

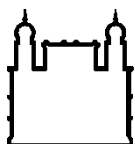
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

IMUNOMODULAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELA  
HEMAGLUTININA DO VÍRUS INFLUENZA

NATALIA FINTELMAN RODRIGUES

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*NATALIA FINTELMAN RODRIGUES*

Imunomodulação da replicação do HIV-1 pela hemaglutinina do vírus Influenza

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Ciências pela pós graduação em Biologia  
Celular e Molecular.

**Orientador :** Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2017

Rodrigues, Natalia Fintelman.

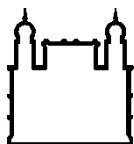
Imunomodulação da replicação do HIV-1 pela Hemaglutinina do vírus Influenza / Natalia Fintelman Rodrigues. - , 2017.  
91 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Thiago Moreno Lopes e Souza.

Bibliografia: f. 65-74

1. HIV-1. 2. Hemaglutinina. 3. Influenza. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTORA: NATALIA FINTELMAN RODRIGUES***

### **IMUNOMODULAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELA HEMAGLUTININA DO VÍRUS INFLUENZA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib - Presidente (IOC)**

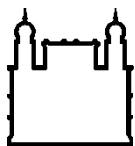
**Prof. Dr. Renato Santana de Aguiar (UFRJ)**

**Prof. Dr. José Nelson Dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)**

**Prof. Dra. Milene Dias Miranda (Revisor/Suplente - IOC)**

**Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro (Suplente-CDTS)**

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Ao meu anjinho que mesmo  
antes de chegar ao mundo já me  
enche de alegrias e preocupações.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr Thiago Moreno que acreditou em mim e me convenceu a iniciar o doutorado mesmo com todos meus traumas da pós graduação. Pela enorme paciência e por me obrigar a sair da minha "zona de conforto".

Ao grupo de alunos do Thiago que são a família Fio. À Carol e Andressa por estarem comigo desde o princípio de tudo, aprendendo e sofrendo juntas. Obrigada Carol por entender meus desabafos e desesperos no zap, por compartilhar as sofrências de pegar ônibus na Av. Brasil, além das horas extras no Lab. Ao André (Sr Orelha) por toda a paciência, porque sem ele não sei o que seria dos meus westerns. À Carol Freitas, Natasha e Mayara por todos os momentos divertidos e por todos os repiques de células. À Milene, que nunca deixará de fazer parte do grupo de alunas mesmo já tendo crescido.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia pelo acolhimento e ao LVRS pelo início da minha vida científica na Fiocruz.

Ao meu marido que sempre me apoiou incondicionalmente. Mesmo não sendo da área nunca reclamou de ouvir repetidamente minhas apresentações desde a seleção de doutorado até a defesa da Tese. À minha família emprestada por todo o apoio nos momentos difíceis.

À minha Mãe e ao meu Pai que sempre me apoiaram e acreditaram que a melhor herança que podemos deixar para nossos filhos é a educação/conhecimento.

À Rafa que sempre me apoiou e acredita em mim, mesmo sendo a irmã caçula. A Luana que me ajudou nos momentos de fuga da vida científica para descontraír.

À Mione e ao Miguel que fazem a palavra casa significar Lar.

À banca por ter aceitado o convite de avaliar o meu trabalho.

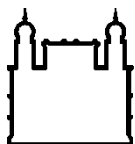
À Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade de crescimento.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“São as nossas escolhas que mostram o que realmente somos,  
muito mais do que nossas habilidades.”

J.K. Rowling





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

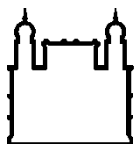
### **IMUNOMODULAÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELA HEMAGLUTININA DO VÍRUS INFLUENZA**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Natalia Fintelman Rodrigues**

Diversos agentes infecciosos de etiologia viral vêm afetando as populações durante séculos. A grande dispersão dos vírus HIV-1 por todo o mundo possibilita inúmeras coinfeções clínicas com outros patógenos, como por exemplo, o vírus Influenza, principalmente por sua distribuição geográfica ao longo do globo e por ser responsável por epidemias sazonais. A infecção pelo HIV-1 leva a uma ativação crônica do sistema imune, gerando uma resposta policlonal, reduzindo a chance de resposta específica contra infecções oportunistas, além de gerar um estado de imunocomprometimento nos pacientes. Surpreendentemente, na pandemia de 2009, causada pelo vírus influenza A(H1N1)pdm09, diversos trabalhos na literatura descreveram que o desfecho clínico dos pacientes portadores do HIV em relação ao vírus influenza foi muito semelhante ao observado em indivíduos na população em geral. Nesse mesmo contexto, após a pandemia do Influenza, um estudo analisando o esquema de vacinação contra influenza de indivíduos HIV-1 demonstrou que após a vacinação os participantes mantiveram ou reduziram a carga viral. Fato curioso, já que a vacinação de indivíduos portadores do HIV pode promover uma ativação do sistema imune e conseqüentemente aumento da replicação viral. É possível que durante a coinfeção HIV-1/influenza tanto sinais positivos quanto negativos para a replicação de ambos os vírus possam existir, portanto durante a coinfeção um novo equilíbrio deve ser imposto ao hospedeiro. Sendo assim, visamos investigar o potencial inibitório do vírus influenza, ou da hemaglutinina (HA), principal componente da vacina antiinfluenza, sobre a replicação do HIV-1. Nossos resultados mostraram que o tratamento com HA em diferentes tipos celulares, como macrófagos e PBMCs, de doadores saudáveis, leva a inibição da replicação do HIV-1. Em adição, a exposição a HA também promove o aumento dos níveis de IL-10, uma citocina regulatória, assim como de APOBEC3G, um importante fator de restrição celular. Além disso, corroborando o dado anterior, o bloqueio do receptor para IL-10 preveniu o efeito inibitório da replicação do HIV-1 pela HA. Sendo assim, nossos dados mostram a participação da IL-10 e do APOBEC3G nessa modulação da replicação do HIV-1 pela HA.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **IMMUNOMODULATION OF HIV-1 REPLICATION BY INFLUENZA HEMAGGLUTININ**

#### **ABSTRACT**

#### **PHD THESIS IN IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Natalia Fintelman Rodrigues**

Several viral agents have been affecting populations for centuries. The worldwide dispersion of HIV-1 viruses allows for numerous clinical co-infections with other pathogens, such as Influenza virus, mainly due to its geographical distribution across the globe and for being responsible for seasonal epidemics. HIV-1 infection leads to a chronic activation of the immune system, generating a polyclonal response, reducing the chance of specific response against opportunistic infections, and also promote immunocompromised status of the patients. Surprisingly, in the 2009 Influenza pandemic, the literature have described that the A (H1N1)pdm09 clinical outcome of HIV patients was very similar to that observed in individuals of general population. In the same context, after Influenza pandemic wave, a study analyzing the influenza vaccination schedule of HIV individuals demonstrated that after influenza vaccination the HIV viral load was maintained or reduced. Curiously, HIV individuals vaccination can promote an immune system activation and consequently increase viral replication. It is possible that during HIV-1/influenza coinfection, positive and negative replication signals of both viruses may exist, therefore a new equilibrium should be imposed on the host. Thus, we decided to investigate the HIV-1 inhibition, *in vitro*, by Influenza virus, as well as HA, the main component of the anti-influenza vaccine. Our results showed that HA treatment of different cell types, such as macrophages and PBMCs, leads to inhibition of HIV-1 replication. . In addition, HA exposure also promotes increased levels of IL-10, a regulatory cytokine, as well as APOBEC3G, an important cell restriction factor. Furthermore, corroborating the above data, blocking IL-10 receptor prevented the inhibitory effect of HIV-1 replication by HA. Thus, our data show the participation of IL-10 and APOBEC3G in this HA modulation of HIV-1 replication.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 O vírus da imunodeficiência humana (HIV)	1
1.1.1 Caracterização viral	1
1.1.2 Classificação filogenética	3
1.1.3 Epidemiologia	4
1.1.4 O ciclo replicativo do HIV	7
1.1.5 Fisiopatologia da infecção pelo HIV-1	9
1.1.6 Estratégias de controle da infecção pelo HIV-1	13
1.2 O vírus Influenza	21
1.2.1 Caracterização viral	21
1.2.2 Epidemiologia	25
1.2.3 Ciclo replicativo	27
1.2.4 Hemaglutinina	28
1.2.5 Fisiopatologia da infecção	30
1.2.6 Estratégias de controle da infecção por Influenza	31
1.3 Co-infecção HIV-1/Influenza	33
1.3.1 Vacinação contra Influenza em pacientes HIV-1 positivos	34
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>OUTRAS PRODUÇÕES DURANTE O DOUTORADO</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Esquema representativo do vírus HIV-1.....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2 - Classificação do HIV.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3 - Resumo global da epidemia de Aids no ano de 2016.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4 - Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde referente a taxa de detecção do HIV-1 nas diferentes regiões do país.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 5 - Esquema do projeto implementado na 20° Conferência Internacional de AIDS, a fim de finalizar a epidemia de Aids no mundo.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 6 – Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 7 - Curso natural da infecção pelo HIV-1.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 8 - Esquema representativo da porcentagem de pessoas em terapia antiretroviral no país.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 9 - Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1 e os pontos de controle da replicação pela terapia antirretroviral.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 10 - Esquema representativo da estratégia "Shock and Kill" .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 11 – Ação antiviral do APOBEC3G na ausência e presença de Vif.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 12 - Esquema representativo do vírus Influenza.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 13 - As diferentes hemaglutininas e neuraminidasas existentes na natureza.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 14 : Comparação do genoma do vírus influenza H1N1 sazonal com a cepa pandêmica de 2009, mostrando os rearranjos gênicos entre quatro linhagens distintas.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 15 : Perfil da circulação das cepas dos vírus influenza no Brasil, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 40 de 2017.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 16 - Esquema representativo do ciclo replicativo do vírus Influenza.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 17 - Esquema representativo dos diferentes padrões de glicosilação da HA ao longo do tempo .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 18 - Representação da carga viral dos pacientes HIV pré e pós vacinação contra influenza.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 19 - Efeito da exposição ao A(H1N1)pdm09 sobre a replicação do HIV-1 em cultura de MDM.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 20 - A exposição de culturas de MDM à HA em duas condições diferentes de tratamento inibe a replicação do HIV-1.....</b>	<b>46</b>

<b>Figura 21 - A replicação de HIV-1 é inibida pela exposição aos diferentes subtipos de HA.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 22 - A HA inibe a replicação do HIV-1 em cultura de PBMC.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 23 - Ensaio de dosagem de diferentes citocinas em macrófagos (A) e PBMCs (B) tratados com HA por 24 horas .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 24 - Ensaio de cinética enzimática para dosagem de citocinas em PBMCs tratados com HA.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 25 - Tratamento com HA poderia ativar a região LTR do HIV-1 em células TZM-bl.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 26: Tratamento com HA não ativa a região LTR do HIV-1 no modelo de células J-lat.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 27: A HA aumenta os níveis do APOBEC3G de maneira dependente do receptor para IL-10.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 28: Esquema representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento do projeto e sua consequente conclusão.....</b>	<b>62</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Os nove genes que formam o genoma do HIV e suas funções.....</b>	<b>3</b>
<b>Tabela 2 - Análise dos indivíduos HIV positivos vacinados contra influenza.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3 - Análise da carga viral dos indivíduos HIV vacinados contra influenza.....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Do inglês “acquired immunodeficiency syndrome”, Síndrome da imunodeficiência adquirida
APOBEC3G	Do inglês “apolipoprotein mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like”
AZT	Zidovudina
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CRF	Forma recombinante circulante
CTL	Células T CD8+ citotóxicas
CV	Carga viral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Env	Gene do envelope
FDA	Do inglês “Food and Drug Administration”
Gag	Gene dos antígenos grupo específicos
GFP	Do inglês “green fluorescent protein”
HA	Hemaglutinina
HAART	Do inglês “Highly active antiretroviral therapy”, Terapia antiretroviral altamente ativa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
INI	Instituto Nacional de Infectologia
LNTPs	Do inglês “long term nonprogressors”, Progressores de longo termo
LPS	Lipopolissacarídeo
IFITM3	Do inglês “interferon induced transmembrane protein 3”
LTR	Repetições longas terminais
MDCK	Do inglês “Madin-Darby Canine Kidney Cells”
MDM	Macrófago derivado de monócitos
MX2	Do inglês “myxovirus resistance 2”
NA	Neuraminidase
Nef	Gene do fator negativo
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NP	Nucleoproteína viral
PBMC	Do inglês “Peripheral blood mononuclear cell”



PBS	Tampão fosfato salina
PEP	Profilaxia pós exposição
Pol	Gene da polymerase
PR	Protease
PrEP	Profilaxia pré-exposição
Rev	Gene regulador da transcrição viral
RF	Forma recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNP	Ribonucleoproteína
SAMHD1	Do inglês “SAM domain and HD domain-containing protein 1”
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
Tat	Gene do transativador transcripcional
TLR4	Do inglês “Toll-likeceptir 4”, Receptor tipo toll 4
TR	Transcriptase reversa
Trim-5 $\alpha$	Do inglês, “Tripartite motif-containing protein 5”
UNAIDS	Do inglês, “Joint United Nations Programme on HIV/AIDS”
URF	Forma recombinante única
Vif	Gene do fator de infectividade viral
Vpu	Gene da proteína viral u
Vpr	Gene da proteína viral r

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)

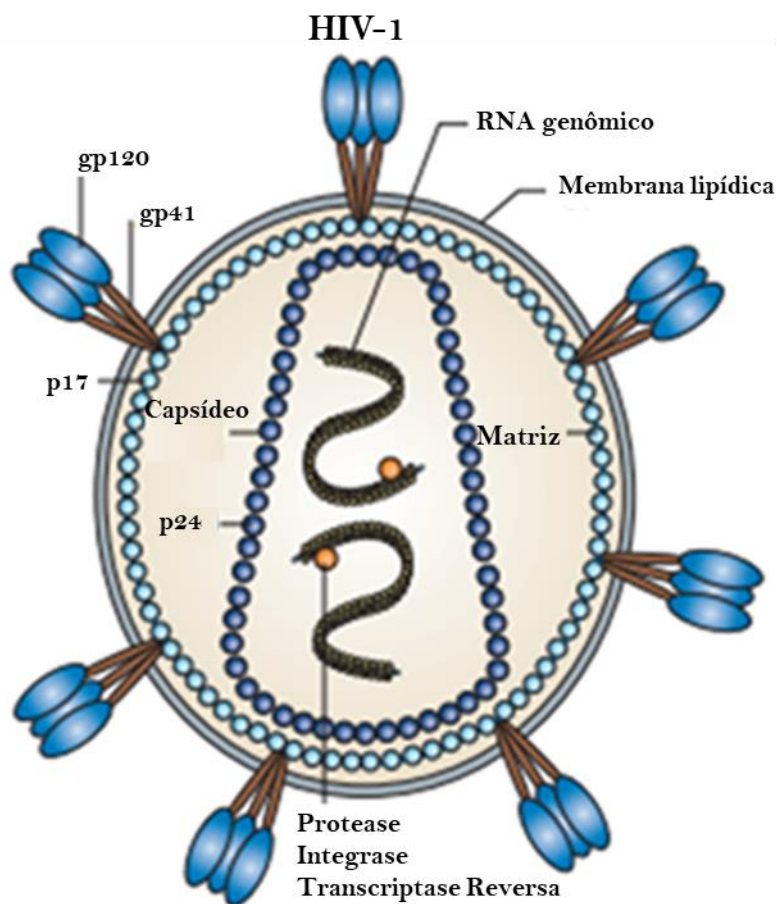
### 1.1.1 Caracterização viral

A síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) foi identificada primeiramente, em 1981, nos Estados Unidos, em um grupo de homossexuais masculinos que apresentavam sintomas de pneumonia causada por um fungo oportunista raro (*Pneumocystis jirovecii*) conhecido por infectar pacientes imunocomprometidos (1). Em 1983, o vírus suspeito de causar a infecção foi identificado independentemente por dois grupos de pesquisa, Gallo defendia que se tratava de um novo isolado do vírus T-linfotrópico humano enquanto o grupo de Montaigner associou o vírus a linfadenopatia (2, 3). Somente em 1986, o *International Committee on the Taxonomy of Viruses*, modificou a nomenclatura para vírus da imunodeficiência adquirida (4).

No Brasil, o primeiro caso de Aids notificado retrospectivamente, ocorreu na cidade de São Paulo, em 1980 (5). Em 1987, o vírus foi isolado pela primeira vez na América Latina, por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, a partir da amostra biológica de um paciente infectado por transfusão sanguínea (6).

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) pertence ao gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e é o agente etiológico da Aids, caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e manifestações neurológicas (7).

O HIV-1 é constituído externamente por um envelope lipoglicoprotéico derivado da célula do hospedeiro e as glicoproteínas gp120 e gp41, provindas do precursor gp160. Essas glicoproteínas tem grande importância na infecção viral, pois são responsáveis pela adsorção viral à célula hospedeira. Internamente, o vírus apresenta uma matriz proteica formada pela proteína p17 e o capsídeo viral composto pela proteína p24. Encontram-se dentro do capsídeo o genoma viral que consiste de duas fitas simples de RNA associadas a três enzimas virais, denominadas transcriptase reversa (TR), integrase e protease (PR) (**Figura 1**).



