

Joana Isabel da Silva Valente

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano — Perspetivas de Cura

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Isabel da Silva Valente

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano — Perspetivas de Cura

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Isabel da Silva Valente, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 201013794, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia de Estágio apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito de unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2015.

Assinatura

(Joana Isabel da Silva Valente)

Índice

Lista de Acrónimos	2
Resumo	3
Introdução	4
Replicação	4
Mecanismos de estabelecimento e manutenção da Latência.....	5
Terapêutica HAART	7
Os Reservatórios	8
Reservatório Celulares	9
Reservatórios Anatômicos	10
Estratégias para erradicar o vírus dos reservatórios.....	12
Cura Funcional.....	13
Estratégia " <i>Shock and Kill</i> "	13
Fase " <i>Shock</i> "	13
Reativação farmacológica do vírus como estratégia de cura.....	13
Fase " <i>Kill</i> "	16
Terapêutica Precoce	19
Cura Esterilizante	21
Estratégias Genéticas	21
Conclusão	25
Bibliografia	26

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

Lista de Acrónimos

CCR5- <i>C-C Chemokine Receptor type 5</i>	HSCT- <i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
CD- <i>Cluster of Differentiation</i>	HSPC- <i>Hematopoietic stem/progenitor cell</i>
CPI- <i>Complexo de pré-integração</i>	IL- <i>Interleucina</i>
CTL- <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>	IN- <i>Integrase</i>
CXCR4- <i>C-X-C Chemokine Receptor type 4</i>	LMA- <i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
DC- <i>Dendritic cell</i>	LTR- <i>Longas Repetições Terminais</i>
DNA- <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	mAb- <i>Monoclonal Antibody</i>
DNMTi- <i>Inibidores da Metiltransferase</i>	NF- <i>Fator Nuclear</i>
DSB- <i>Double-strand breaks</i>	PKC- <i>Protein kinase C</i>
GALT- <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>	RNA- <i>Ribonucleic Acid</i>
Gp- <i>Glicoproteína</i>	RT- <i>Reverse Transcriptase</i>
HAART- <i>Highly active antiretroviral therapy</i>	SIDA- <i>Síndrome de Imunodeficiência Adquirida</i>
HDACi- <i>Inibidores da Histona Deacetilases</i>	SNC- <i>Sistema Nervoso Central</i>
HDAC- <i>Histona Deacetilases</i>	TGI- <i>Trato Gastro Intestinal</i>
HIV- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>	TGU- <i>Trato Genito-Urinário</i>
HSC- <i>Hematopoietic stem cell</i>	ZNF- <i>Zinc Finger Nucleases</i>
HSCT- <i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>	

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

Resumo

Apesar dos resultados favoráveis provenientes da utilização da terapêutica HAART, existem vários reservatórios virais, celulares e anatómicos, que podem contribuir para a persistência do HIV-1, especialmente os linfócitos T CD4+ de memória, em repouso e o tecido linfoide. Estes reservatórios constituem a principal barreira à eliminação do vírus do organismo humano e consequente cura da infeção.

Nos últimos anos surgiram alguns casos intrigantes e inspiradores que indicam que uma cura total ou parcial da infeção é uma possibilidade, como por exemplo os casos “Berlin Patient” ou “Mississippi Baby”, podendo acreditar-se que se trata de uma questão de tempo até encontrar uma cura para esta infeção.

Esta monografia tem como objetivo conhecer os reservatórios virais existentes em doentes tratados e os mecanismos de estabelecimento e manutenção da latência viral, analisando possíveis estratégias para a eliminação do vírus dos seus reservatórios no organismo e possível cura da infeção por HIV.

Abstract

In spite of the favorable results obtained by HAART therapy, several viral, cellular and anatomical reservoirs can contribute to HIV-1 persistency, specially CD4+ memory T cells and lymphoid tissue. These reservoirs are the main barrier to the elimination of the virus from the human organism and consequentially the cure of the infection.

In the last few years, there have been some intriguing and inspiring cases that indicate that total or partial cure is a possibility, for example, "Berlin Patient" or "Mississippi Baby", making it possible to believe that finding a cure for this infection is only a matter of time.

This monograph addresses the subject of viral reservoirs existing in treated patients and the establishment and maintenance mechanisms of viral latency, analyzing possible strategies for eradication of the virus from its human reservoirs and possible cure for HIV infection.

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

Introdução

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente causal da Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA), e o grande responsável pelo maior flagelo das últimas décadas. (1) Trinta anos depois da sua identificação, a cura para a infeção causada por este vírus continua a ser uma das mais procuradas (2).

O HIV pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* e ao subgénero dos Lentivírus dos Primatas (1). Com genoma (+)ssRNA e intermediário dsDNA é um vírus envelopado, esférico com cápside em forma de cone truncado. O seu envelope é obtido a partir da membrana citoplasmática da célula hospedeira e contém a glicoproteína de adsorção viral gp 120 e a glicoproteína transmembranar gp 41 (3). O genoma é constituído por duas moléculas (+)ssRNA linear, idênticas, fisicamente ligadas através de ligações de hidrogénio.

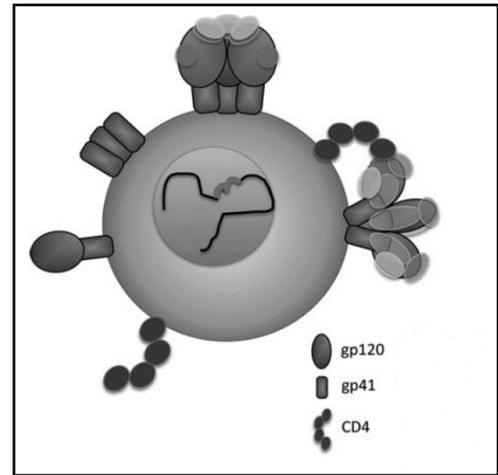


Figura 1: Morfologia do HIV (5).

É um retrovírus complexo constituído por 3 genes principais *gag*, *pol*, *env* e 6 genes acessórios ou reguladores. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais da matriz (p17)

(MA), cápside (p24) e nucleocápside (p7), o gene *pol* codifica as enzimas: transcriptase reversa/RNaseH (RT) (p66/p51) e integrase (p32) (IN) sendo que a protéase é codificada pelo fim do gene *gag* e início do gene *pol*; o gene *env* codifica as proteínas do envelope (Fig.1). Estes genes são transcritos numa poliproteína que deve ser clivada por protéases virais e celulares de modo a que o vírus se torne infeccioso (4).

Replicação

Para que o HIV infete uma célula é necessário que esta possua na sua membrana os recetores CD4 e um dos

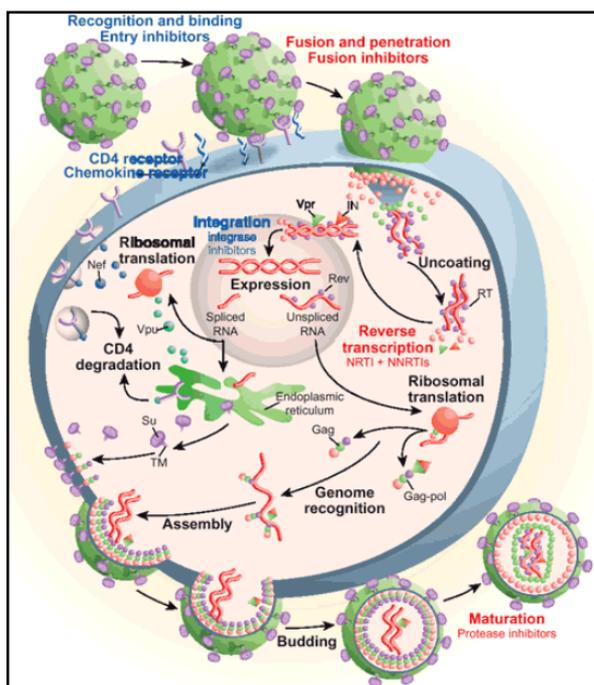


Figura 2: Processo de Replicação do DNA (7).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

recetores das quimiocinas, normalmente o CCR5 ou o CXCR4, que funcionam como co-recetor (1). O CCR5 está presente em macrófagos e monócitos, células dendríticas, e linfócitos T CD4+ ativados, enquanto o CXCR4 é expresso constitutivamente nos linfócitos (6). Assim, as proteínas do envelope (Gp120 e Gp41) ligam ao recetor celular CD4 que posteriormente dá origem a uma alteração conformacional na gp120 que expõe o epitopo de ligação ao co-receptor (CCR5 ou CXCR4). Seguem-se alterações conformacionais na gp41 que resultam na conformação activa do péptido de fusão. Após a fusão da membrana da célula com o envelope viral, a nucleocápside entra na célula hospedeira, é descapsidada por ação de enzimas e o material genético viral é exposto à maquinaria da célula. Durante a replicação o (+)ssRNA viral, por ação da RT é transcrito em dsDNA, formando posteriormente o complexo de pré integração (CPI) transportado até ao núcleo em que, por via da IN e enzimas celulares é integrado no genoma celular, formando o provírus (dsDNA integrado no genoma da célula hospedeira) (3) (Fig.2).

