangali, PT Ngom, M Rolfe, A Wilkins: HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS* 1994; 8:1617-1620.
4. Poulsen AG, P Aaby, O Larsen, H Jensen, A Naucler, IM Lisse, CB Christiansen, F Dias, M Melbye: 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* 1997; 349:911-914.
5. Reeves JD, RW Doms: Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002; 83:1253-1265.
6. Rowland-Jones SL, HC Whittle: Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 2007; 8:329-331.
7. de Silva TI, M Cotten, SL Rowland-Jones: HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* 2008; 16:588-595.
8. Simon F, S Matheron, C Tamalet, I Loussert-Ajaka, S Bartczak, JM Pepin, C Dhiver, E Gamba, C Elbim, JA Gastaut, et al.: Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* 1993; 7:1411-1417.
9. Berry N, K Ariyoshi, S Jaffar, S Sabally, T Corrah, R Tedder, H Whittle: Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1998; 1:457-468.
10. Popper SJ, AD Sarr, KU Travers, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 1999; 180:1116-1121.

11. Andersson S, H Norrgren, Z da Silva, A Biague, S Bamba, S Kwok, C Christopherson, G Biberfeld, J Albert: Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 2000; 160:3286-3293.
12. Popper SJ, AD Sarr, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki: Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* 2000; 74:1554-1557.
13. Drylewicz J, S Matheron, E Lazaro, F Damond, F Bonnet, F Simon, F Dabis, F Brun-Vezinet, G Chene, R Thiebaut: Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *AIDS* 2008; 22:457-468.
14. Coordenação Nacional para a Infecção VIH/sida: Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção VIH/sida- 2007-2010. Um compromisso com o futuro. 2007.
15. Poulsen AG, P Aaby, A Gottschau, BB Kvinesdal, F Dias, K Molbak, E Lauritzen: HIV-2 infection in Bissau, West Africa, 1987-1989: incidence, prevalences, and routes of transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:941-948.
16. Marlink R: Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS* 1996; 10:689-699.
17. Remy G: HIV-2 infection throughout the world. A geographical perspective. *Sante* 1998; 8:440-446.
18. Pádua E: Epidemiologia da infecção por VIH-2. *Manual sobre SIDA* 2004.
19. Noursadeghi M, DR Katz, RF Miller: HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:794-804.
20. Carter CA, LS Ehrlich: Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62:425-443.
21. Wu L, VN KewalRamani: Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:859-868.
22. Donaghy H, J Wilkinson, AL Cunningham: HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? *J Leukoc Biol* 2006; 80:1001-1012.
23. Piguet V, RM Steinman: The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol* 2007; 28:503-510.
24. Giorgi JV, LE Hultin, JA McKeating, TD Johnson, B Owens, LP Jacobson, R Shih, J Lewis, DJ Wiley, JP Phair, SM Wolinsky, R Detels: Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-870.
25. Deeks SG, CM Kitchen, L Liu, H Guo, R Gascon, AB Narvaez, P Hunt, JN Martin, JO Kahn, J Levy, MS McGrath, FM Hecht: Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004; 104:942-947.
26. Sousa AE, J Carneiro, M Meier-Schellersheim, Z Grossman, RM Victorino: CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 2002; 169:3400-3406.

27. Grossman Z, M Meier-Schellersheim, AE Sousa, RM Victorino, WE Paul: CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319-323.
28. Zack JA, SJ Arrigo, SR Weitsman, AS Go, A Haislip, IS Chen: HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990; 61:213-222.
29. Bukrinsky MI, TL Stanwick, MP Dempsey, M Stevenson: Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991; 254:423-427.
30. Cavaleiro R, AE Sousa, A Loureiro, RM Victorino: Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS* 2000; 14:2679-2686.
31. Boasso A, JP Herbeuval, AW Hardy, SA Anderson, MJ Dolan, D Fuchs, GM Shearer: HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2007; 109:3351-3359.
32. Petrovas C, JP Casazza, JM Brenchley, DA Price, E Gostick, WC Adams, ML Precopio, T Schacker, M Roederer, DC Douek, RA Koup: PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203:2281-2292.
33. Meier A, A Bagchi, HK Sidhu, G Alter, TJ Suscovich, DG Kavanagh, H Streeck, MA Brockman, S LeGall, J Hellman, M Altfeld: Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* 2008; 22:655-658.
34. Dittmer U, H He, RJ Messer, S Schimmer, AR Olbrich, C Ohlen, PD Greenberg, IM Stromnes, M Iwashiro, S Sakaguchi, LH Evans, KE Peterson, G Yang, KJ Hasenkrug: Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 2004; 20:293-303.
35. Sakaguchi S, K Wing, M Miyara: Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S116-123.
36. Misra N, J Bayry, S Lacroix-Desmazes, MD Kazatchkine, SV Kaveri: Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:4676-4680.
37. Onishi Y, Z Fehervari, T Yamaguchi, S Sakaguchi: Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10113-10118.
38. Taams LS, JM van Amelsfort, MM Tiemessen, KM Jacobs, EC de Jong, AN Akbar, JW Bijlsma, FP Lafeber: Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66:222-230.
39. Dolganiuc A, S Chang, K Kodys, P Mandrekar, G Bakis, M Cormier, G Szabo: Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006; 177:6758-6768.
40. Jude BA, Y Pobeinskaya, J Bishop, S Parke, RM Medzhitov, AV Chervonsky, TV Golovkina: Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat Immunol* 2003; 4:573-578.
41. Fantuzzi L, C Purificato, K Donato, F Belardelli, S Gessani: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004; 78:9763-9772.

