

Cláudia Filipa Moreno Baptista

**NOVAS TERAPIAS ANTIRRETROVIRAIS:
PARA QUANDO UMA VACINA ANTI HIV?**

Orientador: Professor Doutor Nuno Almeida Saraiva

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2018

Cláudia Filipa Moreno Baptista

**NOVAS TERAPIAS ANTIRRETROVIRAIS:
PARA QUANDO UMA VACINA ANTI HIV?**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 18/12/2018, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação 382/2018, de 26/11/2018, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^a Doutora Ana Sofia Fernandes

Vogais:

Professora Ana Mirco (especialista ULHT)

Professora Dulce Santos (especialista ULHT)

Orientador:

Prof. Doutor Nuno Almeida Saraiva

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2018

Resumo

O sucesso da terapia anti-retroviral (ART) na manutenção da infecção pelo HIV tem sido um dos melhores neste último século. A ART levou à transformação do HIV, de uma sentença universal de morte para uma doença crónica. Em todas as partes do mundo, assistimos a uma redução dramática na morbilidade e mortalidade relacionadas com o HIV, e o tratamento está agora disponível para cerca de 21 milhões de indivíduos – mais de metade do número de pessoas que vivem com este vírus. No entanto, apesar desses grandes avanços, mais de um milhão de pessoas morrem a cada ano de doenças relacionadas com o HIV, e há registo de cerca 1,8 milhão de novas infeções. Contudo, permanecem por resolver dois grandes desafios científicos para realmente ver o fim do HIV – encontrar uma cura e uma vacina eficaz.

Investigações realizadas na última década resultaram numa melhor compreensão de como e onde o HIV persiste em pacientes a realizar ART. Ficou claro que, o estabelecimento de uma infeção latente em células de vida longa é a principal barreira para curar o HIV ou para permitir uma remissão sustentada livre de ART. Baseadas por estudos *in vitro* e *ex vivo*, várias abordagens terapêuticas destinadas a esgotar o *pool* de células infetadas de forma latente, foram testadas em ensaios clínicos experimentais de pequena escala, incluindo estudos de intensificação de ART, na edição de genoma, na ART durante a infeção precoce e aguda, e na reversão de latência. Mais recentemente, tem havido um maior foco em terapias imuno-baseadas na busca progressiva de uma cura para o HIV, incluindo vacinas terapêuticas, agonistas do recetor *toll-like*, anticorpos amplamente neutralizantes, inibidores do *checkpoint* imunológico, interferon- α e terapia com interleucinas. Também estão a decorrer estudos em que as intervenções de imunoterapia são igualmente testadas em combinação com a reversão de latência.

Nesta dissertação, são apresentados e discutidos os resultados globais destas intervenções clínicas, que em última análise se direccionam para uma cura ou vacina para o HIV.

Palavras-chave: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), Terapia Antirretroviral, Vacinação, Profilaxia

Abstract

The success of antiretroviral therapy (ART) in the management of HIV infection has been one of the best in medicine in the last century. ART led to the transformation of HIV from a universal death sentence to a chronic manageable disease. In every part of the world, we have seen a dramatic reduction in HIV-related morbidity and mortality, and treatment is now available to 21 million people – over half the number of people living with this virus. However, despite these great advances over one million people die of HIV-related illnesses each year and there are 1.8 million new infections. Two profound scientific challenges remain that must be solved to truly see an end to HIV – finding a cure and an effective vaccine.

Research over the past decade has resulted in a much-improved understanding of how and where HIV persists in patients on otherwise ART. It has become clear that the establishment of a latent infection in long-lived cells is the key barrier to curing HIV or allowing for sustained ART-free remission. Informed by *in vitro* and *ex vivo* studies, several therapeutic approaches aimed at depleting the pool of latently infected cells have been tested in small-scale experimental clinical trials including studies of ART intensification, genome editing, ART during acute/early infection and latency reversal. More recently, there has been an enhanced focus on immune-based therapies in the onwards search for an HIV cure including therapeutic vaccines, toll-like receptor agonists, broadly neutralizing antibodies, immune checkpoint inhibitors, interferon- α and interleukin therapy. In ongoing studies immunotherapy interventions are also tested in combination with latency reversal.

In this dissertation, the overall results of these clinical interventions ultimately aimed at a cure or vaccine for HIV are presented and discussed.

Keywords: Acquired Immunodeficiency Syndrome (SIDA), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Antiretroviral Therapy, Vaccination, Prophylaxis.

Índice de Abreviaturas

Sigla	Nomenclatura
Abs	Anticorpos
ALVAC	Vetor Aventis Pasteur's canarypox
APC	Células apresentadoras de antígenos
ARVs	Antiretrovirais
ART	Terapia antirretroviral
AZT	Zidovudina
CA	Cápside
cART	Terapia Antirretroviral Combinada
bnAbs	Anticorpos Amplamente Neutralizantes
CDC	Centro de Controlo e Prevenção da Doença
CD4bs	Sítio de ligação ao CD4
CPV	Vírus Canaripox
CRFs	Formas Recombinantes Circulantes
CRM1	Região de Manutenção do Cromossoma 1
CTC	Células T Citotóxicas
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
CTLA4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
CV	Carga Viral
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddl	Didanosina
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA celular
dsDNA	DNA de cadeia dupla
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EUA	Estados Unidos da América
gp	Glicoproteína
GFP	Green fluorescent protein
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HDAC	Histona deacetilase
HDACi	Inibidores da histona deacetilase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

IBD	Domínio de ligação à Integrase
IC50	Metade da concentração necessária para atingir o máximo da inibição
IE	Inibidores da entrada
IFN- α	Interferão alfa
IIN	Inibidores da integrase
IL	Interleucina
IN	Integrase
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
INTR	Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa
INNTR	Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa
IP	Inibidor da Protease
IPAN's	Interações proteína-ácido nucleico
IPP's	Interações proteína-proteína
LRAs	Agentes de reversão de latência
LTR	Repetição de terminação longa
MA	Matriz
MCH	Complexo Major de Histocompatibilidade
MER	Mutação específica de resistência
NC	Nucleocápside
Nef	Fator Negativo
NIAID	Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infeciosas
NHP	Primatas não Humanos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PD1	Morte programada 1
PKC	Proteína cinase C
PR	Proteína Viral
RNA	Ácido ribonucleico
RPME	Região proximal da membrana externa
RV	Replicação viral
s.c.	subcutânea
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TCEH	Transplante de células estaminais hematopoiéticas
TCR	Complexo Recetor Células T
TQ	Tirosina Quinase

TR	Transcriptase Reversa
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre VIH/SIDA
URFs	Formas Recombinantes Únicas
Vif	Fator de Infetividade Viral
Vpr	Proteína Viral R
Vpu	Proteína Viral U
vRNA	RNA viral
WHO	Organização Mundial da Saúde

Índice

Resumo.....	4
Abstract.....	5
Índice de Abreviaturas.....	6
Índice	9
Índice de Figuras.....	11
Índice de Tabelas	12
1 – Introdução	14
1.1 – Estrutura do virião do HIV	15
1.2 – O genoma do HIV	16
1.3 – Ciclo de replicação do HIV	17
1.4 – Epidemiologia do HIV.....	18
2 – Terapia antirretroviral atualmente utilizada	23
2.1 – História da terapia anti-HIV	23
2.2 – Perspetiva geral da Terapia anti-HIV atual.....	24
2.3 – Geração de resistência aos Antirretrovirais	27
2.3.1 – Aptidão viral do HIV-1 e a sua influência na resistência aos fármacos	30
2.3.2 – Mutagénese letal	32
2.3.3 – Mecanismos de resistência ao HIV-1.....	33
3 – Novas Terapias anti HIV	37
3.1 – Terapia Antirretroviral.....	37
3.2 – Novos Agentes Antirretrovirais	37
3.2.1 – Transplante de células-estaminais hematopoiéticas e quimioterapia	38
3.2.3 – Agentes de Reversão de Latência: <i>Shock and Kill</i>	39
3.2.4 – Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos.....	43
3.2.5 – Agonistas dos Recetores <i>Toll-Like</i>	44
3.2.6 – Terapia com Interleucinas (IL2, IL7, IL15).....	46

3.2.7 – Interferão-Alfa.....	47
3.2.8 – Terapias com péptidos e proteínas	47
3.2.9 – Anticorpos Amplamente Neutralizantes	50
4 - Para quando uma vacina anti HIV	55
4.1 – Conceito de vacinação.....	55
4.1.1 – Perspetiva histórica das várias abordagens para produção de uma Vacina anti HIV	56
4.2 – Diferentes Abordagens para o Desenvolvimento de Vacinas Preventivas Anti HIV	58
4.2.1 – Indução de Anticorpos Neutralizantes	58
4.2.2 – Indução de células T específicas do HIV-1	59
4.3 – Novas vacinas em estudo	60
4.3.1 – Progresso dos ensaios clínicos pós RV144	62
4.4 – Considerações a ter no <i>design</i> das vacinas anti-HIV	66
5 – Conclusão	68
6 – Bibliografia.....	72

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura de uma partícula viral de HIV, sendo que do lado esquerdo temos uma partícula imatura e do lado direito uma partícula madura.	16
Figura 2: Genoma do HIV e RNA mensageiros.	17
Figura 3: Os três passos da entrada do HIV na célula hospedeira (célula T CD4).	26
Figura 4: Determinantes celulares para o estabelecimento e persistência do HIV na HAART. A persistência do HIV é determinada primeiro pela suscetibilidade de diferentes células à infecção (i), que é regulada pelo equilíbrio entre os fatores de dependência do hospedeiro e os fatores de restrição viral presentes nas células. Para persistir, as células infectadas precisam resistir aos sinais apoptóticos induzidos pela infecção viral e evitar a vigilância imunológica (ii). Essas células infectadas resistentes persistirão por períodos de tempo variáveis, dependendo do seu específico tempo de vida e da sua capacidade em proliferar sem aumentar os sinais de morte celular HIV-dependentes (iii).	30
Figura 5: Representação esquemática da mutagênese letal do HIV-1	33
Figura 6: A expressão de MARCH8 nas células produtoras diminui a infecciosidade viral, de uma maneira dependente do domínio RING-CH. Do lado esquerdo e médio, as células MAGIC5, à direita células 293T.	48
Figura 7: Níveis de Expressão intracelular do Env do HIV-1 e VSV-G com ou sem MARCH8 em células produtoras. Os extratos celulares foram submetidos a análises de imunotransferência usando Acs contra gp120, VSV-G, p24, MARCH8 e β -actina.	49
Figura 8: Concepção de combinações de sítios de ligação dos Acs no formato triespecífico. A solubilidade / rendimento de cada triespecífico é apresentada em ++ (mais alto), + (médio) ou +/- (baixo). A potência relativa contra um painel de vírus é indicada como a mais alta (vermelho), média/baixa (amarelo), - indica que o Ac não foi desenvolvido.....	52
Figura 9: Títulos de neutralização de diferentes bnAbs e abs triespecíficos contra um painel geneticamente diverso de cepas de HIV-1 circulantes.....	54
Figura 10: Diferentes tipos de elaboração de vacinas.	56

Índice de Tabelas

Tabela 1: Epidemia da SIDA de acordo com a UNAIDS, 2015	19
Tabela 2: Novos casos de Infecção por HIV ($\geq$ 15 anos), em Portugal, diagnosticados em 2016, por grupo etário e sexo	20
Tabela 3: Novos casos de Infecção por HIV, em Portugal, diagnosticados em 2016: por estadio inicial e sexo.	20
Tabela 4: Visão Geral da Terapia Antirretroviral	25
Tabela 5: Resistência e a prevalência dos diversos tipos de medicamentos Antirretrovirais na Europa	28

1 – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

O estudo sobre o primeiro paciente com síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) foi pela primeira vez descrito em 1981 (Hoffmann & Rockstroh, 2015). Os relatórios iniciais descreviam uma epidemia de pneumonia por *Pneumocytis* adquirida na comunidade, na maioria dos casos combinado com candidíase oral, pelo menos em homens que mantinham relações com outros homens. Ainda que, inicialmente o estilo de vida e os fatores comportamentais fossem tidos como possíveis causas, em 1983 foi, finalmente, identificado o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV/VIH) como a causa da SIDA (Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, 1983) (Gallo et al., 1983). Este vírus tem duas variantes: o tipo 1 (HIV-1) e o tipo 2 (HIV-2), sendo que a primeira variante tem uma maior prevalência do que a segunda (Hoffmann & Rockstroh, 2015).

No que diz respeito ao HIV este é constituído por diversas estirpes que são classificadas em quatro grupos, designados por grupo M, N, O e P. Destes, o grupo M é o principal e é responsável pela maioria da epidemia global. Os outros três grupos são bastante incomuns. O grupo O representa até 5% das infeções em vários países da África Ocidental e Central, e os grupos N e P foram raramente identificados nos Camarões. Dentro do grupo M, sabe-se que existem pelo menos nove subtipos geneticamente distintos e são eles o A, B, C, D, F, G, H, J, K. Na última década os avanços no sequenciamento do genoma completo do HIV levaram à identificação de formas recombinantes circulantes e únicas (CRFs e URFs, respetivamente).

A SIDA é considerada uma síndrome, ou seja, um conjunto de sintomas que não dizem respeito apenas a uma doença. É uma síndrome de imunodeficiência uma vez que o vírus deixa o sistema imunológico deficiente; e é adquirida, uma vez que resulta da ação de um agente externo ao organismo humano. Desde a sua descoberta, a SIDA já provocou mais de 25 milhões de mortes a nível mundial (Hoffmann & Rockstroh, 2015).

Em 1987, foi autorizado o primeiro agente antirretroviral, a zidovudina (AZT) para o tratamento do HIV, tendo aqui início a descoberta de outras novas terapias, no entanto nenhuma capaz de eliminar o vírus totalmente.

As principais vias de transmissão do HIV são as relações sexuais não protegidas com parceiros infetados pelo HIV, a partilha de seringas com um parceiro infetado e a transmissão vertical da mãe infetada para o filho recém-nascido (antes ou depois do nascimento; ou mais tarde, devido à amamentação). Existem ainda outras vias de transmissão, como por exemplo através de transfusões de sangue, mas estas são raras (Shaw & Hunter, 2012).

Até hoje não foi possível desenvolver um fármaco que ofereça uma cura definitiva ou uma vacina contra o HIV, embora a esperança média de vida dos indivíduos infetados tenha

aumentado significativamente devido ao desenvolvimento de fármacos antirretrovirais cada vez mais eficientes (Siliciano et al., 2003). O tratamento mais eficaz atualmente é a Terapia Antirretroviral Altamente Eficaz (HAART), que combina antirretrovirais que inibem diferentes passos do ciclo de replicação. No entanto e, devido à elevada taxa de mutação do vírus associada a uma taxa de replicação também elevada, surgem continuamente novas estirpes de HIV resistentes a estes fármacos. Como tal, novas abordagens terapêuticas capazes de inibir os principais mecanismos do ciclo de vida do HIV-1 e/ ou o desenvolvimento de uma vacina, são urgentemente necessárias para contornar os problemas sociais, económicos e humanos causados por este vírus (Ensoli, Cafaro, Monini, Marcotullio, & Ensoli, 2014).

1.1 – Estrutura do virião do HIV

O HIV-1 pertence ao género *Lentivirus* da família *Retroviridae*. As infeções com lentivírus, normalmente, mostram um curso crónico da doença, um longo período de latência clínica, uma replicação viral (RV) persistente e um envolvimento do Sistema Nervoso Central (Engelman & Cherepanov, 2012).

A partícula viral do HIV-1 é constituída por um genoma composto por duas cadeias simples de RNA de sentido 5'→3' associadas a proteínas da nucleocápside (NC). Este complexo encontra-se envolvido por uma cápside (CA) crónica, que é formada por monómeros de uma proteína de 24 kDa, designada por p24. No interior desta CA encontram-se também algumas enzimas como a protease (PR), a transcriptase reversa (TR), a integrase (IN) e ainda, as proteínas auxiliares Nef (*negative factor*), Vpr (*Viral Protein R*) e Vif (*viral infectivity factor*). A envolver as proteínas da CA existe a matriz (MA) da partícula viral, que é formada por monómeros da proteína p17, e à superfície da partícula viral existe uma membrana lipídica (Figura 1) (Turner & Summers, 1999). Cada partícula viral contém 72 complexos de glicoproteínas, que são integrados na membrana lipídica e, cada um destes complexos é composto por trímeros de glicoproteínas, gp120 externas e gp41 (Hoffmann & Rockstroh, 2015) (Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, 2011).

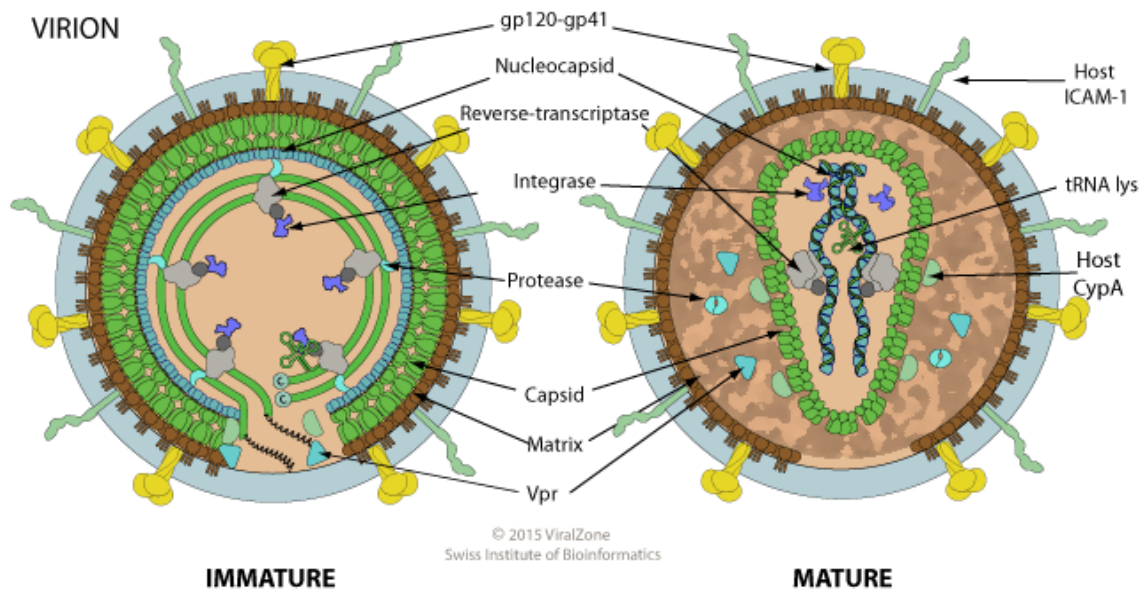


Figura 1 - Estrutura de uma partícula viral de HIV, sendo que do lado esquerdo temos uma partícula imatura e do lado direito uma partícula madura (Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, 2011).

1.2 – O genoma do HIV

O genoma do HIV-1 é ladeado por duas zonas terminais repetidas que se designam por LTR (*Long Terminal Repeats*) (Figura 2). A estrutura clássica do esquema de um genoma retroviral é 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' (Hoffmann & Rockstroh, 2015) (Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, 2011). A maior parte das replicações competentes dos retrovírus dependem de três genes: *gag*, *pol* e *env*, que são comuns a todos os retrovírus. *Gag* significa 'grupo-antígeno', *pol* representa a polimerase e *env* o envelope. O primeiro e último gene codificam para a NC e para as glicoproteínas do invólucro viral, enquanto o gene *pol* codifica para a TR e outras enzimas, como a IN. Para além destes, o HIV-1 contém seis genes (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*) no seu RNA, que contribuem para a sua complexidade genética. *Nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* foram, no passado, classificados como genes acessórios, uma vez que não são absolutamente necessários para a replicação *in vitro*. Os genes *nef*, *tat* e *rev* são produzidos, precocemente no ciclo de RV (Knysz, Szetela, & Gładysz, 2007).

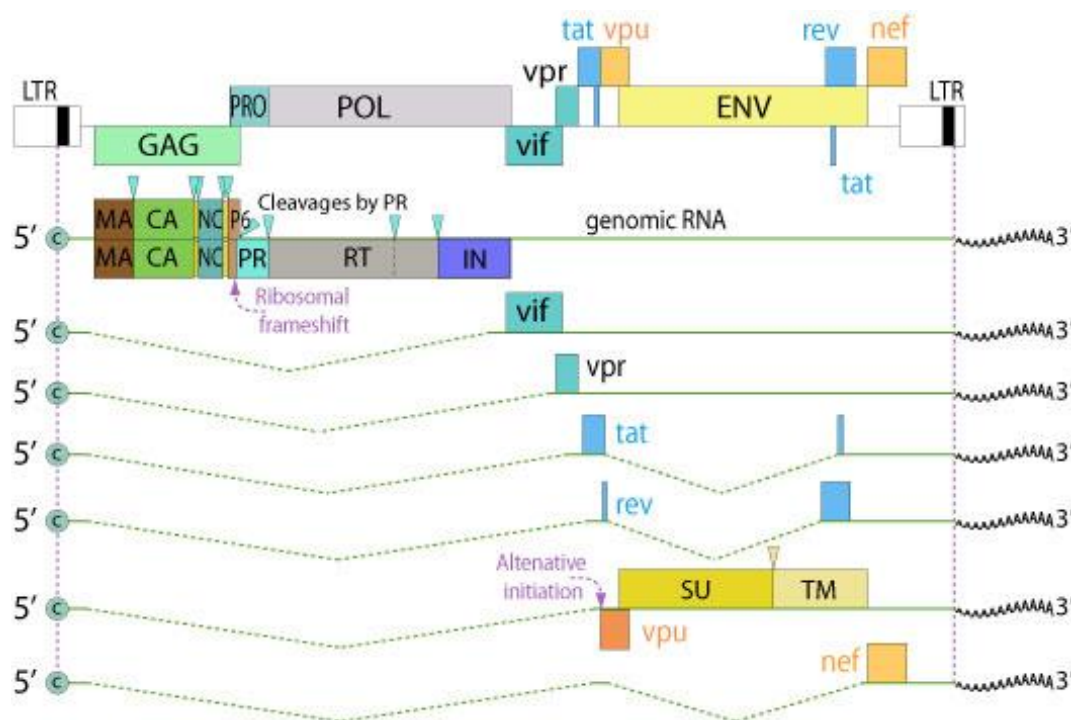


Figura 2 – Genoma do HIV e RNA mensageiros produzidos durante a infecção da célula hospedeira (Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, 2011).