Mecanismos de estabelecimento e manutenção da Latência

O estabelecimento da latência do HIV ocorre em fases muito precoces, 3 dias após a infeção segundo estudos em não primatas (9), iniciando com a infeção dos linfócitos T CD4+ de memória que têm um elevado tempo de semivida.

Os mecanismos responsáveis pelo estabelecimento da latência do HIV não estão completamente elucidados mas existem duas principais teorias que explicam como a latência é estabelecida em células T CD4 + em repouso (Fig. 3) (10).

Apesar da infeção dos linfócitos T CD4+ ativadas (células azuis) resultar na sua maioria em morte celular (célula vermelha) devido ao efeito citopático provocado pelo vírus, uma minoria das células T CD4+ ativadas, é infetada e transita para um estado de repouso-memória (células cinzentas com

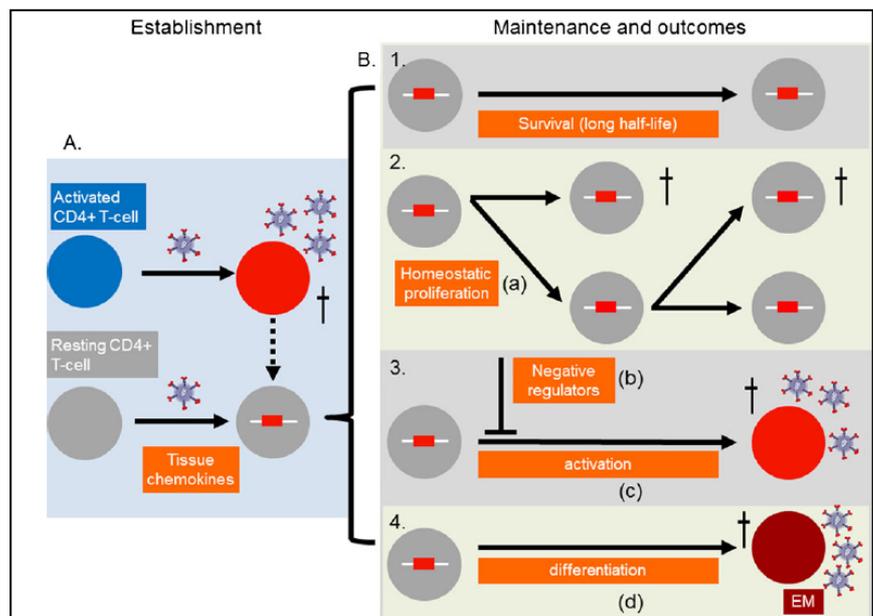


Figura 3: Estabelecimento, manutenção e resultados da Latência em células T infetadas (10).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

retângulo vermelho) onde o provírus fica silenciado (10) não existindo expressão génica viral. (Fig. 3) Deste modo estas células permanecem indetetáveis pelo sistema imunitário (11).

O modelo alternativo proposto para o processo diz-nos que a latência do HIV se estabelece diretamente nas células T CD4+ em repouso, na ausência da ativação de Linfócitos T CD4+, depois da interação com células dendríticas e/ou quimiocinas específicas (12). Foi já demonstrado, *in vitro*, que a infeção direta de células em repouso pode ser alcançada através da incubação com quimiocinas específicas que leva à localização nuclear e integração. Esta informação sugere que a infeção latente nos linfócitos T CD4+ em repouso pode estar relacionada com a passagem dos mesmos, por ambientes extremamente ricos em quimiocinas como os nódulos linfáticos e o TGI (10).

Existem vários mecanismos que determinam quando a infeção por HIV se torna produtiva ou latente. Um possível mecanismo para manutenção da latência envolve mudanças epigenéticas na cromatina que suprime a expressão génica do HIV. Os genes ativamente transcritos encontram-se em DNA cromossomal “relaxado”, pelo contrário os genes não expressos encontram-se normalmente em DNA cromossomal mais condensado. A compactação da cromatina em volta do provírus limita o acesso dos fatores de transcrição à extremidade 5’ não existindo expressão génica viral. Contudo, essa condensação é reversível quando as células são ativadas, permitindo o acesso dos fatores de transcrição (13).

O local de iniciação de transcrição do HIV é flanqueado por 2 nucleótidos CpG metilados, o domínio de ligação Metil-CpG e Histona deacetilase (HDAC) são detetados num destes nucleótidos durante a fase latente. Histonas acetiladas recrutam ativadores da transcrição e promovem a remoção de grupos de acetilo pelas histonas desacetilases (HDACs) permitindo a formação de estruturas repressivas de cromatina (8). Os inibidores de HDAC (HDACi), utilizados para estimular ativação viral, estão agora bem caracterizados em vários modelos de células T CD4 + latentes, em repouso, de doentes infetados (10).

Histonas Metiltransferases mostram também ação semelhante à das HDACs levando à metilação das histonas e repressão da transcrição do HIV no LTR.

Uma vez estabelecida a latência, as células infetadas podem:

- a. Sobreviver por um longo período;
- b. Sofrer proliferação homeostática promovida por citocinas como a IL-7;
- c. Sofrer ativação resultando numa infeção produtiva;

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

d. Sofrer diferenciação celular tornando-se células memória efectoras promovendo uma infecção produtiva (ex:IL-15) (Fig.3).

É plausível que a ativação imune contribua para a persistência do HIV em doentes tratados com HAART pois facilita a replicação e reposição de células infetadas latentes, contudo as evidências para este facto são limitadas (10).

Nos doentes infetados com HIV tratados com HAART os linfócitos T CD4+ que expressam PD-1 (Morte programada-1), um regulador negativo da ativação da células T, têm níveis significativamente mais elevados de DNA viral integrado que as células que não expressam PD-1. Além disto, a inibição do PD-1 por incubação com anti-PD-1 levou a libertação do vírus das células T CD4+ em repouso em doentes em terapêutica HAART, o que significa que o PD-1 suprime a produção de vírus nas células em latência.

As células infetadas em latência podem também ser mantidas por proliferação homeostática induzidas por citocinas como a IL-7. Os níveis de IL-7 são elevados na infeção por HIV e estão correlacionados com a frequência de proliferação das células memória T CD4+. Se a IL-7 induz a proliferação de células infetadas e não infetadas com a mesma eficiência então a IL-7 consegue expandir o número de células latentes como foi recentemente demonstrado por um aumento de cópias/ml de DNA viral no sangue após a administração de IL-7. (1) Portanto, o reservatório estabelecido nas células T CD4+ em repouso sobrevive através de proliferação homeostática (14).

Terapêutica HAART

A pesquisa contínua levou ao desenvolvimento e licenciamento para uso clínico de 30 substâncias ativas diferentes, pertencentes a seis famílias de fármacos, as quais tem um alvo em diferentes fases do ciclo de vida do vírus (Tab.1) (14).

A terapia antirretroviral combinada levou a uma redução da morbilidade e

mortalidade em doentes infetados com HIV mas trata-se de uma terapêutica para o resto da vida, sem perspectiva de cura. A terapêutica HAART funciona bem na maioria dos doentes mas provoca diversos efeitos secundários graves e além disso contribui para o desenvolvimento de resistência viral. A nível económico implica elevados gastos financeiros

Tabela 1: Alvos Virais da HAART.

Fase do Ciclo de Replicação do HIV	Fármacos
Ligação e Fusão	Maraviroc, Fuzeon...
Transcrição Reversa	Emtriva, Edurant...
Integração	Raltegravir, dolutegravir
Montagem	Aptivus, Ritonavir...
Maturação	Bevirimat

(Adaptado de Zhang,J., Crumacker,C.-Eradication of HIV and cure AIDS, now and how?- Frontiers in Immunology (2013) (4): 337).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

que países pouco desenvolvidos (locais onde a epidemia apresenta maior preocupação) não conseguem suportar (10).

Não desvalorizando os efeitos benéficos da terapêutica, a HAART sozinha não é capaz de erradicar o vírus (13). A descoberta de um pequeno grupo de células infetadas em estado latente, os reservatórios virais, que persistem em indivíduos infetados pelo HIV tratados (12), constitui uma fonte de replicação do vírus depois da interrupção do tratamento, o que se traduz numa das principais barreiras para a cura da infeção por HIV (10). Além disto, a HAART não reestrutura completamente a saúde do doente, aumentando o risco de doenças não relacionadas com a SIDA como doença cardiovascular, doença renal, hepática e doenças neurológicas. A disfunção imunológica e a inflamação persistente promovem também o aumento da morbidade e mortalidade não relacionada diretamente com a infeção (14).