**Figura 1: Esquema representativo do vírus HIV-1.** As glicoproteínas de membrana gp120 e gp41 encontram-se inseridas no envelope lipídico. O capsídeo, formado pela proteína p24, engloba o material genômico composto por 2 fitas de simples de RNA e as enzimas virais. Adaptado de Karlsson Hedestam *et al.*, 2008 (8).

O genoma do HIV-1 é constituído por nove genes que podem ser divididos em 2 grupos: os que codificam proteínas estruturais: gag e env; polimerase, e as que codificam proteínas acessórias: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu e Vpr (**Tabela 1**). Além desses genes, estão presentes as repetições terminais longas (LTRs), responsáveis pelos sinais de início e término da transcrição das proteínas do HIV, sendo importantes também na transcrição reversa e integração viral (9).

**Tabela 1: Os nove genes que formam o genoma do HIV e suas funções.**

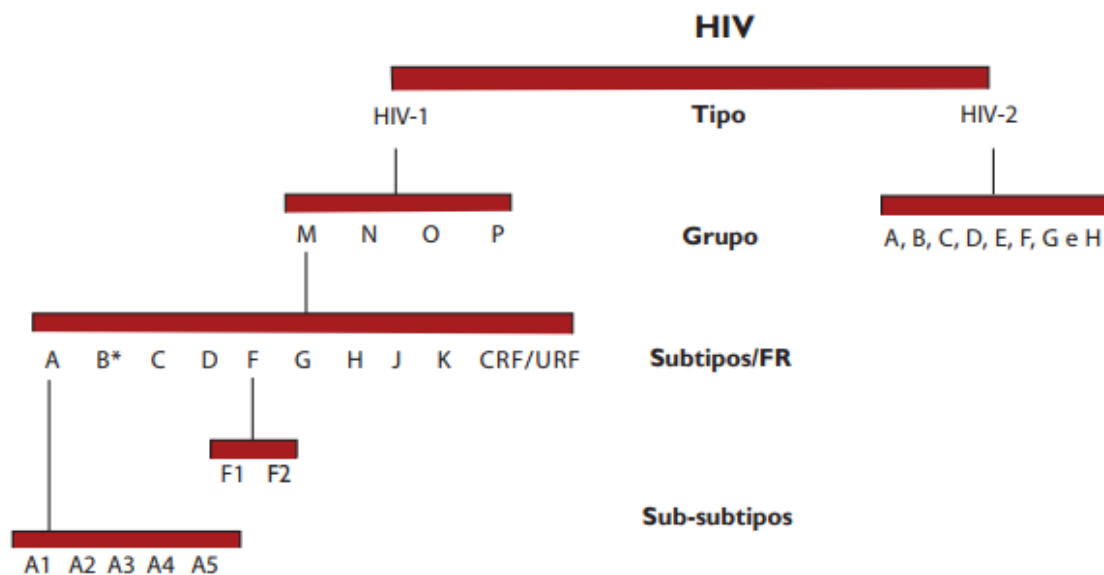
<b>Gene</b>	<b>Função</b>
<b>Gag</b>	Codifica proteína de 55 kd que após processamento pela PR origina a proteína da matriz (p17), capsídeos (p24) e nucleocapsídeo (p7)
<b>Pol</b>	Codifica as enzimas virais, protease, transcriptase reversa e integrase.
<b>Env</b>	Codifica as proteínas externas do envelope viral. Apresenta maior variabilidade genética, muitas das quais auxiliam no escape a resposta imune do hospedeiro
<b>Tat</b>	Regula a transcrição da região LTR. É uma das primeiras proteínas a ser sintetizada.
<b>Rev</b>	Facilita o transporte do RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma
<b>Nef</b>	Ativação de infócitos T, além de promover redução da expressão de CD4 na superfície celular
<b>Vif</b>	Envolvido na maturação viral, além de interromper a atividade antiviral da proteína humana APOBEC3G por degradação proteossômica
<b>Vpu</b>	Liberação dos vírions por brotamento e promove a degradação da molécula CD4
<b>Vpr</b>	Induz a degradação via proteossoma de várias proteínas celulares e reativação do HIV-1 latente.

### 1.1.2 Classificação filogenética

A classificação do HIV é feita por meio da análise filogenética de sequências de nucleotídeos dos vírus. A classificação atual consiste na divisão em tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes (**Figura 2**). O HIV-1 e o HIV-2 são tipos distintos do vírus, mais distantes filogeneticamente. O HIV-2 é restrito a algumas regiões da África e raros casos ocorrem em outros continentes, enquanto o HIV-1 é o responsável pela pandemia (10).

O HIV-1 é subdividido em quatro grupos: M (*major*), O (*outlier*), N (*non-M/non-O*) e P (*new group*). Na maioria das infecções os vírus pertencem ao grupo M, o qual é diferenciado em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F, por sua vez, são subdivididos em A1, A2, A3, A4 e A5, e em F1 e F2, respectivamente (11). Em pacientes portadores de infecção mista, ou seja infectados por dois ou mais subtipos virais diferentes, pode ocorrer a recombinação do material genético dos vírus e conseqüentemente originar formas recombinantes (RF) (12). Caso a transmissão de uma RF tenha sido documentada em mais de três indivíduos não relacionados epidemiologicamente, passa a ser denominada como CRF (forma recombinante circulante). No caso das RF identificadas, mas cujas transmissões são desconhecidas, são definidas como URF (forma recombinante única) (12). A variação

genética do HIV tem implicações na biologia e transmissão do vírus, na progressão da infecção, no desenvolvimento de resistência, na evolução clínica e no diagnóstico.



**Figura 2: Classificação do HIV.** A análise filogenética permite a classificação dos vírus HIV em tipos, grupos, subtipos e sub-subtipos. Adaptado de Ministério da Saúde (Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV) (13).

Na epidemia de HIV no Brasil prevalece o subtipo B do HIV-1, entretanto observa-se a presença de outros subtipos como F1 e C, de acordo com a região do país (14).

### 1.1.3 Epidemiologia

Atualmente, a UNAIDS estima que mais de 35 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus HIV-1 em todo o mundo (15). Mais de três décadas após o aparecimento dos primeiros casos de Aids o número de indivíduos infectados pelo vírus alcançou proporções pandêmicas (**Figura 3**).

## Resumo global da epidemia de AIDS | 2016

<b>Número de pessoas vivendo com HIV</b>	Total	36.7 milhões [30.8 milhões–42.9 milhões]
	Adultos	34.5 milhões [28.8 milhões–40.2 milhões]
	Mulheres (15+ anos)	17.8 milhões [15.4 milhões–20.3 milhões]
	Crianças (<15 anos)	2.1 milhões [1.7 milhão–2.6 milhões]

---

<b>Número de novas infecções por HIV em 2016</b>	Total	1.8 milhão [1.6 milhão–2.1 milhões]
	Adultos	1.7 milhão [1.4 milhão–1.9 milhão]
	Crianças (<15 anos)	160 000 [100 000–220 000]

---

<b>Mortes relacionadas à AIDS em 2016</b>	Total	1.0 milhão [830 000–1.2 milhão]
	Adultos	890 000 [740 000–1.1 milhão]
	Crianças (<15 anos)	120 000 [79 000–160 000]

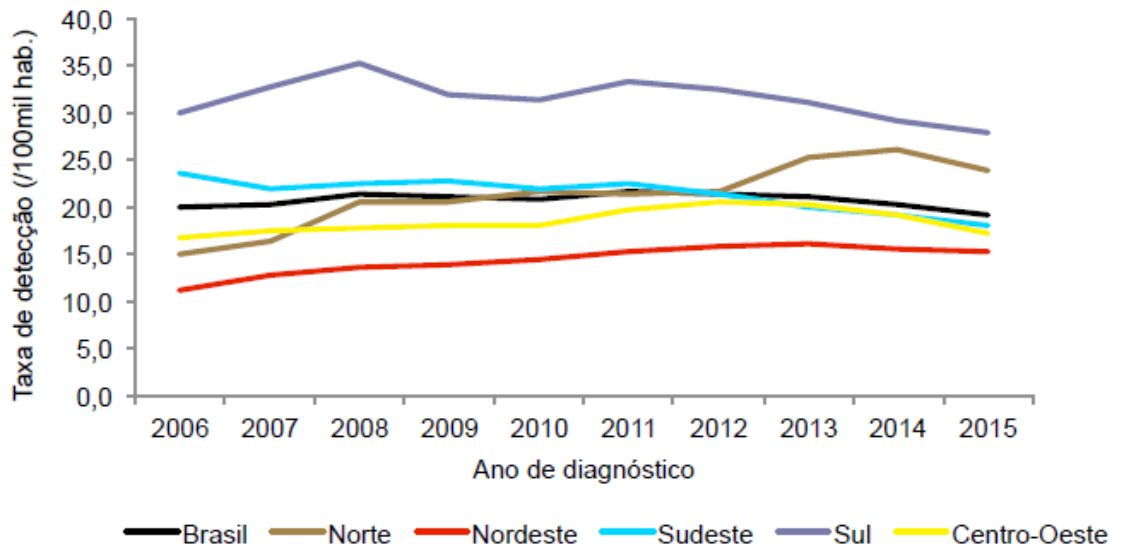


**Figura 3: Resumo global da epidemia de Aids no ano de 2016.** Adaptado de UNAIDS Brasil (15).

No Brasil, de acordo com a UNAIDS, em 2016 havia aproximadamente 830.000 pessoas vivendo com HIV, sendo 48.000 novas infecções somente naquele ano (15).

Nos últimos dez anos a taxa de detecção da infecção no Brasil apresentou estabilização com uma média de 20,7 casos para cada 100 mil habitantes. Entretanto os casos não se distribuem de forma homogênea entre as regiões. A distribuição dos casos identificados até 2016, de acordo com as diferentes regiões do país, mostra uma concentração nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo a 53% e 20,1%, respectivamente, seguidas das regiões Nordeste (15,1%), Centro-Oeste (6%) e Norte (5,9%) (**Figura 4**).

O coeficiente de mortalidade do país apresentou uma leve queda nos últimos dez anos e passou de 5,9 a 5,6 óbitos a cada 100 mil habitantes, entre 2006 e 2015. Essa tendência foi observada nas regiões Sudeste e Sul, enquanto as regiões Norte, Nordeste e Centro- Oeste apresentaram aumento do coeficiente (15).



**Figura 4: Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde referente a taxa de detecção do HIV-1 nas diferentes regiões do país.** Adaptado de Boletim Epidemiológico HIV/Aids, Secretaria de Vigilância em Saúde (16).

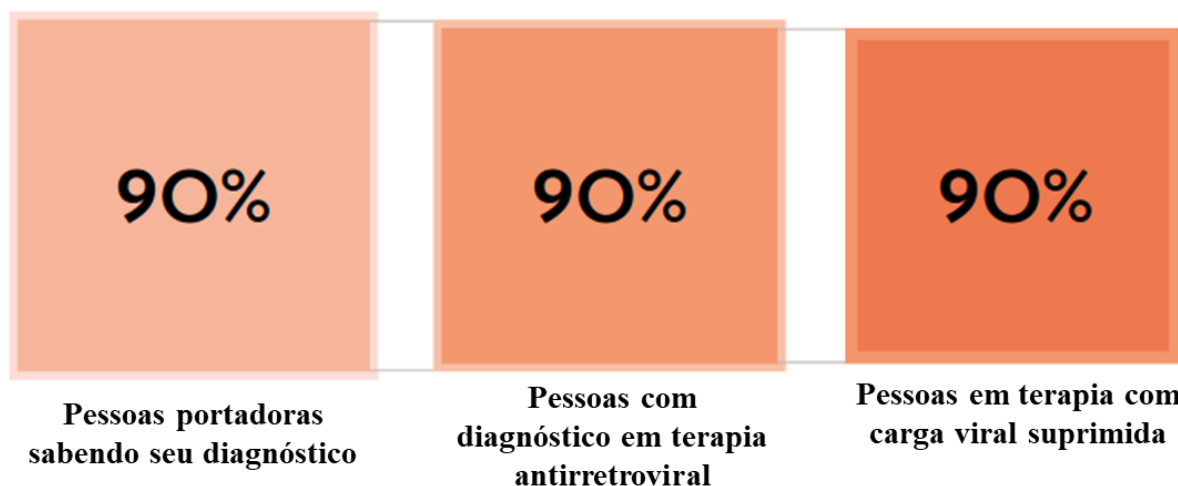
É importante salientar que no Brasil o tratamento de pacientes portadores de HIV é considerado referência devido à oferta dos antirretrovirais pelo SUS de forma gratuita (16).

O Brasil adotou em 2013 novas estratégias para frear a epidemia e ofereceu tratamento para todos os portadores de HIV-1 independente da contagem de células T CD4+. Uma ação importante para a saúde do paciente, e principalmente uma medida de saúde pública para controle da transmissão. Sendo assim, no Brasil, mais da metade (64%) das pessoas infectadas com o vírus recebe tratamento antirretroviral, este índice era maior que a média global (53%) em 2016 (15).

A introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), promoveu um aumento na expectativa de vida dos pacientes HIV, e conseqüentemente reduziu a mortalidade dos mesmos e como efeito indireto aumentou o número global de pessoas infectadas pelo HIV.

Em 2014, foi realizada a 20ª Conferência Internacional de Aids na Austrália, e nela foi sugerido que o pilar central para finalizar a epidemia de Aids seria atingir o alvo 90-90-90 (17). O objetivo é dar ênfase não somente na terapia antirretroviral, mas na supressão viral das pessoas que vivem com o vírus, porque assim protege os portadores das doenças relacionadas a Aids e principalmente reduz drasticamente o risco de transmissão viral. O projeto busca até

2020 que 90% das pessoas que vivem com HIV tenham o diagnóstico, que 90% das pessoas que saibam ser portadoras estejam em terapia antirretroviral e que 90% das pessoas que estejam em terapia apresentem supressão viral, ou seja, carga viral indetectável (**Figura 5**).



**Figura 5: Esquema do projeto implementado na 20ª Conferência Internacional de AIDS, a fim de finalizar a epidemia de Aids no mundo.** Adaptado de Global Aids update (17).

#### 1.1.4 O ciclo replicativo do HIV

O HIV-1 infecta diferentes células como linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas. O ciclo de replicação do HIV-1 é bastante complexo (**Figura 6**). Este se inicia pela interação da glicoproteína de superfície gp120 ao receptor CD4 na superfície celular, o que muda a conformação estrutural de gp120 e aumenta sua afinidade pelo coreceptor CCR5 ou CXCR4, formando um complexo. Posteriormente, mudanças conformacionais na glicoproteína transmembranar gp41 permitem que esta se insira na membrana celular e promova a fusão ao envelope viral (18). É essa fusão que permite o acesso do core viral ao citoplasma.

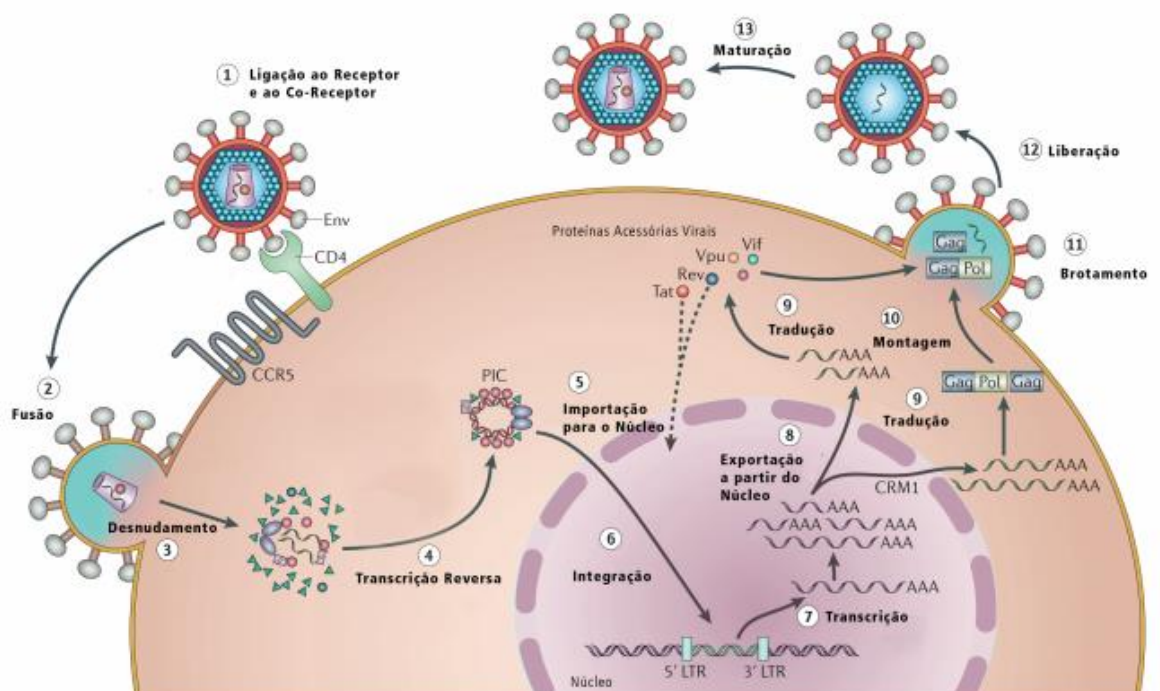
Após essa etapa ocorre o desnudamento viral, e liberação do genoma no citoplasma sendo este seguido pela transcrição reversa do RNA viral, pela ação da enzima transcriptase reversa (19). A transcrição reversa é a capacidade de converter os genomas de RNA em DNA dupla-fita, sendo esta uma das características que definem os retrovírus. Durante o processo de transcrição reversa, o DNA viral recém-formado fica associado ao complexo de transcrição



reversa. A transcrição reversa pode introduzir erros no genoma viral a cada ciclo de replicação, contribuindo para a alta diversidade genética do vírus (20).