1.3 – Ciclo de replicação do HIV

Como já foi referido, o HIV pertence à família *Retroviridae*, sendo um vírus do género *Lentivirus*, tipicamente responsável por infeções lentas e progressivas. As partículas virais são constituídas por um invólucro lipídico, que alberga no seu interior a cápside viral, cujo interior contém o genoma viral, complexado com a proteína viral da NC e, proteínas virais: IN e TR.

O tropismo destes vírus explica os sintomas associados à infeção, uma vez que as células eleitas como alvo do HIV são os linfócitos T do tipo CD4⁺. A entrada do vírus processa-se através da interação entre proteínas presentes no invólucro viral (gp41 e gp120) e o recetor CD4 da célula alvo, bem como os co-recetores CCR5 e CXCR4, que em conjunto levam à fusão das membranas virais e celular (Knysz et al., 2007). Uma vez no citoplasma, a CA viral sofre desagregação e o seu conteúdo é libertado, evento seguido da transcrição reversa do genoma viral de RNA para DNA de cadeia dupla (dsDNA), operação levada a cabo pela TR. A cópia de DNA do genoma viral é transportada para o núcleo onde, por ação da IN, sofre integração no genoma da célula hospedeira (Sierra, Kupfer, & Kaiser, 2005). Recorrendo à maquinaria enzimática celular, o genoma é seguidamente transcrito, originando cópias do RNA genómico viral, bem como vários mRNAs destinados à tradução de proteínas virais (Figura 2). Este último processo resulta na produção de 3 proteínas: o precursor da poliproteína Gag, constituída pelas proteínas matriciais (MA), CA e NC; o precursor da

poliproteína Gag-Pol, que dará origem à TR, IN e PR; e finalmente, o precursor da glicoproteína do envólucro, chamado de gp160. Este último, durante a sua passagem pelo retículo endoplasmático vai sofrer clivagem por uma protease do hospedeiro, sendo convertido nas proteínas do envólucro: gp41 e gp120 (Adamson & Freed, 2010). Estas proteínas são seguidamente transportadas para as imediações da membrana citoplasmática, juntamente com cópias do RNA viral (vRNA), onde, sobre coordenação mediada pela proteína Gag, ocorre a formação de partículas virais nascentes. A sua formação fica completa quando ocorre o *budding* da partícula na membrana citoplasmática, sendo esta a origem do envólucro lipídico do virião. No entanto, nesta fase o virião não se encontra ainda num estado maduro, esse estado é atingido quando a protease viral cliva os precursores proteicos Gag e Gag-Pol. Esta reação permite que a proteína NC se associe ao vRNA, que a proteína CA forme a cápside, que a MA se associe abaixo do envólucro, e que as proteínas TR e IN estejam prontas para catálise, quando o virião infectar uma nova célula alvo (Sierra et al., 2005). Para além das proteínas mencionadas, o genoma do HIV também codifica várias proteínas acessórias (Vif, Vpr, Nef e Vpu), que desempenham diversos papéis no ciclo de vida do vírus (Knysz et al., 2007).

1.4 – Epidemiologia do HIV

A epidemia pelo HIV representa um dos maiores desafios de saúde em todo o mundo, tendo importantes implicações tanto sociais, como económicas para a Saúde Pública. Aproximadamente 34 milhões de pessoas vivem, atualmente, com HIV, num total de 1,1 milhões de mortes relacionadas com a SIDA em 2015 e, ainda 2,6 milhões de novas infeções por ano. Com uma estimativa de 6,1 milhões de pessoas a viverem com HIV, a África do Sul continua a ser o país com a maior epidemia de HIV do mundo (Tabela 1) (Ensoli et al., 2014) (UNAIDS, 2016).

A amostra mais antiga de sangue humano com HIV positivo foi descoberta em Kinshasa (Zaire, que agora pertence à República Democrática do Congo) e data do ano de 1959. Após a primeira descrição de um paciente com SIDA em 1981, até aos tempos de hoje, quase todos os países do mundo têm sido afetados pelo HIV.

Tabela 1 – Epidemia da Sida de acordo com a UNAIDS, 2015 (UNAIDS, 2016)

Region	People living with HIV (total)	New HIV infections			AIDS-related deaths (total)	Total number accessing antiretroviral therapy
		total	Aged 15+	Aged 0–14		
Eastern and southern Africa	19.0 million [17.7 million–20.5 million]	960 000 [830 000–1.1 million]	910 000 [790 000–1.1 million]	56 000 [40 000–76 000]	470 000 [390 000–560 000]	10 million
Latin America and the Caribbean	2.0 million [1.7 million–2.3 million]	100 000 [86 000–120 000]	100 000 [84 000–120 000]	2100 [1600–2900]	50 000 [41 000–59 000]	1.1 million
Western and central Africa	6.5 million [5.3 million–7.8 million]	410 000 [310 000–530 000]	350 000 [270 000–450 000]	66 000 [47 000–87 000]	330 000 [250 000–430 000]	1.8 million
Asia and the Pacific	5.1 million [4.4 million–5.9 million]	300 000 [240 000–380 000]	280 000 [220 000–350 000]	19 000 [16 000–21 000]	180 000 [150 000–220 000]	2.1 million
Eastern Europe and central Asia	1.5 million [1.4 million–1.7 million]	190 000 [170 000–200 000]	190 000 [170 000–200 000]	...*	47 000 [39 000–55 000]	320 000
Middle East and North Africa	230 000 [160 000–330 000]	21 000 [12 000–37 000]	19 000 [11 000–34 000]	2100 [1400–3200]	12 000 [8700–16 000]	38 000
Western and central Europe and North America	2.4 million [2.2 million–2.7 million]	91 000 [89 000–97 000]	91 000 [88 000–96 000]	...*	22 000 [20 000–24 000]	1.4 million

Quem tem maior probabilidade de serem infetados são normalmente pessoas dos denominados grupos de risco: consumidores de drogas, “profissionais do sexo”, homens que têm relações com outros homens; e também outros grupos de população que são infetados por terem relações sexuais desprotegidas (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

A prevalência e as subseqüentes implicações da epidemia são marcadamente diferentes de país para país. O HIV/SIDA constitui um problema menor de cuidados de saúde nos países industrializados; no entanto, na África Sub-Sahariana, tornou-se a causa mais comum de mortes.

No que diz respeito à epidemia em Portugal, até 30 de Junho de 2017 foram recebidas, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), notificações referentes a 1030 novos casos de infeção por HIV relativos ao ano 2016 e tendo o diagnóstico sido efetuado entre 1 de Janeiro e 31 de Dezembro do mesmo ano (2016). Verifica-se assim que 99,7% (1027) destes novos casos foram registados em indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos. A distribuição por grupo etário revela que o maior número de novos diagnósticos se regista no escalão entre os 30-39 anos, no entanto a taxa mais elevada ocorre no grupo dos 25-29 anos. (Tabela 2) (Departamento de Doenças Infecciosas, 2016).

Tabela 2 – Novos casos de Infecção por HIV (≥ 15 anos), em Portugal, diagnosticados em 2016, por grupo etário e sexo (Departamento de Doenças Infecciosas, 2016)

Grupo etário	Homens			Mulheres			Total		
	Nº Casos	%	Casos/10 ⁵ habitantes	Nº Casos	%	Casos/10 ⁵ habitantes	Nº Casos	%	Casos/10 ⁵ habitantes
15-19 anos	11	1,5	3,9	4	1,4	1,5	15	1,5	2,7
20-24 anos	74	10,1	27,1	23	7,8	8,7	97	9,4	18,0
25-29 anos	115	15,7	41,6	29	9,9	10,5	144	14,0	26,1
30-39 anos	188	25,6	28,9	79	27,0	11,4	267	26,0	19,8
40-49 anos	175	23,8	23,3	70	23,9	8,5	245	23,9	15,6
50-59 anos	111	15,1	15,9	51	17,4	6,6	162	15,8	11,0
≥ 60 anos	60	8,2	5,0	37	12,6	2,3	97	9,4	3,4
Total	734	100,0	15,0	293	100,0	5,5	1027	100,0	10,0

Na avaliação clínica inicial a maioria (65,2%) dos casos diagnosticados em 2016 apresentavam-se assintomáticos, em 17,7% ocorreu um diagnóstico concomitante de SIDA e foram notificados 23 casos com diagnóstico já numa fase aguda da infeção (Tabela 3) (Departamento de Doenças Infecciosas, 2016).

Tabela 3 – Novos casos de Infecção por HIV, em Portugal, diagnosticados em 2016: por estadió inicial e sexo. (Departamento de Doenças Infecciosas, 2016)

	Homens		Mulheres		Total	
	n	%	n	%	N	%
Infeção Aguda	20	2,7	3	1,0	23	2,2
Portador Assintomático	476	64,9	194	66,2	670	65,2
Sintomático Não-SIDA	72	9,8	35	11,9	107	10,4
SIDA	132	18,0	50	17,1	182	17,7
Sem informação	34	4,6	11	3,8	45	4,4
Total	734	100,0	293	100,0	1027	100,0

A qualidade da informação que é obtida em relação ao número de células T CD4⁺ da primeira avaliação clínica tem vindo a aumentar de ano para ano. Assim constatou-se que 55% dos casos referem valores inferiores a 350 células/mm³, mostrando que existiu uma apresentação tardia aos cuidados clínicos. Relativamente a 35,5% dos casos que apresentavam valores inferiores a 200 células/mm³, este é um indicador de doença já em estado avançado. Foram também notificados 10 casos com valores de contagens iniciais superiores a 350 células/mm³,

mas que apresentavam já uma doença definidora de SIDA quando foi feito o diagnóstico (Departamento de Doenças Infeciosas, 2016).

2 – TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ATUAL

2 – Terapia antirretroviral atualmente utilizada

2.1 – História da terapia anti-HIV

O desenvolvimento da terapia antirretroviral (ART) tem sido uma das evoluções mais dramáticas da história da Medicina. Os primeiros anos, entre 1987-1990, trouxeram grandes esperanças e os primeiros, modestos, avanços na monoterapia. A Zidovudina (AZT) foi a primeira molécula testada em humanos para controlo da infeção por HIV em 1985 e, foi introduzida como tratamento em Março de 1987 com grandes expectativas. Apesar de ter sido rapidamente aprovado após alguns estudos efetuados, como monoterapia era bastante limitado. O mesmo aconteceu com os análogos de nucleósidos ddC (Zalcitabina), ddl (Didanosina) e d4T (Estavudina), introduzidos entre 1991 e 1994 (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Em Setembro de 1995, os resultados preliminares do estudo DELTA Europeu-Australiano (Darbyshire & Aboulker, 1996) e o estudo Americano ACTG 175 (Hammer et al., 1996), atraíram atenção, uma vez que se tornou evidente que a ART com combinação (cART) de dois análogos nucleosídeos era mais eficaz, quando comparado com a monoterapia. Estes dois estudos demonstraram que foi bastante importante iniciar o tratamento com dois análogos nucleosídeos, em vez de se usar os medicamentos sequencialmente.

Os primeiros estudos com inibidores da Protease (IP), uma classe de fármacos nova na altura, estiveram em curso por vários meses. Estes compostos tinham sido concebidos em laboratório, com base no conhecimento da estrutura do HIV, mas também da protease, contudo o seu valor clínico permanecia incerto. Os três fármacos deste grupo (de 1ª Geração): ritonavir, saquinavir e indinavir, foram aprovados entre Dezembro de 1995 e Março de 1996 (Ho, 1995).

Foi então que, em Junho de 1996 na Conferência Mundial de SIDA, quando o grande potencial dos IP já era totalmente conhecido apareceu a expressão 'Terapia Antirretroviral Altamente Ativa' (HAART), sendo que esta se espalhou em grande escala e de forma "irreversível". Ainda nesta altura, foi introduzida uma terceira classe de fármacos quando o primeiro inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa (INNTR), a nevirapina, foi autorizado (Ho, 1995).

Em 1997, estimava-se que para a supressão viral, 3 anos no máximo seriam suficientes; previa-se assim que nesse tempo todas as células infetadas morreriam. Porém, desde então, este tempo de supressão viral tem sido constantemente ajustado para cima, o que mostra que o HIV não se consegue tratar apenas com a ART *standard*. Estudos

recentes têm permitido perceber que este vírus permanece indetetável em células infectadas latentes, após supressão a longo prazo. Os antagonistas do CCR5, bem como os inibidores da IN (IIN), abriram novas possibilidades de tratamento. Tornou-se possível baixar a carga viral (CV), de modo a ser menos detetável na maioria dos pacientes. (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Apesar de tudo, a realidade dos dias de hoje pareceria impossível há dez anos: a infecção pelo HIV é uma doença crónica, que apesar de ser incurável, é controlável ao longo da vida com terapia, mesmo em pacientes com vírus mais resistentes. Assim, a expectativa de uma vida normal parece agora mais realista com os tratamentos disponíveis (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

2.2 – Perspetiva geral da Terapia anti-HIV atual

Até Março de 2012 existiam 30 agentes individuais ou combinados autorizados para o tratamento da infecção por HIV (Tabela 4), a maioria são medicamentos orais (Broder, 2012) (Rockstroh & Hoffmann, 2015). Esses fármacos provêm de cinco classes diferentes:

- Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR);
- Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR);
- Inibidores da Protease (IP);
- Inibidores da Entrada (IE) (antagonistas do co-recetor e inibidores da fusão);
- Inibidores da Integrase (IIN).

Tabela 4 — Visão Geral da Terapia Antirretroviral (Rockstroh & Hoffmann, 2015)

Trade name	Abbrev.	Drug
Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)		
Emtriva®	FTC	Emtricitabine
Epivir®	3TC	Lamivudine
Retrovir®	AZT	Zidovudine
Videx®	ddI	Didanosine
Viread®	TDF	Tenofovir
Zerit®	d4T	Stavudine
Ziagen®	ABC	Abacavir
Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)		
Sustiva®, Stocrin®	EFV	Efavirenz
Viramune®	NVP	Nevirapine
Edurant®*	RPV	Rilpivirine
Intelence®	ETV	Etravirine
Rescriptor®*	DLV	Delavirdine
Protease Inhibitors (PIs)		
Aptivus®	TPV	Tipranavir
Crixivan®	IDV	Indinavir
Invirase®	SQV	Saquinavir
Kaletra®	LPV	Lopinavir/Ritonavir
Norvir®	RTV	Ritonavir
Prezista®	DRV	Darunavir
Reyataz®	ATV	Atazanavir
Telzir®, Lexiva®	FPV	Fosamprenavir
Viracept®	NFV	Nelfinavir
Entry Inhibitors		
Celsentri®, Selzentry®	MVC	Maraviroc
Fuzeon®	T-20	Enfuvirtide
Integrase Inhibitors		
Isentress®	RAL	Raltegravir
Combination Drugs		
Atripla®	ATP	TDF+FTC+EFV
Combivir®	CBV	AZT+3TC
Complera®, Eviplera®	CPL	TDF+FTC+RPV
Kivexa®, Epzicom®	KVX	3TC+ABC
Stribild®*		TDF+FTC+ELV/c
Trizivir®	TZV	AZT+3TC+ABC
Truvada®	TVD	TDF+FTC

Começando então pelos INTR, o seu alvo, tal como se subentende pelo nome é a enzima Transcriptase Reversa. Estes atuam incorporando um análogo nucleosídeo, que vai induzir a paragem da síntese de DNA por impedir a continuação da formação da cadeia de DNA. Esta classe de medicamentos são pró-fármacos, ou seja são administrados de forma inativa, sendo posteriormente ativados através do metabolismo normal (biotransformação) (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

A classe dos INNTR, têm o mesmo alvo que os INTR, no entanto, estes ligam-se diretamente e de forma não competitiva à enzima, numa posição próxima mas distinta do sítio de ligação do substrato para os nucleosídeos. Os complexos resultantes

bloqueiam assim a atividade catalítica do sítio de ligação da TR. Isto por sua vez, pode ligar mais nucleosídeos, abrandando a polimerização significativamente. Ao contrário do que acontece com os INTR, estes não necessitam de ativação no interior da célula (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Quanto aos IP, a protease do HIV corta a poliproteína viral gag-pol em subunidades funcionais. Se a protease é inibida e o *splicing* proteolítico impedido, vai dar azo a partículas virais imaturas, ou seja, infecciosas. Assim os fármacos desta classe foram alterados de forma a encaixarem no centro ativo da protease do HIV (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

No que diz respeito aos Inibidores de entrada, estes incluem os antagonistas do co-receptor CCR5 e os inibidores de fusão. Existem três passos que são cruciais para a entrada do HIV na célula T CD4 (Figura 3) (Rockstroh & Hoffmann, 2015):

- Ligação ou fixação do HIV ao recetor CD4 (alvo dos inibidores da fixação);
- Ligação aos co-recetores (alvo dos antagonistas dos co-recetores);
- Fusão da membrana do vírus com a membrana da célula (alvo dos inibidores de fusão).

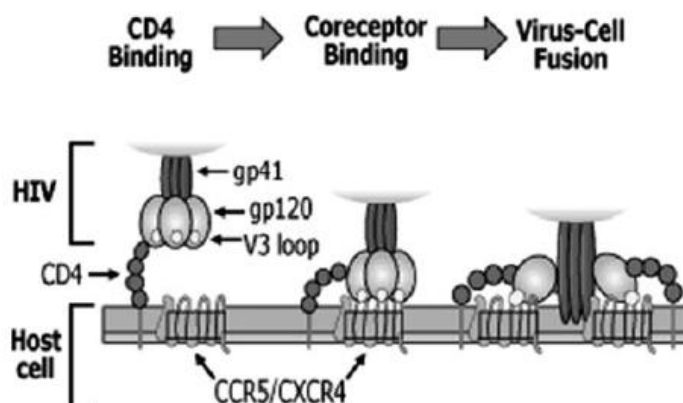


Figura 3 - Os três passos da entrada do HIV na célula hospedeira (célula T CD4) (Rockstroh & Hoffmann, 2015)

Teoricamente, cada passo da entrada do HIV pode ser inibido. Todas as três classes já mencionadas são corretamente denominadas de Inibidores de entrada. Uma diferença importante para com as outras classes de fármacos, é que esta não inibe o HIV intracelular. Estes interferem no início do ciclo de replicação do HIV (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Quanto à classe dos antagonistas dos co-recetores, estes (os co-recetores) são aqueles que o HIV necessita para entrar na célula alvo. Os dois (co-recetores) mais importantes são o CXCR4 e o CCR5. As variantes do HIV utilizam tanto um co-recetor como o outro.

Estas variantes são denominadas R5-trópicos se utilizam o co-recetor CCR5, enquanto os vírus com preferência para o CXCR4 são denominados vírus X4-trópicos.

Temos também os inibidores de fusão, que previnem o último passo da entrada do HIV na célula alvo. A fusão do vírus com a célula, não é ainda muito compreendida, mas ao que parece a ligação ao CD4 e ao co-recetor induz alterações conformacionais na glicoproteína gp41, a subunidade transmembranar da proteína do envelope viral (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Por fim, os IIN, sendo que a IN é uma das três enzimas chave do ciclo de replicação do HIV, juntamente com a TR e a PR. Esta está envolvida na integração do DNA viral no genoma do hospedeiro e é essencial para a replicação. Existem pelo menos quatro passos que levam à integração do DNA viral, sendo que todos eles, teoricamente, podem ser inibidos por diferentes IIN (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

O efeito do *timing* do início da ART nos resultados clínicos e microbiológicos têm sido controversos nas avaliações do benefício da terapia e das complicações e custos associados a curto e longo prazo. Durante muitos anos, a ART foi adiada até que a contagem de CD4 do paciente tivesse abaixo de 200 células/mm³, o que provocou infecções oportunistas frequentes. As análises retrospectivas de pacientes com infecção pelo HIV-1 que foram tratados, em países desenvolvidos, sugerem benefícios da ART precoce (Cohen et al., 2011).

2.3 – Geração de resistência aos Antirretrovirais

A resistência é a resposta natural de qualquer microrganismo infeccioso que enfrenta a pressão dos fármacos e, como tal, o HIV não é exceção (Vella & Palmisano, 2005).