Podemos dizer que o maior reservatório do HIV são os órgãos e tecidos linfoides, como por exemplo o baço, a medula óssea e os nódulos linfáticos (1). Hoje sabe-se que os reservatórios de HIV são maiores e mais persistentes do que se pensava e as técnicas atuais podem não ser suficientes para os detetar (2).

Os Reservatórios

Um reservatório viral é um tipo de célula ou local anatómico, onde o vírus é capaz de se replicar, acumular e persistir de forma estável, de modo a salvaguardar a continuidade da infeção no hospedeiro (16).

A presença de infeção por HIV-1 latente em reservatórios foi sugerida inicialmente quando foi observada uma virémia permanente (acima de 50 cópias/ml) em doentes tratados com HAART. A fonte desta virémia persistente ainda é muito discutida mas sabe-se que ela é o resultado de vários mecanismos. Estes incluem o baixo nível de replicação viral em curso, devido à inibição da replicação viral pela terapêutica HAART, ou a existência de "santuários virais" pouco acessíveis aos fármacos, como as células do SNC, TGI, outras células do sistema imunológico incluindo a linhagem dos monócitos/macrófagos e ainda as células hematopoiéticas mais recentemente identificadas como um dos reservatórios virais (14). A capacidade do vírus para infetar diferentes células e tecidos contribui em grande parte para a sua persistência, mesmo na presença de HAART, e tem grande responsabilidade nas resistências desenvolvidas pelo vírus aos fármacos antirretrovirais, principalmente devido ao estabelecimento desses santuários onde por vezes apenas chegam quantidades de fármaco subterapêuticas (16).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

As células T CD4+ são as que melhor estão caracterizadas como reservatórios de HIV e estas podem sobreviver por longos períodos de tempo, potenciando a propagação do provírus através da sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, facilitando a longo prazo a persistência viral (2). A identificação de provírus não induzidos por ativação das células T CD4+, capazes de se replicar, indica que a quantidade de reservatórios latentes do vírus é muito maior do que previamente estimado (17).

Reservatórios Celulares

Diferentes tipos de células distribuídas por diferentes tecidos são suscetíveis à infecção por HIV. Linfócitos T CD4+ e macrófagos são os alvos primários do HIV. Outros tipos de células suscetíveis à infecção incluem: monócitos, Linfócitos T CD8+, células Natural Killer (NK), outras células do sangue periférico e Células Dendríticas, Linfócitos B, e uma variedade de células especializadas provenientes de vários tecidos reservatório de HIV (por exemplo, tecido renal, mucosa, e células epiteliais do colo do útero, astrócitos e microglia no SNC, fibroblastos da pele, e células estaminais de medula óssea) (9).

Linfócitos T Memória – A persistência de Linfócitos T CD4+ infetados latentes no sangue e tecido linfóide em doentes tratados com HAART foi, pela primeira vez, reportada há dezoito anos atrás (10).

Assim como noutras infecções virais, os Linfócitos T CD4+, especificamente os Linfócitos T CD4+ memória, são responsáveis pela imunidade contra a infecção por HIV, mas neste caso, estas células são também o alvo do vírus. Os Linfócitos T CD4+ estão predominantemente em repouso mas são capazes de se renovar e de sobreviver por longos períodos de tempo. Além disso, possuem propriedades das células tronco hematopoiéticas: capacidade de autorrenovação, divisão assimétrica e diferenciação em células efetoras.

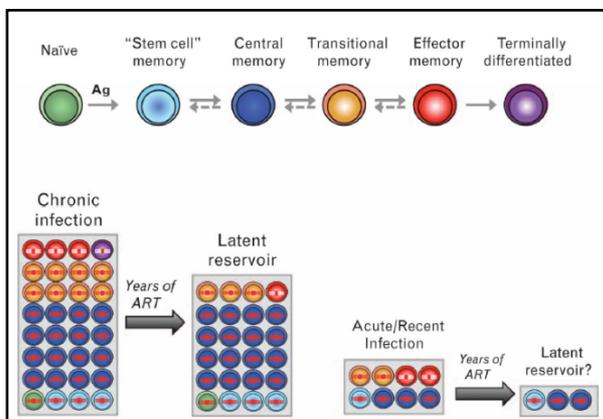


Figura 4: Tamanho e composição dos reservatórios latentes de HIV. Os linfócitos T CD4+ memória são o maior reservatório em doentes tratados com HAART (12).

Quando os Linfócitos T CD4+ naïve contactam com um antígeno, neste caso o HIV, estes diferenciam-se e transformam-se em células efetoras específicas para esse antígeno (Fig.4). Algumas morrem devido à infecção viral mas as que sobrevivem transformam-se em linfócitos T memória que posteriormente se diferenciam e transformam em células efetoras secundárias aquando de um novo contato

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

com o HIV. A divisão assimétrica dos Linfócitos T CD4+ memória permite-lhe assim ter um longo tempo de semivida: por um lado, faz com que estas constituam o maior reservatório de HIV no organismo, e por outro, providenciam uma vida curta às células efetoras que servem como alvos de replicação (15).

Macrófagos – Os macrófagos representam outro importante alvo do HIV para além dos Linfócitos T CD4+, embora tenham pouca expressão de CD4 à sua superfície e o número de macrófagos infetados seja inferior, estes conseguem produzir grandes quantidades de vírus. Estas células são capazes de produzir viriões e transferem partículas virais para os linfócitos TCD4+ através de um mecanismo de fusão e ativação da via oxidativa. Os macrófagos são o agente principal de disseminação viral com uma ampla distribuição. Em contraste com linfócitos, os macrófagos encontram-se numa fase de diferenciação terminal e têm o potencial de diferenciação limitado. Eles são insensíveis ao efeito citopático do vírus, e o seu elevado tempo de vida provavelmente compensa o número relativamente baixo de macrófagos infetados, justificando a sua contribuição para a produção viral (16).

Células Dendríticas – As células dendríticas (DC's) são células apresentadoras de antígeno, desempenham um papel importante na patogénese do HIV constituindo um dos alvos iniciais da infeção. A natureza migratória das DC's e sua capacidade de recrutar numerosos linfócitos T para o tecido linfóide faz com que estas células tenham um papel central na difusão do HIV no hospedeiro. Um grande número de DC's acumula-se rapidamente no tecido linfóide nas primeiras semanas após a infeção, o que coincide com um aumento maciço do número de linfócitos T CD4 + infetados no tecido linfóide. Assim as DC's são um importante reservatório do HIV nos tecidos linfóides na fase pré-sintomática e em fases tardias da doença (16).

Reservatórios Anatômicos

Existem alguns locais anatómicos que atuam como reservatórios de replicação viral do HIV (Fig.5), incluindo o tecido linfóide, cérebro/SNC, trato urogenital (10) e GI (1), e pulmão. Estes locais são imunologicamente separados e protegidos por barreiras hematológicas e sistemas linfáticos impedindo a penetração dos fármacos antirretrovirais em concentrações

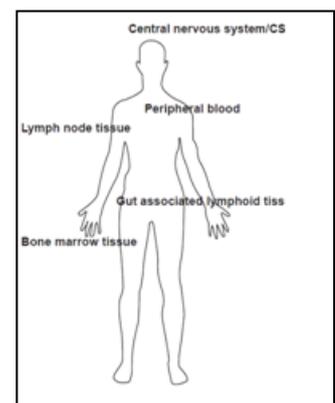


Figura 5: Reservatórios de HIV (5).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

terapêuticas efetivas (17).

Trato Gastrointestinal e GALT – O intestino e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é um órgão linfóide do corpo onde se encontra uma extensa população de Células T CD4+ suscetíveis à infeção por HIV, com elevados níveis de ativação e expressão de coreceptores do vírus, fazendo destes locais um dos primeiros e mais importantes alvos do HIV durante a infeção aguda. O GALT funciona como um santuário, e como um reservatório sendo que as concentrações virais são mais elevadas que no sangue em doentes tratados com HAART. É também o maior reservatório de macrófagos do organismo e contém elevada quantidade de citocinas devido ao contacto com diversos antígenos e bactérias exógenas, por isso é um alvo preferencial da infeção por HIV (16).

Sistema Nervoso Central – O SNC com as suas peculiares células de longo tempo de vida torna-se um reservatório fundamental para o HIV quer em doentes tratados com HAART quer em doentes não tratados. Visto que é protegido pela barreira hematoencefálica e pelo fluído hemato-cerebrospinal no epitélio dos plexos coroídeos, há uma limitação da passagem dos fármacos antirretrovirais (16) e células do sistema imunitário específicas para o HIV. Os astrócitos e os monócitos infetados são os dois principais reservatórios no cérebro.