O DNA viral é em seguida transportado para o núcleo, como parte do complexo de pré-integração composto por proteínas virais e celulares. No núcleo, o DNA será integrado ao genoma celular pela enzima integrase. Este DNA integrado, chamado provírus se comporta como um gene celular que poderá ser transcrito em RNAm, pela maquinaria celular (21). A partir da integração o DNA. A regulação da síntese de RNA é realizada pelas LTR, inseridas nas terminações do DNA integrado durante a transcrição reversa. A região 5' da LTR serve como promotora da transcrição viral, enquanto a região 3' auxilia na poliadenilação do RNA transcrito.

Os RNAs transcritos são exportados do núcleo para o citoplasma, onde serão traduzidos em proteínas virais que farão parte das novas partículas virais. As novas partículas virais são liberadas por brotamento e são capazes de infectar novas células somente após o processo de maturação. Este processo ocorre no meio extracelular, após processamento proteolítico das proteínas Gag e Pol pela ação da protease viral (22).



**Figura 6: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1.** O vírus se liga a célula hospedeira pela ação das glicoproteínas gp120 e gp41 no receptor celular CD4 e coreceptor CCR5. A ligação permite a fusão viral e desnudamento do material genético. O

RNA viral é transcrito em DNA no citoplasma pela transcriptase reversa, em seguida importado para o núcleo onde é integrado no genoma celular pela ação da integrase viral. A transcrição e tradução ocorrem pela maquinaria celular e os novos vírus são liberados por brotamento. No meio extracelular ocorre a maturação dos novos vírus pela ação da protease viral. Adaptado de Engelman & Cherepanov, 2012 (23).

A transmissão do HIV requer contato com fluidos corporais que contenham vírus, células infectadas ou ambos. Apesar de estar presente em quase todos os fluidos corporais, a transmissão ocorre pelo sangue, sêmen, fluidos vaginais e anais e leite materno. As principais rotas de transmissão são por via parenteral (por exemplo, compartilhamento de seringas), relação sexual sem proteção e transmissão vertical (mãe para filho) (24). Existem diferentes formas de se prevenir a transmissão do vírus, como por exemplo, uso de preservativos, seringas descartáveis e circuncisão masculina, e todas devem ser empregadas, mas a principal é a utilização de antirretrovirais. Afinal, a terapia antirretroviral, quando seguida corretamente, deverá reduzir a carga viral a níveis indetectáveis, ou seja, abaixo do limite de detecção dos principais kits utilizados no diagnóstico clínico, reduzindo as chances de transmissão tanto nos casos da transmissão vertical como durante a relação sexual. O tema antirretrovirais será mais extensamente discutido no tópico Estratégias de controle do HIV-1 (item 1.1.6)

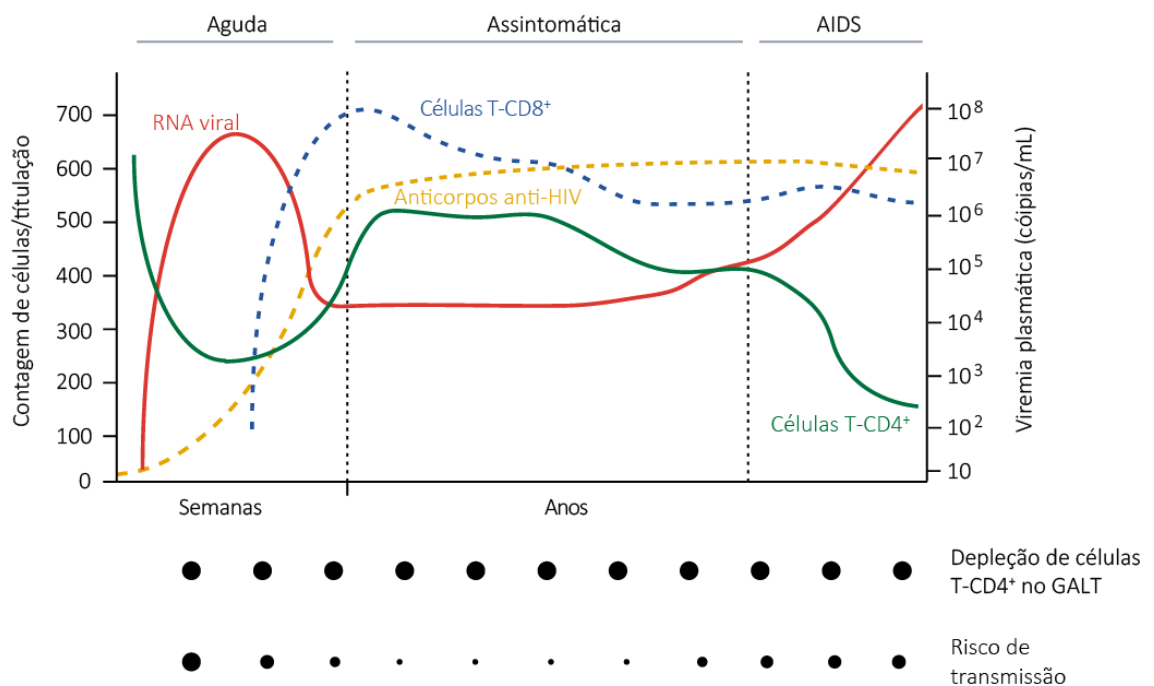
### **1.1.5 Fisiopatologia da infecção pelo HIV-1**

O curso natural da infecção pelo HIV-1, ou seja, na ausência do uso de antirretrovirais, apresenta três fases clínicas distintas: a fase aguda da infecção pelo HIV-1 corresponde ao período de alta viremia e diminuição na contagem de células T CD4+, que geralmente é transitória. Nessa fase as manifestações clínicas são inespecíficas e podem se assemelhar a uma gripe ou resfriado. A soroconversão do paciente ocorre em geral após duas a seis semanas do contágio. Esse período é conhecido como “janela imunológica”, onde os testes sorológicos para detecção de anticorpos podem ser negativos. Nesta etapa a resposta imune é capaz de controlar parcialmente a infecção e a replicação viral (**Figura 7**).

Com a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o paciente entra na fase crônica da infecção. Essa fase é conhecida como fase assintomática ou latência clínica, onde a destruição das células T CD4+ é lenta e gradativa, sendo parcialmente contrabalanceada pela sua produção (25).

Essa fase pode durar de vários meses a alguns anos, o que classifica os portadores em diferentes subtipos: os progressores típicos, progressores rápidos e não progressores de longo termo. Em geral, pacientes que após a soroconversão apresentam declínio das células T CD4+ em um tempo inferior a cinco anos são denominados progressores rápidos; a maior parte dos indivíduos, chamados progressores típicos progridem para Aids em até 10 anos, enquanto uma pequena parcela, os denominados não progressores de longo termo (LNTPs), se mantém assintomáticos e com níveis de células T CD4+ elevados por mais de 10 anos. Recentemente, foi identificada uma nova classe dentro dos LNTP, os controladores de elite, indivíduos capazes de suprimir a replicação do HIV de tal forma que os níveis de carga viral permanecem indetectáveis na ausência de terapia (26).

O final do período de latência é caracterizado pelo declínio constante de células T CD4+ e aumento da carga viral, e o surgimento de doenças oportunistas, caracterizando a fase de Aids (27).



**Figura 7: Curso natural da infecção pelo HIV-1.** Podem ser observadas 3 fases distintas: a fase aguda, com aumento da carga viral e redução das células T CD4+, fase crônica ou assintomática, na qual observa-se recuperação da resposta imune e controle da carga viral e a fase de Aids, caracterizada pelo declínio das células T CD4+ e aumento da carga viral, propiciando o aparecimento de infecções oportunistas. Adaptado de Simon *et al.*, 2006 (28).

As manifestações clínicas ao longo das fases não são específicas, como no caso de outras infecções virais, como por exemplo, dengue ou sarampo. Na fase aguda as manifestações clínicas podem ser semelhantes à mononucleose, com sintomas inespecíficos como dor de garganta, febre, cefaleia, mialgia, entre outros. Na fase crônica, devido a recuperação da resposta imune, segue-se um período de latência clínica. A fase de Aids é marcada pela diminuição da defesa imune do hospedeiro, especialmente redução da contagem de linfócitos T CD4+ e conseqüentemente, o aparecimento das infecções oportunistas, como pneumonia, criptosporidíase, encefalite por *Toxoplasma gondii*, entre outras (29).

A ativação crônica do sistema imune em pacientes HIV positivos tornam o organismo mais propenso a infecções oportunistas, assim como co-infecções com outros microrganismos. Alguns autores defendem que a ativação crônica e generalizada do sistema imune possa ser o fator principal causador da aceleração e progresso da infecção pelo HIV-1 até o quadro clínico de Aids (30).

A maior parte da transmissão do HIV-1 ocorre através das superfícies de mucosas. A principal delas é a barreira da mucosa intestinal, especialmente na transmissão sexual. O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) representa um importante local de infecção e replicação viral, devido ao grande número de linfócitos T CD4+. Além disso, estão presentes também macrófagos, destaque na formação de reservatórios virais (31). Na fase aguda a intensa replicação viral promove a depleção das células T CD4+, que juntamente com outros fatores como apoptose de enterócitos, promovem danos na integridade da mucosa, levando a translocação microbiana, que permite o aumento da passagem de produtos microbianos para circulação sistêmica, que conseqüentemente está relacionada a ativação imune (32). A resposta de linfócitos T CD8+ controla a replicação viral, percebendo-se melhora na contagem de células T CD4+, o que resulta no fim da fase aguda e início da fase crônica, a contagem de linfócitos CD4, em geral, só volta a diminuir mais tardiamente com o estabelecimento da fase de Aids. Sendo assim, essa fase aguda é decisiva no estabelecimento e progressão da infecção.

Na mucosa, após transmissão sexual, a depleção dramática de linfócitos T CD4+ parece não ser o único fator responsável pela progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida, uma vez que macacos de diversas espécies africanas que são infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), também apresentam essa depleção de células T CD4+, porém sem apresentar quadro clínico semelhante à Aids. Curiosamente, o macaco rhesus que

progredir para imunodeficiência severa após a infecção por SIV, mostra sinais de ativação imune e inflamação exacerbada quando comparado com Sooty mangabeys, um primata que é naturalmente infectado com SIV, e permanece saudável apesar de apresentar carga viral detectável (33).

Dentre os fatores que podem estar associados com ativação do sistema imune, temos a participação das citocinas. Durante a infecção pelo HIV-1, as citocinas podem apresentar super expressão, inibição ou até não sofrer alteração nos seus níveis. No que diz respeito a sua atuação, elas podem estar relacionadas com a progressão ou inibição da infecção.

Uma importante citocina, o TNF- $\alpha$ , é secretado durante fase inicial da infecção e está relacionado intimamente com a progressão da infecção. É possível observar uma relação positiva entre a viremia e os níveis de TNF- $\alpha$  no sangue (34). Além disso, outras citocinas pró-inflamatórias que também estimulam a replicação viral, como IL-6 e IL-8, podem ser induzidas pelo TNF- $\alpha$ . Nesse contexto, o monitoramento dos seus níveis é de grande importância para o controle da progressão da infecção. Curiosamente, alguns estudos mostraram que a presença de TNF pode levar o estímulo da produção de IL-10, uma citocina regulatória, que por sua vez, regularia a inflamação através da inibição do TNF (35).

A IL-1, assim como TNF- $\alpha$ , é produzida durante a ligação da gp 120 ao receptor CD4 na infecção pelo HIV (36). A IL-1 tem sido descrita na patogênese do HIV associada à demência (37). Já a IL-6 encontra-se aumentada no soro de indivíduos infectados, quando comparados com indivíduos soronegativos. Outra importante molécula neste contexto é o IFN- $\gamma$ , que atua nas APCs a fim de aumentar a expressão de MHC-II, promovendo assim a habilidade em apresentar antígenos dessas células. A proteína Tat do HIV interfere na sinalização intracelular do interferon e conseqüentemente diminui a capacidade de apresentar antígeno, limitando a resposta imune a infecção (38, 39). Destacamos também o TGF- $\beta$ , que está relacionado a diferentes processos fisiológicos, como desenvolvimento embriológico, homeostase, ciclo celular, proliferação e diferenciação entre outros (40). Além disso, pode estar relacionada a inibição ou estímulo do crescimento celular, dependendo do tipo celular. A infecção pelo HIV induz a secreção e transcrição de TGF que pode aumentar a apoptose de células NK (41).

A IL-10 atua no aumento de expressão de diferentes genes em macrófagos e células dendríticas, que são normalmente estimulados por receptores tipo Toll e atuam na proliferação

de células T citotóxicas e ativação de células B (42). Seu papel chave na regulação da resposta imune é sua habilidade em inibir citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, IL-2 e IL-12. Atualmente há uma série de especulações sobre sua atuação efetiva na infecção pelo HIV-1, podendo agir a favor ou contra a infecção. Naicker e colaboradores (2009) (43) demonstraram que o papel da IL-10 vai depender da fase da infecção. Na fase aguda, a IL-10 poderia promover a replicação viral, devido seu poder de inibição da resposta imune inata, assim como a adaptativa. Já na fase crônica, apresentaria papel protetor reduzindo ativação imune, inibindo a replicação viral em macrófagos, já que os níveis de IL-10 no plasma estão relacionados diretamente com o aumento do número de células T CD4+ e inversamente com a carga viral.

Nesse contexto, de maneira bastante interessante, o aumento da inflamação também é observado em controladores de elite, pacientes que controlam a replicação viral na ausência de terapia antirretroviral, o que sugere que carga viral elevada, assim como a depleção de células T CD4+, não são as únicas responsáveis pelo estado pró-inflamatório durante a infecção (44). Esses fatos suportam a ideia que para o combate a infecção do HIV, se faz necessário além de controlar a carga viral, investigar e investir nos componentes do próprio sistema imune do hospedeiro, que envolvem tanto imunidade inata quanto a adaptativa, a fim de controlar a resposta imune exacerbada.

### **1.1.6 Estratégias de controle da infecção pelo HIV-1**

Em 1987, foi dado o primeiro passo na terapia contra o HIV, no qual um teste clínico mostrou que o AZT (zidovudina) diminuiu a mortalidade e as infecções oportunistas em pacientes com Aids (45). O AZT que havia sido sintetizado previamente para o tratamento anticâncer, tem papel na inibição da transcrição reversa, como análogo nucleosídeo, inibindo assim o ciclo replicativo do HIV (46). No entanto, classicamente como a maioria das moléculas antivirais, mutações de resistência a essa molécula surgiram e novas foram desenvolvidas para o mesmo alvo, assim como para novos alvos do ciclo replicativo viral.

Atualmente observam-se avanços significativos na terapia antirretroviral (TARV) e principalmente o aumento do número de pacientes com acesso a terapia nos últimos anos. A combinação de agentes antiretrovirais, denominada “Highly Active Anti-Retroviral Therapy” (HAART), diminuiu a mortalidade da infecção pelo HIV-1, e melhorou a qualidade de vida dos pacientes que aderem corretamente ao tratamento (47, 48). O objetivo primário da terapia

é a manutenção da saúde e prevenção de doenças, enquanto o secundário é impedir a transmissão devido a manutenção da carga viral indetectável.

Os benefícios da TARV são incalculáveis e é recomendada para todas as pessoas HIV positivas, independentemente do seu estágio clínico e/ou imunológico. Devido a isso, esforços devem ser feitos para reduzir o tempo entre diagnóstico e início da terapia. A TARV é indicada, por exemplo, para toda gestante infectada pelo vírus e não deve ser suspensa após o parto.