Tem sido documentado desde 1989, o aparecimento de mutações resistentes a qualquer novo agente antirretroviral introduzido na prática clínica para o HIV-1. A resistência é das principais causas de insucesso da ART o que pode comprometer a eficácia do fármaco na população (Tabela 5). Na maior parte dos casos, a resistência deve-se à fraca adesão pelo paciente e/ou à baixa potência do regime terapêutico. Sob estas condições, a RV não é completamente suprimida, permitindo o aparecimento de variantes resistentes (Vella & Palmisano, 2005). O surgimento destas está associado, como já foi mencionado, a uma baixa resposta à ART, o que se reflete num aumento na CV, que é uma situação indesejável uma vez que a CV se pretende indetetável (o que ocorre quando o valor de cópias/ml é inferior a 50). Se a CV tiver com estes valores a contagem de células CD4 encontra-se elevada, sendo que é este o que objetivo da terapia (Afani S & Gallardo O, 2011). Para se saber em que valores está a CV é feito

um exame, normalmente, duas a oito semanas após início ou alteração do tratamento e a cada três a quatro meses durante o tratamento ou conforme critério do médico. É através do resultado deste exame que se decide o passo seguinte. Se a CV tiver com valores muito elevados significa que a terapia que está a ser feita não está a produzir o efeito desejável, tendo que ser alterada (Afani S & Gallardo O, 2011).

A resistência é denominada “primária” se for detetada em pessoas que nunca tinham experienciado tratamento e “adquirida” quando se desenvolve em pessoas já experientes no tratamento (Vella & Palmisano, 2005).

Como já foi mencionado anteriormente a resistência aparece em decorrência das mutações que surgem espontaneamente em qualquer grupo de células em crescimento, expostas ou não a medicamentos. O que acontece com algumas mutações é uma alteração de partes da célula afetadas pelos medicamentos, diminuindo a sua capacidade de ação, causando resistência (Vella & Palmisano, 2005).

O uso sequencial de combinações potentes de agentes antirretrovirais atrasa e minimiza a ocorrência de resistências, contudo não é capaz de as eliminar. A população com o género de resistência adquirida é potencialmente transmissora de vírus resistentes aos recém-infetados (Vella & Palmisano, 2005).

Tabela 5 – Resistência e a prevalência dos diversos tipos de medicamentos Antirretrovirais na Europa (Vella & Palmisano, 2005).

Type of resistance	Prevalence, %	No. of patients with resistance/no. of patients tested
Any	9.6	157/1633
NRTI	6.9	111/1617
NNRTI	2.6	42/1623
PI	2.2	36/1608
≥2 Drug classes	1.7	28/1623

Como já referido anteriormente, a HAART reside em dois ou três fármacos combinados. Apesar dos medicamentos atuais anti-HIV e as estratégias de tratamento manterem a CV suprimida e os pacientes relativamente saudáveis, o desenvolvimento de resistências às ARTs reduz ou até mesmo elimina a eficácia da ART. O HIV-1 possui uma elevada taxa de mutação e uma frequência de recombinação alta (as quais serão descritas mais à frente neste capítulo), o que pode resultar num surgimento rápido de variantes resistentes aos fármacos quando a RV não é suficientemente inibida (Pinar lyidogan & Anderson, 2014).

A ART atingiu um sucesso impressionante no que diz respeito à prevenção da progressão da infecção pelo HIV-1. Contudo, a ART é uma terapêutica e não uma cura. O HIV-1 persiste em reservatórios virais que levam ao *rebound* viral se a terapêutica é descontinuada. Um melhor entendimento destes reservatórios do HIV é fundamental na investigação e desenvolvimento para uma cura contra o HIV. A persistência do HIV-1 sob a ART (descrita por (Clutter, Jordan, Bertagnolio, & Shafer, 2016; Dahabieh, Battivelli, & Verdin, 2015)) pode ser devida a: (1) a um baixo nível de RV particularmente em tecidos onde a concentração de antirretrovirais pode nem sempre atingir os níveis ótimos; e (2) a longa meia-vida e auto-renovação de células infectadas latentes.

Embora seja provável que a persistência do HIV-1 seja consequência da combinação desses dois processos, o estabelecimento e manutenção de reservatórios de HIV-1 é um processo multifacetado (descrito por (L. Zhang & Lewin, 2018)) que depende: (1) da relativa suscetibilidade celular à infecção do HIV; (2) da capacidade das células infectadas em resistir à apoptose HIV-induzida e de escapar à vigilância imunológica; e (3) do tempo de vida e do potencial *turnover* das células infectadas (Figura 4).

Todos estes processos são determinados pelo programa de cada tipo de célula e regulados pela localização do tecido, da ativação e do estado de diferenciação das células em resposta às condições ambientais e aos sinais de stress. Zhang *et al*, analisam cada um desses processos em relação à forma como eles contribuem para a persistência do HIV na ART (L. Zhang & Lewin, 2018).

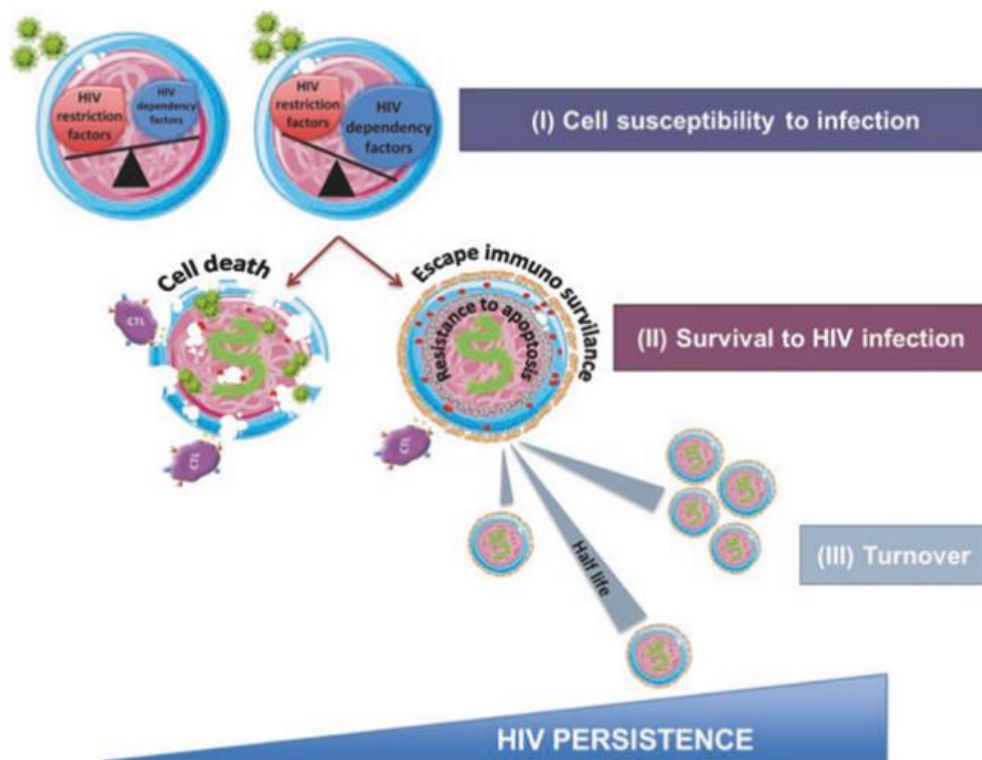


Figura 4 – Determinantes celulares para o estabelecimento e persistência do HIV na HAART. A persistência do HIV é determinada primeiro pela suscetibilidade de diferentes células à infecção (i), que é regulada pelo equilíbrio entre os fatores de dependência do hospedeiro e os fatores de restrição viral presentes nas células. Para persistir, as células infectadas precisam resistir aos sinais apoptóticos induzidos pela infecção viral e evitar a vigilância imunológica (ii). Essas células infectadas resistentes persistirão por períodos de tempo variáveis, dependendo do seu específico tempo de vida e da sua capacidade em proliferar sem aumentar os sinais de morte celular HIV-dependentes (iii) (L. Zhang & Lewin, 2018).

2.3.1 – Aptidão viral do HIV-1 e a sua influência na resistência aos fármacos

O HIV-1 é um membro da família dos retrovírus com uma alta taxa de mutação, tal como já foi mencionado anteriormente. As estimativas da taxa de mutação do HIV dependem de vários fatores, incluindo o tamanho da população viral e a aptidão viral das estirpes mutantes. Estudos anteriores para avaliar a taxa de mutação do HIV *in vivo*, determinaram uma taxa de mutação direta de 3×10^{-5} mutações por par de bases alvo por ciclo de replicação (Pinar Iyidogan & Anderson, 2014; Mansky & Temin, 1995). Estudos de isolados clínicos de HIV sugerem um *turnover* viral rápido (108 a 109 viriões por dia) (Ho et al., 1995; X. Wei et al., 1995), um grande número de células infetadas (107-108) e um elevado nível de recombinação (Jung et al., 2002). A elevada taxa de mutação inerente ao HIV gera um conjunto geneticamente diverso de vírus, geralmente a partir de um único genoma viral infetante. As combinações desses subtipos de HIV-1 geneticamente distintos exibem diferentes propriedades fisiopatológicas. A elevada taxa de mutação do HIV-1 é crucial para adaptação a mudanças ambientais, como concentrações intracelulares de nucleotídeos, presença de mutagênicos, etc., que podem afetar a fidelidade, ou seja, a quantidade de erros existentes, geral do processo de replicação (Mansky, 1998). Mais importante, a fidelidade é vital para a eficiência da infecção da célula hospedeira e o surgimento da resistência aos fármacos (Mansky, 2002). Medições *in vitro* da fidelidade da TR do HIV-1 indicam que mutações *de novo* são geradas no decorrer da síntese de DNA propensa a erros enquanto geram substituições de bases, *frame shifts*, rearranjos genéticos e hipermutações (Menendez-Arias, 2002; L. Zhang & Lewin, 2018). A principal fonte para a elevada taxa de mutação do HIV-1 é devido à ausência da atividade de revisão exonucleolítica 3' → 5' da TR do HIV-1 (Jonckheere, Anne, & de Clercq, 2000). Vários estudos cinéticos da TR recombinante indicaram um alto nível de incorporação errônea durante a polimerização, sugerindo a contribuição da TR para a hipermutabilidade do HIV-1 (Pinar Iyidogan & Anderson, 2014). Outra fonte para as mutações adicionais no genoma do HIV-1 pode derivar da RNA polimerase II do hospedeiro, durante a síntese da cadeia-positiva do RNA (J. Zhang, 2004). Contudo, O'Neil et al., sugerem que a maioria da mutagênese no genoma viral é um resultado da incorporação incorreta pela TR do HIV-1 ao invés da RNA polimerase II da célula hospedeira (Iyidogan & Anderson, 2014; Rouzine et al., 2008).

Um aumento na taxa de mutação garante a adaptabilidade do vírus num ambiente em mudança, como a utilização da ART, mas o ajuste fino da hipermutabilidade antes de perder a aptidão viral é crucial para o HIV. Um mecanismo para ajustar a taxa de mutação do HIV-1 é estabelecido através da interação entre a proteína viral Vif (fator de infecciosidade viral) e a proteína do hospedeiro APOBEC3G, uma citosina desaminase (P. Iyidogan & Anderson, 2014; Malim & Emerman, 2008). A APOBEC3G é um elemento crítico de um mecanismo de defesa inato contra a infecção pelo HIV-1. Em essência, o hospedeiro induz biologicamente a mutagénese letal para se defender contra infeções virais. O HIV combate a hipermutagénese APOBEC3G mediada com um contra-ataque. Isto envolve a ligação da proteína Vif à APOBEC3G e a indução da poli-ubiquitinação e degradação da APOBEC3G (Goff, 2003). Avanços recentes na compreensão dessa interação da ligação entre o Vif e a APOBEC3G, e os estudos dos mecanismos de ação relacionados serão importantes para desenvolver novos fármacos antivirais que tenham como alvo as proteínas de ligação hospedeiras e virais (Cadima-Couto & Goncalves, 2010; Lavens et al., 2010).

Além das enzimas codificantes do hospedeiro que alteram a sequência viral codificadora e o processo de replicação retroviral propenso a erros, a recombinação genética é outro processo na evolução do HIV-1 que contribui para a aptidão viral e que evita mutações deletérias, enquanto conserva a informação genómica sob uma pressão seletiva, tal como o tratamento com fármacos antivirais (Zhuang et al., 2002). Mulder *et al.*, demonstraram que apenas a recombinação do vírus HIV-1 hipermutado do tipo selvagem (WT) gerou vírus de replicação-competentes resistentes a fármacos (Mulder, Harari, & Simon, 2008). A recombinação ocorre principalmente durante a síntese da cadeia-negativa ou raramente durante a da cadeia-positiva do DNA e associada a um único *crossover* (J. Zhang, Tang, Li, T.; Ma, & Sapp, 2000). A habilidade de recombinação fornece um mecanismo eficiente para redistribuir mutações, enquanto aumenta a variação na população viral. A geração de variantes multi-resistentes a fármacos numa população viral, através dos ciclos frequentes de recombinação, dificulta o tratamento antiviral (Nora et al., 2007; Perales, Iranzo, Manrubia, & Domingo, 2012). Como mencionado, esta característica escapatória que o HIV-1 explora deve ser mais investigada no contexto da hipermutação. Neste ponto, a mutagénese letal poderia ser uma estratégia alternativa para lutar contra o problema da multi-resistência a fármacos através do aumento artificial de mutações com o auxílio de mutagénicos químicos, a tal ponto de que mesmo a reparação mediada por recombinação dos genomas retrovirais defeituosos não iria funcionar, e que eventualmente encaminharia à catástrofe-erro (Pinar Iyidogan & Anderson, 2014).

2.3.2 – Mutagénese letal

Uma grande diversidade de progenia mutante é gerada a partir da infidelidade inerente da TR do HIV-1, e essa propriedade é crucial para haver a evasão viral da defesa imunológica do hospedeiro ou da ART, o que fornece uma adaptabilidade extraordinária para o vírus (Mullins & Jensen, 2006). No entanto, uma alta taxa de erro da TR do HIV-1 também leva a efeitos deletérios sobre a aptidão viral após atingir um certo limiar (Gao et al., 2004).

O conceito de mutagénese letal foi primeiro introduzido ao HIV-1 utilizando um análogo desoxinucleosídeo mutagénico de 5-hidroxi-2'-desoxicitidina (5-OH-dC) que reduz a fidelidade de replicação (Loeb et al., 1999). Quando o limiar de erro é abordado com um agente mutagénico, pequenos aumentos nas taxas de mutação dão origem a grandes declínios na viabilidade (Grande-Perez, Lazaro, Lowenstein, Domingo, & Manrubia, 2005). Contudo, esses nucleosídeos mutagénicos precisam de ser metabolicamente ativados nas suas formas correspondentes de 5'-trifosfato através de quinases celulares, de modo a exibir as suas atividades mutagénicas após a penetração desses análogos de nucleosídeos nas células infetadas, isto através da via de difusão passiva ou através de transportadores de nucleosídeos como destacado na Figura 5 (Huber-Ruano & Pastor-Anglada, 2009). Posteriormente, o nucleosídeo trifosfato análogo mutagénico farmacologicamente ativo é incorporado na cadeia nascente do DNA viral pela TR do HIV-1 durante a síntese da cadeia-negativa do DNA, o que geraria desemparelhamentos na subsequente síntese da cadeia-positiva do DNA como demonstrado na Figura 5 (Pinar Iyidogan & Anderson, 2014). Consequentemente, os nucleosídeos mutagénicos incorporados levam a taxas de mutação aumentadas. Similarmente, os ribonucleosídeos análogos mutagénicos incorporados em transcrições de vRNA por fosforilação através da RNA polimerase II celular, resultam em erros de desemparelhamento de bases durante a subsequente síntese da cadeia-negativa de DNA, catalisada pela TR nas novas células infetadas (Loeb & Mullins, 2000). Por conseguinte, as mutações acumulam-se no genoma vRNA recentemente sintetizado por ciclo de replicação, e provocam um colapso genético irreversível da população de vírus até que atinja um ponto tal que não possam ser produzidas mais proteínas virais funcionais. Felizmente para o vírus, o vasto tamanho populacional, a estrutura do genoma e a regulação rigorosa dos requisitos adaptativos colocaram as populações de vírus muito próximas do limiar de extinção. Consequentemente, tem sido sugerido que a alteração da frequência de erro através de um mutagénico letal pode ser ineficaz para a extinção total da população viral ou para diminuir a propagação do vírus (Bull, Sanjuan, & Wilke, 2007; Pinar Iyidogan & Anderson, 2014).



2.3.3 – Mecanismos de resistência ao HIV-1

33

A seleção das variantes resistentes aos fármacos depende da extensão em que a RV continua durante a incompleta terapia de supressão, a facilidade de aquisição de uma mutação específica de resistência a fármacos (MER), e o efeito das MERs na suscetibilidade farmacológica e na replicação do vírus. Embora surjam todos os dias vírus resistentes a fármacos que ocorrem naturalmente em doentes não tratados, essas variantes raramente chegam a níveis detetáveis pois são menos adequadas do que os vírus-suscetíveis aos fármacos, isto na ausência de uma pressão fármaco-seletiva. De facto, quase todas as MERs clinicamente significativas surgem apenas como o resultado da pressão fármaco-seletiva e são de outro modo não polimórficos (Clutter et al., 2016). Para alguns antiretrovirais (ARVs), várias MERs são necessárias para reduzir a suscetibilidade, enquanto para outros, uma única MER é suficiente. O número de MERs requeridas e o efeito de cada MER na aptidão viral, contribuem para a barreira genética da MER à resistência. As MERs podem ser categorizadas como: primárias, que reduzem diretamente a suscetibilidade a fármacos; e acessórias, que melhoram a aptidão das variantes que contêm MERs primárias ou que contribuem numa redução adicional na suscetibilidade. A extensão em que um ARV reduz os níveis plasmáticos de RNA-HIV-1 é conhecida como a potência antiviral. A potência antiviral intrínseca de um ARV combinada com a sua barreira genética à resistência, influencia a sua capacidade de proteger um regime ART da falha virológica (Clutter et al., 2016). Não há essencialmente resistência cruzada entre as classes de fármacos. Os vírus que são altamente resistentes a fármacos de uma classe de ARVs, são completamente suscetíveis a classes de ARVs não utilizadas. Em contraste, uma significativa resistência cruzada dentro de uma classe de ARVs é comum, porque a maioria das MERs reduzem a suscetibilidade a múltiplos ARVs da mesma classe. No entanto, existem exceções importantes em que vários MERs aumentam a suscetibilidade a outros ARVs da mesma classe. O conhecimento dos perfis de resistência cruzada de ARVs é, portanto, essencial ao usar mais do que um fármaco da mesma classe de ARVs, em combinação ou em sequência (Clutter et al., 2016). A maioria dos esquemas de ART utilizados para terapia de primeira linha são suficientemente potentes para bloquear completamente a replicação do HIV-1, e têm uma barreira genética para a resistência alta o suficiente para manter a supressão virológica a longo prazo. Como resultado, a maioria dos casos de falha virológica e de resistência aos fármacos surge da falta de adesão à terapêutica, que expõe o vírus de um doente aos níveis insuficientemente supressivos da ART capaz de exercer uma pressão fármaco-seletiva. Assim, a resistência do HIV parece ser menos comum em doentes que recebem doses fixas de ARVs que possuem semividas semelhantes, porque é menos provável de expor um vírus à pressão fármaco-seletiva na falta de

adesão terapêutica destas combinações. Taxas mais baixas da resistência do HIV também têm sido associadas a programas de rotina da monitorização da CV, nos quais a deteção precoce do *rebound* virológico oferece a oportunidade de aconselhamento à adesão ou à alteração do regime conforme necessário, antes da evolução de várias MERs.

3 – NOVAS TERAPIAS ANTI HIV

3 – Novas Terapias anti HIV

3.1 – Terapia Antirretroviral

Nos últimos 25 anos, o HIV-1 passou de um agente infeccioso não tratável para um agente suscetível a uma série de terapias aprovadas (Broder, 2012).

Certas crenças impregnadas desde os anos 70, complicaram o desenvolvimento de novos fármacos, incluindo: 1) retrovírus ativos, ou seja que se replicam, não existiriam em seres humanos; 2) se existissem, não estariam associadas com doenças humanas; 3) em alternativa, mesmo que se de alguma forma existissem retrovírus humanos ativos, tais agentes desempenhariam um papel menor ou mesmo, quase inexistente na saúde pública; ou 4) mesmo se as 3 primeiras condições de alguma forma não se aplicassem, os retrovírus pela sua própria natureza não seriam tratáveis, isto baseado primeiramente na sua capacidade de integrar no genoma do hospedeiro e/ou sofrer rapidamente uma mutação devido à TR ser propensa a erros (Broder, 2012).

Estas crenças eram inicialmente uma barreira para o progresso da prevenção, diagnóstico e tratamento da SIDA, como tal, mudá-las era um elemento essencial para a evolução da terapia (Broder, 2012).

A ART provou que a infeção pelo HIV-1 é tratável e, tal prova forneceu ânimo para novas terapias a partir de diversas fontes, dirigidas a uma variedade de alvos virais, a um ritmo que raramente foi acompanhado no desenvolvimento de fármacos modernos (Broder, 2012).

Esta terapia trouxe uma diminuição substancial na taxa de mortalidade devido à infeção por HIV-1, alterando-a de uma doença rapidamente mortal para uma condição crónica controlável (Broder, 2012).