42. Williams MA, R Trout, SA Spector: HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:829-847.
43. Hume DA: Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008; 181:5829-5835.
44. Fitzgerald-Bocarsly P, J Dai, S Singh: Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:3-19.
45. Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:275-306.
46. Krug A, S Rothenfusser, V Hornung, B Jahrsdorfer, S Blackwell, ZK Ballas, S Endres, AM Krieg, G Hartmann: Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2154-2163.
47. Vollmer J, R Weeratna, P Payette, M Jurk, C Schetter, M Laucht, T Wader, S Tluk, M Liu, HL Davis, AM Krieg: Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; 34:251-262.
48. Nowroozalizadeh S, F Mansson, ZD Silva, J Repits, B Dabo, C Pereira, A Biague, J Albert, J Nielsen, P Aaby, EM Fenyo, H Norrgren, B Holmgren, M Jansson: Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections. *Cytokine* 2009.
49. Meylan PR, JC Guatelli, JR Munis, DD Richman, RS Kornbluth: Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* 1993; 193:138-148.
50. Tilton JC, MM Manion, MR Luskin, AJ Johnson, AA Patamawenu, CW Hallahan, NA Cogliano-Shutta, JM Mican, RT Davey, Jr., S Kottlilil, JD Lifson, JA Metcalf, RA Lempicki, M Connors: Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *J Virol* 2008; 82:3997-4006.
51. Zhang Z, FS Wang: Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2005; 2:411-417.
52. Herbeuval JP, GM Shearer: HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 2007; 123:121-128.
53. Boasso A, GM Shearer: Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 2008; 126:235-242.
54. Francis ML, MS Meltzer, HE Gendelman: Interferons in the persistence, pathogenesis, and treatment of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:199-207.
55. Herbeuval JP, J Nilsson, A Boasso, AW Hardy, MJ Kruhlak, SA Anderson, MJ Dolan, M Dy, J Andersson, GM Shearer: Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7000-7005.
56. Meyers JH, JS Justement, CW Hallahan, ET Blair, YA Sun, MA O'Shea, G Roby, S Kottlilil, S Moir, CM Kovacs, TW Chun, AS Fauci: Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2007; 2:e458.

57. Lehmann C, JM Harper, D Taubert, P Hartmann, G Fatkenheuer, N Jung, J van Lunzen, HJ Stellbrink, RC Gallo, F Romerio: Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 48:522-530.
58. Tilton JC, AJ Johnson, MR Luskin, MM Manion, J Yang, JW Adelsberger, RA Lempicki, CW Hallahan, M McLaughlin, JM Mican, JA Metcalf, C Iyasere, M Connors: Diminished production of monocyte proinflammatory cytokines during human immunodeficiency virus viremia is mediated by type I interferons. *J Virol* 2006; 80:11486-11497.
59. Pandrea I, DL Sodora, G Silvestri, C Apetrei: Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol* 2008; 29:419-428.
60. Heeney JL, SA Plotkin: Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. *Nat Immunol* 2006; 7:1281-1284.
61. Schramm B, ML Penn, EH Palacios, RM Grant, F Kirchhoff, MA Goldsmith: Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J Virol* 2000; 74:9594-9600.
62. Paroli M, A Propato, D Accapezzato, V Francavilla, E Schiaffella, V Barnaba: The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett* 2001; 79:127-129.
63. Pantaleo G, S Menzo, M Vaccarezza, C Graziosi, OJ Cohen, JF Demarest, D Montefiori, JM Orenstein, C Fox, LK Schragar, et al.: Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332:209-216.