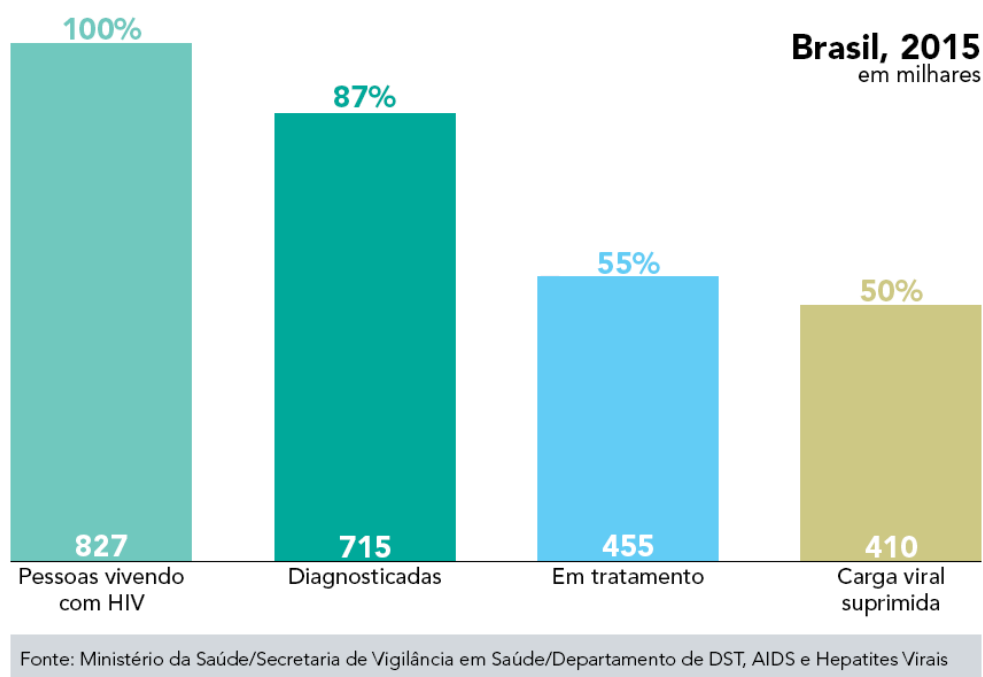
No caso dos controladores de elite, segundo o Manual Técnico do Ministério da Saúde (49), o atraso no início do tratamento após o diagnóstico, a fim de observar se o indivíduo se tornará um controlador, deve ser desencorajado. No entanto, permanece a incerteza quanto aos controladores que mantêm a carga viral indetectável sem a terapia. Outrossim, mesmo sendo controladores, existe replicação viral, logo esses indivíduos devem ser acompanhados, a fim de se observar um possível aumento da carga viral ou redução do número de células T CD4+.

De acordo com o novo relatório da UNAIDS, os países estão incentivando o “Fast-Track”, um dos projetos com a finalidade de eliminar a infecção, no qual o objetivo é aumentar a rapidez do início do tratamento e ampliar o acesso aos medicamentos (50). Em junho de 2016, cerca de 18,2 milhões de pessoas tiveram acesso ao medicamento, o dobro do registrado cinco anos antes. Se continuarmos caminhando dessa forma, o mundo poderá alcançar a meta de 30 milhões de pessoas em tratamento até 2020.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estima-se que 87 % das pessoas vivendo com o vírus estão diagnosticadas, 55 % deste total estão em tratamento. Além disso, o mais importante é que estima-se que 50 % das pessoas vivendo com HIV apresentam carga viral suprimida (**Figura 8**) (14).

## Cascata de cuidado para HIV e AIDS

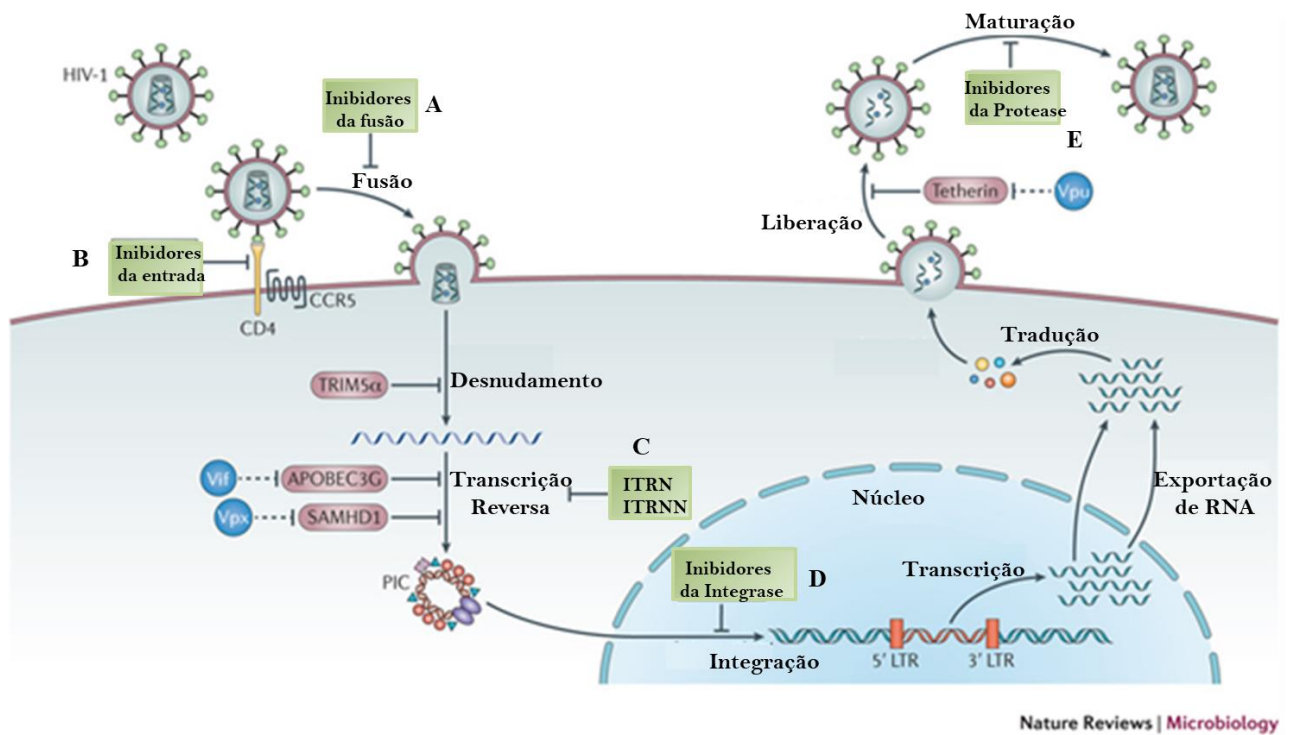
Em relação ao total de pessoas vivendo com HIV



**Figura 8: Esquema representativo da porcentagem de pessoas em terapia antirretroviral no país.** Dados do Ministério da Saúde mostram que 55% das pessoas diagnosticadas com HIV estão em tratamento antirretroviral. Adaptado de <http://unids.org.br/estatisticas> (15).

A terapia antirretroviral é um fator fundamental para o controle da dispersão viral. Diferentes fases do ciclo replicativo do HIV-1 são alvos para esta terapia: fusão do envelope viral com a membrana celular, transcrição reversa, integração, proteólise e liberação de novos vírions. Segundo a agência reguladora americana, *Food and Drug Administration* (FDA) seis classes de drogas estão disponíveis atualmente para uso clínico: Inibidores da TR análogos de nucleosídeos (ITRN), Inibidores da TR não-análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores da protease, inibidores de fusão, inibidores da entrada e inibidores da integrase (51) (**Figura 9**).





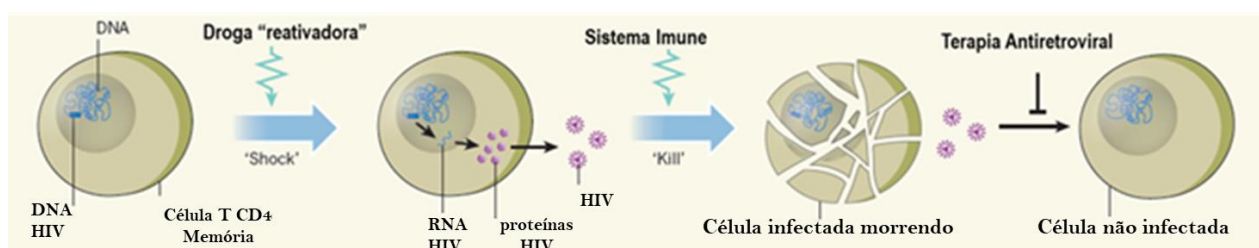
**Figura 9: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1 e os pontos de controle da replicação pela terapia antirretroviral.** A) inibidores de fusão. B) inibidores de entrada. C) Inibidores da transcrição reversa: análogos nucleosídeos e não-análogos nucleosídeos. D) Inibidores da integrase E) inibidores da protease. Adaptado de Barré-Sinoussi *et al.*, 2013 (52).

O sucesso da terapia tem grande relação com a adesão do paciente, com esquemas de medicamentos adequados e com o reconhecimento precoce da falha virológica. Um dos principais parâmetros para identificar a falha virológica é a carga viral detectável, após seis meses do início da terapia. A falha prejudica a recuperação da resposta imune, pode aumentar o risco de aparecimento de doenças e principalmente levar a emergência de cepas resistentes aos antirretrovirais.

Apesar do sucesso do tratamento com terapia antirretroviral no controle da replicação do HIV, com conseqüente redução da mortalidade, os antivirais não promovem a cura da infecção. O vírus persiste, mesmo durante o tratamento, devido o seu potencial de latência. Latência pode ser entendida como a integração do vírus no genoma celular do hospedeiro, entretanto não há produção viral, ou seja, permanecem invisíveis ao sistema imune. De modo que, assim que a terapia antirretroviral, que mantém a carga viral indetectável, for removida haverá reativação dos vírus latentes e conseqüentemente a infecção de novas células e

aumento da carga viral. Os principais reservatórios do vírus são as células T de memória latentes, macrófagos e o sistema nervoso central (53).

Uma das diferentes estratégias que buscam a cura do HIV envolve o “despertar” da latência viral e chama “shock and kill”. Essa técnica envolve a reativação do vírus latente através da utilização de drogas específicas em indivíduos em tratamento com HARRT. Dessa forma, espera-se a remoção das células infectadas seja feita pelo sistema imune ou por morte pela própria infecção viral (54) (**Figura 10**). Entretanto, alguns estudos mostraram que essas drogas não conseguem reativar efetivamente todos os reservatórios, permitindo assim o combate a todas as células infectadas pelo sistema imune (55). Em contrapartida, outro estudo demonstrou que as células citotóxicas de controladores de elite conseguem reconhecer e combater células infectadas que produzem apenas gag e não replicam vírus efetivamente (56).



**Figura 10: Esquema representativo da estratégia “Shock and Kill”.** As células de memória que apresentam o vírus latente seriam expostas a drogas reativadoras, que levariam a replicação viral e liberação de novos vírus. Essa célula passaria a ser reconhecida pelo sistema imune que a mataria. Como o indivíduo estaria em TARV, isso impediria a infecção de novas células. Adaptado de Deeks, 2012 (54).

Tendo em vista a importância da formação dos reservatórios na manutenção da infecção, a iniciação precoce do uso de antirretrovirais favorece a redução desses reservatórios virais. O Brasil hoje já trata todos os pacientes com a terapia independente de seus níveis de células T CD4+ (49) e também iniciou o tratamento pré-exposição que autoriza a utilização de medicamento para pessoas que estão nos grupos de risco ou casais sorodiscordantes, o que pode auxiliar na diminuição de novas infecções e dos reservatórios.

Até o presente momento, o único caso reportado e reconhecido como cura foi o paciente de Berlim (57). O paciente era portador de HIV-1 e desenvolveu leucemia mieloide aguda. Devido a leucemia, o paciente recebeu dois transplantes de medula óssea e seu médico procurou por doadores que apresentassem a mutação em homozigose no receptor CCR5

(deleção de 32 pares de base no gene, CCR5 $\Delta$ 32), receptor importante para entrada do HIV na célula. Após o transplante o paciente deixou de tomar os antirretrovirais e até o momento o vírus não foi detectado em seu organismo, mesmo após biópsias em diferentes órgãos.

Baseados nesse caso, alguns pesquisadores estudam a possibilidade de usar células tronco para bloquear a ação do receptor CCR5, a fim de eliminar o vírus do organismo (58). Um dos fatos negativos dessa terapia é a função celular desse receptor no organismo, que poderia prejudicar a resposta imune. Na verdade, alterações no gene que codifica o receptor são associadas com aumento do risco de infecções com outros vírus com West Nile e alguns flavivírus (59, 60).

Ainda no contexto de controle da infecção pelo HIV-1, apesar da utilização de fármacos ser um grande passo no controle da replicação viral, o hospedeiro também tem papel no controle da infecção, através tanto da resposta imune inata como adaptativa. Como discutido anteriormente, as citocinas tem importante papel, tanto no favorecimento da infecção como no controle da replicação.

O IFN tipo I, por exemplo, tem grande importância no controle da replicação do HIV-1, devido a sua atuação no aumento da expressão de genes denominados genes estimulados por interferon, que levam a tradução de diferentes fatores de restrição celulares ao HIV, como por exemplo Trim5 $\alpha$ , SAMHD1, Tetherina, IFITM3, MX2 e APOBEC3G. A proteína Trim5 $\alpha$  se liga ao capsídeo do HIV bloqueando estágios iniciais da replicação viral, impedindo o transporte do cDNA ao núcleo (61). Podemos destacar também o SAMHD1, que promove a depleção dos níveis intracelulares de desoxinucleosídeos trifosfatos, interferindo na transcrição reversa (62). A Tetherina inibe a liberação das partículas virais da superfície celular por brotamento, impedindo a dispersão viral, na ausência de vpu (63). Já a IFITM3 atua bloqueando a entrada do vírus, alterando a composição e reduzindo a fluidez da membrana (64). Apesar da MX2 ainda não apresentar uma função totalmente definida, parece atuar no passo após a entrada do vírus, possivelmente inibindo a importação do DNA para o núcleo ou inibindo o desnudamento viral (65).

Dentre os diferentes fatores de restrição celular, a família APOBEC3 tem sido bastante estudada no controle da replicação pelo HIV-1. A família APOBEC3 tem a função de citidinas deaminases e é composta por sete membros (A, B, C, D, F, G e H). As proteínas são induzidas por IFN tipo 1 e apresentam papel importante no controle de múltiplos retrovírus

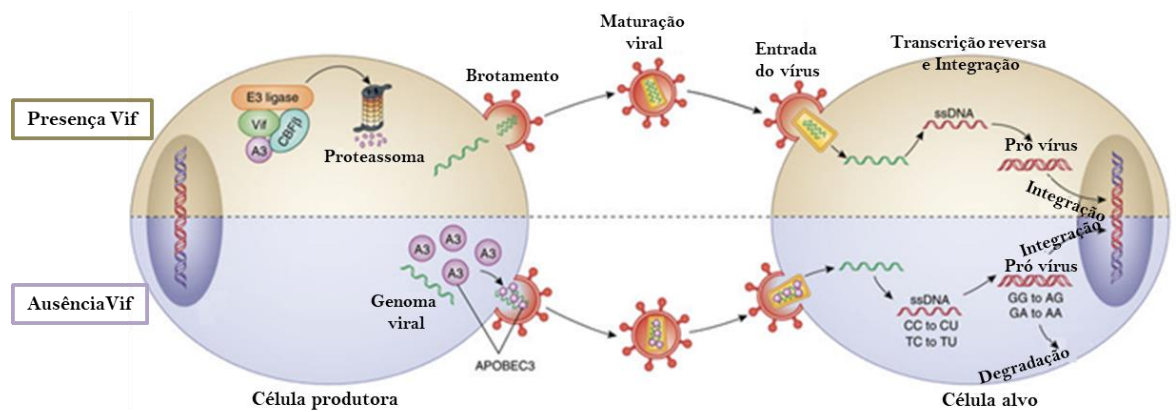
através da ligação ao RNA ou pela deaminação de fitas simples de DNA (66). As proteínas dessa família são expressas em células T CD4+, T CD8+, células B e mielóides (67).

APOBEC3G (A3G) é uma das principais proteínas da família com papel antiviral e essa função está relacionada a duas propriedades: a habilidade da proteína em se ligar em RNA fita simples e atividade deaminase em fita simples de DNA. A porção N-terminal CD1 tem afinidade para ligação ao RNA e fita simples de DNA (68), enquanto a porção C-terminal CD2 exerce atividade catalítica (69).

Alguns autores acreditam que sua função na ligação ao RNA fita simples possa ter maior influência na ação antiviral, já que proteínas com a porção C-terminal CD2 inativada ainda são capazes de diminuir a infecção pelo HIV-1 (70, 71). A atividade da porção N-terminal está provavelmente associada a uma inibição não enzimática, ou seja, envolve a ligação ao RNA viral e inibição de forma física da ligação da transcriptase reversa (72, 73).

O APOBEC3G também promove a inibição da replicação do HIV-1 através do mecanismo de deaminação das citidinas. Nesse processo a porção C-terminal catalisa a deaminação de citidinas em uracilas que em um novo round de transcrição reversa resulta na substituição de guaninas por adeninas no DNA viral, ocasionando hipermutação na nova molécula formada. Sabe-se que mutações no genoma viral podem levar a melhor adaptação ao ambiente, a resistência a drogas, porém um número elevado de mutações pode alterar o quadro de leitura, introduzir códons de terminação inapropriados, assim como ocasionar falha na replicação viral, denominada catástrofe por erro (74).