3.2 – Novos Agentes Antirretrovirais

A ART combinada para tratar a infeção pelo HIV foi amplamente introduzida em meados da década de 1990, e isso marcou um avanço importante permitindo a supressão da RV abaixo do limite de deteção dos ensaios clínicos. A ART melhorou significativamente a função imunológica das pessoas que vivem com o HIV e transformou uma doença aguda numa infeção crónica para aqueles com acesso à terapia (Deeks, Lewin, & Havlir, 2013; L. Zhang & Lewin, 2018). Inicialmente, foram levantadas esperanças de que a potente inibição viral pela combinação ART poderia levar à decadência e erradicação de todas as células infetadas pelo HIV dentro de

poucos anos de terapia. No entanto, foi logo demonstrado que o HIV estabelece uma infecção transcripcionalmente inativa em células T CD4⁺ de memória de longa duração, e que a ativação subsequente dessas células pode levar ao *rebound* viral na ausência da ART (Finzi et al., 1997).

A infecção latente em células T CD4⁺ de vida longa permite que o vírus persista por décadas num estado inativo evitando as respostas imunes do hospedeiro e a combinação de ART. A ART vitalícia é, portanto, necessária para evitar o *rebound* viral e a progressão da doença. A persistência a longo prazo do HIV em células latentes T CD4⁺ infetadas é considerada como a principal barreira à cura do HIV, mas outros mecanismos também podem contribuir para a persistência a longo prazo (Damouche et al., 2015; Fukazawa et al., 2015; L. Zhang & Lewin, 2018). As implicações da persistência viral a longo prazo em doentes a efetuar a ART são demonstradas mais dramaticamente pela rápida recuperação viral observada após a interrupção da ART, mesmo após muitos anos de supressão viral (T. Chun et al., 2010; L. Zhang & Lewin, 2018). Isto mostra que, apesar da inibição viral potente causada pela cART, o vírus de replicação-competente persiste em todos os indivíduos infetados e, geralmente, leva ao *rebound* viral quando a terapia é descontinuada.

Várias linhas de investigação estão atualmente em curso, com o objetivo de longo prazo, de desenvolver uma cura para o HIV ou de permitir uma remissão sem o auxílio da ART. A maioria desses esforços está a ocorrer ao nível pré-clínico, mas algumas estratégias já avançaram para o estágio de testes clínicos.

3.2.1 – Transplante de células-estaminais hematopoiéticas e quimioterapia

Até à data, houve apenas um exemplo de uma cura completa de um doente com HIV. Isso ocorreu com o indivíduo Timothy Ray Brown, que foi submetido a um transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) para uma leucemia mielóide aguda, e recebeu células-estaminais HLA-emparelhadas com uma deleção homozigótica de 32 pares de bases no gene codificante para CCR5 (CCR5Δ32) (Hutter et al., 2009). A ART foi descontinuada após a transfusão e sem *rebound* viral, e desde então nenhuma evidência de replicação do HIV foi demonstrada neste indivíduo durante mais de 10 anos de acompanhamento (Hutter et al., 2009; Yukl et al., 2013). Não se sabe, no entanto, se foi o próprio procedimento de transfusão de células estaminais, a quimioterapia, entre outros, ou uma combinação desses fatores que foi o principal responsável pela erradicação de todas as células infetadas (Cillo et al., 2014).

Foram relatados dois casos de indivíduos de Boston que confirmaram a capacidade da TCEH de reduzir drasticamente a frequência de células infetadas latentes (Henrich et

al., 2013). Ambos os indivíduos infectados pelo HIV a efetuar ART foram submetidos a um TCEH para a síndrome mielodisplásica e para um linfoma de Hodgkin, respetivamente. Em ambos os indivíduos, isso levou a uma extensa depleção de células infectadas pelo HIV; de facto, o HIV não foi detetado em células ou no plasma durante o acompanhamento pós-TCEH durante a ART. Ainda assim, houve um *rebound* viral após 12 e 32 semanas da interrupção da ART (Henrich et al., 2014). Estes dois casos demonstraram dois pontos importantes. Em primeiro lugar, a persistência viral capaz de causar um *rebound* viral e, segundo, mesmo com uma profunda depleção no número de células infectadas, é necessária uma vigilância imunológica efetiva e durável para identificar qualquer vírus residual.

Contrariamente a Timothy Brown, os dois indivíduos de Boston receberam células doadoras CCR5 *wild-type*, e isso pode ser uma diferença importante, mas há muito poucos casos nos quais podemos basear essa avaliação. De facto, sete outros indivíduos infectados pelo HIV a efetuar ART e com uma malignidade hematológica, receberam TCEH com células-estaminais de doadores homozigotos CCR5 Δ 32, e a maioria desses recetores morreu dentro dos 12 meses após o TCEH (Hutter, 2014). Finalmente, o *rebound* viral nos pacientes de Boston, apesar dos níveis indetetáveis de HIV no plasma e células aquando da ART, subestima a importância da realização de interrupções analíticas do tratamento para avaliar a extensão da depleção funcional do reservatório após o TCEH ou outras intervenções (Kuritzkes, 2016)

Existem poucos casos descritos de recetores de TCEH com infeção pelo HIV que subsequentemente descontinuaram a ART (Henrich et al., 2014; Hutter et al., 2009). Portanto, como há muitas variáveis potencialmente importantes, ainda tem que ser feito um caso científico sólido para a realização de interrupções analíticas do tratamento pós-TCEH, embora os riscos e considerações éticas precisam obviamente de ser levados cuidadosamente em consideração caso-a-caso (Sugarman, Lewin, Henrich, & Rasmussen, 2016).

3.2.3 – Agentes de Reversão de Latência: *Shock and Kill*

3.2.3.1 – *Shock and Kill*

O conceito de *shock and kill* caracteriza-se pela utilização de agentes farmacológicos para reverter a latência do HIV, e estimular as células infectadas latentes a expressar proteínas virais, pois tal expõe teoricamente este tipo de células a uma morte mediada pelo sistema imunológico ou à lise celular mediada pelo vírus. Um grande número dos chamados agentes de reversão de latência (LRAs), p. ex.,

compostos que induzem a produção de HIV em células infectadas latentes, foram investigados inicialmente ao nível pré-clínico (Shang et al., 2015; L. Zhang & Lewin, 2018), mas poucos candidatos foram também submetidos a testes em ensaios clínicos de pequena escala.

3.2.3.2 – Inibidores da histona deacetilase

No estudo clínico inicial que testa a hipótese de *shock and kill*, o anticonvulsivante ácido valpróico, o qual exerce a inibição da histona deacetilase (HDAC) requerendo concentrações muito altas para eficácia *in vitro* (Matalon et al., 2010), foi adicionado durante 12 semanas de forma a intensificar a ART. Foi relatado no estudo inicial um declínio na frequência de células T CD4⁺ em repouso que transportam HIV replicação-competentes (Lehrman et al., 2005), mas estudos adicionais falharam em demonstrar qualquer efeito do ácido valpróico em reservatórios latentes (Archin et al., 2008; Routy et al., 2012). Reconhecendo que a reversão de latências com este pode ser bastante fraca, os inibidores de HDAC (HDACi) com maior potência tornou-se o foco de investigação. O vorinostat, aprovado pela FDA em 2006 para o tratamento do linfoma cutâneo de células T (Mann, Johnson, Cohen, Justice, & Pazdur, 2007), foi o primeiro potente HDACi a ser testado em indivíduos infectados pelo HIV a efetuar ART. Neste estudo, uma dose única de 400 mg de vorinostat levou a um aumento de quase cinco vezes na transcrição do HIV, medida em células CD4⁺ em repouso, demonstrando assim para a primeira vez que o estado de latência do HIV pode ser interrompido em doentes em ART. Num estudo subsequente de doses múltiplas, o vorinostat diário (400 mg) administrado durante 14 dias também aumentou significativamente a transcrição do HIV, conforme medido pelo RNA-HIV em células T CD4⁺ (Elliott et al., 2014; L. Zhang & Lewin, 2018)). Em contraste, num outro estudo de dose múltipla em que o vorinostat foi administrado 3 dias por semana durante 8 semanas, os níveis de transcrição do HIV não foram globalmente aumentados acima da linha de base quando medidos após 11 e 22 doses (L. Zhang & Lewin, 2018)

O potente HDACi, panobinostat, aprovado pela FDA em 2015 para o tratamento do mieloma múltiplo (Laubach, Moreau, San-Miguel, & Richardson, 2015), também foi testado em ensaio clínico pela sua capacidade de reverter a latência do HIV em doentes infectados em ART (Rasmussen et al., 2014). Este foi adicionado à ART três vezes por semana a cada duas semanas durante 8 semanas em 15 doentes infectados pelo HIV. Isto resultou num aumento significativo na transcrição do HIV, e o panobinostat também aumentou a taxa de deteção plasmática de RNA-HIV (Rasmussen et al., 2014). No entanto, o efeito mais eficaz na reversão da latência no cenário clínico foi visto num

estudo piloto do HDACi romidepsina, que inibe as HDACs com uma potência ainda maior (D. G. Wei et al., 2014). Neste estudo, três infusões de romidepsina (5 mg/m²) não só aumentaram significativamente a transcrição do HIV, mas também levaram a um aumento do RNA-HIV plasmático (Søgaard et al., 2015).

Estes estudos de HDACi forneceram evidências de que é possível, com uma intervenção clínica, interromper o estado de latência do HIV, e para algumas intervenções, isso aumenta o RNA-HIV plasmático. Este último é importante porque está associado à expressão da proteína viral, que é um requisito para o reconhecimento imunológico (Rasmussen et al., 2014).

3.2.3.3 – Dissulfiram

O potencial de reversão da latência do dissulfiram e seus metabolitos foi inicialmente descoberto numa pesquisa bibliográfica de fármacos (Yang et al., 2009). Investigações subsequentes revelaram que o dissulfiram ativa a transcrição do HIV através da depleção do homólogo da fosfatase e da tensina, o que resulta na ativação da via de sinalização do Akt (L. Zhang & Lewin, 2018). Dado que o dissulfiram tem sido utilizado com segurança há muitos anos para tratar o alcoolismo, estas observações formaram imediatamente a base para testar o efeito do dissulfiram na latência do HIV num estudo clínico. Neste estudo, a dose padrão de dissulfiram (500 mg) foi administrada diariamente durante 14 dias a indivíduos infectados pelo HIV em ART (Spivak et al., 2014). Embora não tenha havido um efeito global no RNA-HIV plasmático utilizando um ensaio com sensibilidade de cópia única (ensaio de cópia única; SCA), foi observado um aumento transitório do RNA-HIV plasmático numa análise *post hoc* em indivíduos com amostragem imediata após a dose disponível, e em indivíduos com maiores concentrações plasmáticas de dissulfiram (Spivak et al. 2014). Para explorar ainda mais estas observações, foi realizado posteriormente um estudo de aumento de dose, onde 30 indivíduos infectados pelo HIV em ART receberam 3 dias de dissulfiram tanto na dose de 500 mg (dose licenciada), 1000 mg ou 2000 mg. Em todos os ensaios de três doses, o tratamento com dissulfiram levou a um aumento nos níveis de RNA-HIV, embora a magnitude do aumento tenha sido ligeiramente menor do que a observada nos estudos HDACi (Elliott et al., 2015). Além disso, o dissulfiram a 2000 mg/dia resultou num aumento significativo no RNA-HIV plasmático (Elliott et al., 2014; Rasmussen et al., 2014). Nenhum dos estudos que utilizaram dissulfiram incluiu a interrupção analítica da TAR.

3.2.3.4 – Agonistas de Proteína cinase C (Briostatina-1)

A ativação da proteína cinase C (PKC) mostrou-se promissora como um mecanismo de reversão da latência do HIV *in vitro* e *ex vivo*, e nestas investigações os agonistas da PKC aparecem entre as LRAs mais potentes, principalmente quando utilizadas em combinação com HDACi (Bullen, Laird, Durand, Siliciano, & Siliciano, 2014; Laird et al., 2015). Em termos do seu efeito na latência do HIV, a briostatina-1 e a prostatina são os compostos mais bem caracterizados neste grupo. A prostatina ativa potencialmente o HIV latente *in vitro* (L. Zhang & Lewin, 2018), mas dada a sua toxicidade não pode proceder para estudos clínicos para o HIV. A briostatina-1 é um agonista de PKC (Ramsdell, Pettit, & AH, 1986) e está em desenvolvimento clínico para vários tumores malignos incluindo o mieloma múltiplo e o carcinoma de células renais (Plimack et al., 2014). Devido à preocupação com a sua potencial toxicidade exercida pela ativação de células T, as investigações clínicas progrediram lentamente, e a briostatina-1 foi apenas recentemente testada num ensaio clínico de pequena escala. Neste estudo, 12 indivíduos infetados pelo HIV foram randomizados para placebo ou para uma dose única de briostatina-1 a 10 µg/m² ou 20 µg/m² (Gutierrez et al., 2016). Não foram observadas toxicidades significativas com estas doses, mas a briostatina-1 não demonstrou qualquer efeito sobre a atividade da PKC ou sobre a transcrição do HIV, provavelmente devido às baixas concentrações plasmáticas observadas com as dosagens utilizadas (Gutierrez et al., 2016).

3.2.3.5 – Associação de Agentes de Reversão de Latência com Imunoterapia

A experiência acumulada com a utilização de LRAs para o HIV em ensaios clínicos de pequena escala, incluindo o efeito demonstrado na latência do HIV, mas também a falta de um efeito na frequência de células T CD4⁺ infetadas latentes, inspirou estudos de combinação onde um LRA é combinado com imunoterapia. No primeiro destes estudos, a vacina contra o HIV à base de péptidos terapêuticos Vacc-4x (Bionor Pharma), com rhGM-CSF como adjuvante local, foi administrada por via intradérmica seis vezes numa sequência de reforço inicial e depois seguida por três infusões de romidepsina numa dose de 5 mg/m² (Leth et al. 2016). Esta intervenção combinada foi associada a uma diminuição moderada na frequência de linfócitos T CD4⁺ infetados latentes, como medido pelo nível de DNA-HIV e, para aqueles com níveis avaliáveis, houve crescimento viral quantitativo, mas não atrasou o tempo do *rebound* viral durante as interrupções analíticas do tratamento (Leth et al., 2016). Num estudo a decorrer, indivíduos infetados pelo HIV que iniciaram a ART menos de 6 meses após a infeção,

receberam vacinação contra HIV contendo uma sequência conservada de RNA (HIVconsv) utilizando o primeiro vetor de adenovírus de chimpanzé e uma com vetor de *vaccinia* modificado (MVA) numa sequência de reforço inicial. Subsequentemente, os participantes do estudo receberam três infusões de romidepsina a uma dose de 5 mg/m² antes da interrupção da ART para avaliar o efeito no controlo virológico. Notavelmente, embora os resultados finais ainda sejam esperados, os dados preliminares mostraram que o controlo virológico da ART foi alcançado para cinco dos 13 indivíduos (Mothe & Brander, 2018).

3.2.4 – Inibidores de *checkpoints* imunológicos

As vias estimuladoras e inibitórias das células T desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio delicado entre a imunidade protetora contra patógenos estranhos e a prevenção da autoimunidade. A sinalização co-inibitória de células T ocorre através da ligação de ligandos a imuno-receptores de *checkpoint* expressos na superfície das células T CD4⁺ e CD8⁺ (Schildberg, Klein, Freeman, & Sharpe, 2016). Até agora, os alvos que provaram ser clinicamente mais relevantes foram as vias da morte programada 1 (PD1) e da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA4). Os anticorpos monoclonais contra a CTLA4 (ipilimumab) e a PD1 (nivolumab e pembrolizumab), incluindo um bloqueio combinado, passaram a ter aprovação regulatória e proporcionaram grandes melhorias no tratamento do cancro do pulmão de células não-pequenas (NSCLC) (Postow et al., 2015; Robert et al., 2014) e também são investigados em outras malignidades (Boutros et al., 2016).

A expressão de *checkpoints* de controlo imunológico (CCI) e a sinalização negativa associada de células T também são de interesse na investigação para a cura do HIV. A infeção crónica pelo HIV é caracterizada pelo aumento da sinalização negativa através de CCI, o que leva ao esgotamento das células T e está associado à progressão da doença (Chew et al., 2016; Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006). Portanto, tem havido especial interesse sobre o bloqueio de CCI como uma estratégia para aumentar as respostas de células T específicas para o HIV contra células que expressam vírus (Porichis et al., 2011). Isto é suportado por estudos anteriores, os quais demonstraram que o bloqueio de CTLA4 ou PD1 aumenta a função das células T específicas para o HIV e o vírus da imunodeficiência símia (SIV) (Amancha, Hong, Rogers, Ansari, & Villinger, 2013; Porichis et al., 2011; Velu et al., 2008). Além disso, a expressão de CCI pode identificar as células T CD4⁺ que abrigam o HIV, como exemplificado por um estudo que revelou níveis sanguíneos mais elevados de DNA-HIV em células PD1 que expressam memória T em comparação com as suas contrapartes PD1-negativas

(Chomont et al., 2009). As células que expressam CTLA4 de doentes virémicos também mostraram conter mais DNA-HIV do que as células CTLA4-negativas (El-Far et al., 2015). Outro estudo demonstrou que após 48 semanas em ART, a expressão induzível de p24 foi maior em células T auxiliares foliculares (Tfh) periféricas do que nas Tfh não periféricas, e que o nível mais alto de vírus induzido foi encontrado em Tfh periféricas que expressam a PD1 ((Pallikkuth et al., 2016). Finalmente, estas observações foram corroboradas recentemente através de um estudo que demonstrou que as células linfonodais T CD4⁺ que expressam a PD1, cuja maioria são Tfh, são a principal fonte de vírus infecciosos em doentes que realizam a ART até há 14 anos (Banga et al., 2016). Coletivamente, estes estudos demonstraram que bloquear a sinalização negativa das células T através de CCI poderia ter um impacto positivo nas respostas de células T específicas para o HIV, mas também que a expressão do CCI, particularmente da PD1, desempenha um papel fundamental na persistência do HIV. Este último pode explicar porque a ativação da função das células T através do bloqueio do CCI também pode ativar a expressão de HIV latente; esta foi uma observação chave num caso clínico de um doente infetado pelo HIV que recebeu anti-CTLA4 (ipilimumab) para o melanoma (Wightman et al., 2015). Neste relatório, houve um aumento na transcrição do HIV até 19,6 vezes em relação ao nível pré-ipilimumab, e uma diminuição cíclica no RNA-HIV plasmático residual (Wightman et al. 2015).

Apesar de todos os resultados obtidos nos estudos *in vitro*, em estudos com animais e em casos clínicos, muito pouca pesquisa intervencionista foi realizada para investigar o efeito dos inibidores do CCI sob a imunidade HIV-específica e sob a persistência do HIV em indivíduos infetados em ART.

3.2.5 – Agonistas dos Recetores *Toll-Like*

Receptores *Toll-like* (TLRs) são uma classe de proteínas que desempenham um papel fundamental no sistema imunológico inato. Os TLRs reconhecem e ligam estruturas moleculares que são amplamente compartilhadas por patógenos, os chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) (Kanzler, Barrat, Hessel, & Coffman, 2007). Essa ligação induz a ativação da sinalização imunológica inata (Liu & Zeng, 2012). Portanto, os agonistas dos TLRs são investigados quanto ao seu efeito potencial no tratamento de várias neoplasias malignas (Krieg, 2007), mas esses efeitos imunológicos também são relevantes na investigação para a cura do HIV. No HIV, a maioria dos estudos têm-se concentrado nos agonistas da TLR7 e TLR9, ambos expressos intracelularmente em endolisossomas - TLR7 em células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e DCs convencionais, e TLR9 em pDCs e células B (Kawai &

Akira, 2010). Vários estudos *in vitro* indicaram que certos agonistas de TLR (TLR2, TLR7 e TLR9) poderiam ativar o HIV a partir da latência (Scheller et al., 2004) e, portanto, terem uma função potencial como LRAs *in vivo*. Outra função importante de certos agonistas dos TLR é a sua capacidade de ativar as células apresentadoras de antígenos (APC), de aumentar a maturação das células B, de aumentar a iniciação cruzada das células T e induzir a ativação das células *natural killer* (NK) (Buitendijk, Eszterhas, & Howell, 2013; Offersen et al., 2016). Esses efeitos estimulantes imunológicos aumentam diretamente a morte de células infectadas, mas também podem ser utilizados para potencializar as respostas de vacinas (Krieg, 2007). Embora vários estudos tenham investigado a vacinação com um adjuvante de agonista dos TLR em doentes com HIV, o uso experimental deste tratamento adicionado à ART de longo prazo, foi introduzido apenas recentemente em testes clínicos. O MGN1703, um novo agonista da TLR9, induziu respostas imunitárias inatas antivirais e reforçou a inibição viral mediada por células NK *in vitro* (Offersen et al., 2016).