In vitro, a infeção por HIV das linhas celulares de astrócitos resulta em integração viral, mas com produção viral pouco significativa, semelhante à infeção latente. DNA viral integrado em astrócitos pode ser encontrado no cérebro de doentes e está relacionado com a demência associada ao HIV (10).

Tecido Linfóide – Geralmente o HIV entra no hospedeiro humano através das superfícies mucosas, mediado por células dendríticas e macrófagos. Subsequentemente é disseminado através dos tecidos linfóides, que se tornam o maior reservatório do vírus em todo o curso da infeção (16). Linfócitos T CD4+ em repouso, contendo DNA viral integrado, circulam através do sangue e nódulos linfáticos, fazendo do tecido linfóide um reservatório importante no organismo humano. Além disto, as células dendríticas ou outras células mielóides que residem em centros germinativos podem ser uma fonte para a replicação do vírus competente. Interações DC-linfócitos T podem contribuir para aumentar a suscetibilidade dos linfócitos T em repouso para serem infetados (10).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

Trato Geniturinário – RNA viral foi detetado nas secreções do trato genital de 54% das mulheres e no sêmen de 8 -10% dos homens tratados com HAART (10). O TGU masculino e feminino são então potenciais reservatórios para o HIV pois cada um tem microambientes que permitem uma replicação viral independente da replicação viral a nível sistémico (16). Assim como no SNC, a penetração dos fármacos no trato genito-urinário é limitada. No aparelho masculino, especificamente nos testículos, a barreira hemato-testicular também limita a entrada de células do sistema imune (10).

Estratégias para erradicar o vírus dos reservatórios

As duas principais abordagens para a cura da infeção por HIV são a "Cura Funcional", que pretende reduzir os reservatórios até se atingir um controlo da infeção na ausência de fármacos, e a "Cura Esterilizante", que ambiciona eliminar o vírus latente dos reservatórios.

A abordagem de "Cura Funcional" inclui diferentes estratégias como (Fig.6):

1. Iniciação da terapêutica HAART durante a primeira fase da infeção, levando a um controlo duradouro da virémia após da descontinuação de HAART;
2. Através da estratégia "*Shock and Kill*" que consiste em induzir, através de fármacos, a transcrição do vírus latente e reativar a replicação viral (fase de choque), na presença de HAART que por sua vez bloqueia a disseminação do vírus. Deste modo, as células com o vírus reativado ficam suscetíveis à *clearance* imunológica, ao efeito citopático e outros efeitos terapêuticos *ad hoc* (fase de eliminação), como explicarei mais à frente. Portanto, nestes casos, deve haver um aumento e reestruturação das funções imunológicas efetivas de modo a eliminar a replicação de vírus competente resultante da fase de choque (19).

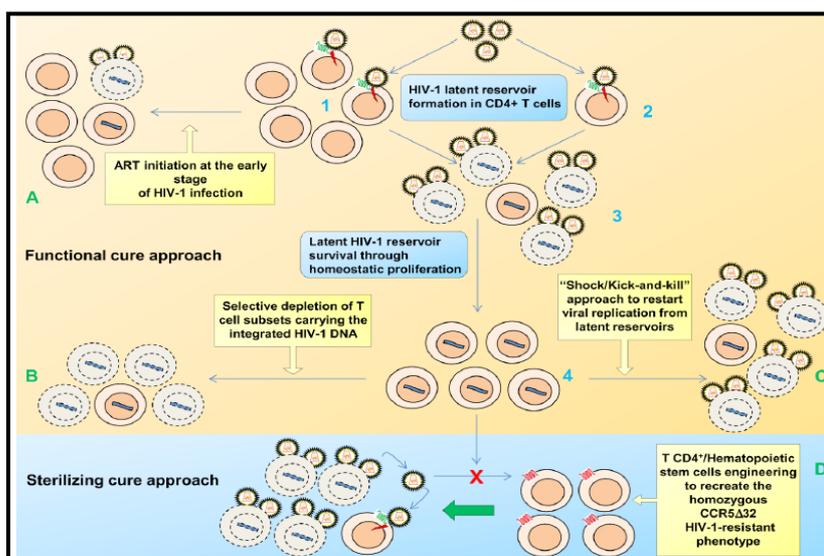


Figura 6: Estabelecimento da latência pós integracional e abordagens terapêuticas (14).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

A abordagem de “Cura esterilizante” (Fig.6) consiste na manipulação dos próprios linfócitos T CD4+ do doente ou células tronco hematopoiéticas através da deleção do co-receptor CCR5 seguido de uma infusão/transplante autólogo com essas células resistentes à infecção eliminando-se a população inicial de células infetadas. Contudo esta abordagem não funciona contra os vírus com tropismo para CXCR4, deste modo continuam-se a estudar diferentes estratégias que consigam a deleção de ambos os recetores (14).

A maioria das estratégias para a erradicação do vírus dos reservatórios inclui abordagens farmacológicas para eliminar as células infetadas latentes ou terapia génica utilizada com o objetivo de tornar as células resistentes ao HIV (10).

Cura Funcional

Estratégia "Shock and Kill"

Uma das abordagens que tem gerado algum entusiasmo inclui estratégias farmacológicas para reativar a latência de células infetadas levando à produção de vírus (“*shock*”) em conjunto com intervenções que permitam ao hospedeiro eliminar as células produtoras de vírus (“*kill*”) (20).

Fase “Shock”

Reativação farmacológica do vírus como estratégia de cura

Inibidores da Histona Deacetilase (HDACi) – As HDAC mantêm o HIV em silêncio transcricional, como referido anteriormente. Os HDACi são modificadores epigenéticos e têm sido investigados em estudos recentes (19). A inibição das HDAC através de HDACi's tem como objetivo induzir a transcrição no LTR do HIV e é a estratégia que melhor está caracterizada para eliminar a latência viral (20).

O Vorinostat (SAHA), utilizado no tratamento do linfoma das células T Cutâneas (CTCL) mostra uma potente atividade na ativação de células infetadas latentes *in vitro* e nos linfócitos T CD4+ em repouso, *ex vivo*, nos doentes tratados com HAART (10). Contudo, para ocorrer uma ativação eficaz do estado de latência, provavelmente terá de induzir a produção de RNA viral, a tradução deste RNA em proteína viral e a eventual libertação de novos virões, terminado idealmente na morte da célula hospedeira associada. Contudo, recorrendo a este fármaco a transcrição de RNA não conduz à produção de proteínas,

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

como sugerido por um estudo num modelo de células T primárias, em que Vorinostat aumentou a transcrição viral mas não ocorreu a produção da proteína (19).

HDACi's mais potentes têm-se mostrado promissores em ensaios de fase I (19). O Panobinostat, um HDACi mais potente que o Vorinostat encontra-se em ensaios clínicos de fase III em doentes com linfoma de Hodgkin's e CTCL e foi estudado quanto à sua capacidade de perturbar a latência viral em doentes tratados com HAART. (NCT01680094). (20) Até à data não foram publicados quaisquer resultados (21). Sabe-se ainda que o Panobinostat leva a um aumento dos níveis de RNA viral no plasma e uma diminuição transitória no DNA viral, evidenciado que os problemas associados ao bloqueio pós transcricional podem ser superados. Outro HDACi, a Romidepsina, foi bem tolerada, induzindo a transcrição do HIV resultando assim em virémia plasmática.

Devemos ainda considerar o impacto negativo destas moléculas como por exemplo, o facto de suprimirem a capacidade dos linfócitos T citotóxicos eliminarem as células infetadas pelo HIV, limitando potencialmente o papel da imunidade inata e da imunoterapia como estratégia de cura. Portanto, os HDACi's podem ser cada vez mais eficazes na reversão da latência mas também podem provocar efeitos colaterais indesejados e mais duradouros.

Contudo, embora seja claro que HDACi's por si só não efetuam a cura da infeção por HIV eles podem ser utilizados para reativar o provírus latente (19).

Inibidores da Metilação – O LTR 5' do HIV contém domínios CpG metilados que contribuem para a manutenção da latência viral através de silenciamento transcricional (7), como explicado anteriormente. Assim os inibidores da Metiltransferase (DNMTi) apresentam potencial para ativar a infeção latente. Estudos *in vitro* com o DNMTi 5-aza-2'deoxicitidina (5-aza-dC) mostraram efeitos variáveis em diferentes linhas de células (Fig.7). Contudo, existe um efeito sinérgico entre o efeito do 5-aza-dC e o Vorinostat na reativação do HIV *ex vivo* em linfócitos T CD4+ de doentes tratados com HAART (10).

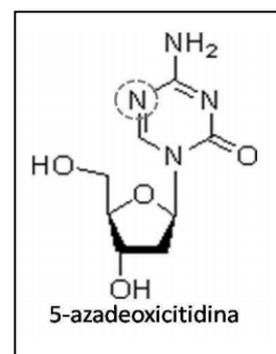


Figura 7: Estrutura da 5-aza-dC (22).