Por outro lado, o HIV-1 apresenta uma proteína considerada acessória chamada vif (fator viral de infectividade) que antagoniza a ação de defesa de APOBEC3G. Vif recruta APOBEC3G para o complexo ubiquitina ligase E3 e conseqüentemente leva a degradação da proteína pela via ubiquitina-proteossoma. Em vírus que sejam mutados para vif, a incorporação de apenas sete moléculas de A3G pelo vírus é suficiente para prejudicar a replicação do HIV-1 (75) (**Figura 11**).



**Figura 11: Ação antiviral do APOBEC3G na ausência e presença de vif.** Na ausência de vif, o A3G é envelopado e liberado dentro do vírus e vai atuar durante a transcrição reversa, promovendo a deaminação de citidinas em uracila, levando posteriormente a hipermutação de G para A. Na presença de vif, o A3G é ubiquitinado e degradado no proteossoma, impedindo assim sua ação antiviral. Adaptada de Simon *et al.*, 2015 (76).

A relevância da atuação de APOBEC3G *in vivo* se comprova pelo fato de reservatórios de pacientes tratados com terapia antirretroviral apresentarem sequências de vírus hipermutados (77) assim como indivíduos que apresentam carga viral indetectável, denominados controladores de elite, também apresentarem hipermutação G-A (78). Logo, mesmo em pacientes com baixa e controlada replicação viral, e infecção provável com vírus que apresentam vif, observa-se a atuação de A3G. E o fato de serem encontrados em reservatórios, caso os vírus “despertem” da latência, os mesmos podem não ser infecciosos.

O mecanismo exato do efeito antiviral de A3G ainda não está bem estabelecido, mas é fato que a presença da proteína inibe a replicação do HIV-1. O potencial antiviral de A3G já foi associado com outras infecções, por exemplo, A3G apresenta um efeito antiviral pequeno contra vírus da leucemia de células T humana tipo 1, sem utilizar as porções C-terminal e N-terminal e sem causar deaminação de citidinas no DNA (79).

Além das estratégias de controle do vírus após a infecção propriamente dita, recentemente tem sido discutida a Profilaxia pré-exposição ao HIV (PrEP). A PrEP é uma estratégia de prevenção que envolve a utilização diária de um medicamento antirretroviral, por pessoas não infectadas, para reduzir o risco de aquisição do HIV. A população prioritária

envolve os indivíduos que se encontram no grupo de risco, como homens que fazem sexo com outros homens, pessoas trans e profissionais do sexo (80).

O medicamento utilizado no Brasil é conhecido comercialmente como Truvada<sup>®</sup>, que é a combinação do Tenofovir, inibidor de análogo nucleotídeo da transcriptase reversa, e Entricitabina, inibidor análogo de nucleosídeo da transcriptase reversa. No Rio de Janeiro, o Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fundação Oswaldo Cruz faz parte do projeto, e os medicamentos são fornecidos sem custo pelo Sistema Único de Saúde.

Diferentes estudos já mostraram eficiência do projeto, o iPreEx que avaliou PrEP em homens que fazem sexo com homens e mulheres trans mostrou redução de 44% no risco de aquisição do HIV, já entre indivíduos heterossexuais a eficácia da PrEP foi de 62% e em casais discordantes houve a redução de 75% no risco de infecção (81).

Existe também a Profilaxia pós-exposição (PEP), cujo objetivo é o uso da terapia antirretroviral depois de uma possível exposição ao vírus, com a finalidade de prevenir a infecção (82). A PEP deve ser utilizada somente em situações de emergência, ou seja, um acidente de trabalho, abuso sexual, ou exposição durante a relação sexual, e deve ser iniciada até 72 h após a exposição.

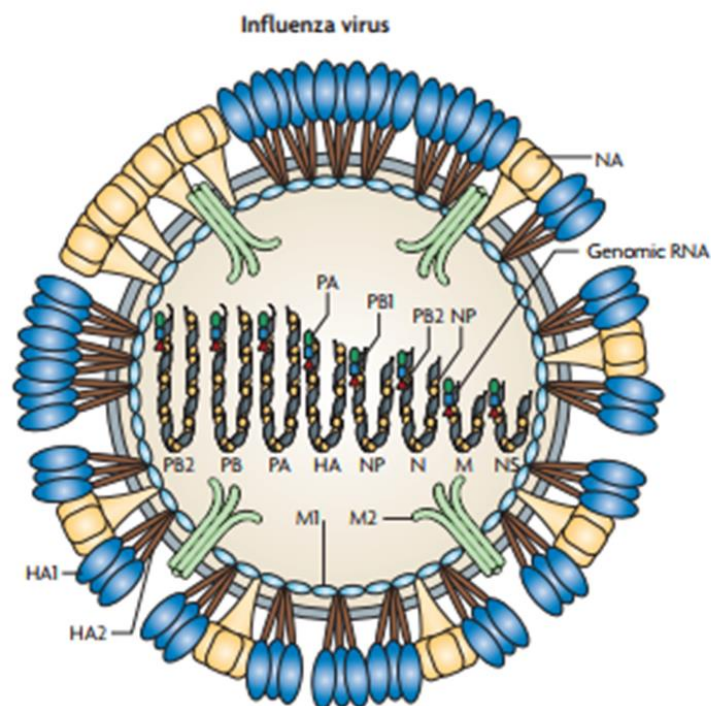
## **1.2 O vírus Influenza**

### **1.2.1 Caracterização viral**

Os vírus influenza são classificados na família *Orthomyxoviridae* e apresentam quatro gêneros distintos: *Influenzavirus A, B, C e D*. O gênero D foi descrito recentemente no sudeste da China e está associado a doenças respiratórias principalmente no gado e também em porcos, em adição, em humanos foram detectados anticorpos contra o tipo B principalmente em indivíduos com contato com gado (83, 84). Os gêneros B e C são isolados de humanos, enquanto o A possui ampla variedade de hospedeiros. Os vírus influenza A, como por exemplo, o vírus A(H1N1)pdm09 responsável pela pandemia de 2009, estão associados aos surtos epidêmicos sazonais e a pandemias, enquanto o gênero B causa epidemias periódicas e o gênero C endemias e doenças respiratórias leves (85).

O influenza A é envelopado e apresenta genoma de RNA fita simples, octasegmentado e polaridade negativa (**Figura 12**). Inseridas no envelope viral estão presentes duas

glicoproteínas importantes, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), além da proteína formadora de canal de prótons M2. Abaixo do envelope viral há um arranjo de proteínas de matriz M1, que delimitam a porção interna da partícula viral, conferem rigidez ao envelope, atuam como a força motriz do brotamento viral, além de ancorarem o material genético (86). Cada segmento de RNA encontra-se associado a nucleoproteínas virais (NP). Além das NPs, o RNA viral também está associado a um complexo polimerase (formados pelas proteínas PA, PB1 e PB2), e este conjunto recebe o nome de ribonucleoproteína (RNP) (87).



**Figura 12: Esquema representativo do vírus Influenza.** Inseridas no envelope estão as glicoproteínas HA e NA, além de M2. O genoma do vírus é formado por oito segmentos de RNA fita simples. Adaptado de Karlsson Hedestam *et al.*, 2008 (8).

Na Tabela estão listados os oito segmentos gênicos do vírus e a descrição das funções das proteínas codificadas pelos mesmos (**Tabela 2**).

**Tabela 2: Os oito genes que formam o genoma do influenza e as principais funções de suas proteínas.**

<b>Gene</b>	<b>Função principal das proteínas virais</b>
PB2	PB2-Participa do processo de transcrição viral através do reconhecimento e captura do Cap
PB1	PB1- Possui atividade de alongamento de cadeia
PA	PA –Possui atividade endonuclease
HA	HA-Adsorção viral e atividade de fusão
NP	NP -Ligação de RNA viral
NA	NA - Clivagem da ligação com ácido siálico
M	M1 – Proteína de Matriz, interage com RNPs virais M2- Proteína de membrana, atua na formação do canal iônico
NS	NS1- proteína não estrutural, multifuncional NS2 – proteína não estrutural de exportação nuclear dos RNPs virais

De todas as 10 proteínas virais, a neuraminidase e a hemaglutinina são as mais estudadas, pois possuem os principais sítios antigênicos do influenza. Projetam-se a partir da bicamada lipídica do envelope numa proporção geralmente de 5 moléculas de HA para 1 de NA e não se encontram, necessariamente, dispostas num arranjo homogêneo (88). A neuraminidase é uma proteína tetramérica que apresenta atividade sialidase. Esta atividade é importante para a formação do envelope viral a partir da membrana celular e consequente dispersão dos vírus influenza no trato respiratório (89). A hemaglutinina é uma proteína trimérica formada por monômeros ligados de forma não-covalente. Cada monômero de hemaglutinina (HA0) é composto por subunidades HA1 e HA2, que interagem entre si por ligações dissulfeto (90). É importante para adsorção viral, pois nela localiza-se o sítio de ligação que interage com resíduos de ácido siálico presentes na membrana citoplasmática.

Atualmente são conhecidas 18 HA e 11 NA e as diferentes combinações classificam os vírus influenza A em subtipos (91) (**Figura 13**). Os três subtipos H1, H2 e H3 de hemaglutininas são transmitidos eficientemente entre humanos, sendo H1 e H3 responsáveis pelas epidemias sazonais. Entretanto, os subtipos H5, H6, H7 e H9 já infectaram humanos e podem ser considerados possíveis ameaças para uma futura pandemia (92-95).



Hemaglutinina					Neuraminidase				
Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos/outros	Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos/outros
H1					N1				
H2					N2				
H3				Outros animais	N3				
H4				Outros animais	N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7				Outros animais	N7				Outros animais
H8					N8				Outros animais
H9					N9				
H10					N10				
H11					N11				
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									
H17									
H18									

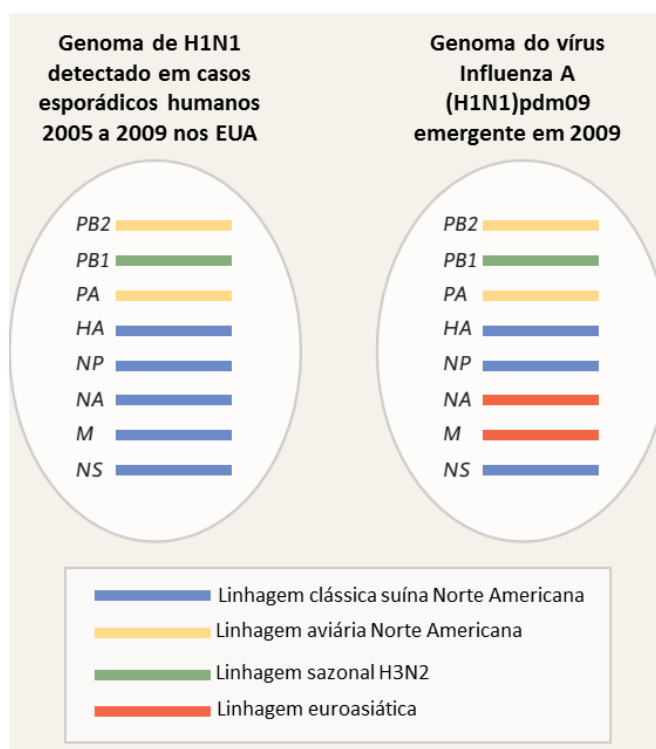
**Figura 13: As diferentes hemaglutininas e neuraminidasas existentes na natureza.**

Podemos observar na figura os 18 subtipos de hemaglutininas e 11 subtipos de neuraminidase descritos e seus diferentes hospedeiros. Adaptado de [www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm](http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm) (96).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a nomenclatura dos vírus Influenza é representada pelo gênero do vírus ao qual pertence (A, B, C ou D), o local de isolamento (cidade ou país), número da amostra do laboratório, ano de isolamento e, o subtipo de HA e NA. Por exemplo, o vírus responsável pela pandemia de 2009 foi nomeado como A/Califórnia/07/2009(H1N1). No caso dos vírus influenza B, eles não apresentam subtipos de HA e NA, este gênero é constituído por duas linhagens principais (Yamagata e Victoria). Assim, a nomenclatura adotada para o vírus influenza B descreve apenas o gênero, local de detecção, número de origem e ano, por exemplo: B/Florida/4/2006. No caso de isolamento de

amostra animal, a espécie é escrita logo após o gênero, por exemplo: A/duck/Alberta/35/76(H1N1) para vírus isolado de pato (97).

A partir do século XX, quatro pandemias de Influenza assolaram o mundo. A primeira foi a Gripe Espanhola (H1N1) em 1918; seguida da Gripe Asiática (H2N2) em 1957; a Gripe de Hong Kong (H3N2) em 1968 e em 2009, a primeira pandemia do século XXI, que ficou conhecida popularmente como “Gripe Suína” (H1N1). O vírus influenza A(H1N1)pdm09 é produto de um rearranjo gênico composto por: dois genes (PA e PB2) da linhagem aviária norte-americana; um gene (PB1) derivado da linhagem sazonal H3N2; três genes (HA, NP e NS) da linhagem suína clássica norte-americana; e dois genes (NA e M) da linhagem suína euro-asiática (98) (**Figura 14**).



**Figura 14: Comparação do genoma do vírus influenza H1N1 sazonal com a cepa pandêmica de 2009, mostrando os rearranjos gênicos entre quatro linhagens distintas.** Adaptado de Dawood et al., 2009 (99).

### 1.2.2 Epidemiologia

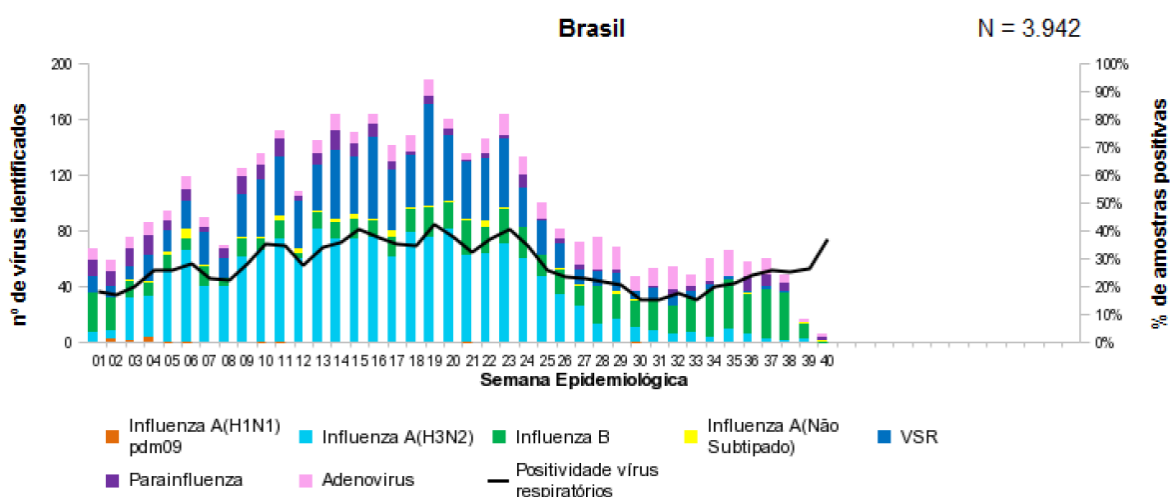
Os vírus influenza são os principais agentes responsáveis pelas infecções respiratórias agudas que, apesar de geralmente autolimitadas, constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade. De acordo com dados da OMS cerca de 20% da população mundial

se infecta todo ano com o vírus Influenza, com até 500 milhões de casos severos e podendo chegar a 200 a 500 mil óbitos globalmente (100).

As infecções por influenza ocorrem principalmente durante o período de inverno e portanto, apresentam um padrão sazonal. Desta maneira, os surtos epidêmicos nos hemisférios Norte e Sul ocorrem em períodos do ano diferentes. De acordo com a OMS, esse ano de 2017 os subtipos virais que circularam majoritariamente no mundo foram A(H3N2) e Influenza B (101).

O sistema de vigilância da circulação dos vírus influenza no Brasil é composto pela vigilância sentinela de Síndrome Gripal (SG), de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e pela vigilância universal de SRAG. Os objetivos da vigilância incluem identificar os vírus circulantes, informação crucial para composição da vacina anual, além de permitir o monitoramento da demanda de atendimento por essa infecção.

No Brasil, os dados atualizados obtidos pela vigilância epidemiológica demonstram que até a semana epidemiológica 40 (01/10/2017 até 07/10/2017) de 2017, das 16.704 amostras coletadas, 3942 tiveram resultado positivo para vírus respiratórios, das quais 60,4% foram positivas para Influenza, desse total 0,6% foram Influenza A(H1N1)pdm09, 30% Influenza B, 2,3% influenza A não subtipado e 66,9% influenza A(H3N2) (**Figura 15**) (102). Esses dados vão ao encontro do que foi observado mundialmente.