O efeito do MGN1703 na imunidade antiviral e no reservatório do HIV foi investigado num estudo de fase 1b/2a no qual 15 indivíduos HIV-suprimidos em ART receberam 60 mg de MGN1703 s.c. duas vezes por semana durante 4 semanas (Vibholm, 2017). Pouco depois da administração, o MGN1703 induziu uma ativação pronunciada de pDCs e aumentou os níveis plasmáticos de interferon- α 2. Subsequentemente, as proporções de células NK citotóxicas ativadas e de células T CD8 + expandiram-se significativamente. Em 6 dos 15 participantes, foram observados *blisters* de 30 c/mL até >1500 cópias/mL de RNA-HIV-1 plasmático durante o tratamento com MGN1703. Este subconjunto de participantes demonstrou um aumento da capacidade de células T CD8⁺ de mediar a inibição viral HIV-específica, e também mostrou uma redução significativa nos níveis de DNA-HIV no tecido intestinal, sugerindo que a estimulação TLR9 com MGN1703 ativou o HIV latente e aumentou a imunidade antiviral, ambos os principais resultados na terapia de erradicação do HIV (L. Zhang & Lewin, 2018).

Os agonistas orais do TLR7, GS-9620 e GS-986, foram administrados a macacos *rhesus* infectados com SIV que estavam a realizar ART, e estes agonistas induziram aumentos consistentes na ativação de RNA viral plasmático e de células T (Whitney et al., 2016). Contudo, dois dos nove macacos tratados com TLR7 não tinham vírus induzíveis no sangue e nos tecidos linfáticos, e esses dois animais também apresentaram um controlo virológico quando a ART foi retirada (Whitney et al., 2016). Com base nestes encorajadores resultados clínicos e pré-clínicos, vários outros estudos estão em curso que investigam os efeitos dos agonistas do TLR7 e TLR9 isoladamente ou em associação com outras intervenções, como as vacinas terapêuticas contra o HIV e os anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs) contra o HIV env.

3.2.6 – Terapia com Interleucinas (IL2, IL7, IL15)

A estratégia de eliminar células infetadas latentes através da ativação da expressão do HIV foi inicialmente testada utilizando a interleucina-2 (IL-2). Estudos iniciais sugeriram que a terapia com IL-2 poderia ter impacto na frequência de células em repouso portadoras de vírus de replicação-competentes (T.-W. Chun, Davey Jr, Engel, Lane, & Fauci, 1999), mas o *rebound* viral ocorreu rapidamente quando a ART foi interrompida (T.-W. Chun et al., 1999). No entanto, estudos adicionais não conseguiram estabelecer um efeito da IL-2 no agrupamento de células T CD4⁺ infetadas latentes ou na produção do HIV (Dybul et al., 2002), e quando a IL-2 foi utilizada em associação com o anticorpo OKT3 anti-CD3, isso levou à ativação perniciosa de células T e à depleção irreversível de células T CD4⁺ (L. Zhang & Lewin, 2018). Posteriormente, a citocina homeostática IL-7 foi investigada com um objetivo semelhante de reverter a latência do HIV e facilitar a eliminação de células infetadas latentes. Vários estudos mostraram que a IL-7 em *ex vivo* induziu um crescimento do vírus em células T CD4⁺ em repouso de doentes infetados pelo HIV em ART (Lehrman et al., 2005), e dois pequenos ensaios clínicos reportaram que a administração de IL-7 em indivíduos infetados em ART causou um aumento transitório do RNA-HIV plasmático em cerca de metade dos participantes do estudo (Lévy et al., 2012; Sereti et al., 2009).

Um estudo recente entre 32 indivíduos infetados com HIV descobriu, como era expectável, que o tratamento com IL-7 humana recombinante aumentasse o número de células T CD4⁺ de um fenótipo predominante *naïve* e de memória central (Lévy et al., 2012). Foi observada uma virémia transitória de baixo nível numa minoria dos indivíduos do estudo, o que indicou algum efeito na latência do HIV, mas os níveis de DNA-HIV aumentaram por mL/sangue contudo tal não foi observado por milhão de células T CD4⁺. Uma conclusão semelhante foi alcançada no ensaio ERAMUNE-01, o qual foi desenhado para investigar se o tratamento com IL-7 associado à ART intensificada teria impacto na persistência do HIV em indivíduos infetados em ART. Neste estudo, 29 indivíduos com HIV receberam uma ART intensiva com raltegravir e maraviroc adicionados ao seu regime inicial de terapia, e foram posteriormente randomizados para uma intensificação isolada ou para 3 injeções semanais adicionais com IL-7 (Katlama C, et al., 2016). Como observado anteriormente, o tratamento com IL-7 conduziu a aumentos de células T CD4⁺, de um fenótipo predominante de memória central, e também causou um aumento no nível de DNA-HIV medido em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Durante o posterior acompanhamento, os níveis de DNA-HIV mL/sangue permaneceram elevados, mas não por milhão de PBMCs (Katlama C, et al., 2016). Estes estudos demonstraram que, embora o tratamento com IL-7 tenha

algum efeito na reversão de latência, o que teoricamente poderia ter facilitado a eliminação de células produtoras de vírus, os efeitos homeostáticos dessa citocina induziram a proliferação de células T de memória, incluindo células infetadas, e expandiram realmente o número de células infetadas latentes.

Mais recentemente, a IL-15 e os superagonistas da IL-15 também foram explorados em pesquisas relacionadas com a cura. Num modelo *in vitro*, tanto a IL-15 como dois superagonistas da IL-15 (e também da IL-2) preparou células infetadas latentes para o reconhecimento de células T CD8⁺. Adicionalmente, concentrações terapeuticamente relevantes do superagonista de IL-15 ALT-803 preparou células infetadas latentes T CD4⁺ para o reconhecimento de células T CD8⁺ *ex vivo* (Jones et al., 2016). Este composto é atualmente testado num ensaio clínico para observar o seu efeito sobre a persistência do HIV em indivíduos infetados em ART (NCT02191098) (L. Zhang & Lewin, 2018).

3.2.7 – Interferão-Alfa

O interferão- α (IFN- α) é essencial para o controlo imunológico da infeção pelo HIV (p. ex., pela indução de fatores de restrição antirretrovirais) (Abdel-Mohsen et al., 2014). Estudos clínicos demonstraram que o tratamento a longo prazo com IFN- α exógeno pode levar à supressão viral e a um declínio no DNA-HIV integrado (Azzoni et al. 2013), DNA-HIV total (L. Zhang & Lewin, 2018) e no RNA-HIV (Moron-Lopez et al. 2016). Num ensaio, a dosagem de IFN-2 α peguado na ausência de ART conduziu a um controlo viral em 9 de 20 indivíduos, isto enquanto a administração do IFN-2 α foi continuada. Os efeitos colaterais bioquímicos e neurológicos consideráveis do tratamento com IFN-2 α peguado, tornam essa estratégia menos atraente do que a ART *standard*, mas os resultados são intrigantes, pois sugerem que o tratamento com IFN-2 α pode contribuir para o controlo virológico em doentes cronicamente infetados.

3.2.8 – Terapias com péptidos e proteínas

Uma das mais recentes descobertas, foi a “*membrane-associated RING-CH 8 (MARCH8)*”, este que é um dos 11 membros da recentemente descoberta família MARCH do RING (*really interesting new gene*)-finger E3 ubiquitin ligases. MARCH8 foi referido por diminuir a expressão de várias proteínas transmembranares hospedeiras, incluindo o complexo major de histocompatibilidade (MCH)-II, CD44, CD81, CD86, CD98, Bap31, a proteína acessória do recetor interleucina (IL)-1, TNF- relacionado com

o ligando que induz a apoptose (TRAIL) no recetor 1 e o recetor da transferrina, no entanto o seu papel fisiológico permanece em grande parte desconhecido. Neste artigo (Tada et al., 2015) é identificado como sendo um novo fator antiviral. Na maior parte dos casos a sobre expressão deste nas células-vírus produtoras não influenciou os níveis de produção de viriões, mas os vírus derivados a partir de células que expressam o MARCH8 foram, substancialmente, menos infecciosos do que os vírus de controlo, e têm também a capacidade de diminuir substancialmente a eficácia na entrada viral e também de inibir os vírus envelopados (Tada et al., 2015).

Assim, as descobertas indicam que MARCH8 é altamente expresso nas células mieloides diferenciadas terminalmente e que é uma proteína antiviral potente que tem como alvo as glicoproteínas e que reduz a sua incorporação nos viriões.

Para investigar se a expressão de MARCH8 nas células alvo, inibe a infeção viral, foi estabelecida uma linha de células T CD4, M8166, que expressa de forma estável MARCH8 sem alterar a proliferação celular. A expressão deste nas células alvo não afetou a infecciosidade viral, ao passo que ‘múltiplas rondas’ de replicação foram inibidas nessas células. Assim, conclui-se que a expressão de MARCH8 nos vírus produtores de células, mas não nas células alvo, prejudica a infecciosidade viral (Figura 6). Pode-se então concluir que a atividade antiviral de MARCH8 é, largamente, independente da origem do Env (Tada et al., 2015).

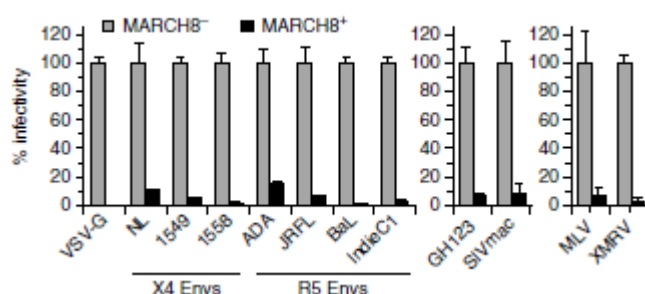


Figura 6 – A expressão de MARCH8 nas células produtoras diminui a infecciosidade viral, de uma maneira dependente do domínio RING-CH. Do lado esquerdo e médio, as células MAGIC5, à direita células 293T (Tada et al., 2015).

De seguida, os investigadores mediram as transcrições reversas virais para determinar a etapa da fase inicial da replicação, durante o qual a infeção com vírus produzidos a partir de células que expressam o MARCH8 poderiam ser bloqueados. MARCH8 reduziu, notavelmente, não apenas a etapa tardia e “2-LTR”, mas também os produtos precoces da transcriptase reversa de ambos os vírus (VSV-G e HIV-1); isto sugere que MARCH afeta uma fase bastante precoce do ciclo de RV. Esta observação fez com que se investigasse se o MARCH8 seria ou não capaz de bloquear a entrada do vírus nas células (Tada et al., 2015).

Para analisar a eficiência de entrada, foi usado a β -lactamase (BlaM) fundida com a proteína viral R (Vpr). A eficiência da entrada de HIV-1 VSV-G-pseudotipado preparado a partir células que expressam MARCH8 foi notavelmente reduzida em comparação com a dos vírus de controle. Semelhante redução na entrada viral foi observada nos vírus do HIV-1. Foi assim concluído que a expressão do MARCH8 nas células produtoras leva a um defeito marcante na entrada do HIV-1 (Tada et al., 2015).

É importante de salientar, o nível de expressão intracelular do Env do HIV-1 nas células produtoras não foi afetado pela presença do MARCH8 (Figura 7a), enquanto a de VSV-G foi drasticamente diminuída (Figura 7b). Usando um anticorpo monoclonal, foi descoberto que o nível intracelular da expressão deste foi reduzida pelo MARCH8. Estes resultados foram confirmados usando imunofluorescência, na qual o MARCH8 bloqueia a expressão da superfície da célula, mas não a 'expressão' intracelular do Env do HIV-1 e bloqueia a expressão intracelular do VSV-G. Assim, conclui-se que uma reduzida incorporação do Env HIV-1 no virião é devida a uma baixa regulação da superfície celular pelo MARCH8 (Tada et al., 2015).

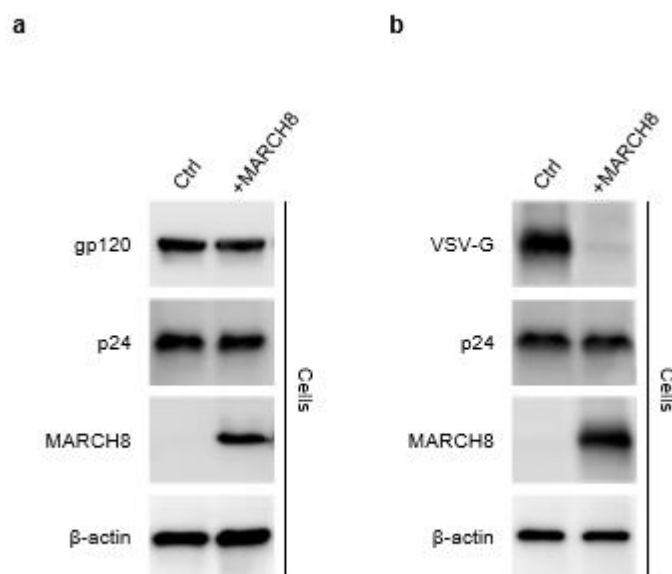


Figura 7 – Níveis de Expressão intracelular do Env do HIV-1 e VSV-G com ou sem MARCH8 em células produtoras. Os extratos celulares foram submetidos a análises de imunotransferência usando Acs contra gp120, VSV-G, p24, MARCH8 e β -actina (Tada et al., 2015).

Sumariamente, este artigo mostra que a proteína do hospedeiro transmembranar específico do tipo de célula MARCH8 é um novo fator antiviral que bloqueia a incorporação do envelope da glicoproteína no envelope dos viriões, reduzindo a infecciosidade viral. Neste estudo, o MARCH8 não inibiu a produção do vírus HIV-1, que é conhecido por ser mediado pelo NF- κ B através da ativação transcricional da LTR. Isto

é provavelmente devido ao MARCH8 não estar envolvido nas vias independentes de NF- κ B que requerem uma forma recentemente identificada, de *splicing* alternativo. Assim, MARCH8 pode exibir atividade de amplo espectro contra os vírus com envelope, embora uma investigação mais aprofundada seja necessária para verificar esta possibilidade. É de notar que o domínio RING-CH do MARCH8, que é crítico para a baixa regulação das proteínas transmembranares, é dispensável para a habilidade do MARCH8 interagir com estas proteínas (Tada et al., 2015).

3.2.9 – Anticorpos Amplamente Neutralizantes

Algumas classes de bNAbs podem prevenir a transmissão celular do HIV, mas ainda não é claro se alguns ARVs são capazes de bloquear a transmissão célula-célula do vírus (T.-W. Chun et al., 2014).

Até agora, apenas um estudo investigou o efeito de bNAbs no tamanho do reservatório de HIV em participantes virêmicos, e não encontrou impacto do bNAbs VRC01 no DNA-HIV total e integrado em células T CD4⁺ periféricas (Lynch et al., 2015). Em indivíduos que já fazem ART a longo prazo, a ausência ou expressão muito baixa do Env HIV em células infetadas pode prejudicar significativamente a capacidade dos bNAbs de eliminar essas células (L. Zhang & Lewin, 2018). Deste modo, novos ensaios estão em curso para analisar o efeito da combinação de bNAbs com LRAs, na tentativa de reduzir o tamanho dos reservatórios latentes (NCT02850016 e NCT03041012) (L. Zhang & Lewin, 2018).

Outra grande descoberta foram os anticorpos anti HIV triespecíficos. Desta forma, uma variedade de anticorpos amplamente neutralizantes (bnAbs) tem sido isolada através de indivíduos infetados com HIV-1, contudo o seu potencial para tratar ou prevenir a infecção em humanos pode ser limitada pela potência ou amplitude dos vírus neutralizados. Os alvos desses anticorpos foram definidos com base na compreensão da estrutura do envelope do HIV-1. Enquanto os bnAbs ocorrem em indivíduos selecionados infetados com o vírus, geralmente após vários anos de infecção continua a ser um desafio conseguir provocá-los através da vacinação, uma vez que a ampla e potente neutralização do HIV-1 muitas vezes requer características de anticorpos fora do comum, como longos laços hipervariáveis, interação com glicanos, bem como um nível substancial de mutação somática. Assim sendo, as estratégias tiveram que ser alteradas de imunização ativa para passiva, de modo a proteger contra a infecção e a atingir o vírus latente. Como tal os cientistas começaram por explorar combinações de bnAbs que otimizassem a potência e a amplitude de proteção, reduzindo a probabilidade

de resistência e de 'escape' viral. Anticorpos direcionados aos sítios de ligação de CD4 (CD4bs), à região externa proximal da membrana (MPER), e a glicanos de região variável estão entre as combinações que até agora conseguiram proporcionar uma neutralização ótima. Também foram testadas combinações alternativas para a imunoterapia da SIDA, direcionando os linfócitos T para ativar a expressão do vírus latente e aumentar a lise das células infectadas por este. Dado que múltiplos anticorpos podem ajudar a reduzir a RV que 'alimenta' a infecção crônica pelo HIV-1, este artigo vem relatar a geração de anticorpos com várias especificidades projetados para aumentar a eficácia da terapia contra este vírus (Xu et al., 2017).

Quanto ao desenho dos anticorpos biespecíficos e a evolução da amplitude de neutralização, apesar dos bnAbs anti HIV-1 individuais conseguirem neutralizar os isolados virais que ocorrem naturalmente com elevada potência, a percentagem de estirpes inibidas varia. Além disso, ainda existem os vírus resistentes que podem sempre ser encontrados mesmo nos pacientes dos quais os bnAbs foram isolados, sugerindo que a pressão imune que é exercida contra um único epítipo pode não ser o suficiente para proteger ou tratar a infecção. Assim chega-se à hipótese de aumentar a amplitude e a potência da neutralização do HIV-1 através de um único anticorpo, combinando especificidades contra diferentes epítopos numa única molécula, sendo assim expectável que esta estratégia melhore não só a eficácia, mas também venha simplificar os regimes de tratamento (Xu et al., 2017).

Para este ensaio vários bnAbs foram avaliados, incluindo VRC01, 10E8, PGT121 e PGT128 para a sua capacidade de neutralizar um painel selecionado de vírus com conhecida resistência ou sensibilidade para esses anticorpos. Foram testadas várias combinações, assim como os bnAbs em diferentes posições. Estes dados indicaram que as melhorias na amplitude poderiam ser alcançadas através de um formato biespecífico; no entanto, a potência não foi melhorada em todos os ensaios em relação a cada anticorpo sozinho (Xu et al., 2017).

Já no que diz respeito ao esboço de anticorpos triespecíficos, para que o objetivo fosse atingido, foi usado um formato, que não tinha sido descrito previamente. Um painel de bnAbs foi avaliado, incluindo aqueles dirigidos contra CD4bs, que incluíam o VRC01 (já anteriormente testado para um anticorpo biespecífico) e N6, bem como PGT121, 10E8 (também testados anteriormente) e PGDM1400. Uma versão melhorada do 10E8, 10E8V4 foi usada devido à sua melhor solubilidade. Primeiro foi determinado qual o braço biespecífico que mostrava a melhor potência, amplitude e rendimento. Esta análise de triagem revelou que as combinações que contenham PGDM1400, CD4bs e 10E8V4 mostraram o nível mais elevado de produção e a maior potência de neutralização. De seguida foram avaliadas diferentes combinações (Figura 8), levando

em última análise à identificação de anticorpos triespecíficos VRC01 / PGDM1400 – 10E8V4 e N6 / PGDM1400 – 10E8V4 como candidatos principais (Xu et al., 2017).

	10E8v4	N6	PGDM1400	VRC01
10E8v4-N6	—	—	++	—
N6-10E8v4	—	—	++	—
N6-PGDM1400	++	—	—	—
PGDM1400-N6	++	—	—	—
N6-PGT121	+/-	—	+/-	—
PGT121-N6	+/-	—	+/-	—
PGDM1400-10E8v4	—	++	—	++
10E8v4-PGDM1400	—	++	—	++
PGT121-10E8v4	—	+/-	+/-	+/-
10E8v4-PGT121	—	+/-	+/-	+/-
PGDM1400-PGT121	+/-	+/-	—	+/-
PGT121-PGDM1400	+/-	+/-	—	+/-

Figura 8 – Concepção de combinações de sítios de ligação dos Acs no formato triespecífico. A solubilidade / rendimento de cada triespecífico é apresentada em ++ (mais alto), + (médio) ou +/- (baixo). A potência relativa contra um painel de vírus é indicada como a mais alta (vermelho), média/baixa (amarelo), - indica que o Ac não foi desenvolvido (Xu et al., 2017).

Quando analisados contra um painel de 208 vírus e comparados apenas com os anticorpos “parentes” sozinhos, a maior neutralização, potência e amplitude foram observadas com N6 / PGDM1400 – 10E8V4, com apenas 1 dos 208 vírus a apresentar resistência à neutralização e uma IC₅₀ mediana, inferior a 0,02 µg/ml (Figura 9). Para além da sua eficácia superior, os anticorpos triespecíficos também produziram maiores níveis de proteína e maior solubilidade do que o modelo biespecífico, facilitando a produção em grande escala e a tradução clínica (Xu et al., 2017).