Moduladores da Proteína Cinase C (PKC) – Um dos muitos mecanismos propostos para erradicar os reservatórios de HIV envolve modulação farmacológica das vias de sinalização envolvidas na replicação do HIV como a via da PKC (20). Os agonistas da PKC

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

mostram-se potentes indutores reativação da latência viral através da sinalização PKC-NF- κ B (22). O Fator Nuclear Potenciador da cadeia leve κ dos linfócitos B ativados (NF- κ B) é uma proteína ubíqua reguladora, envolvida na promoção da transcrição de muitos genes. NF- κ B encontra-se no citoplasma associada às proteínas I κ B, a fosforilação destas proteínas leva à sua degradação e consequente libertação do NF- κ B. Este é então transportado para o núcleo onde vai promover a transcrição através do recrutamento de outros co ativadores (20).

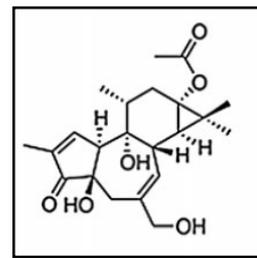


Figura 8: Estrutura da Prostatina (22).

A ativação da PKC mostrou-se um mecanismo potencial para a eliminação da latência, *in vitro*, através da utilização de Prostatina (Fig.8) (10). Esta Molécula foi reconhecida pela primeira vez na década de 1990, quando se descobriu que era um componente ativo da planta medicinal tradicional, *Homalanthus nutans* (22). Este composto tem-se mostrado capaz de reativar o vírus da latência através da fosforilação das I κ B mediada por PKC, que por sua vez conduz à ativação de NF- κ B, promovendo a transcrição (20).

Existe também um efeito sinérgico entre a utilização da Prostatina e os HDACi como o Vorinostat. Mas a Prostatina é um agente ativador não específico e nunca foi administrado em humanos, portanto, não é claro que este fármaco possa ser usado em ensaios clínicos (10).

Mais recentemente a Briostatina macrólido (Fig.9), outro potente ativador da via PKC mostrou reativar o vírus latente (10) além disto este é candidato fundamental para a eliminação do vírus dos seus reservatórios tendo em conta a sua posterior utilização em ensaios clínicos como agente terapêutico em humanos com cancro fazendo com que o composto possa ser mais facilmente testado em seres humanos pela sua capacidade para eliminar o HIV *in vivo* (20). Nano partículas carregadas com Briostatina ou com a combinação de Briostatina e HDACi (butirato de sódio) ativaram o vírus latente *in vitro* e podem ser eficientemente direcionadas aos linfócitos T CD4⁺ por incorporarem um anticorpo anti CD4 (10).

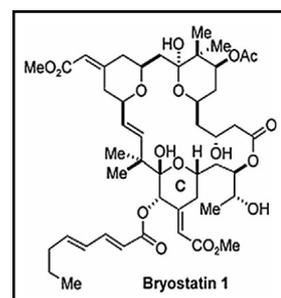


Figura 9: Estrutura da Briostatina (22).

No entanto, estudos sobre a Briostatina têm sido limitados devido ao custo associado à sua síntese, que é restringida pela sua complexidade estrutural e baixa abundância de briozoários a partir do qual é sintetizada. Recentemente, foi descrita a síntese de análogos da Briostatina, os Briólogos, que se mostraram mais potentes na

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

reativação da latência em relação a Briostatina e até 1000 vezes mais potentes que a Prostatina. Estes análogos permanecem ainda em estudo (20).

Fase "Kill"

Contudo, sabe-se que depois da reativação da latência dos linfócitos T CD4+ através de fármacos (fase de Choque), os linfócitos reativados não são eliminados pelos linfócitos autólogos citotóxicos devido a defeitos na qualidade da resposta dos CTL específicos do HIV. Estes resultados sugerem que a reativação farmacológica da latência não é suficiente para eliminar os reservatórios. Portanto são necessárias alternativas ou abordagens complementares para assegurar que o sistema imunitário tenha a capacidade para identificar e erradicar as células infetadas (16).

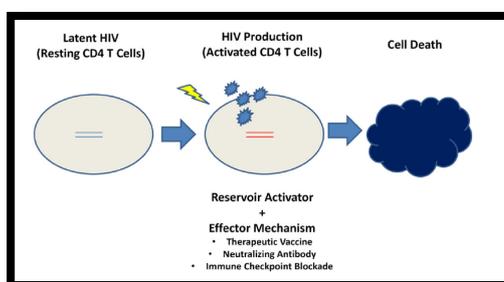


Figura 10: Estratégias "Kill" (23).

Para aumentar a capacidade do hospedeiro para eliminar as células reservatório depois da sua ativação, muitas estratégias imunológicas estão a ser investigadas (Fig.10). Estas estratégias incluem vacinas terapêuticas, anticorpos monoclonais e inibidores do ponto de verificação do sistema imunológico (13).

Vacinas Terapêuticas – “Controladores do HIV” ou “Elite Controladora” correspondem à pequena percentagem de doentes que conseguem controlar naturalmente a replicação viral abaixo dos níveis de deteção padronizados (13). Nestes indivíduos os linfócitos T CD8+ conseguem eliminar seletivamente as células produtoras de vírus. Este conceito levou a um interesse renovado pelas vacinas terapêuticas com o objetivo de aumentar a resposta imune específica, impulsionando a atividade dos linfócitos T citotóxicos de modo a acelerar a diminuição progressiva dos reservatórios durante o tratamento HAART ou melhorar o controlo das recidivas após interrupção da terapêutica. Diversas vacinas terapêuticas foram avaliadas em pessoas infetadas. No entanto, embora se tenham mostrado imunogénicas na maior parte dos estudos, não mostraram benefício clínico ou

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

virológico, apresentando uma capacidade limitada na prevenção da recidiva viral e além disso, algumas ainda mostraram efeitos adversos.

Apenas a infusão de células dendríticas pulsadas com antígeno têm mostrado alguma potencialidade, mas ainda necessita de confirmação.

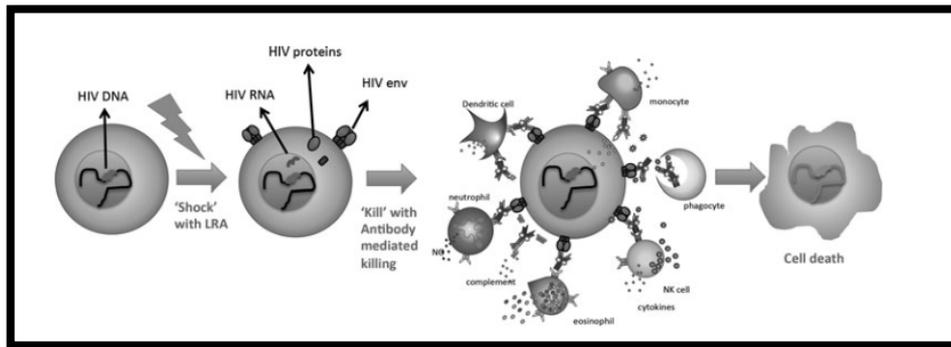
A próxima geração de vacinas terapêuticas será combinada com agentes ativadores dos reservatórios (23).

Anticorpos – Um anticorpo pode ser dividido em dois domínios funcionais, incluindo dois braços de ligação que formam o domínio de ligação ao antígeno (Fab) e um domínio constante (Fc). Enquanto o Fab é responsável pela especificidade da molécula para o antígeno e consequente potencial de neutralização, o domínio Fc é responsável pelas indicações dadas ao sistema imunitário inato sobre como destruir o antígeno ao qual o anticorpo se encontra ligado. Os anticorpos podem ser dirigidos contra vários epítopos conservados, tendo como alvo diferentes estruturas virais. Contudo os anticorpos neutralizantes são essencialmente dirigidos à glicoproteína de superfície gp 120. Além disto, estas terapêuticas monoclonais permitem eliminar rápida e efetivamente o material onde se ligam através do recrutamento de células do sistema imunitário inato e da sua atividade citotóxica e antiviral.

Uma nova geração de mAb aumentou o interesse dos investigadores por esta estratégia. Dois estudos em macacos rhesus demonstraram que a infusão de um *cocktail* de mAb ou certos mAb injetados individualmente resultaram numa supressão substancial da virémia, embora que transitória. A infusão do mAb, PGT121, resultou não só numa supressão rápida e profunda do RNA viral no plasma, mas também em reduções substanciais de DNA pró-viral no sangue periférico, nódulos linfáticos, e mucosa gastrointestinal. Estes dados sugerem que certos mAbs podem ser capazes de atingir células infetadas pelo vírus nos tecidos, embora continue a ser necessário determinar se estes mAbs podem ter impacto nos reservatórios virais. Nomeadamente avaliar a sua acessibilidade limitada a certos reservatórios anatómicos como o SNC (23).