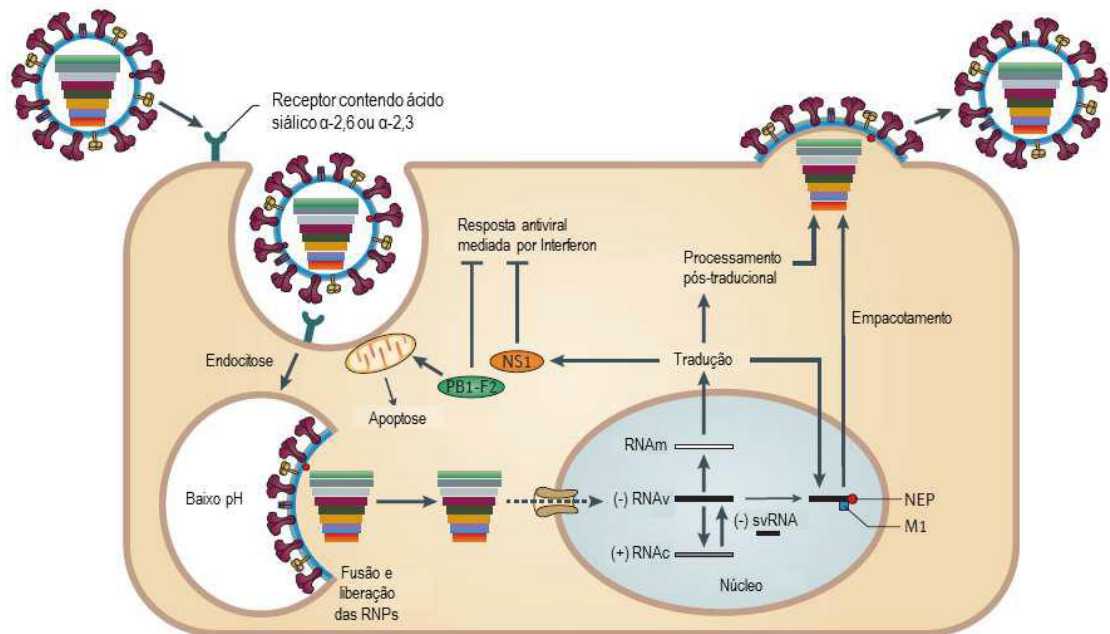


**Figura 15: Perfil da circulação das cepas dos vírus influenza no Brasil, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 40 de 2017 (102).**

Até a semana epidemiológica 40, do total de óbitos notificados, aproximadamente 16% foram confirmados para vírus influenza, sendo 2,8% decorrentes de influenza A(H1N1)pdm09, 25,6% por influenza B e 60,6% influenza A(H3N2). O estado com maior número de óbitos por influenza, até o momento, foi São Paulo.

### 1.2.3 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo do vírus influenza A se inicia pela ligação da hemaglutinina do vírus aos resíduos de ácido siálicos presentes na superfície celular. Então, ocorre a internalização do vírus por endocitose (103). No endossomo ocorre um processo de acidificação devido ao fluxo de prótons H<sup>+</sup>, através dos canais iônicos formados pela proteína M2 (104). O baixo pH no endossomo desencadeia a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, liberando as ribonucleoproteínas (RNPs) virais para o citoplasma (105). Estas são importadas para o núcleo, onde o complexo da polimerase viral inicia o processo de transcrição e replicação viral. Durante a duplicação, é sintetizado o RNA antígenômico de polaridade positiva (também chamado de RNA complementar), que serve de molde para a síntese das novas fitas de RNA viral. A tradução das novas proteínas virais e montagem dos novos vírions ocorrem no citoplasma da célula (106). As RNPs recém-sintetizadas são exportadas do núcleo para o local de montagem no citoplasma, então protegidas pela proteína M1 migram até a membrana celular, onde são recobertos por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície virais HA e NA e a proteína M2. A NA é responsável pela liberação da partícula viral recém-sintetizada, pois cliva o ácido siálico da superfície celular, impedindo assim retenção na superfície da célula devido à interação com a HA da superfície viral (105) (**Figura 16**).



**Figura 16: Esquema representativo do ciclo replicativo do vírus Influenza.** A HA se liga ao ácido siálico da célula hospedeira, e o vírus é endocitado. A alteração do pH promove a liberação das RNPs para o citoplasma, que seguem para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição e replicação viral. A tradução das proteínas ocorre no citoplasma e os novos vírus montados são liberados por brotamento devido a ação da NA. Adaptado de Medina *et al.*, 2011 (107).

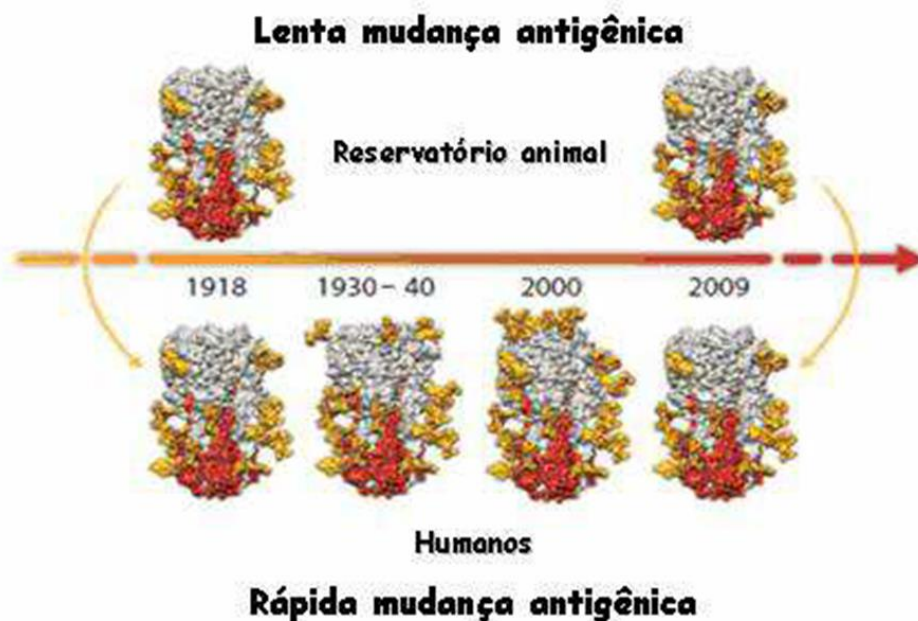
#### 1.2.4 Hemaglutinina

A hemaglutinina é transcrita pelo quarto segmento gênico dos vírus Influenza com aproximadamente 1778 nucleotídeos, o qual codifica uma proteína de 550 aminoácidos (103). Encontra-se inserida no envelope viral na forma trimérica. Após sua síntese no retículo endoplasmático, ocorre o seu processamento que envolve a adição de açúcares (glicosilação) e ácidos graxos e a clivagem do precursor HA0 por proteases celulares em duas subunidades monoméricas HA1 e HA2 que permanecem unidas por pontes dissulfeto (importante na infecciosidade e patogenicidade do vírus) (108). A subunidade HA1 é a extremidade amínica e hidrofílica, onde ocorrem as glicosilações, e nela estão localizados os domínios de ligação aos receptores celulares e os cinco sítios antigênicos (109). A subunidade HA2, parte hidrofóbica da HA, constitui a maior parte da haste contendo o domínio fusogênico, que atua na fusão do envelope viral com a membrana endossomal durante o ciclo replicativo (109, 110).

Devido a sua função na adsorção viral, a hemaglutinina tornou-se alvo para desenvolvimento de compostos antivirais. Além disso, é o principal componente antigênico da vacina antiinfluenza anual e a proteína viral para qual os anticorpos neutralizantes do hospedeiro são dirigidos, e conseqüentemente apresenta uma grande variabilidade genética (111). Dessa forma, mutações na HA tem papel fundamental na emergência de novas variantes virais, esse fato explica a necessidade de revisão anual da composição da vacina sazonal.

A geração de diversidade do vírus influenza ocorre por dois mecanismos evolutivos diferentes, o *drift* antigênico e o *shift* antigênico. O mecanismo de *drift* resulta de mutações pontuais inseridas durante a replicação, devido a ação da enzima RNA polimerase viral que apresenta baixa fidelidade (112). Esse processo permite a seleção de novas variantes contendo alterações nas sequências da HA, assim como na NA. Essas mudanças superam a imunidade pre-existente em humanos, ou seja, as alterações tornam inespecíficas as ligações aos anticorpos existentes, sendo estas novas cepas responsáveis por uma nova epidemia sazonal (107). Já o *shift* apresenta uma mudança mais drástica na partícula viral, pois resulta de rearranjo de segmentos gênicos de vírus diferentes durante infecção simultânea e pode levar ao surgimento de uma nova variante com potencial pandêmico, como ocorreu em 2009 com o vírus A(H1N1)pdm09 (98).

O diferencial entre o vírus A (H1N1)pdm09 e o A H1N1 sazonal, que circulou na população humana desde sua reemergência em 1977 até 2009, está especialmente localizado na HA viral. A faixa etária mais acometida ao longo desta recente pandemia de H1N1 em 2009 foram os adultos jovens, ao contrário do que vinha sendo observado durante as infecções sazonais (99). O motivo que explicaria tal inversão na faixa etária poderia ser a inexistência de anticorpos contra esta nova cepa que apresenta menor taxa de glicosilação da HA entre adultos jovens, já que indivíduos com idade superior a 60 anos poderiam apresentar imunidade cruzada adquirida por possível exposição a variantes similares que circularam entre 1940 e 1950 (113) (**Figura 17**). Ao todo foram confirmados laboratorialmente cerca de 18 mil óbitos no mundo de abril de 2009 a agosto de 2010, podendo este número ter sido até 15 vezes maior (114).



**Figura 17: Esquema representativo dos diferentes padrões de glicosilação da HA ao longo do tempo.** Pode-se observar que o padrão de glicosilação da HA do vírus que circulou em 2009 era mais próximo do vírus que circulou em 1918. Essa semelhança pode ter proporcionado reação cruzada da resposta imune e talvez por isso a infecção não tenha afetado o grupo de idosos, como nos anos anteriores. Adaptado de Settembre *et al.*, 2010 (113).

### 1.2.5 Fisiopatologia da infecção

A transmissão do vírus influenza ocorre pela inalação de partículas virais oriundas de gotículas da tosse e do espirro ou pelo modo indireto, quando as mãos entram em contato com superfícies contaminadas por secreções e é levada às mucosas nasal, oral ou ocular. Após vencer a barreira física imposta pelo muco produzido no epitélio respiratório, o vírus pode penetrar nas células do trato respiratório superior e inferior, onde ocorrerá a replicação. Indivíduos saudáveis podem transmitir o vírus de 24 a 48 h antes do início dos sintomas até entre cinco e dez dias pós infecção. Entretanto, indivíduos imunocomprometidos podem excretar vírus por semanas ou meses (115, 116).

O quadro clínico dos casos de influenza não apresenta sintomas específicos, podem estar presentes febre, tosse, coriza, cefaleia, congestão nasal, calafrio, dor no corpo e, algumas vezes, diarreia e vômito com evolução clínica geralmente benigna e autolimitada. A maioria

dos pacientes recupera-se em uma semana, no entanto podem ser observados casos com acometimento pulmonar de forma grave, principalmente em grupos de risco para complicações da infecção por influenza, levando até a morte (117).

Durante o período de incubação, entre a infecção e o aparecimento dos sintomas clínicos da gripe (2 a 3 dias), inicia-se ativação da resposta imune inata. Nesta etapa, atuam principalmente citocinas/quimiocinas, além de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que reconhecem RNA viral, como receptores tipo toll (118). Os IFNs do tipo I, por exemplo, vão estimular genes conhecidos como estimulados por interferon (ISG) que estimulam fatores de restrição celular, como proteínas transmembranas induzidas por interferon (IFITMs), que são capazes de bloquear infecções virais, como aquelas por Influenza A e outros vírus (119). O aumento dos níveis de IFITM3 inibem a fusão do envelope viral com a membrana endossomal celular dos hospedeiros, impedindo que as ribonucleoproteínas virais sejam liberadas no citoplasma (120).

As citocinas, liberadas durante a infecção por influenza, geram resposta tecidual pró-inflamatória que recrutam monócitos, linfócitos e células *Natural killers* para o local (121). Essas células vão liberar mais citocinas favorecendo resposta Th1, essencial para imunidade específica. Em adição, a resposta celular pelas células T CD8+ possuem papel chave no *clearance* viral. Ainda, a resposta imune adaptativa humoral leva a produção de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus Influenza, especialmente contra a proteína HA, além daquelas contra a NA.

### **1.2.6 Estratégias de controle da infecção por Influenza**

As infecções por vírus Influenza apresentam um padrão sazonal e disseminam-se principalmente durante o período de inverno. Portanto torna-se possível a sua prevenção através da vacinação da população anualmente. A vacina é um método de prevenção seguro e tem grande impacto na epidemia sazonal de influenza, e consequentemente impacta positivamente na saúde pública.

Atualmente a vacina contra influenza é trivalente, composta basicamente por hemaglutininas dos diferentes tipos de Influenza circulantes, H1N1, H3N2 e FluB. Até o ano passado as cepas que compunham a vacina eram A/California/7/2009 (H1N1), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), e B/Brisbane/60/2008. Esse ano, devido as informações geradas pela vigilância das cepas circulantes, o subtipo H1N1pdm, que permanecia o mesmo desde



seu aparecimento em 2009, foi modificado e a cepa que compõe a nova vacina é A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 (122).

No Brasil, a vacina é gratuitamente oferecida para grupos especiais que inclui idosos, gestantes, crianças menores de 5 anos, profissionais da saúde e indivíduos com doenças crônicas não transmissíveis, imunocomprometidos e outras condições clínicas especiais.

A grande variabilidade genética do vírus Influenza, devido aos mecanismos de *drift* e *shift* gênico, pode dificultar o controle das infecções somente com a vacinação. Afinal o surgimento de uma nova cepa que tenha potencial pandêmico não poderá ser combatido com vacinação, já que a produção de vacinas é um processo longo e com custo elevado (123). Dessa forma, é importante a estratégia de utilização dos antivirais.

Atualmente existem duas classes de antivirais para uso clínico aprovadas pelo FDA, os bloqueadores do canal de prótons M2 e os inibidores de neuraminidase (NAI). Os bloqueadores de M2, conhecidos como adamantanas, foram a primeira classe de anti-influenza (124), entretanto não apresentam atividade contra o vírus Influenza B e o vírus H1N1 pandêmico surgiu resistente naturalmente a essa classe (125). Sendo assim, os inibidores de NA são os utilizados para tratamento clínico, dentre eles o principal é o Oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>).

Os NAI se ligam de forma competitiva ao sítio ativo da NA e impedem a clivagem do ácido siálico e conseqüentemente inibem a liberação dos novos vírus formados, impactando na propagação da infecção (126). Já foram descritas cepas com mutações de resistência aos NAIs tanto vírus influenza sazonal H3N2 (127) como do vírus pandêmico (128), no caso do vírus A(H1N1)pdm09 foram relatados casos de infecções primárias, causadas por vírus resistentes, em indivíduos saudáveis (129).

Existem dois compostos em fase de desenvolvimento capazes de inibir a HA, o arbidol e a flufirvitida-3 (FF-3). O arbidol ainda não está aprovado em países ocidentais, mas já é utilizado na Rússia e China (130, 131). A FF-3 passou por estudo de fase 1 nos Estados Unidos para avaliação de segurança, tolerabilidade e farmacocinética, enquanto o estudo de fase 2, realizado no Reino Unido, avaliou segurança e eficácia (132).

O uso do antiviral está indicado para todos os casos de síndrome respiratória aguda grave e casos de síndrome gripal com fatores de risco para complicações, de acordo com o

Protocolo de Tratamento de Influenza, do Ministério da Saúde. Em todos os casos, o início do tratamento deve ser preferencialmente nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas (133).

### **1.3 Co-infecção HIV-1 /Influenza**

A infecção pelo HIV-1 pode levar a uma ativação crônica do sistema imune, que gera uma resposta policlonal, que reduz a chance de resposta específica contra infecções oportunistas, tornando mais propenso o aparecimento destas infecções (134).

No entanto, é sabido que em pacientes infectados pelo HIV-1 ocorre redução na quantificação do seu RNA plasmático e aumento dos níveis de células T CD4+ durante a coinfeção com certos patógenos, como os vírus do sarampo e dengue, ambos causadores de infecções agudas (135, 136). A infecção por influenza, comumente conhecida como gripe, é uma infecção viral aguda do sistema respiratório. Apesar de ser geralmente uma infecção autolimitada, pode se manifestar sob diferentes formas clínicas, ocasionando desde infecções assintomáticas até infecções graves e morte.

O vírus influenza causa epidemias sazonais anuais, afetando a população geral no mundo inteiro. Sendo assim, a possibilidade de co-infecção entre os vírus influenza e HIV-1, ao longo da vida de um paciente infectado pelo HIV-1, é praticamente 100%. Por ser um patógeno sazonal o impacto da infecção pelo influenza na replicação do HIV-1 poderá ocorrer várias vezes durante a vida de indivíduos HIV positivos.