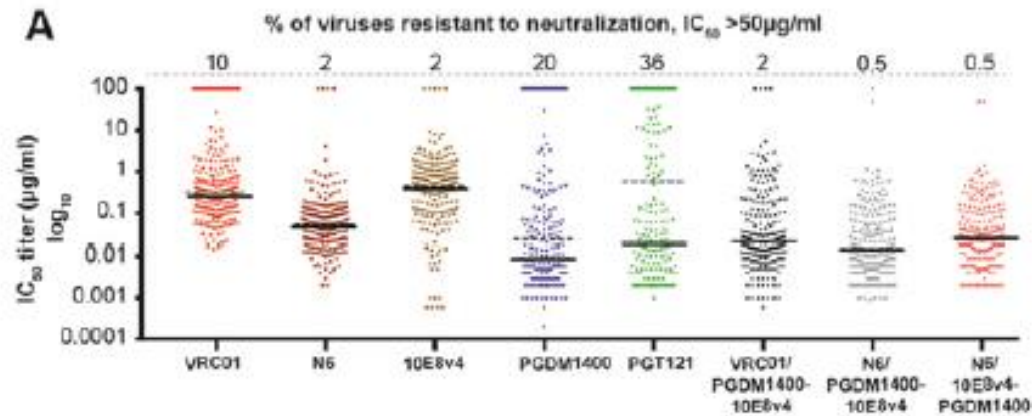


Figura 9 – Títulos de neutralização de diferentes bnAbs e abs triespecíficos contra um painel geneticamente diverso de estirpes de HIV-1 circulantes (Xu et al., 2017).

Uma característica da infecção pelo HIV é a notável diversidade genética do vírus. Desde 2010 foram feitos progressos significativos na identificação de bnAbs que mostram amplitude e potência excepcional. Vários desses anticorpos evoluíram para ensaios clínicos visando a prevenção ou o tratamento e, há um interesse renovado na exploração do seu potencial em ensaios clínicos. Neste artigo (Xu et al., 2017) o objetivo era explorar o potencial de diferentes combinações de bnAbs numa única proteína que conferisse proteção contra diversas estirpes de HIV. Como já foi mencionado, entre as classes de bnAbs foi descoberto um anticorpo triespecífico derivado de bnAbs com CD4bs, MPER e glicanos V1V2 que tinha ampla especificidade, era potente e poderia ser produzido em quantidades suficientes para permitir avaliação em NHP e, eventualmente, em humanos. Quando testado em NHPs com vírus resistentes a bnAbs individuais, o anticorpo triespecífico demonstrou proteção completa contra ambos os vírus, enquanto a infecção foi estabelecida na maioria dos animais tratados com anticorpos individuais VRC01 e PDGM1400.

A capacidade deste anticorpo triespecífico atingir três epítomos independentes pode melhorar a eficácia do tratamento em seres humanos. No entanto, apesar dos bnAbs mostrarem amplitude e potência excepcionais, foram detetadas estirpes virais resistentes em pacientes que fazem esses mesmos anticorpos e entre isolados virais naturais, trazendo a preocupação de que a resistência e as mutações de escape possam surgir. O Ac triespecífico ainda não foi avaliado quanto à sua segurança e eficácia em seres humanos (Xu et al., 2017).

4 – VACINAÇÃO

4 - Para quando uma vacina anti HIV

4.1 – Conceito de vacinação

Nos dias de hoje, o termo vacina aplica-se a todas as preparações biológicas produzidas a partir de microrganismos vivos, que melhoram a imunidade contra a doença e previnem (vacinas profiláticas) ou, nalguns casos, tratam (vacinas terapêuticas). As vacinas são administradas em forma líquida, quer por injeção, ou por via oral ou ainda por vias intranasais (Plotkin, 2013).

Uma vacina é uma substância derivada, ou quimicamente semelhante, a um agente infeccioso particular, causador de doença. Esta substância é então reconhecida pelo sistema imunitário do indivíduo vacinado e suscita da parte deste uma resposta que o protege de uma doença associada ao agente. A vacina induz o sistema imunitário a reagir como se tivesse realmente sido infetado pelo agente (Gomes, 2003).

Estas são constituídas por antigénios, cujas características são dependentes do tipo de vacina que se pretende. Pode-se ter o agente infeccioso inativado ou atenuado, partes do agente, etc (Gomes, 2003). As vacinas são formuladas com outras soluções como água estéril ou salina, aditivos ou conservantes e algumas contêm também adjuvantes. É esta constituição que garante a qualidade e potência da vacina (Rockstroh & Hoffmann, 2015). As vacinas podem ser constituídas de diferentes maneiras (Figura 10) (Plotkin, 2013):

- A partir de microrganismos vivos que foram enfraquecidos, geralmente através de cultivo em condições sub-ótimas (também denominado atenuação), ou através de uma modificação genética, que reduz a capacidade de causar a doença;
- Através de todos os microrganismos que foram inativados por via química, térmica ou por outros meios;
- Por componentes do microrganismo causador de doença, tais como proteínas e polissacáridos específicos ou ácidos nucleicos;
- De toxinas inativadas provenientes de bactérias produtoras destas;
- A partir da articulação (conjugação) de polissacáridos a proteínas (isto aumenta a eficácia de vacinas de polissacáridos em crianças pequenas).

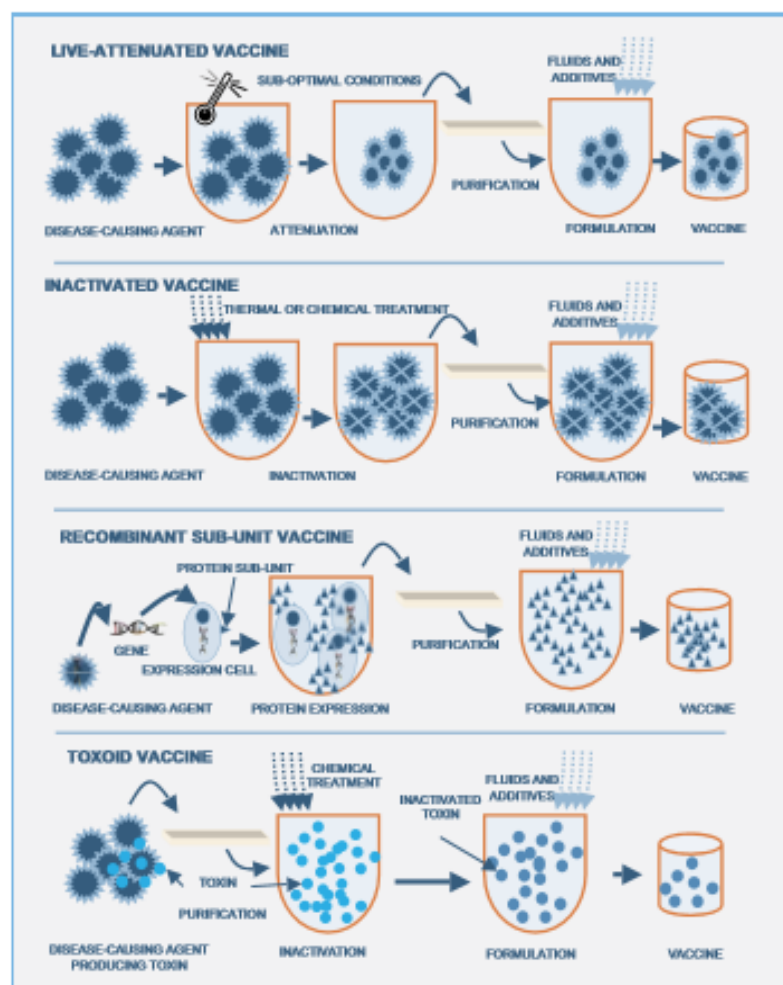


Figura 10 – Diferentes tipos de elaboração de vacinas (Plotkin, 2013).

4.1.1 – Perspetiva histórica das várias abordagens para produção de uma Vacina anti HIV

A vacinação tem sido um pilar importante na prevenção e controlo das doenças desde 1798 (McMichael, 2006).

Com o decorrer dos anos, pensa-se, que o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV está entre os desafios mais difíceis na história da medicina por uma grande razão: o vírus é extremamente diversificado geneticamente, mais ainda que o da gripe. Assim sendo, é difícil pensar como é que um único “tiro” pode funcionar contra todos os diferentes subtipos de HIV que circulam (McMichael, 2006).

Desde o primeiro estudo de fase I, em humanos, da vacina contra a SIDA em 1986 no Zaire, mais de 250 ensaios clínicos têm sido conduzidos, a maior parte destes de fase I ou II. Normalmente, os anticorpos neutralizantes são a primeira escolha para uma vacina que induz a imunidade contra as doenças infecciosas, como a febre-amarela e o HIV-1. Tendo isto em conta, muitos dos estudos nos primeiros 10 anos focaram-se na

imunidade humoral anti HIV. Com base neste conceito, os cientistas usaram a proteína monomérica gp120 do Env do HIV-1 para induzir respostas imunes humorais específicas do envelope. Em ensaios clínicos de fase inicial, apesar dos imunogénios gp120 serem capazes de desencadear anticorpos de ligação específica aos próprios imunogénios, estes falharam ao induzir anticorpos amplamente neutralizantes (bnAbs). Em dois estudos clínicos de fase III, patrocinados pela VaxGen, os candidatos às vacinas não obtiveram eficácia protetora detetável, indicando que essas respostas de anticorpos específicos não forneceram proteção contra a infeção por HIV-1 em humanos (Wang, Mo, & Yang, 2015).

A vacina mais famosa do HIV-1, focada na imunidade das células T é a “HIV Vaccine Trials Network” 502, também conhecida como o ensaio “STEP”, que foi iniciado para determinar se a imunidade da célula T específica do HIV-1, induzida por esta vacina poderia levar à prevenção da infeção por HIV-1 ou, pelo menos, reduzir as cargas virais plasmáticas após a infeção. Esta vacina candidata foi formulada como uma mistura trivalente de vetores rAd5 (*“recombinant Adenovirus serotype-5”*) expressando as cadeias do HIV-1, B Gag, Pol e Nef, respetivamente. Contudo, este estudo terminou em Setembro de 2017, de forma inesperada. A vacina não preveniu a infeção nem diminuiu os níveis plasmáticos precoces de vírus naqueles que receberam a vacina, em comparação com os recetores de placebo. Além disso, surgiu uma observação completamente inesperada: um número considerável de recetores da vacina ficaram infectados (Wang et al., 2015).

Surpreendentemente, dois anos após o fracasso do ensaio STEP, o teste RV144 Thai demonstrou uma eficácia de 31,2% na prevenção da infeção pelo HIV-1, esta que foi a primeira vacina que mostrou alguma prevenção. O ensaio usou uma combinação de *“prime-boost”* de duas vacinas, incluindo a vacina vCP1521 vectorial *“canaripox”*, que consiste numa vacina baseada nos vetores de *canaripox* recombinantes, e a vacina de subunidades AIDSVAX B/E gp120 (Wang et al., 2015), ou seja, vacina de subunidades da glicoproteína 120 recombinada, e em que os anticorpos de ligação são a gp120 MN, gp120 A244 e p24 (Rerks-Ngarm et al., 2009), previamente testada nos ensaios VAX003 e VAX004. A análise de correlação imunológica deste estudo indicou que os anticorpos V1V2 podem ter contribuído para a proteção contra a infeção pelo HIV-1, enquanto níveis elevados de anticorpos IgA específicos do Env podem ter atenuado os efeitos dos anticorpos protetores. A análise não conseguiu identificar o anticorpo de neutralização como potencial ‘correlacionador’, mas, inesperadamente, os anticorpos não neutralizantes, especialmente os envolvidos na citotoxicidade mediada pelas células dependentes de anticorpos (ADCC), podem desempenhar um papel na proteção (Wang et al., 2015).

Uma vacina contra o HIV é a estratégia mais promissora e viável para evitar os eventos que influenciam tanto o curso da doença como a transmissão. No entanto e, apesar do otimismo e avaliação de mais de 30 produtos em mais de 85 ensaios, a procura pela vacina ainda tem de alcançar o seu objetivo após mais de 20 anos. Ainda que não existam correlações estabelecidas de proteção e de não existirem candidatos capazes de induzir uma imunidade esterilizante, tem-se visto uma rápida expansão nos últimos anos em termos de números e tipos de vacinas candidatas. Apesar de não ter sido observada uma limpeza espontânea do HIV, atribuível à imunidade natural, testes que foram feitos em modelos animais sugerem que a imunidade celular induzida pela vacina reduz a virémia do HIV e impede a perda de células T CD4. Estudos em curso testam se a imunidade induzida pela vacina conduz à melhoria do curso da doença. Embora seja um desafio “assustador”, desenvolver uma vacina segura, globalmente eficaz, talvez seja a prioridade mais elevada de saúde pública a nível mundial (McMichael, 2006).

4.2 – Diferentes Abordagens para o Desenvolvimento de Vacinas Preventivas Anti HIV

4.2.1 – Indução de Anticorpos Neutralizantes

As abordagens para o desenvolvimento de vacinas preventivas contra o HIV, tem algumas variantes. Entre elas, temos a estratégia “tradicional” que é considerada a melhor abordagem, com base na estimulação de anticorpos neutralizantes (Duerr, Wasserheit, & Corey, 2006).

Idealmente, todas as vacinas preventivas contra o HIV iriam interromper a infeção providenciando a imunidade esterilizante, através da estimulação de títulos elevados dos anticorpos amplamente neutralizantes. De facto, a maioria das vacinas autorizadas dependem primeiramente, de tais respostas. Em 1990, experiências em primatas não humanos indicavam que a transferência passiva de anticorpos neutralizantes poderiam proteger contra a infeção experimental de lentivírus de primatas. Assim, a estratégia inicial para o desenvolvimento da vacina para o HIV passou pela utilização de proteínas recombinantes do envelope do vírus (gp160 ou gp120) na tentativa de induzir anticorpos neutralizantes (Duerr et al., 2006).

Várias características do envelope contribuem para a sua capacidade de iludir os “controles de vigilância” eficazes através do sistema imune humoral. O envelope do HIV é um trímero de heterodímeros. É composto por uma subunidade superficial (gp120) e uma subunidade transmembranar (gp41) que estão ligadas de forma não covalente. A

manutenção desta estrutura trimérica nativa parece necessária para induzir a produção dos anticorpos neutralizantes. Por outro lado, a estrutura originária do envelope do HIV protege-o de diversos epítomos potencialmente neutralizadores, tal como o local de ligação do co-recetor, que é feito acessível, apenas depois da ligação da célula T CD4. De forma semelhante, os estudos de substituição mutacional dos sítios de glicosilação demonstraram que as alterações nestes locais afetam a neutralização dos epítomos distantes (Duerr et al., 2006).

A estratégia atual é a estimulação da imunidade celular. Tendo em conta a falta de eficácia de produtos concebidos para provocar a produção de anticorpos neutralizantes o desenvolvimento das vacinas contra o HIV teve de mudar o foco principal para a imunidade celular. A maior parte dos ensaios em curso, estão a testar vacinas que se destinam a induzir a proteção de CTLs específicas para este vírus. Estas células imunes efetoras reconhecem os epítomos que são exibidos na superfície das células em conjunto com antígeno de leucócitos humanos, mas não reconhecem vírus livres. Eles limitam a propagação da infeção pelo HIV através da destruição de células infetadas por apoptose ou através da secreção de quimiocinas e citocinas que interferem com ciclos subsequentes de infeção (Duerr et al., 2006).

O trabalho feito em primatas não humanos indica que as vacinas que induzem a produção de CTLs específicas do HIV, provavelmente atuam através da limitação da replicação do HIV, reduzindo a carga deste nos indivíduos infetados. Em alguns animais, a RV parece ser completamente suprimida com o uso destas vacinas. Nos seres humanos, o ponto de ajuste da CV prevê o subsequente curso da doença, enquanto a transmissão a parceiros sexuais correlaciona-se com a CV no plasma e pode ser prevenida se esta diminuir para um valor inferior a 1500 cópias/ml (Duerr et al., 2006). Em 1994, o facto da vacina indutora de anticorpos para o HIV ter falhado na proteção contra esta infeção nos humanos, levou a uma reavaliação do esforço global das vacinas, o que levou os cientistas até à resposta imune celular (Duerr et al., 2006).

4.2.2 – Indução de células T específicas do HIV-1

Com todos os obstáculos em relação à indução de respostas pelos anticorpos neutralizantes, o foco do desenvolvimento de vacinas, virou-se para as que podem induzir a resposta imune das células T específicas do HIV-1. As células T citotóxicas (CTC) têm um papel importante no controlo deste vírus em humanos e também para o controlo do SIV nos seus modelos. Ao contrário dos anticorpos neutralizantes, estas células não exercem uma imunidade esterilizante, uma vez que só podem reconhecer as células que estão infetadas (Rockstroh & Hoffmann, 2015).

Contudo, a observação das CTLs específicas do HIV-1 em indivíduos expostos mas não infectados por este vírus elevou a esperança de que uma vacina baseada numa célula T do HIV-1 poderia prevenir uma infecção em curso por contenção e erradicação de pequenos focos de infecção viral (Rockstroh & Hoffmann, 2015). Assim a melhor esperança para uma vacina deste género seria assegurar uma resposta mais rápida direcionada aos locais da mucosa, de modo a atuar nos estágios iniciais da infecção e eliminar o vírus nesse momento. Como ainda não existem estudos em animais que comprovem a eficácia deste método, um cenário mais provável seria uma vacina estimuladora das células T de memória que necessitaria: a) expansão por divisão celular; b) diferenciação para adquirir a capacidade de matar células infectadas com o vírus e c) deslocação para locais mucoso e drenagem de gânglios linfáticos. Assim, a janela para poder interromper a infecção inicial seria muito estreita (McMichael, 2006).

4.3 – Novas vacinas em estudo

Apesar dos tratamentos antirretrovirais já existentes, uma vacina terapêutica ou profilática contra o HIV continua a ser de extrema importância, o que leva a que seja necessário todo o esforço dos cientistas. As tecnologias tradicionais de vacinas incluíam vírus vivos atenuados, vírus mortos inteiros e vacinas de subunidades proteicas. No entanto as preocupações de segurança e a incapacidade de induzir bnAbs limitaram o seu uso na vacina contra o HIV. Assim sendo, a atenção agora vira-se para algumas novas estratégias de vacinação.

Tendo em conta, as propriedades estruturais pouco comuns dos bnAbs (elevada mutação somática e CDRH3 longa), as quais não podem ser induzidas pelas abordagens tradicionais de vacinação, são necessárias alternativas. A primeira é a vacinação sequencial. A segunda abordagem é a conceção de imunogénios que podem ativar especificamente células B que expressam os anticorpos da linha germinal (Wang et al., 2015).

Em adição, Sodora et al 2009, acreditavam que a procura pela vacina contra o HIV poderia beneficiar do estudo das infeções pelo SIV dos hospedeiros naturais, como o *Cercopithecus aethiops*, que compartilham muitas características da infecção nos humanos (Sodora et al., 2009). Isto apesar, destes hospedeiros não desenvolverem imunodeficiência. Assim, estes estudos poderiam fornecer ideias para o “projeto” de novas futuras abordagens de vacinas. Uma potencial abordagem que poderia ser criada, seria incluir componentes ou adjuvantes para diminuir a disponibilidade das células alvo para o vírus a nível dos tecidos da mucosa, desde que os hospedeiros expressassem níveis mais baixos de CCR5 nas células T CD4. Outra ideia seria reduzir os níveis de

ativação imune crónica no caso de acontecer uma infeção “inovadora”. Isto porque numa infeção SIV, a ativação imune elevada numa infeção aguda foi rapidamente reduzida durante uma infeção crónica. Entender como a imunidade inata regularizava as respostas imunes adaptativas seria de grande importância para otimizar as vacinas candidatas. E por fim, um grande aspeto do desenvolvimento das vacinas contra o HIV foi identificar relações de proteção. Para ensaios clínicos em humanos, apenas cinco deles avançaram até à fase III, até agora, com quatro resultados desapontantes (nos ensaios sobre a glicoproteína recombinante 120, o AIDSVAX B/E, o HVTN 502 e o HVTN 505, sendo que alguns destes já foram abordados posteriormente) e um resultado modesto no ensaio RV144 (mais direcionado para prevenção do HIV) e mesmo neste último, foi desafiado pela análise estatística recente, o que indicava que a vacinação tinha uma eficácia de baixo nível, com uma possibilidade igual ou superior a 22% de não ter qualquer eficácia, mas este também já falado anteriormente (Wang et al., 2015). Outro dos estudos, este demonstrando ser mais promissor, é o HVTN 702. É o primeiro estudo de eficácia, que está a testar com um regime de vacina experimental, se previne com segurança a infeção pelo HIV entre adultos sul-africanos. Este envolve uma nova versão do único candidato a vacina contra este vírus que já demonstrou fornecer alguma proteção. Este ensaio decorre na África do Sul onde mais de 1000 pessoas são infetadas todos os dias. (Wang et al., 2015)

Este ensaio, HVTN 702 é então baseado no ensaio clínico RV144, realizado na Tailândia. Este novo regime visa proporcionar uma maior proteção e mais sustentada, tendo sido o *design*, o cronograma e os componentes do RV144 modificados na tentativa de aumentar as respostas imunes protetoras induzidas pela vacina. Esta nova vacina consiste em duas vacinas experimentais: uma vacina baseada nos vetores *canaripox* recombinantes, denominada ALVAC-HIV, e uma vacina de subunidades de proteína de gp120, com um adjuvante, o MF59, para aumentar a resposta imune do corpo à vacina. Tal como já foi mencionada estes foram os componentes usados também no ensaio clínico RV144, contudo estes foram alterados de modo a serem específicos do subtipo C do HIV, este que é o predominante na região sul de África. Este estudo conseguiu atingir a fase 2b/3 dos ensaios clínicos, este que é o maior e mais avançado ensaio de vacina contra o HIV a ocorrer na África do Sul, onde se esperam obter resultados em 2020 (Wang et al., 2015).