Assim, terapêuticas baseadas em anticorpos monoclonais constituem a fase “Kill” de uma estratégia “*Shock and Kill*”, de modo a suportar a clearance imunológica mediada por linfócitos T ou oferecer uma estratégia alternativa que nos conduza até uma cura funcional (Fig.11) (5).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura



Figural I: Administração de anticorpos exógenos contra epítomos Env vai recrutar células efetoras inatas para eliminar as células infetadas na presença de HAART de modo a evitar infeções posteriores (5).

Outros métodos para erradicar células ativadas têm sido estudados, como por exemplo as imunotoxinas que são compostas por um domínio derivado de um anticorpo monoclonal ligado a um fragmento tóxico. Esta imunotoxina contém um anticorpo direcionado à proteína viral do envelope Gp120 e carrega uma potente toxina (PE38) capaz de eliminar a célula infetada aquando da ligação do anticorpo à proteína, através de efeito citopático. A imunotoxina têm sido utilizada para eliminar a latência em linfócitos T e macrófagos, depois da reativação da expressão génica do HIV através de fármacos indutores (16). Deste modo esta abordagem pode ser considerada uma estratégia “*Shock and Kill*”, na medida em que se reativam as células latentes fazendo com que a célula expresse proteínas virais, que por sua vez constituem o alvo terapêutico, neste caso a Gp120.

Outra estratégia com potencialidade para aumentar o controlo imunitário do hospedeiro envolve o bloqueio de reguladores imunológicos. Os linfócitos T ativados expressam uma série de recetores que quando em contato com os seus ligandos resultam numa supressão de funções e entram num estado de latência, perdendo a sua função imunológica. O regulador imunológico que melhor está caracterizado é o PD-1 (23), um regulador negativo da ativação de linfócitos T (19).

Os ligandos de PD-1 (PDL-1 e PDL-2) são amplamente expressos nos tecidos e por isso o uso de inibidores do PD-1 apresenta efeitos diretos no estabelecimento e manutenção da latência pois as células ativadas apresentam maior probabilidade para serem infetadas do que células em repouso (23). Em doentes tratados com HAART há uma correlação entre a expressão de PD-1 e a frequência de RNA e DNA viral (12). Bloquear o PD-1 restaura parcialmente a função imune do hospedeiro pois os linfócitos T CD8+ recuperam as suas funções de secreção de citocinas e proliferação, e ainda se observa uma diminuição da carga viral (24).

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

O PD-I está a ser investigado como potencial alvo terapêutico para erradicação do HIV latente.

Outra abordagem interessante relaciona-se com o uso de anticorpos bi- específicos. Depois de ser conhecido o papel de PD-I como marcador de latência em células infetadas, é plausível que um anticorpo bi- específico para PD-I e simultaneamente para as proteínas do envelope pode fornecer uma maior especificidade na deteção e destruição de células reativadas (19).

Terapêutica Precoce

Tratar a infeção HIV precocemente após a infeção pode também contribuir para a sua erradicação. A administração de HAART durante a fase aguda da infeção reduz o tamanho dos reservatórios, limita a geração de vírus mutantes e preserva a função imune. Por estas razões pensa-se que indivíduos infetados com HIV que iniciaram a terapêutica

durante a fase aguda têm maiores probabilidades de erradicar o vírus (Fig.12). É possível que uma administração precoce da terapêutica se torne curativa tendo como exemplo o caso "Missisipi Baby" e de outro caso semelhante, recentemente relatado, como será explicado mais à frente, embora a aplicabilidade destes dados em adultos permaneça incerta (23).

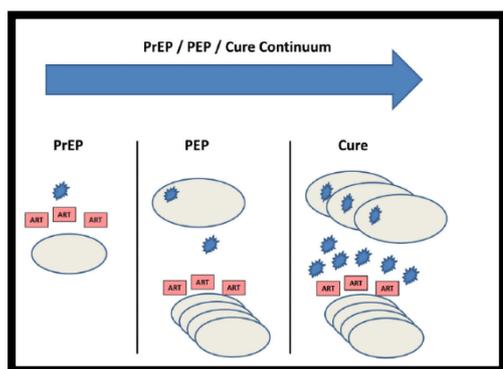


Figura 12: A terapêutica HAART, iniciada antes da exposição, é denominada profilaxia pré-exposição (PrEP), enquanto a HAART, iniciada logo após a exposição, é a profilaxia pós-exposição (PEP) que deve ser associada aos esforços que visam a erradicação do vírus (cura). Mesmo se a administração de HAART precoce não for curativa, reduz o tamanho do reservatório viral e preserva a função imunitária (23).

Coorte VISCONTI – OS “Controladores do HIV” ou “Elite Controladora” são um importante modelo para perceber os mecanismos por trás do controlo da infeção na ausência de tratamento. Uma “cura funcional” assemelhar-se-á ao mecanismo que ocorre nesses doentes, isto é, permite aos doentes infetados com HIV alcançar a remissão viral em que o HIV permanece no organismo em níveis baixos e é controlado pelo hospedeiro na ausência de HAART. Esta condição ocorre em 5 a 15% dos doentes que são tratados durante a fase primária da infeção, estes indivíduos são capazes de controlar a infeção

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

durante longos períodos de tempo após a interrupção dos tratamentos, e são chamados os controladores pós-tratamento (13).

Investigadores franceses conduziram um estudo em 14 doentes infetados com HIV nos anos 1990's e 2000's, um grupo conhecido por VISCONTI (2) (Viro-Immunological Sustained CONtrol after Tratement Interruption). Foi avaliado se as características de 14 controladores pós-tratamento eram semelhantes às dos doentes que conseguem controlar naturalmente a replicação viral abaixo dos níveis de deteção padronizados (13). Os doentes foram tratados 10 semanas após a infeção e pararam o tratamento 3 anos depois, em média (2). Depois da interrupção os controladores pós-tratamento apresentaram um controlo da infeção sustentada durante 7 anos (13). Os investigadores concluíram assim que a carga viral estava controlada após a paragem no tratamento.

Durante a fase aguda, os controladores pós-tratamento tinham níveis mais elevados de virémia e menor contagem de linfócitos T CD4+ que os doentes naturalmente controladores, além disso os grupos tinham uma base genética diferente assim como diferentes respostas a nível dos linfócitos TCD8+ e ativação imunitária (23).

Geralmente a maioria dos doentes tratados apresentam recidivas quando deixam de receber tratamento, mas certos doentes são uma exceção. Os investigadores franceses reportaram que o tratamento precoce após a infeção pode ter sido decisivo para garantir uma cura funcional em 10% dos casos diagnosticados precocemente (2).

"Missisipi Baby" – Uma criança do sexo feminino nascida de uma mãe seropositiva começou o tratamento com HAART 30 horas após o nascimento. O RNA viral foi detetado às 31h, ao 6º dia, 11º dia e 19º dia e chegou a níveis indetetáveis ao 29º dia. A terapêutica foi descontinuada entre os 18 e os 23 meses e aos 36 meses de idade e com a terapêutica retirada, o RNA viral, o DNA pró-viral e os anticorpos HIV-I permaneceram indetetáveis ou extremamente baixos no sangue e nos tecidos. No entanto, 27 meses depois da interrupção do tratamento, a criança apresentou recidiva viral. Embora os investigadores tenham ficado impressionados com o resultado de uma intervenção precoce, por esta ter conseguido eliminar temporariamente o HIV, ela não representou a cura da infeção (13).

Enquanto no caso "Mississippi Baby" a remissão durou apenas 27 meses após a interrupção da terapia antirretroviral, recentemente, na oitava conferência sobre a patogénese do HIV (19-22 de julho de 2015), foi divulgado um estudo francês, apresentado por Asier Sáez-Cirion, do Instituto Pasteur, que descreve o caso de uma jovem agora com 18 anos e meio que, ao nascer foi infetada pelo HIV via transmissão vertical e que está em

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

remissão virológica, apesar de não ter tomado qualquer terapia antirretroviral nos últimos 12 anos. A criança foi imediatamente tratada com antirretrovirais durante seis semanas e diagnosticada como portadora do HIV um mês depois do nascimento. Dois meses depois, e após ter sido interrompido o tratamento profilático, a criança tinha uma carga viral muito elevada, levando ao início de uma terapia combinada com quatro antirretrovirais durante os primeiros seis anos. A criança interrompeu o tratamento durante um ano e, um ano mais tarde, quando voltou a ser reexaminada, tinha uma carga viral indetetável e foi decidido mantê-la sem tratamento (<50 cópias do RNA do HIV por ml de sangue). Doze anos depois, apresenta uma carga viral indetetável medida com um limiar de deteção particularmente baixo (<4 cópias de RNA do HIV por ml de sangue), apesar de nunca ter retomado o tratamento antirretroviral. A sua contagem de linfócitos T CD4+ manteve-se estável durante todo este período. Foi também referido que a menina não apresenta nenhum dos fatores genéticos conhecidos para ser associado a um caso de controlo natural da infeção e o mais provável é que ela esteja em remissão virológica. Apesar deste caso de remissão abrir novas perspetivas para a pesquisa, não deve ser considerada como uma cura, a jovem continua infetada e é impossível prever a evolução da sua condição. Deste modo são necessários estudos para determinar por que razões o controlo do vírus pode ocorrer após a cessação do tratamento (25).