A replicação do HIV-1 ocorre em diferentes compartimentos anatômicos, tais como o trato gastrointestinal, linfonodos, pulmão e sangue periférico (PB), entre outros, podendo criar vários “santuários” replicativos (137). Enquanto o tecido linfóide associado a trato gastrointestinal (GALT) participa da infecção aguda pelo HIV-1 (138), o papel biológico da replicação do HIV-1 no trato respiratório permanece incerto (139, 140). Como os macrófagos residentes no pulmão são as principais células infectadas por HIV-1 nos pulmões (141, 142) e como este órgão tem uma dinâmica imune única (143-145), infecções oportunistas no trato respiratório poderiam afetar o ciclo de vida do HIV-1.

É possível que, devido à singularidade da resposta imune nos pulmões (143) e da dinâmica do HIV-1 no trato respiratório durante a coinfeção HIV-1/influenza, tanto sinais positivos quanto negativos para a replicação destes vírus possam existir, e o equilíbrio entre

estes sinais pode ditar a história natural dessas infecções (139, 146). Por exemplo, a infecção por influenza atrai monócitos do sangue para o trato respiratório, onde se diferenciam em macrófagos, e induz a produção de citocinas e quimiocinas, como RANTES, Interferons tipo I e TNF- $\alpha$ , envolvidos com a modulação da replicação do HIV-1 nos linfócitos pulmonares (147). O interferon tipo 1, por exemplo, exerce função importante no controle da infecção pelo HIV-1, pois induz a expressão de diferentes fatores de restrição, como por exemplo APOBEC3G e IFITM3, que são capazes de inibir a replicação viral.

O vírus influenza A(H1N1)pdm09 causou 10 vezes mais mortes que o influenza A sazonal (H3N2), principalmente em grupos específicos, como crianças, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos em geral (148, 149). Embora fosse esperado que este cenário fosse ainda mais impactante em pacientes HIV positivos, devido a imunossupressão, isso não foi observado. Surpreendentemente os pacientes infectados pelo vírus HIV-1 e pelo vírus influenza A(H1N1)pdm09 apresentaram desfechos clínicos semelhantes a população geral, um aumento da mortalidade em indivíduos HIV positivos infectados pelo A(H1N1)pdm09 foi verificado somente quando estes já estavam em estágios avançados de Aids (150).

Nesse contexto, um estudo realizado por nosso grupo investigou a biologia do vírus influenza durante a coinfeção com HIV-1, *in vitro* (151). Nesse estudo, demonstramos que uma proteína ativada por interferon, a IFITM3, é induzida pelo HIV-1 ou por sua principal proteína de superfície, a gp120, o que promove acentuada diminuição da replicação do influenza em cultura de células epiteliais. Além disso, o knockdown da IFITM3 preveniu a habilidade do HIV-1 em inibir a replicação do influenza. Sendo assim, esse mecanismo pode ter atenuado o curso clínico da infecção pelo influenza em pacientes portadores de HIV-1 durante a pandemia de 2009.

Esses fatos, em conjunto, sugerem que durante a co-infecção por HIV-1 e influenza possam existir mecanismos envolvidos com a inibição da replicação desses patógenos.

### **1.3.1 Vacinação contra Influenza em pacientes HIV-1 positivos**

A vacinação de pacientes HIV-1 positivos é de extrema importância, por serem considerados indivíduos imunocomprometidos, especialmente na ausência de antirretrovirais, os pacientes tem risco maior de apresentarem sintomas mais severos de doenças preveníveis

por vacinas (152), além de ser um importante fator de prevenção de infecções oportunistas e manutenção da saúde.

As vacinas podem ser inativadas, que são bastante seguras e com vírus atenuados, que envolve outros aspectos nos casos dos indivíduos imunocomprometidos. A condição do sistema imune dos portadores do HIV-1 pode levar a uma resposta imune modificada frente aos estímulos vacinais, daí a importância da escolha do esquema mais apropriado de vacinação, assim como o momento certo durante a infecção, o contexto epidemiológico, idade, carga viral, contagem de células T CD4+, entre outros (153). Embora alguns estudos mostrem que alguns indivíduos imunocomprometidos possam não apresentar resposta humoral satisfatória após a vacinação, a eficácia na maioria dos pacientes justifica a imunização.

No que diz respeito ao melhor momento, a resposta imune às vacinas logo após a infecção pelo HIV, durante a fase aguda, é semelhante a população geral. Com a progressão da infecção, a resposta imune diminui e o risco e a gravidade das infecções aumentam. A administração das vacinas, especialmente com vírus atenuado, vai estar sempre condicionada a análise individual de risco-benefício e não deverá ser realizada em casos de imunodepressão grave (153).

Uma das preocupações a respeito da vacinação em pacientes HIV-1 ocorre devido ao fato da ativação do sistema imune ser importante para a patogênese da infecção e conseqüentemente, a ativação do sistema imune pela vacinação, poder acelerar a progressão da doença. A ativação das células T CD4+, por resposta ao estímulo antigênico, as torna mais susceptíveis a infecção pelo HIV e conseqüentemente ao aumento da replicação viral. Sendo assim, a grande preocupação sobre a vacinação desse grupo ocorre porque, em geral, a vacinação, especialmente com adjuvante, pode promover um *boost* do sistema imune do indivíduo que pode levar a ativação de linfócitos T CD4+ e conseqüente aumento da carga viral.

Durante a pandemia de influenza em 2009 foi recomendação internacional a priorização da vacinação dos grupos de risco. Indivíduos HIV positivos podem apresentar maior risco de complicações oriundas de uma infecção por influenza, por isso a importância na vacinação desse grupo (154, 155). No entanto, observou-se que os níveis de soroconversão

após a vacinação de influenza entre indivíduos HIV-1 positivos foram mais baixos, quando comparados ao da população geral (156, 157).

Nesse contexto, em 2012, nosso grupo em colaboração com o INI, avaliou uma alternativa no esquema de vacinação, comparando o efeito de duas doses únicas e duas doses duplas da vacina em pacientes portadores do HIV-1(158). O objetivo do estudo foi avaliar a segurança, imunogenicidade e a persistência da resposta imune após a vacinação adjuvada, com dose simples ou dupla. O estudo mostrou que a soroconversão aumentou significativamente, após a segunda dose nos dois esquemas de vacinação, tanto simples como dupla, mas o esquema de duas doses duplas apresentou uma resposta ligeiramente melhor. Entretanto, o fato mais curioso observado no estudo, foi que a vacinação (adjuvada) com o antígeno do influenza, no caso a hemaglutinina, reduziu ou manteve a carga viral dos pacientes HIV inalterada.

## 2 OBJETIVOS

### Justificativa

Em 2009, durante a pandemia de influenza, foi observado que pacientes HIV apresentaram desfecho clínico semelhante a população geral, mesmo sendo considerados imunocomprometidos. Em adição, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que indivíduos HIV vacinados contra influenza apresentaram redução, ou mantiveram a carga viral inalterada, o que não é esperado, tendo em vista que a vacinação pode gerar um boost do sistema imune, com ativação de células T CD4+ e consequente aumento transitório da carga viral.

### Objetivo Geral

Nesse contexto, o objetivo principal do nosso estudo foi avaliar se o vírus influenza, assim como sua principal glicoproteína de superfície, a hemaglutinina são capazes de modular a replicação do HIV-1, *in vitro*.

### Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade da HA em inibir a replicação do HIV-1;
- Investigar o perfil de citocinas produzidos frente a exposição à HA;
- Estudar a participação de fatores de restrição celular na inibição da replicação do HIV-1 pela HA.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo celular

##### 3.1.1 Cultura celular primária

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram utilizados *buffy coat* de doadores saudáveis, cedidos pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Homogeneizou-se o sangue das bolsas (40 mL) e diluiu-se em tampão fosfato salina (PBS- pH 7,4) na proporção de 1:2. As amostras de sangue diluídas foram aplicadas cuidadosamente sobre a solução de Ficoll-Paque TM PLUS,  $d=1,078$  g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences), na proporção de 1:3. Logo após, as amostras foram centrifugadas a  $640 \times g$  por 30 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$  para separação da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e lavadas duas vezes, pela adição de 50 mL de PBS, seguida de centrifugação a  $400 \times g$ , por 10 min a  $20^{\circ}\text{C}$ . Por fim, ressuspendeu-se o precipitado celular em 5 mL de meio RPMI-1640 (Gibco) incompleto e procedeu-se à contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de Tripán para análise da viabilidade celular. PBMCs foram cultivadas em meio RPMI-1640, acrescido de 10% de SBF (Gibco), penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich), em estufa úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Para a realização dos ensaios, o subcultivo destas células foi feito em placa de 96 poços, contendo  $2 \times 10^5$  células/mL por poço.

Para obtenção de macrófagos derivados de monócitos (MDM), após a contagem das PBMCs, as mesmas foram semeadas em placas de 48 poços contendo  $2 \times 10^5$  células por poço, em meio DMEM-HIGH GLYCOSE (Gibco), acrescido de 10% de soro humano (Millipore), em estufa úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 10 dias era obtida a cultura de MDM por aderência ao plástico.

É importante ressaltar que os ensaios com PBMCs e MDM são realizados com no mínimo 3 doadores saudáveis e distintos em virtude da variação na amplitude da replicação do HIV-1, observada entre diferentes doadores.

### **3.1.2 Células de linhagem**

Para realização do ensaio de quantificação do vírus HIV-1, utilizou-se a linhagem celular TZM-BL. Essa célula é uma linhagem de célula HeLa transfectada com vetores para expressar receptores e co-receptores que as tornam permissivas à infecção e replicação dos HIV-1 R5 e X4 trópicos, além de apresentar um promotor para luciferase, que é ativado durante a replicação retroviral pela região LTR do HIV-1. As células foram cultivadas em meio DMEM–HIGH GLYCOSE acrescido de 10% de SBF, penicilina e estreptomicina, incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia anterior ao ensaio, realizou-se o subcultivo destas células em placa de 96 poços, contendo 4 x 10<sup>4</sup> células por poço.

Foi utilizada também a linhagem celular Jurkat, linhagem de linfócitos T derivada da leucemia/linfoma de células T, além de sua variante a J-lat. As células J-lat são Jurkat modificadas que apresentam a região LTR do HIV como promotora do gene GFP, ou seja, quando estimuladas produzem sinal quantificável. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 acrescido de 10% de SBF, penicilina e estreptomicina, incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia anterior ao ensaio, realizou-se o subcultivo destas células em placa de 96 poços, contendo 2 x 10<sup>5</sup> células por poço.

Para crescimento e titulação do vírus influenza foi utilizada a linhagem de células MDCK. MDCKs foram cultivadas em meio DMEM–HIGH GLYCOSE acrescido de 10% de SBF, penicilina e estreptomicina, incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2 Expansão e Titulação Viral**

Os estoques de vírus HIV-1 foram crescidos a partir da cepa CCR5 HIV-1 Ba-L (cedido pelo programa de reagentes NIH AIDS), em diferentes passagens em PBMCs de doadores saudáveis, obtidas pelo método de separação por Ficol (item 3.1.1) e ativadas com fitohemaglutinina.

O título de HIV-1 foi quantificado através do sobrenadante da cultura por dois diferentes métodos independentes: ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do antígeno p24, conforme o kit comercial (Zeptomatrix), de acordo com as instruções do fabricante e ensaio luminescente em células TZM-bl. No ensaio luminescente, a replicação do HIV-1 nestas células ativa um promotor para expressão de luciferase, que é detectada após a



adição de seu substrato, utilizando o kit “Luciferase Assay System” (Promega) no luminômetro (Optima versão 2.20R2), seguindo as instruções do fabricante.

O vírus A(H1N1pdm09 (CA-07/2009-like) foi expandido em células MDCK, segundo protocolo estabelecido (159). A titulação do influenza foi realizada pelo método de TCID<sub>50</sub>/mL. Assim, células MDCK previamente semeadas em placas de 96 poços, com densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/poço foram expostas a diluições virais seriadas de base 10. Após 72 h de infecção, esses poços foram avaliados seguindo metodologia descrita previamente (159).

### **3.3 Ensaio de exposição celular à proteína de superfície do influenza (infectadas ou não com HIV-1).**

A atividade da HA/vírus influenza A sobre a replicação do HIV-1 foi avaliada a partir da exposição dos diferentes subtipos de hemaglutinina aos diferentes tipos celulares, na ausência ou presença de infecção viral, seguida da análise por quantificação viral, dosagem de citocinas ou quantificação de proteínas.

PBMCs foram infectados com vírus HIV-1 (10 ng/ml) e após duas horas de infecção as células foram lavadas com PBS 1x e semeadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço). Em seguida, as células foram tratadas com diferentes moléculas: HA (100 ng/ml) (Abcam), LPS (100 ng/mL) (Sigma), Anticorpo anti-IL-10R (1 µg/mL) (Sigma), AZT (1mM) (Cedido por Farmanguinhos). Após 5 dias de infecção, o sobrenadante era recolhido para análise da quantificação replicação do HIV-1, dosagem de citocinas e a monocamada era lisada com tampão Ripa para quantificação de proteínas.

Para a quantificação da replicação do HIV-1, o sobrenadante recolhido foi adicionado a cultura de células TZM-bl ( $4 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços). Após 24 h, o sobrenadante foi retirado, a monocamada lavada com PBS 1x e em seguida lisada (30 ul do Tampão de lise - kit Luciferase Assay System). Recolheram-se 20 ul do lisado, que foi semeado em uma placa branca, onde foram adicionados 10 µl do substrato para a enzima Luciferase. Após a adição do substrato, a placa foi lida imediatamente em um luminômetro e os dados obtidos foram analisados para observação dos níveis de replicação do HIV-1. Quanto maior o sinal de luminescência, maior a quantidade de vírus presente.

No caso dos ensaios de exposição que foram realizados sem a infecção, as células eram expostas a diferentes tratamentos, e após 24 horas, o sobrenadante era analisado por dosagem de citocinas, e a monocamada lisada para quantificação de proteínas.

### **3.4 Dosagem de citocinas:**

A secreção de diferentes citocinas foi quantificada nos sobrenadantes de culturas de células PBMCs e de macrófagos humanos derivados de monócitos infectados ou não com HIV-1, e tratados com a hemaglutinina do vírus influenza. Esta quantificação foi realizada através do método de ELISA, com os kits R&D Dual Set ou BD de acordo com a citocina analisada, seguindo as recomendações dos fabricantes.

### **3.5 Citometria**

Esse ensaio foi realizado com cultura de células J-lat, estimulada por 24 horas com HA e TNF- $\alpha$ , como controle de ativação da replicação. Em seguida as amostras foram passadas em citômetro (FacsCalibur BD), para análise dos níveis do GFP produzidos, após os diferentes estímulos.

### **3.6 Immunoblotting para APOBEC3G.**

Foi realizado o ensaio de immunoblotting contra a proteína APOBEC3G, para quantificar seu conteúdo em PBMCs submetidos a infecção experimental pelo HIV-1 ou a exposição a diferentes tratamentos. Culturas de PBMCs foram infectadas pelo HIV-1, durante 5 dias, ou expostas por 24 horas a tratamentos diversos com hemaglutinina. As células foram lisadas e 20 a 30  $\mu$ g de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, e transferidas para membrana. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra APOBEC3G (Sigma-Aldrich) overnight. Após esse período, uma nova incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi realizada. Este sistema produz quimioluminescência, revelada no equipamento Odyssey. Todas as imagens tiveram sua densitometria quantificada pelo programa ImageJ 1.6.0 e normalizada através da quantificação da proteína de citoesqueleto celular,  $\beta$ -actina.

### **3.7 Análise estatística**

Todos os experimentos foram analisados por teste T de *student* para obtenção do valor de p, utilizando o programa GraphPad Prism 5. É importante ressaltar, que nos ensaios que foi utilizada cultura de células primárias foram analisados, pelo menos, três doadores saudáveis distintos, devido a variação de amplitude de resposta, observada nos diferentes doadores.

## 4 RESULTADOS

Como dito anteriormente, dois trabalhos realizados pelo nosso grupo em colaboração com o Instituto Nacional de Infectologia (INI) avaliaram o esquema de vacinação (monovalente ou trivalente), simples ou dupla contra influenza em uma coorte de pacientes portadores de HIV-1 (158, 160).

A grande preocupação sobre a vacinação desse grupo ocorre porque em geral a vacinação, especialmente com vacina adjuvada, pode promover um *boost* do sistema imune do indivíduo. Essa resposta imunológica leva a ativação de linfócitos TCD4+ e consequente aumento da carga viral. Entretanto, dados obtidos com o primeiro estudo (158) mostraram um fato curioso, que a vacinação, composta pelo principal antígeno da influenza, no caso a hemaglutinina, reduziu ou manteve a carga viral da maioria dos pacientes portadores do HIV inalterada.