No que diz respeito ao *canaripox* este pertence à família *avipoxvirus*, e é capaz de infetar células de mamíferos, resultando numa infeção não produtiva com expressão génica precoce e em alguns casos tardia antes do bloqueio da replicação. Este não cresce em células humanas, tornando-se também por isso mais seguro. Por esta razão este vírus tem sido utilizado como um vetor de vacinas contra uma variedade de agentes. Tal como

a *vaccinia*, que será abordada posteriormente, esta infeta as células dendríticas imaturas em maior grau do que as maduras (Larrison, Marie; Bhardwaj, 2001)

O *poxvirus* e, em particular a *vaccinia virus* (VACV), estavam entre os primeiros vírus animais a serem investigados como vetores de transferência de genes. A expressão do gene recombinante pelo VACV foi primeiro demonstrada em 1982 e desde então que os *poxvirus* têm sido utilizados com sucesso nos estudos de interações vírus-célula hospedeira, para produção *in vitro* e caracterização funcional de proteínas, bem como vacinas vivas e ferramentas para pesquisa destas. Diversas características únicas fazem com que os *poxvirus* recombinantes sejam excelentes candidatos como vetores de vacinas: 1) A estabilidade da vacina liofilizada, o seu baixo custo, facilidade de fabricação e administração; 2) o local citoplasmático da expressão génica; 3) a flexibilidade de empacotamento do genoma, o que permite que grandes quantidades de genoma sejam perdidas ou apagadas e que seja integrado DNA estranho sem perda de infetividade; 4) a capacidade de induzir anticorpos e respostas de células T citotóxicas contra antígenos estranhos com imunidade duradoura após uma única inoculação; 5) A extensa experiência pré-clínica e clínica alcançada e 6) a diminuição da prevalência de população vacinada devido à interrupção da vacinação contra a varíola na década de 1970 após a sua erradicação. Apesar de todas estas vantagens, algumas complicações trouxeram preocupações e dúvidas quanto à segurança da reintrodução da VACV como imunizante. Como tal, uma das abordagens adotadas tem sido o desenvolvimento de estirpes altamente atenuadas (Gómez, Perdiguero, Garcia-Arriaza, & Esteban, 2012).

4.3.1 – Progresso dos ensaios clínicos pós RV144

4.3.1.1 – Ensaio clínico tailandês RV305

Devido ao sucesso parcial do ensaio RV144, foram realizados dois ensaios adicionais com os mesmos produtos, na esperança de melhorar a imunogenicidade deste regime de vacinação, com foco no V1V2. O RV305 foi um ensaio clínico realizado na Tailândia (Rerks-Ngarm S, et al., 2017). Este ensaio foi realizado de 2012 a 2017 em 162 voluntários do estudo RV144 original, que foram randomizados para receberem vacinas ativas, e estes fizeram o plano de vacinação completo. Os voluntários do RV305 foram randomizados para receberem duas vacinações com 6 meses de intervalo, consistindo apenas de AIDSVAX® B/E e ALVAC-HIV, os dois em combinação, ou um placebo de uma forma duplamente cega. Como o intervalo entre as séries originais de RV144 e as séries impulsionadoras de RV305 foi de 6 a 8 anos, o objetivo do estudo foi avaliar a segurança e a imunogenicidade dessas vacinas de reforço tardio, bem como

caracterizar a resposta imune nos compartimentos mucosos, o que não foi realizado no ensaio RV144 devido à magnitude do estudo (L. Zhang & Lewin, 2018).

Consistentemente com a série inicial de RV144, os adicionais aumentos tardios de RV305 foram geralmente seguros e bem tolerados. A quantificação de IgG bAb plasmático para o subtipo E da gp120, bem como para os subtipos B e E V1V2 revelaram um padrão consistente. Todos os recetores da vacina de AIDSVAX B/E®, de forma independente ou em combinação com ALVAC-HIV, formaram anticorpos HIV-específicos, enquanto as respostas com ALVAC-HIV independente ou com os recetores a efetuar placebo foram baixas. Não houve uma diferença significativa na resposta à AIDSVAX B/E® independente da associação com ALVAC-HIV, indicando que esta última desempenha um papel pequeno no aumento da resposta humoral. Curiosamente, a magnitude da resposta à vacinação inicial foi maior que a resposta máxima à série inicial de vacinações RV144, mas a resposta IgG à segunda vacina (6 meses depois) não foi tão alta e teve magnitude semelhante à resposta do pico de RV144 (Rerks-Ngarm S, et al., 2017). Infelizmente, dentro dos 6 meses após a última vacinação a resposta de IgG a todos os antígenos diminuiu rapidamente (Rerks-Ngarm S, et al. 2017).

Foi detetada uma fraca atividade neutralizadora antes do reforço, evidenciando respostas de células B de longa duração Env-específicas geradas por imunizações anteriores com RV144. O aumento das imunizações levou também ao aumento da resposta de neutralização Tier 1 contra vírus mais sensíveis num padrão semelhante ao reforço de anticorpos IgG e IgA, isto sem gerar uma forte neutralização contra os vírus Tier 2, que são menos facilmente neutralizados (Rerks-Ngarm S, et al., 2017). Todavia, a classificação de células B individuais de recetores de vacina revelou uma expansão de um conjunto subdominante de linhagens clonais de células B que produzem anticorpos com qualidades de bNAbs. Especificamente, os reforços tardios da vacina de AIDSVAX B/E®, com ou sem ALVAC, resultaram numa hipermutação somática aumentada e num alongamento da região determinante complementar 3 da cadeia pesada (HCDR3) em anticorpos reativos ao Env, ambas qualidades associadas aos bNAbs (Haynes et al., 2012; Meffre et al., 2001; Wardemann et al., 2003). Além disso, os precursores germinativos e a afinidade dos membros de linhagem clonal de células B maduras neutralizaram um isolado primário de Tier 2, expandiram os anticorpos mediadores de ADCC induzidos pela RV144, e geraram novos anticorpos HIV-1 V2 ADCC-específicos (L. Zhang & Lewin, 2018).

As respostas celulares no sangue consistiam predominantemente de respostas de células T CD4⁺ IFN- γ contra o Env HIV, com algumas respostas de CD4⁺ IL-2 contra o HIV Env em participantes reforçados com AIDSVAX B/E® com ou sem ALVAC, mas

não com ALVAC independente. Os resultados da polifuncionalidade das células T CD4⁺ para o Env HIV aumentaram nestes mesmos dois grupos após o reforço tardio (Rerks-Ngarm S, et al., 2017). Com base nesses resultados, os participantes do estudo RV305 foram então opcionalmente inscritos para receber um reforço adicional de AIDVAX B/E® 3-4 anos após a série com RV305, na esperança de expandir ainda mais esta linhagem clonal. Estão a decorrer de momento análises para este reforço.

4.3.1.2 – Ensaio clínico tailandês RV306

Paralelamente, o ensaio clínico RV306 inscreveu e randomizou 360 voluntários saudáveis na Tailândia, para receber ou o placebo ou a série primária de RV144 durante 6 meses, seguida de um reforço com AIDSVAX B/E® independente ou com ALVAC administrada no mês 12, ou ambas as vacinas administradas no mês 15 ou 18, para utilizar um esquema de vacinação mais longo que incorporasse um reforço tardio (L. Zhang & Lewin, 2018). Em todos os grupos de vacinas, a adição do reforço tardio aumentou: os IgG plasmáticos específicos para o Env HIV e para o V1 V2; as titulações de anticorpos de ligação com a mucosa e a neutralização do Tier 1; e este aumento tem uma forte correlação na magnitude das respostas nos ensaios (L. Zhang & Lewin, 2018). Tal como no RV305, as respostas Plasmáticas celulares predominantes foram células T CD4⁺ que expressam IFN- γ e/ou IL-2 ao Env HIV (L. Zhang & Lewin, 2018). O reforço tardio também aumentou tanto as respostas plasmáticas HIV-específicas como das células B com memória quantificadas pelo ELISpot (*B-cell enzyme-linked immunospot*). Curiosamente, a magnitude das respostas celulares humorais e periféricas, incluindo a polifuncionalidade, melhorou com o aumento do intervalo entre as séries de vacinação primárias e de reforço. Além disso, o aumento do intervalo de reforço melhorou a durabilidade das respostas de bNAbs HIV-específicos (L. Zhang & Lewin, 2018). Estes dados são consistentes com os resultados do RV305, e demonstram que um intervalo prolongado entre o início da vacinação e o reforço pode ser imunologicamente benéfico para a resposta imunológica anamnética, ou seja, uma resposta mais rápida e maior. No entanto, num nível populacional, isso deve ser equilibrado com a necessidade de fornecer proteção contínua contra o HIV durante as séries de vacinação, pois as respostas diminuem rapidamente após a vacinação, e um intervalo mais longo entre o estímulo inicial e o estímulo do reforço pode levar a um período de maior risco antes do reforço.

4.3.1.3 – Ensaios clínicos na África do Sul HVTN 097 e HVTN 100

Paralelamente aos esforços em desenvolvimento na Tailândia, o regime de vacina candidato da AIDSVAX/ALVAC está a avançar na República da África do Sul. O estudo inicial neste esforço, o HVTN 097, avaliou as vacinas usadas no RV144 no mesmo esquema de vacinação num estudo de fase 1b randomizado, duplo-cego controlado por placebo. Em 68 participantes, as vacinas eram seguras e bem toleradas, e as taxas de resposta geral de células T CD4⁺ plasmáticas específicas de Env e que expressavam IFN- γ e/ou IL-2 foram semelhantes às do RV144 (L. Zhang & Lewin, 2018). Este ensaio foi seguido pelo HVTN 100, conduzido em voluntários saudáveis na África do Sul para testar um regime de vacinação semelhante ao RV144 e ao RV306. Embora a importância de combinar os produtos vacinais contra o HIV ao subtipo molecular predominante do HIV circulante na população-alvo permaneça desconhecido, o HVTN 100 utilizou vacinas que expressam genes do subtipo C do HIV os quais são predominantes na África do Sul. A ALVAC-HIV vCP2438 expressando o subtipo C gp120 do HIV e subtipo B gp41, gag e protease foi administrada nos meses 0, 1, 3, 6 e 12, com o subtipo C gp120 bivalente administrado nos meses 3, 6 e 12, mimetizando o braço de reforço tardio de 12 meses no RV306. Enquanto a proteína bivalente AIDSVAX B/E® utilizada no RV144, RV305 e RV306 foi adjuvada com Alum, o subtipo bivalente C gp120 foi adjuvado com MF59®, um adjuvante à base de esqualeno que tem sido utilizado em avaliações de vacinas candidatas contra a gripe e o HIV. O objetivo deste ensaio clínico foi determinar se o regime de vacina HVTN 100 correspondia ou excedia a imunogenicidade de quatro critérios “go/no-go” pré-especificados, que são Env IgG, V1 V2 IgG, células T CD4⁺ Env e os anticorpos função efectora Fc, sobre respostas semelhantes no RV144 (L. Zhang & Lewin, 2018).

4.3.1.4 – Futuros ensaios de eficácia de vacinas candidatas ao HIV-1 após RV144

Em 2016, foi anunciado que todos os critérios de imunogenicidade pré-especificados do HVTN 100 haviam sido observados, levando à decisão de prosseguir com um estudo de eficácia de fase 2b duplamente cego controlado por placebo deste regime do subtipo C na África do Sul (L. Zhang & Lewin, 2018). Este ensaio, o HVTN 702, está a inscrever 5400 homens e mulheres em risco de contrair o HIV. Eles estão sendo randomizados para receber o regime de HVTN 100 ou placebo, durante 12 meses, e acompanhados durante 24 a 36 meses enquanto recebem aconselhamento preventivo do HIV e encaminhamento para serviços de circuncisão masculina médica

voluntária e/ou PrEP se tal desejado. São esperados entre 2019 e 2021 os resultados sobre a incidência do HIV em cada grupo e a eficácia da vacina. Em paralelo, estão a decorrer esforços para o desenvolvimento e fabricação da próxima geração de proteínas B/E bivalentes para desenvolvimento clínico, com o objetivo de realizar um estudo de eficácia em regiões onde os subtipos B e E circulam. Assim, os conhecimentos imunológicos do estudo RV144 e dos seus sucessores continuam a impulsionar a busca de uma vacina licenciada e eficaz para prevenir a infeção pelo HIV em múltiplas regiões.

4.4 – Considerações a ter no *design* das vacinas anti-HIV

Segundo a WHO há certos desafios científicos necessários ultrapassar para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV. São eles a variabilidade do HIV; a falta de um modelo animal ideal para se conseguir estudar; a imunidade natural que falha ao combater o vírus; o facto de este ser um retrovírus – significa que integra o genoma do hospedeiro – logo, há uma janela curta de oportunidade para controlar a infeção; a transmissão sexual e a necessidade de bloquear a infeção logo na superfície das mucosas; o facto do HIV atingir as células do sistema imunitário e por fim mecanismos de evasão do Env do HIV para a indução dos anticorpos amplamente neutralizantes (Duerr et al., 2006).

Desde 1798, quando Edward Jenner estabeleceu a era da vacina com o seu tratado sobre a *Vaccinae Variolae*, cinco abordagens básicas para a conceção de uma vacina passaram a ser usadas. Duas das abordagens mais eficazes, têm aproveitado organismos vivos, atenuados e organismos inativados. Infelizmente, nenhuma provou ser boa para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV. Vacinas com vírus vivos atenuados, inicialmente aparentaram ser bem-sucedidas no desafio experimental da prevenção em primatas; no entanto, os mutantes atenuados parecem ser patogénicos nos humanos: a imunossupressão tardia ocorreu em 3 dos 6 indivíduos que foram expostos através de transfusão de sangue a deleções que transportam o HIV. A patogenicidade atrasada de tal vírus com deleção dupla, lançou dúvidas sobre a segurança do uso de abordagens com vírus vivos atenuados (Duerr et al., 2006).

5 – CONCLUSÃO

5 – Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi abordar as novas terapias antirretrovirais, assim como as vacinas preventivas/terapêuticas e realizar um levantamento comparativo destas mesmas terapias.

Ao longo dos anos, vários tratamentos foram testados, começando com a Zidovudina em 1987 entre outros, não só em terapia ‘singular’, mas também numa associação de compostos, contudo nenhum se mostrou realmente eficiente. Apesar disto é de ressaltar que a esperança média de vida foi aumentando com o passar dos anos, passando esta de uma doença aguda a uma doença crónica.

Nos dias de hoje, a terapia mais eficaz é a HAART, no entanto um problema bastante presente é a resistência aos fármacos. Assim sendo, novas terapias são necessárias tal como foi referido anteriormente. Nesta dissertação foram abordadas algumas possibilidades de terapias, no entanto, algumas delas não foram bem-sucedidas e outras não foram ainda revelados os resultados. Uma destas terapias é o transplante de células estaminais hematopoiéticas e quimioterapia que tiveram sucesso num paciente, contudo estas não se mostraram tão eficientes noutros pacientes em que foi testado o mesmo estudo. Fala-se também nos agentes de reversão de latência: *shock and kill*, isto através dos inibidores da histona deacetilase, do dissulfiram, dos agonistas da proteína cinase C, entre outros. Outra possibilidade abordada são os inibidores de *checkpoints* imunológicos, contudo muito pouca pesquisa foi realizada sobre o efeito destes inibidores; os agonistas dos recetores *toll-like* sendo que estes obtiveram resultados encorajadores levando a que fossem realizados outros estudos; a terapia com interleucinas é outra possibilidade abordada nesta dissertação, assim como o interferão-alfa e os anticorpos amplamente neutralizadores. Foi também abordada a terapia com proteínas, sendo que uma das terapias em estudo envolve o MARCH8, referido por diminuir a expressão de várias proteínas transmembranares do hospedeiro. Com base nisto, foi colocada a hipótese de este ser um fator antiviral a exercer efeito inibidor comparável à de outros fatores de restrição já conhecidos. Chegando-se à conclusão que este teria capacidade de bloquear a incorporação do envelope glicoproteico no envelope dos virões, reduzindo deste modo a infetividade dos mesmos (Tada et al., 2015). Esta nova descoberta implica que MARCH8 possa exibir atividade antiviral de amplo espectro, embora seja necessária uma investigação adicional mais aprofundada.

Os anticorpos amplamente neutralizantes que foram outra possibilidade discutida nesta dissertação são os anticorpos triespecíficos, que parecem ser uma possibilidade

promissora de tratamento uma vez que poderiam 'seguir' diversas direções, com várias especificidades com o objetivo de aumentar a eficácia da terapia contra o HIV-1. Assim, foram usadas várias combinações de bnAbs, chegando à conclusão final que a maior neutralização, potência e amplitude foi observada com N6/PGDM1400 – 10E8V4. Contudo a segurança e eficácia deste método ainda não foi avaliada em humanos.

No que diz respeito à vacinação, também muitos ensaios têm sido realizados, contudo ainda nenhum mostrou ser realmente eficaz. De todos os estudos realizados o que obteve melhores resultados foi o RV144, no entanto este não foi suficiente para prevenir a infecção pelo HIV. Assim com base neste estudo nasce o regime de vacina experimental, HVTN 702, que continua em estudo na África do Sul e que já atingiu a fase 2b/3 nos ensaios clínicos, sendo o primeiro a atingir este patamar.

Com base ainda no ensaio clínico RV144, outros ensaios clínicos foram elaborados, como é o caso do RV305, no entanto estão ainda a decorrer análises para se perceber ao certo o resultado que este teve. Foi elaborado também o ensaio clínico RV306 muito semelhante ao anteriormente mencionado. O HVTN 097 e HVTN 100, sendo que o primeiro foi um ensaio para avaliar as vacinas usadas no ensaio RV144. Já o HVTN 100 pretendeu testar um regime de vacinação muito parecido também ao ensaio clínico RV144 mas também o RV306, tendo como objetivo determinar se este regime de vacina correspondia ou excedia a imunogenicidade de critérios pré-especificados.

No que diz respeito às perspectivas futuras, para além destes novos possíveis candidatos a tratamento contra o HIV-1, estas centram-se no novo medicamento aprovado recentemente em Portugal, para prevenção da transmissão do HIV, através da toma de um comprimido e, que pode ser usado por quem tem comportamentos de risco. Este denomina-se *Truvada* e é composto por emtricitabina e tenofovir (European Medicines Agency (EMA), 2017).

Como a transmissão sexual do HIV-1 de pessoas infetadas aos seus parceiros está fortemente correlacionada com a concentração do vírus na corrente sanguínea e no trato genital, foi colocada a hipótese da ART poder reduzir a transmissão sexual do mesmo. Diversos estudos observacionais relataram a diminuição da aquisição do HIV-1 por parceiros sexuais de pacientes que receberam esta terapia.

Apesar da existência deste novo medicamento preventivo, vai continuar a ser necessário a existência de medicamentos que sejam eficientes a nível do tratamento e, que consigam erradicar esta infecção a nível mundial, uma vez que, mesmo com todos os estudos que existem ainda não foi encontrado um princípio ativo capaz de solucionar esta doença. De salvaguardar todos os avanços que têm sido feitos ao longo dos anos e que possibilitam que o portador de HIV consiga viver por muito mais tempo, contudo, nos países subdesenvolvidos a acessibilidade à ART deveria de ser superior, uma vez

que nestes países e principalmente na África Sub-Sahariana continuam a morrer indivíduos sem terem direito a qualquer tipo de tratamento.

6 – BIBLIOGRAFIA

6 – Bibliografía

- Abdel-Mohsen, M., Deng, X., Liegler, T., Guatelli, J. C., Salama, M. S., Ghanem, H. E. A., ... Pillai, S. K. (2014). Effects of Alpha Interferon Treatment on Intrinsic Anti-HIV-1 Immunity & In Vivo. *Journal of Virology*, 88(1), 763 LP-767.
- Adamson, C. S., & Freed, E. O. (2010). Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Research*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.09.009>
- Afani S, A., & Gallardo O, A. M. (2011). Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Revista Chilena de Infectología*, 28(5), 461–469. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000600011>
- Amancha, P. K., Hong, J. J., Rogers, K., Ansari, A. A., & Villinger, F. (2013). In Vivo Blockade of the Programmed Cell Death-1 Pathway Using Soluble Recombinant PD-1-Fc Enhances CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Responses but Has Limited Clinical Benefit. *The Journal of Immunology*, 191(12), 6060 LP-6070.
- Archin, N., Eron, J., Palmer, S., Hartmann-Duff, A., Martinson, J., Wiegand, A., ... Margolis, D. (2008). Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4⁺ T cells. *AIDS*, 22(10), 1131–1135.
- Banga, R., Procopio, F. A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., ... Perreau, M. (2016). PD-1⁺ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nature Medicine*, 22, 754.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, E. Al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–71. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Boutros, C., Tarhini, A., Routier, E., Lambotte, O., Ladurie, F. L., Carbonnel, F., ... Robert, C. (2016). Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13, 473.
- Broder, S. (2012). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/ AIDS pandemic. *National Institute of Health*, 2.
- Buitendijk, M., Eszterhas, S. K., & Howell, A. L. (2013). Toll-Like Receptor Agonists Are Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus-Type 1 Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30(5), 457–467. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0199>
- Bull, J. J., Sanjuan, R., & Wilke, C. O. (2007). Theory of lethal mutagenesis for viruses.