Estes casos sugerem que a terapêutica precoce em crianças pode alterar o estabelecimento e a persistência de vírus competente nos reservatórios a longo prazo. (13) A iniciação da terapêutica imediatamente depois da infeção pode mudar dramaticamente as estratégias de tratamento nos filhos de mães infetadas com HIV (2).

Cura Esterilizante

Estratégias Genéticas

“Berlim Patient” – A descrição de um único caso de cura após transplante de células tronco hematopoéticas fortaleceu a esperança de uma cura para a infeção por HIV-1 (13).

A cura da infeção por HIV-1 por esterilização tem sido largamente citada e comemorada após o caso do “Berlin Patient”. Trata-se do caso de um doente americano do sexo masculino, morador em Berlim, diagnosticado com infeção por HIV-1 em 1995 e em 2006 com leucemia mieloide aguda (LMA). O doente era tratado com HAART com o esquema Efavirenz, Emtricitabine e Tenofovir nos 4 anos antes do diagnóstico da LMA, sem

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

carga viral detetável durante esse tempo. As análises de genotipagem do vírus indicaram que o coreceptor utilizado pelo vírus era o CCR5 sendo que 2,9% exibiram tropismo para CXCR4 ou para ambos os coreceptores. O doente foi sujeito a um transplante de células tronco de um dador compatível homocigótico para a mutação CCR5 Δ 32, isto é, um indivíduo com deleção de 32 nucleótidos no gene CCR5 que resulta numa proteína defeituosa não expressa na membrana citoplasmática da célula. Indivíduos homocigóticos para este polimorfismo são resistentes à infeção por HIV e os que são heterocigóticos apresentam uma progressão lenta da doença (26).

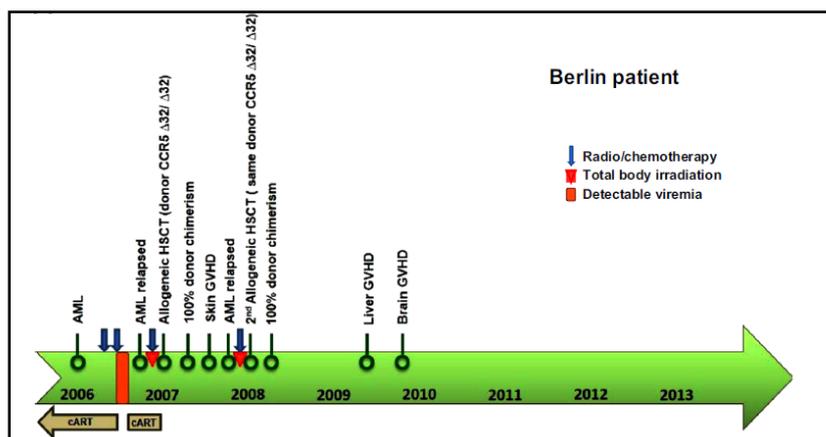


Figura 13: Representação esquemática do curso clínico do doente antes e depois do HSCT alogénico (13).

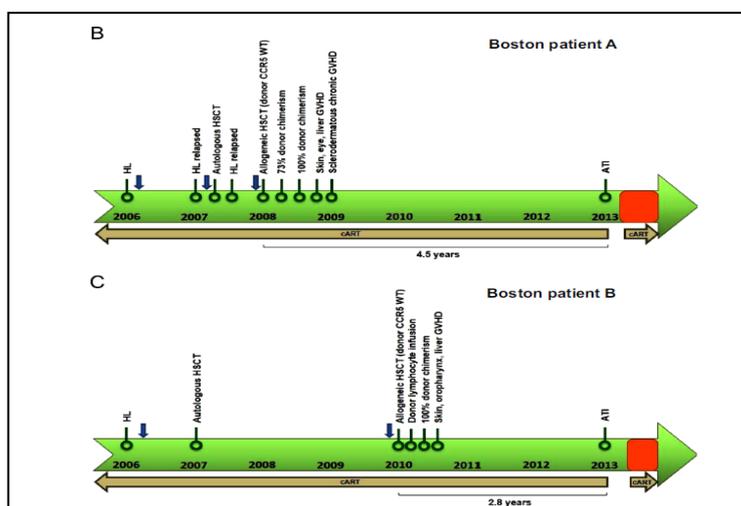
O doente descontinuou a terapêutica HAART no dia antes do primeiro transplante e depois de seis anos de acompanhamento, na ausência da terapêutica, não mostrou vestígios de replicação viral no sangue e em biópsias de tecidos, assim como mostrou uma redução dos níveis de anticorpos sugerindo uma estimulação por antígenos bastante baixa ou ausente (13) (Fig.13).

O procedimento funcionou e o doente aparenta estar livre de Cancro e HIV há mais de cinco anos (23).

Considerando a baixa frequência de população humana homocigótica para o gene CCR5 Δ 32 +/+ e a dificuldade de encontrar dadores compatíveis, o transplante de células tronco CCR5 Δ 32 é impraticável, em média e larga escala. Estratégias experimentais visando a cura através da diminuição da expressão de CCR5 em células tronco autólogas *ex vivo* utilizando, por exemplo, nucleases "Zinc Finger" têm-se mostrado eficazes no controlo da infeção e na obtenção de uma cura funcional em doentes infetados com HIV-1 (26), como explicado mais à frente.

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

"Boston Patients" – Um estudo recente investigou o impacto da HAART nos reservatórios virais em 2 doentes infetados com HIV-1 e diagnosticados com linfoma (2) que receberam um transplante de células HSC, conhecido como o caso “ Boston Patients”. A terapêutica HAART foi usada para proteger as células transplantadas até o quimerismo ocorrer completamente (23). Descreveu-se uma importante redução de DNA viral a longo prazo chegando a valores indetectáveis, em conformidade com outro estudo que mostrou que os níveis de DNA viral 2 meses após o transplante são menores que os níveis de DNA observados na linha de base, o que sugere que o transplante associado a terapêutica HAART reduz os reservatórios virais nos doentes infetados (13). Sobre a cobertura de HAART as células do sistema imune do dador substituíram as originais durante anos (23). Contudo sabe-se que os doentes envolvidos no estudo “Boston Patients” sofreram um forte recidiva de virémia plasmática meses após a interrupção do tratamento HAART (Fig.14), o que



sugere que o HIV permanece em santuários indetectáveis ou em níveis não detetáveis pelas técnicas atuais (13).

Figura 14: Representação esquemática do curso clínico dos doentes de Boston antes e depois do HSCT alogénico. (2).

Nucleases "Zinc Finger" – Apesar das tentativas feitas, o resultado conseguido no caso “ Berlin Patient” nunca mais foi repetido apesar disso continuam a fazer-se esforços para modificar os linfócitos T CD4+ e as células hematopoéticas estaminais/progenitoras humanas (HSPCs) para serem resistentes à infeção (23). Estratégias visando a cura incluem metodologias que procuram a diminuição da expressão dos coreceptores CCR5 e CXCR4 em células tronco *ex vivo*, assim, a utilização de nucleases "Zinc finger" trata-se de uma dessas estratégias (25).

As nucleases desenhadas são uma família de diversas proteínas que são construídas para ligar a determinada sequência do DNA introduzindo um quebra na cadeia dupla (DSB). A reparação da DSB tanto é suscetível de erros finais não homólogos, como pode resultar na recombinação homóloga fiel. A via de reparação com erros não homólogos resulta em inserções e deleções e consequentemente num gene não funcional. As ZNF modificadas

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

artificialmente são uma ferramenta de modificação do genoma bastante comum. As nucleases “zinc finger” (ZFN's) foram as primeiras nucleases desenhadas para modificar o coreceptor CCR5 (15) em HSPC's (2).