- J. Virol.*, (81), 2930–2939.
- Bullen, C. K., Laird, G. M., Durand, C. M., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2014). New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nature Medicine*, 20, 425.
- Cadima-Couto, I., & Goncalves, J. (2010). Towards inhibition of vif-apobec3g interaction: Which protein to target? *Adv. Virol.*, 649315.
- Chew, G. M., Fujita, T., Webb, G. M., Burwitz, B. J., Wu, H. L., Reed, J. S., ... Ndhlovu, L. C. (2016). TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLOS Pathogens*, 12(1), e1005349.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F., Yassine-Diab, B., ... Sekaly, R. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *NatMed*, 15(8), 893–900.
- Chun, T.-W., Davey Jr, R. T., Engel, D., Lane, H. C., & Fauci, A. S. (1999). Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature*, 401, 874.
- Chun, T.-W., Murray, D., Justement, J. S., Blazkova, J., Hallahan, C. W., Fankuchen, O., ... Fauci, A. S. (2014). Broadly neutralizing antibodies suppress HIV in the persistent viral reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36), 13151 LP-13156.
- Chun, T., Justement, J., Murray, D., Hallahan, C., Maenza, J., Collier, A., ... Fauci, A. (2010). Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS*, 24(18), 2803–2808.
- Cillo, A., Krishnan, S., McMahon, D., Mitsuyasu, R., Para, M., & Mellors, J. (2014). Impact of chemotherapy for HIV-1 related lymphoma on residual Viremia and cellular HIV-1 DNA in patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS One*, 9(3), 92118.
- Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., & Shafer, R. W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 292–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
- Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., ... Fleming, T. R. (2011). Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine*, 365(6), 493–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105243>
- Dahabieh, M., Battivelli, E., & Verdin, E. (2015). Understanding HIV Latency: The Road to an HIV Cure. *Annu Rev Med*, 66, 407–421. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-092112-152941>. Understanding

- Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fenoel, V., Huot, N., Dejucq-Rainsford, N., Satie, A., ... Bourgeois, C. (2015). Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection. *PLoS Pathog*, 11(9), e1005153.
- Darbyshire, J. H., & Aboulker, J. P. (1996). Delta: A randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet*, 348(9023), 283–291. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)05387-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05387-1)
- Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., ... Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443, 350.
- Deeks, S., Lewin, S., & Havlir, D. (2013). The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*, 382(39903), 1525–1533.
- Departamento de Doenças Infeciosas. (2016). Infecção VIH e SIDA: a situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2016. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. Retrieved from http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4846/5/VIH_SIDA_2016.pdf
- Duerr, A., Wasserheit, J. N., & Corey, L. (2006). HIV vaccines: new frontiers in vaccine development. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(4), 500–511. <https://doi.org/10.1086/505979>
- Dybul M, Hidalgo B, Chun TW, Belson M, Migueles SA, Justement JS, Herpin B, Perry C, Hallahan CW, Davey RT, Metcalf JA, Connors M, F. A. (2002). Pilot study of the effects of intermittent interleukin-2 on human immunodeficiency virus (HIV)-specific immune responses in patients treated during recently acquired HIV infection. *J Infect Dis*, 185(1), 61–68.
- El-Far, M., Ancuta, P., Routy, J., Zhang, Y., Bakeman, W., Bordi, R., ... Sekaly, R. (2015). Nef promotes evasion of human immunodeficiency virus type 1-infected cells from the CTLA-4-mediated inhibition of T-cell activation. *J Gen Virol*, 96(Pt 6), 1463–1477.
- Elliott, J. H., McMahon, J. H., Chang, C. C., Lee, S. A., Hartogensis, W., Bumpus, N., ... Lewin, S. R. (2015). Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *The Lancet HIV*, 2(12), e520–e529. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00226-X)
- Elliott, J. H., Wightman, F., Solomon, A., Ghneim, K., Ahlers, J., Cameron, M. J., ... Lewin, S. R. (2014). Activation of HIV Transcription with Short-Course Vorinostat in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLOS Pathogens*, 10(11), e1004473.

- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(4), 279–90. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- Ensoli, B., Cafaro, A., Monini, P., Marcotullio, S., & Ensoli, F. (2014). Challenges in HIV vaccine research for treatment and prevention. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00417>
- European Medicines Agency (EMA). (2017). Anexo I resumo das características do medicamento. In *European public assessment report- Xalkori* (pp. 1–55). <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00188.x>
- Finzi, D., M, H., T, P., LM, C., C, B., RE, C., ... Siliciano, R. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295–1300.
- Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J., ... Picker, L. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med*, 21(2), 132–139.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., ... Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), 865–7. <https://doi.org/10.1126/science.6601823>
- Gao, F., Chen, Y., Levy, D. N., Conway, J. A., Kepler, T. B., & Hui, H. (2004). Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. *J. Virol.*, (78), 2426–2433.
- Goff, S. P. (2003). Death by deamination: A novel host restriction system for hiv-1. *Cell*, (114), 281–283.
- Gomes, M. C. (2003). Vacinas. Retrieved from <http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/vacinacao/vacinas/index.html#9>
- Gómez, C. E., Perdiguero, B., Garcia-Arriaza, J., & Esteban, M. (2012). Poxvirus vectors as HIV/AIDS vaccines in humans. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(9), 1192–207. <https://doi.org/10.4161/hv.20778>
- Grande-Perez, A., Lazaro, E., Lowenstein, P., Domingo, E., & Manrubia, S. C. (2005). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (102), 4448–4452.
- Gutierrez, C., Serrano-Villar, S., Madrid-Elena, N., Perez-Elias, M., Martin, M., Barbas, C., ... Moreno, S. (2016). Bryostatín-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS*, 30(9), 1385–1392.
- Hammer, S. M., Katzenstein, D. A., Hughes, M. D., Gundacker, H., Schooley, R. T., Haubrich, R. H., ... Merigan, T. C. (1996). A Trial Comparing Nucleoside

- Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. *New England Journal of Medicine*, 335(15), 1081–1090. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610103351501>
- Haynes, B. F., Gilbert, P. B., McElrath, M. J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G. D., Alam, S. M., ... Kim, J. H. (2012). Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine*, 366(14), 1275–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1113425>
- Henrich, T., Hanhauser, E., Marty, F., Sirignano, M., Keating, S., Lee, T., ... DR, K. (2014). Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after Allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases. *Ann Intern Med*.
- Henrich, T., Hu, Z., Li, J., Sciaranghella, G., Busch, M., Keating, S., ... Kuritzkes, D. (2013). Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis*, 207(11), 1694–1702.
- Ho, D. D. (1995). Time to hit HIV, early and hard. *The New England Journal of Medicine*, 333(7), 450–451. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508173330710>
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and cd4 lymphocytes in hiv-1 infection. *Nature*, (373), 123–126.
- Hoffmann, C., & Rockstroh, J. K. (2015). *Hiv 2015/16*.
- Huber-Ruano, I., & Pastor-Anglada, M. (2009). Transport of nucleoside analogs across the plasma membrane: A clue to understanding drug-induced cytotoxicity. *Curr. Drug Metab.*, (10), 347–358.
- Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, X. I. (2011). ViralZone. Retrieved from https://viralzone.expasy.org/7?outline=all_by_species
- Hutter, G. (2014). More on shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 delta32/delta32 mutation. *N Engl J Med* 3, 71(25), 2437–2438.
- Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., ... Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7), 692–698.
- Iyidogan, P., & Anderson, K. S. (2014). Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses*, 6(10), 4095–4139. <https://doi.org/10.3390/v6104095>
- Iyidogan, P., & Anderson, K. S. (2014). Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses*, 6(10), 4095–4139.
- Jonckheere, H., Anne, J., & de Clercq, E. (2000). The hiv-1 reverse transcription (rt) process as target for rt inhibitors. *Med. Res. Rev.*, (20), 129–154.
- Jones, R. B., Mueller, S., O'Connor, R., Rimpel, K., Sloan, D. D., Karel, D., ... Walker,

- B. D. (2016). A Subset of Latency-Reversing Agents Expose HIV-Infected Resting CD4+ T-Cells to Recognition by Cytotoxic T-Lymphocytes. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005545.
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J. P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., ... Meyerhans, A. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in hiv patients. *Nature*, (418), 144.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., & Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 13, 552.
- Katlama C, Lambert-Niclot S, Assoumou L, Papagno L, Lecardonnel F, Zoorob R, Tambussi G, Clotet B, Youle M, Achenbach CJ, Murphy RL, Calvez V, Costagliola D, Autran B, E.-01 study t. (2016). Treatment intensification followed by interleukin-7 reactivates HIV without reducing total HIV DNA: a randomized trial. *AIDS*, 30(2), 221–230.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373.
- Knysz, B., Szetela, B., & Gładysz, A. (2007). Pathogenesis of HIV-1 infection - Chosen aspects. *HIV and AIDS Review*, 6(1), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S1730-1270\(10\)60035-5](https://doi.org/10.1016/S1730-1270(10)60035-5)
- Krieg, A. M. (2007). Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1184–1194. <https://doi.org/10.1172/JCI31414>
- Kuritzkes, D. (2016). Hematopoietic stem cell transplantation for HIV cure. *J Clin Invest*, 126(2), 432–437.
- Laird, G. M., Bullen, C. K., Rosenbloom, D. I. S., Martin, A. R., Hill, A. L., Durand, C. M., ... Siliciano, R. F. (2015). Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1901–1912. <https://doi.org/10.1172/JCI80142>
- Larrson, Marie; Bhardwaj, N. et al. (2001). Canarypox - an overview | ScienceDirect Topics. Retrieved April 4, 2018, from <https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/canarypox>
- Laubach, J. P., Moreau, P., San-Miguel, J. F., & Richardson, P. G. (2015). Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 21(21), 4767 LP-4773.
- Lavens, D., Peelman, F., van der Heyden, J., Uyttendaele, I., Catteeuw, D., Verhee, A., ... Clayton, R. (2010). Definition of the interacting interfaces of apobec3g and hiv-1 vif using mappit mutagenesis analysis. *Nucleic Acids Res.*, (38), 1902–1912.

- Lehrman, G., Hogue, I., Palmer, S., Jennings, C., Spina, C., Wiegand, A., ... Margolis, D. (2005). Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet HIV*, 366(9485), 549–555.
- Leth, S., Schleimann, M. H., Nissen, S. K., Højten, J. F., Olesen, R., Graversen, M. E., ... Søgaaard, O. S. (2016). Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *The Lancet HIV*, 3(10), e463–e472. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)30055-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)30055-8)
- Lévy, Y., Sereti, I., Tambussi, G., Routy, J. P., Lelièvre, J. D., Delfraissy, J. F., ... Lederman, M. M. (2012). Effects of Recombinant Human Interleukin 7 on T-Cell Recovery and Thymic Output in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: Results of a Phase I/IIa Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases*, 55(2), 291–300.
- Liu, Y., & Zeng, G. (2012). Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother*, 35(4), 299–308.
- Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D., & Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of hiv with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (96), 1492–1497.
- Loeb, L. A., & Mullins, J. I. (2000). Lethal mutagenesis of hiv by mutagenic ribonucleoside analogs. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, (16), 1–3.
- Lynch, R. M., Boritz, E., Coates, E. E., DeZure, A., Madden, P., Costner, P., ... Ledgerwood, J. E. (2015). Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Science Translational Medicine*, 7(319), 319ra206 LP-319ra206.
- Malim, M. H., & Emerman, M. (2008). Hiv-1 accessory proteins—Ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*, (3), 388–398.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist*, 12(10), 1247–1252. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247>
- Mansky, L. M. (1998). Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J. Gen. Virol.*, 79(6), 1337–1345.
- Mansky, L. M. (2002). Hiv mutagenesis and the evolution of antiretroviral drug resistance. *Drug Resist. Updates*, (5), 219–223.
- Mansky, L. M., & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.*, (69), 5087–5094.

- Matalon, S., Palmer, B., Nold, M., Furlan, A., Kassu, A., Fossati, G., ... Dinarello, C. (2010). The histone deacetylase inhibitor ITF2357 decreases surface CXCR4 and CCR5 expression on CD4(+) T-cells and monocytes and is superior to valproic acid for latent HIV-1 expression in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 54(1), 1–9.
- McMichael, A. J. (2006). HIV vaccines. *Annual Review of Immunology*, 24, 227–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090605>
- Meffre, E., Milili, M., Blanco-Betancourt, C., Antunes, H., Nussenzweig, M. C., & Schiff, C. (2001). Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 879–886. <https://doi.org/10.1172/JCI13051>
- Menendez-Arias, L. (2002). Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, (71), 91–147.
- Mothe, B., & Brander, C. (2018). HIV T-cell vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1075, 31–51. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0484-2_2
- Mulder, L. C., Harari, A., & Simon, V. (2008). Cytidine deamination induced hiv-1 drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (105), 5501–5506.
- Mullins, J. I., & Jensen, M. A. (2006). Evolutionary dynamics of hiv-1 and the control of aids. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, (299), 171–192.
- Nora, T., Charpentier, C., Tenaillon, O., Hoede, C., Clavel, F., & Hance, A. J. (2007). Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J. Virol.*, (81), 7620–7628.
- Offersen, R., Nissen, S. K., Rasmussen, T. A., Østergaard, L., Denton, P. W., Søgaaard, O. S., & Tolstrup, M. (2016). A Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist, MGN1703, Enhances HIV-1 Transcription and NK Cell-Mediated Inhibition of HIV-1-Infected Autologous CD4⁺ T Cells. *Journal of Virology*, 90(9), 4441 LP-4453.
- Pallikkuth, S., Sharkey, M., Babic, D. Z., Gupta, S., Stone, G. W., Fischl, M. A., ... Pahwa, S. (2016). Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 90(6), 2718 LP-2728.
- Perales, C., Iranzo, J., Manrubia, S. C., & Domingo, E. (2012). The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics. *Trends Microbiol.*, (20), 595–603.
- Plimack, E. R., Tan, T., Wong, Y.-N., von Mehren, M. M., Malizzia, L., Roethke, S. K., ... Haas, N. B. (2014). A Phase I Study of Temsirolimus and Bryostatins in Patients

- With Metastatic Renal Cell Carcinoma and Soft Tissue Sarcoma. *The Oncologist*, 19(4), 354–355. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0020>
- Plotkin, S. A. (2013). Vaccine Fact Book. *PhRMA*, 4–5.
- Porichis, F., Kwon, D. S., Zupkosky, J., Tighe, D. P., McMullen, A., Brockman, M. A., ... Kaufmann, D. E. (2011). Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood*, 118(4), 965 LP-974.
- Postow, M. A., Chesney, J., Pavlick, A. C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., ... Hodi, F. S. (2015). Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 2006–2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414428>
- Ramsdell, J., Pettit, G., & AH, J. T. (1986). Three activators of protein kinase C, bryostatins, diolins, and phorbol esters, show differing specificities of action on GH4 pituitary cells. *J Biol Chem*, 261(36), 17073–17080.
- Rasmussen, T. A., Tolstrup, M., Brinkmann, C. R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., ... Sogaard, O. S. (2014). Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *The Lancet HIV*, 1(1), e13–e21. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(14\)70014-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(14)70014-1)
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., ... Kim, J. H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine*, 361(23), 2209–2220. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908492>
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Excler JL, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Prensri N, Kunasol P, Karasavvas N, Schuetz A, Nguay V, Sinangil F, Dawson P, DeCamp A, Gurunathan S, Tartaglia J, DiazGranados C, Ratto-Kim S, Pegu P, Eller M, Karnasuta C, Montefiori, G. R. (2017). Randomized, double blind evaluation of late boost strategies for HIV-uninfected vaccine recipients in the RV144 HIV vaccine efficacy trial. *J Infect Dis*, 215(8), 1255–1263.
- Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., ... Ascierto, P. A. (2014). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *New England Journal of Medicine*, 372(4), 320–330. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>
- Rockstroh, J. K., & Hoffmann, C. (2015). *Hiv 2015/2016. Medizin Fokus Verlag*. Retrieved from www.hivbook.com
- Routy, J. P., Tremblay, C. L., Angel, J. B., Trottier, B., Rouleau, D., Baril, J. G., ... Boulassel, M. R. (2012). Valproic acid in association with highly active antiretroviral therapy for reducing systemic HIV-1 reservoirs: results from a multicentre

- randomized clinical study. *HIV Medicine*, 13(5), 291–296.
<https://doi.org/doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00975.x>
- Rouzine, I. M., Brunet, E., & Wilke, C. O. (2008). The traveling-wave approach to asexual evolution: Muller's ratchet and speed of adaptation. *Theor. Popul. Biol.*, (73), 24–46.
- Scheller, C., Ullrich, A., McPherson, K., Hefele, B., Knoferle, J., Lamla, S., ... Dittmer, U. (2004). CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem*, 279(21), 21897–21902.
- Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2016). Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*, 44(5), 955–972.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.002>
- Sereti, I., Dunham, R. M., Spritzler, J., Aga, E., Proschan, M. A., Medvik, K., ... Lederman, M. M. (2009). IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood*, 113(25), 6304 LP-6314.
- Shang, H., Ding, J., Yu, S., Wu, T., Zhang, Q., & Liang, F. (2015). Progress and challenges in the use of latent HIV-1 reactivating agents. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36, 908.
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Sierra, S., Kupfer, B., & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.004>
- Siliciano, J. D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J. B., ... Siliciano, R. F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine*, 9(6), 727–728.
<https://doi.org/10.1038/nm880>
- Sodora, D. L., Allan, J. S., Apetrei, C., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Else, J. G., ... Silvestri, G. (2009). Toward an AIDS vaccine: Lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2013>
- Søgaard, O. S., Graversen, M. E., Leth, S., Olesen, R., Brinkmann, C. R., Nissen, S. K., ... Tolstrup, M. (2015). The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathogens*, 11(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005142>
- Spivak, A. M., Andrade, A., Eisele, E., Hoh, R., Bacchetti, P., Bumpus, N. N., ... Deeks, S. G. (2014). A Pilot Study Assessing the Safety and Latency-Reversing Activity of Disulfiram in HIV-1–Infected Adults on Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 58(6), 883–890.
- Suen, W., Spiro, T. G., Sowers, L. C., & Fresco, J. R. (1999). Identification by uv

- resonance raman spectroscopy of an imino tautomer of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine, a powerful base analog transition mutagen with a much higher unfavored tautomer frequency than that of. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (96), 4500–4505.
- Sugarman, J., Lewin, S., Henrich, T., & Rasmussen, T. (2016). Ethics of ART interruption after stem- cell transplantation. *Lancet HIV*, 3(1), e8–e10.
- Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., ... Tokunaga, K. (2015). March8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3956>
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., ... Sekaly, R.-P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, 12, 1198.
- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 1–32. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354>
- UNAIDS. (2016). AIDS by the numbers. Retrieved from http://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/publication/UNAIDS_AIDS_by_the_numbers_2016.pdf
- Vella, S., & Palmisano, L. (2005). The global status of resistance to antiretroviral drugs. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 4(Supplement 4), S239-46. <https://doi.org/10.1086/430784>
- Velu, V., Titanji, K., Zhu, B., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L., ... Amara, R. R. (2008). Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*, 458, 206.
- Vibholm, L. (2017). Short-course TLR9 agonist treatment impacts innate immunity and plasma Viremia in individuals with HIV infection. *Clin Infect Dis in Press*.
- Wang, H.-B., Mo, Q.-H., & Yang, Z. (2015). HIV Vaccine Research: The Challenge and the Way Forward. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/503978>
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., & Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science*, 301(5638), 1374 LP-1377.
- Wei, D. G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., ... Cihlar, T. (2014). Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLOS Pathogens*, 10(4), e1004071.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., ... Hahn, B. H. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.

- Nature*, (373), 117–122.
- Whitney, J., Lim, S., Osuna, C., Sanisetty, S., Barnes, T., Cihlar, T., ... Hesselgesser, J. (2016). *Repeated TLR7 agonist treatment of SIV+ monkeys on ART can lead to viral remission*.
- Wightman, F., Solomon, A., Kumar, S., Urriola, N., Gallagher, K., Hiener, B., ... Lewin, S. (2015). Effect of ipilimumab on the HIV reservoir in an HIV-infected individual with metastatic melanoma. *AIDS*, 29(4), 504–506.
- Xu, L., Pegu, A., Rao, E., Doria-Rose, N., Beninga, J., McKee, K., ... Nabel, G. J. (2017). Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science*, eaan8630. <https://doi.org/10.1126/science.aan8630>
- Yang, H.-C., Xing, S., Shan, L., O'Connell, K., Dinoso, J., Shen, A., ... Siliciano, R. F. (2009). Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(11), 3473–3486. <https://doi.org/10.1172/JCI39199>
- Yukl, S., Boritz, E., Busch, M., Bentsen, C., Chun, T., Douek, D., ... SG, D. (2013). Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative inter- ventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog*, 9(5), e1003347.
- Zhang, J. (2004). Host RNA polymerase II makes minimal contributions to retroviral frame-shift mutations. *J. Gen. Virol.*, (85), 2389–2395.
- Zhang, J., Tang, L. Y., Li, T.; Ma, Y., & Sapp, C. M. (2000). Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J. Virol.*, (74), 2313–2322.
- Zhang, L., & Lewin, S. R. (2018). *HIV Vaccines and Cure: The Path Towards Finding an Effective Cure and Vaccine*. (L. Zhang & S. R. Lewin, Eds.) (First). Springer.
- Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., ... Dougherty, J. P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: Rate, fidelity, and putative hot spots. *J. Virol.*, (76), 11273–11282.