As ZNF's específicas para CCR5 são capazes de inativar este coreceptor em linhas celulares primárias de linfócitos T CD4+ *in vitro* e além disso ocorre produção de linhagens de células hematopoiéticas sem expressar o coreceptor. Como resultado destas informações promissoras diversos ensaios clínicos estão a testar a segurança e eficácia de transplantes autólogos usando ZNF modificadoras dos linfócitos T CD4+ infetados em indivíduos infetados com HIV (11). Foi provado que depois da interrupção dos tratamentos, 4 semanas após a injeção de linfócitos T autólogos com o gene CCR5 disfuncional através da utilização de ZNF's, o RNA viral tornou-se indetetável em 1 dos 4 doentes em estudo e o DNA viral diminui na maioria dos doentes, indicando que a modificação executada nos linfócitos T é importante para uma intervenção na duração da terapêutica antirretroviral e forneceu fundamentos para acreditarmos numa “cura funcional” (15). Os resultados de um ensaio clínico de fase I mostraram que doentes tratados com linfócitos T CD4+ modificados obtiveram um aumento dos linfócitos T CD4+, com baixa expressão de PD-1 (13).

Contudo, estas nucleases não protegem contra os vírus com tropismo para CXCR4 e estão a estudar-se em linhas de células de rato humanizadas, nucleases X4 específicas e com especificidade para os dois coreceptores, conseguindo-se resultados positivos (14).

O maior desafio desta estratégia é a acessibilidade dos ZNF's ao DNA do HIV devido a formação de cromatina repressiva no promotor do HIV, incluindo a modificação das histonas e a metilação do DNA e por isso a eficácia das ZFN no controlo viral dos reservatórios depende do estado epigenético do HIV no genoma humano (15). A segurança e a eficácia das ZNF, principalmente em relação à sua ação apenas nos genes pretendidos assim como o acesso ao tratamento, pode ser um dos principais problemas de uma estratégia que inclua terapia génica (2).

Conclusão

O largo conhecimento sobre a biologia da infeção por HIV advém do facto de este ser um dos microrganismos infecciosos mais intensamente estudados na história recente. Esse conhecimento tem contribuído para as diversas estratégias descritas ao longo desta monografia, que estão atualmente a ser testadas quanto à sua capacidade para erradicar a infeção por HIV (11).

A obtenção da cura da infeção por HIV-1 por esterilização foi um dos maiores avanços na última década e significou uma mudança de paradigma na luta contra o HIV-1. Oito anos após o caso “Berlim Patient”, a comunidade científica aguarda relatos de procedimentos mais simples e viáveis para a cura da infeção por HIV-1 e que possam estar disponíveis para todos os doentes (26).

A terapia génica, a estratégia “*Shock and Kill*” ou a HSCT’s, constituem diferentes estratégias para alcançar a cura e cada uma apresenta diferentes conjuntos de desafios. Esforços para reativar os reservatórios de HIV devem ser conjugadas de forma efetiva com estratégias de erradicação das células alojadas nesses reservatórios. Abordagens de terapia génica devem superar questões de segurança e melhorar a especificidade para células marcadas por genes de modo a exercer efeito terapêutico (11).

Com o caso “Mississippi baby” e o caso, recentemente divulgado, da jovem que se encontra em remissão há 12 anos (25) foi também demonstrado que terapêutica precoce é eficaz na diminuição do tamanho dos reservatórios podendo levar a um atraso no tempo da recidiva viral quando a HAART é interrompida. Contudo uma remissão ou cura sustentável do HIV não requer apenas a redução do tamanho dos reservatórios, mas também modificar a distribuição da replicação de vírus competente nos linfócitos T CD4+ e tecidos (12).

Apesar da erradicação do HIV do hospedeiro infetado parecer extremamente complexa e desafiante, os investigadores não podem abandonar o objetivo de encontrar estratégias para impedir a replicação do HIV a longo prazo, prevenir a disfunção imunitária e eliminar o vírus dos seus reservatórios (16).

Os investimentos no desenvolvimento de vacinas profiláticas, de novos fármacos, (23) assim como o desenvolvimento de ensaios clínicos para quantificar os reservatórios, e identificação de biomarcadores para a latência viral ou função imunológica, são cruciais para travar esta epidemia. Enquanto estes não aparecem, há que apostar nas medidas ao nosso alcance, nomeadamente na difusão das medidas de prevenção (19).

Bibliografia

1. LORETO, S., PEREIRA, A.,M. J. – A infeção por HIV – importância das fases iniciais e do diagnóstico precoce Ata Farmacêutica Portuguesa, Vol. II N.º 1.
2. QIAN, Y., MING, S., YIMG M. – HIV cure and HIV Reservoirs – Biomed Environ sci 27(6) (2014) 478-480.
3. TURNER G., SUMMERS, F. – Structural biology of HIV. – Journal of Molecular Biology,(1999) 285:1-32.
4. FREED, O. – HIV-1 replication. – Somatic Cell and Molecular Genetics,(2006) 26:13-33, 2002.
5. EULER, Z., ALTER, G. – Exploring the potential of monoclonal antibody therapeutics for HIV-1 eradication – AIDS research and human retroviruses (31) 2015: 13-21.
6. MANAVI, K. – A review on infection with human immunodeficiency virus. –Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, (2006) 20: 923-940.
7. POMERANTZ, R., HORN, D. – Twenty Years of Therapy for HIV-1 Infection – NatMed.(2003);9 (7). [Acedido em 25-07-2015] disponível na Internet : <http://www.medscape.com/viewarticle/458640>
8. SILICIANO, R., GREENE, W – HIV Latency-Cold Spring Harb perspectives in medicine (2011).
9. WHITNEY, J. et al. – Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys – Reserach Letter-Nature (2014) Vol.0.
10. SMITH, M., WIGHTMAN, F., LEWIN, S. – HIV Reservoirs and Strategies for Eradication.
11. DIDIGU, C., DOMS, R. – Gene Therapy Targeting HIV Entry- Journal Viruses (2014) 1395-1409.
12. ANANWORANICH, J., DUBÉ, K.,CHOMONT, N. – How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs? – Curr Opin HIV AIDS (2015) 10 (1):18-28.
13. PASSAES, C., CIRIÓN-SÁEZ, A. – HIV cure Research: Advances and Prospects- Elsevier- Virology 454-455 (2014) 340-352.
14. BATTISTINI, A., SGARBANTI, M. – HIV-1 Latency: An update of Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. Viruses Journal, 6, (2014), 1715-1758.
15. ZHANG, J., CRUMPACKER, C. – Eradication of HIV and cure AIDS, now and how? – Frontiers in Immunology (2013) Volume 4 Artigo 337.

Possíveis estratégias para erradicar o HIV de todos os seus reservatórios no organismo humano – Perspetivas de Cura

16. SAKSENA, N., WANG, B.; ZHOU, L., SOEDJONO, M.; HO, Y., CONCEIÇÃO, V – HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoirs sites. *HIV/AIDS-Research and Palliative Care* (2010) (2) 103-122.
17. HO, C., SHAN, L., HOSMANE, N., WANG, J., LASKEY, B., ROSENBLOOM, I., LAI, J., BLANKSON, N., SILICIANO, D., SILICIANO, R. – Replication-Competent Non induced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell*. (2013) 24;155(3):540-51.
18. PALMER, S., JOSEFSSON, L., COFFIN, M. – HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV Infection – Symposium (2011) *Journal of internal Medicine*.
19. THORNHILL, J., FILDER, S., FRATER, J. – Advancing the HIV cure Agenda: the next 5 years – *Curr Opin Infect Dis*, 28 (2015) 1-9.
20. ARCHIN, N., MANGOLIS, D. – Emerging strategies to deplete the HIV reservoir – *Curr Opin Infect Dis*. (2014) ; 27(1): 29-35.
21. UNIVERSITY OF AARHUS. Safety and Effect of the HDAC Inhibitor Panobinostat on HIV-1 Expression in patients on Suppressive HAART. [Acedido em: 12-07-2015] disponível na Internet:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01680094?term=NCT01680094&rank=1>
22. JIANG, G., DANDEKAR, S. – Targeting NF-kB Signaling with Protein Kinase C Agonists as an emerging strategy for combating HIV latency-AIDS Research and human retroviruses. (2015)13: 4-14.
23. BAROUCH, D., DEEKS, S. – Immunologic Strategies for HIV-1 Remission and Eradication-*Science* (2015) (345): 169-174.
24. CHIESA, M., RAMÍREZ, B., TERÁN, G – Una nueva vía terapéutica para controlar el VIH? La molécula PDI en la inhibición de la respuesta inmune celular – *Gac Méd Méx*. (2008); 144 (1).
25. First case of prolonged remission (12 years) in an HIV-infected child (2015). [Acedido a 27-07-2015] disponível na Internet:
<http://www.pasteur.fr/en/institut-pasteur/press/press-documents/first-case-prolonged-remission-12-years-hiv-infected-child>.
26. SOUZA, T., FERNANDES, R., ACOSTA, E. – Tratamento para cura do HIV-1: “The Berlin Patient” – *Revista Científica da FMC* (7) 2012:9-11.