Durante esses estudos, foram obtidas diferentes informações sobre os participantes, por exemplo, carga viral, data de diagnóstico, título de inibição da hemaglutinação pré vacinação, uso de antirretroviral. Dentro desse contexto, nós buscamos analisar as informações referentes a carga viral da coorte dos pacientes, que retornaram para a segunda fase do estudo, antes e depois da vacinação contra influenza. A fim de entender essa relação entre a redução da carga viral e a vacinação, foram descartados possíveis fatores confundidores que incluem, por exemplo, terapia antirretroviral e contagem de células T CD4+. Ao avaliarmos as informações, observamos que a maior parte dos indivíduos estava em tratamento antirretroviral ou tinha indicação para início do tratamento, pois apresentava número de células T CD4+ menor que 350 (cel/mL), o que era preconizado na época do estudo. É importante ressaltar, que hoje a política de medicamento do Brasil envolve tratamento para qualquer indivíduo com diagnóstico, independente da contagem de células. No entanto, mesmo em tratamento, muitos pacientes não apresentavam supressão viral (carga viral  $\leq 25$  cópias/mL), o que seria esperado após terapia correta com antirretrovirais.

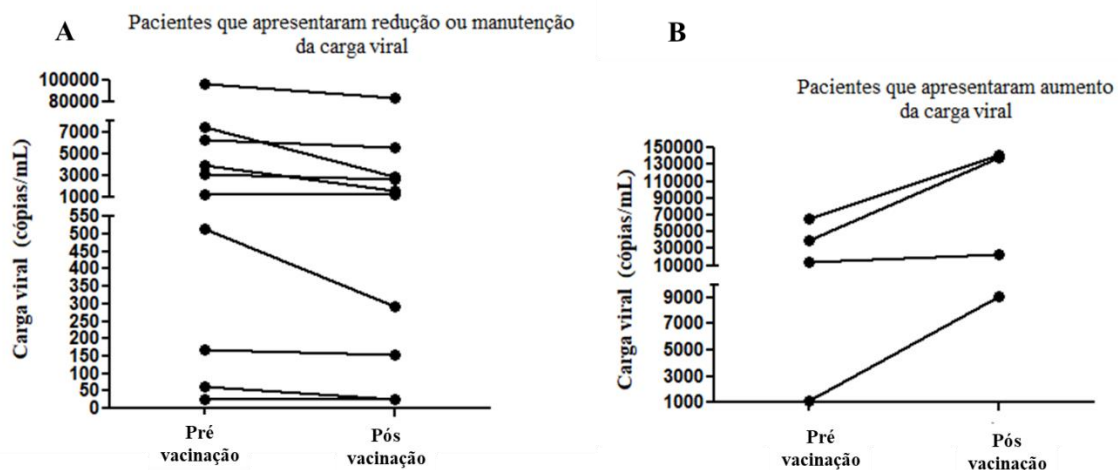
Seguindo a análise, optamos por selecionar somente aqueles que não estavam em terapia antirretroviral. Dessa forma, reduzimos nosso total de participantes de 131 para 14 indivíduos (**Tabela 3**). O próximo passo envolveu selecionar somente aqueles que apresentavam contagem de células T CD4+  $>350$  (cel/mL), no entanto todos os previamente

selecionados tinham contagem acima de 350 (cel/mL), o que confirma nossa seleção já que provavelmente essa é a razão de não estarem em TARV. Em seguida avaliamos se apresentavam carga viral detectável segundo a técnica padrão utilizada ( $\geq 25$  cópias/ml), afinal nosso objetivo era analisar a carga viral após a vacinação, e os mesmo 14 indivíduos permaneceram na análise. O total obtido, então, foram 14 indivíduos, dos quais 10 apresentaram redução ou mantiveram a carga viral inalterada, e somente quatro apresentaram aumento da carga viral. Dentre os dez, calculamos a porcentagem de inibição baseada na carga viral referente ao dia pré e pós vacinação e obtivemos desde 0%, ou seja, manteve a carga viral inalterada até inibição de 60%, ou seja redução da carga viral (**Figura 18**).

**Tabela 3: Análise da carga viral dos indivíduos HIV vacinados contra influenza.**

Foram selecionados somente os indivíduos que não estavam em TARV, apresentavam carga viral detectável ( $>25$  cópias/mL) e tinham contagem de células T CD4+  $>350$  (cel/mL). Em seguida, foi calculado o percentual de inibição a partir da carga viral da pré vacinação e pós vacinação e observamos que somente 4 ( $<30\%$ ) pacientes apresentaram aumento da carga viral pós vacinação. \*No estudo original, para comparação entre os valores pré e pós vacinação, a variação acima de meio log foi considerada significativa.

Código do paciente	Idade	CD4_pré vacinação	CD4_pós vacinação	CV_pré vacinação	CV_pós vacinação	% inibição CV_pré x CV_pós	Diferença (log) entre Pré e Pós*
2.034	42	1.018	746	167	155	<b>7,186</b>	1,079
2.037	55	1.211	1.003	25	25	<b>0,000</b>	-
2.057	33	685	726	6.315	5.628	<b>10,879</b>	2,836
2.068	55	479	457	1.109	9.079	-718,665	-
2.124	37	567	524	96.896	83.574	<b>13,749</b>	4,124
2.139	39	1.194	1.634	514	291	<b>43,385</b>	2,348
2.161	34	429	367	3.181	2.724	<b>14,367</b>	2,659
2.191	25	456	446	39.970	138.528	-246,580	-
2.197	41	1.248	521	7.462	2.906	<b>61,056</b>	3,658
2.241	35	441	1.196	61	25	<b>59,016</b>	1,556
2.264	41	732	443	1.314	1.307	<b>0,533</b>	0,845
2.289	43	497	385	3.963	1.574	<b>60,283</b>	3,378
2.307	41	535	854	14.630	22.978	-57,061	-
2.312	35	497	647	65.448	140.612	-114,845	-



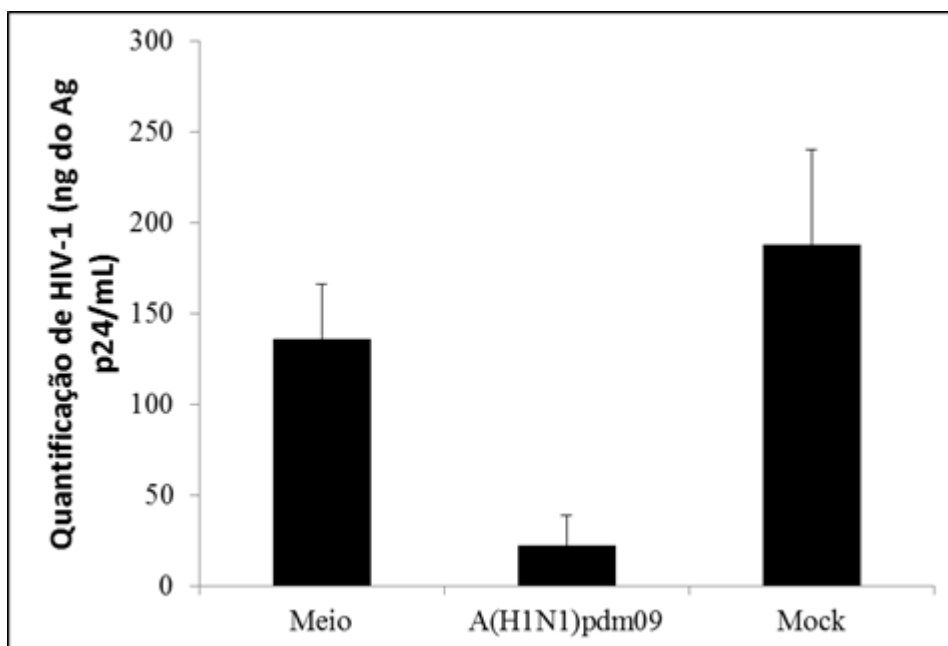
**Figura 18: Representação da carga viral dos pacientes HIV pré e pós vacinação contra influenza.** Para análise dos 131 pacientes da coorte foram utilizados os critérios: exclusão dos indivíduos em TARV e contagem de células T CD4+ > 350 (cel/mL) no dia pré vacinação, o que selecionou 14 indivíduos. No gráfico A podemos observar os pacientes que apresentaram redução ou mantiveram a carga viral inalterada pós vacinação, enquanto no gráfico B observamos os pacientes que apresentaram aumento da carga viral após a vacinação.

Vale destacar que mesmo ao realizarmos uma análise menos minuciosa, ou seja, não retiramos nenhum efeito confundidor, e consideramos todos os indivíduos, aproximadamente 90% da coorte total manteve ou reduziu a carga viral após 21 dias de vacinação.

Tendo em vista essa análise da coorte, observamos que a vacinação antiinfluenza, composta pelas diferentes hemaglutininas (H1 e H3 do Influenza A e HA do Influenza B) do vírus, pode reduzir ou manter a carga viral do paciente inalterada.

Diante da evidência clínica fomos avaliar o efeito da exposição ao vírus influenza sobre a replicação do HIV-1. Para tal, após 10 dias de infecção com HIV-1, MDM foram incubados com o A(H1N1)pdm09 por 3 dias. Então, os sobrenadantes das culturas foram coletados para avaliação da replicação do HIV-1 por ELISA. É importante ressaltar que o influenza não estabelece infecção produtiva em MDM, havendo uma queda da infecciosidade do seu inóculo nestas culturas em 3 dias pós infecção, e no MOI utilizado (MOI 5), a viabilidade das células infectadas permaneceu inalterada. Observamos que a replicação do HIV-1 em MDM é inibida em 75 % quando estas células são expostas ao influenza pandêmico (**Figura 19**). Como os vírus influenza utilizados neste experimento foram expandidos em culturas de MDCK, como controle, utilizamos o meio condicionado destas

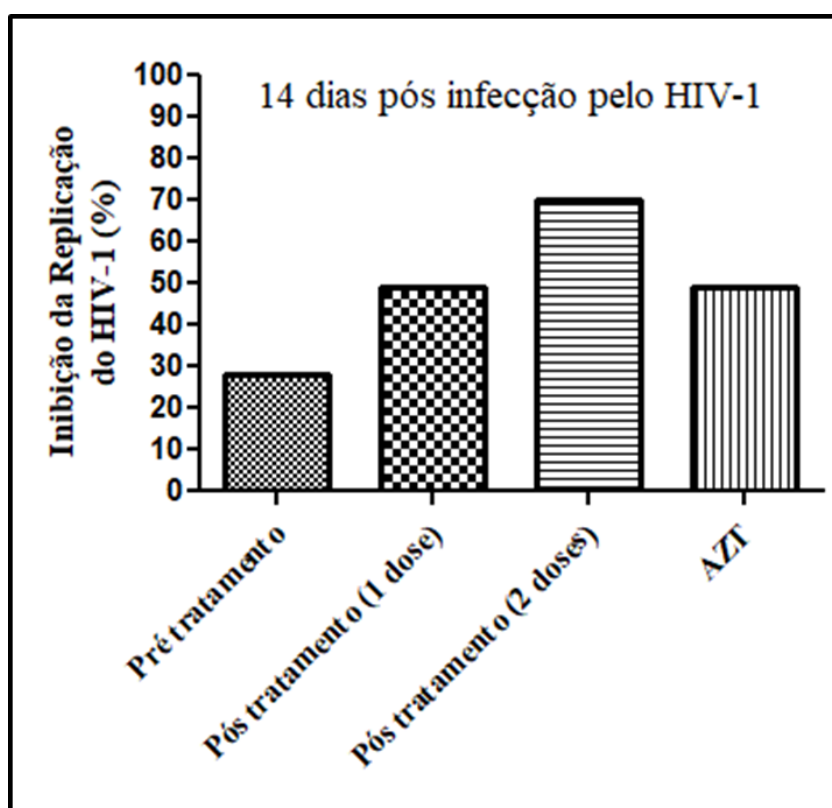
culturas sem vírus (Mock), a fim de certificar que o efeito de inibição foi resultado da exposição ao vírus e não de outras possíveis moléculas secretadas pela cultura.



**Figura 19- Efeito da exposição ao A(H1N1)pdm09 sobre a replicação do HIV-1 em cultura de MDM.** Culturas de MDM foram infectadas com HIV-1 (10 ng/mL). Após 10 dias, foram expostas ao A(H1N1)pdm09 (MOI 5) ou ao seu Mock por 3 dias. O sobrenadante foi coletado para quantificação do título do HIV-1 por ELISA. (n=3 doadores)

Mesmo não apresentando infecção produtiva em MDM, o vírus influenza foi capaz de inibir a replicação do HIV-1. Tendo em vista o efeito da vacina antiinfluenza na redução da carga viral, fomos investigar o potencial da sua principal proteína de superfície, a hemaglutinina, que compõe a vacina anual, em inibir a replicação do HIV-1. Para isso, o ensaio foi realizado sob as condições experimentais, pré-tratamento e pós-tratamento em 1 ou 2 doses com HA (subtipo H1), à infecção pelo HIV-1. No pré-tratamento, as culturas foram expostas à HA (100 ng/mL) durante 24 h, quando foram infectadas pelo HIV-1, e lavadas 12 horas após a infecção. Para as condições de pós-tratamento, as culturas de MDM foram infectadas com HIV-1 e lavadas após 12 h, em seguida tratadas com HA. Para realização do ensaio, 50 % do volume dos sobrenadantes foram trocados a cada 7 dias e, nos experimentos com adição de duas doses da HA, esta foi acrescentada novamente no sétimo dia p.i. pelo HIV-1.

Após este ensaio, o título viral no sobrenadante de MDM foi avaliado através do ensaio luminescente em células TZM-bl. Após 14 da infecção observamos que a HA inibe a replicação do HIV-1 em todas as condições experimentais, entretanto com potências diferentes, o pré-tratamento inibe em 30 % a replicação, o tratamento pós-infecção em única dose inibiu a replicação do HIV-1 em torno de 50 %, conforme esperado, e que o pós tratamento com duas doses promoveu uma inibição da replicação do HIV-1 ainda maior, de 70 % (**Figura 20**). Como controle, utilizamos o AZT, inibidor clássico da replicação do HIV, numa concentração próxima do seu  $IC_{50}$  (1 nM). Esses resultados demonstram o efeito inibitório da HA sobre a replicação HIV-1 e que maiores inibições são atingidas reforçando-se a exposição.



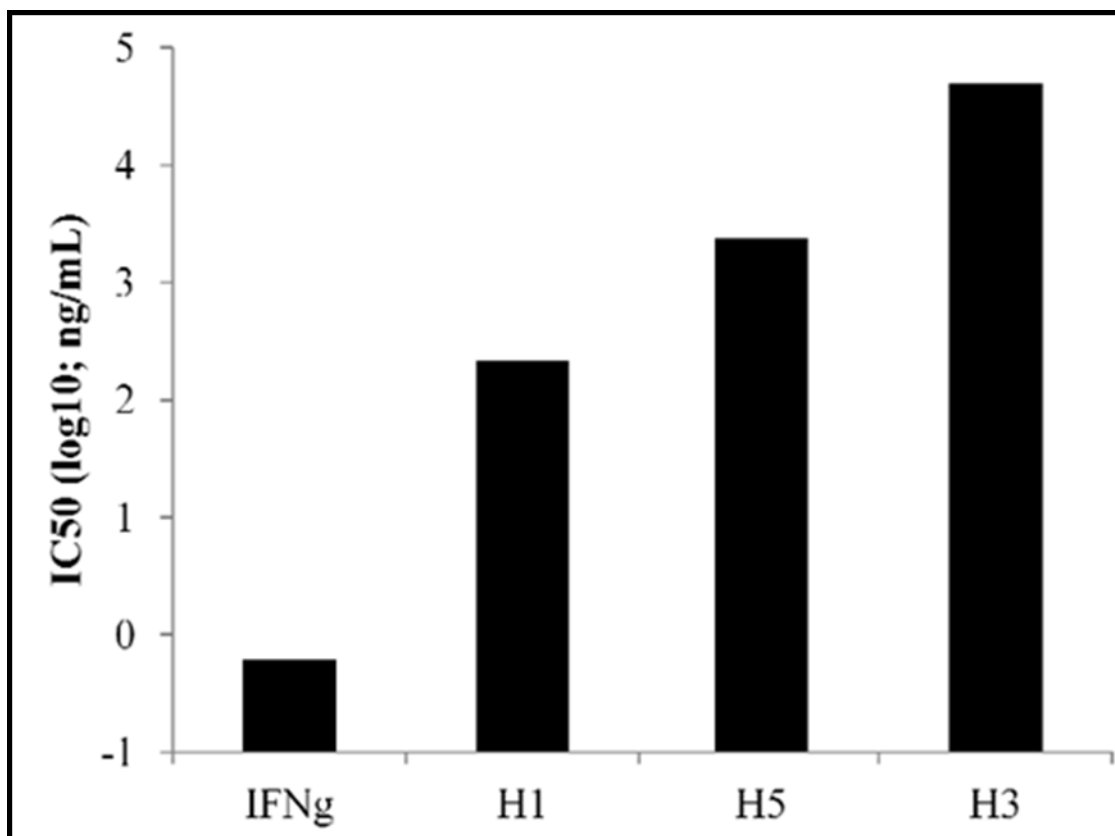
**Figura 20:** A exposição de culturas de MDM à HA em duas condições diferentes de tratamento inibe a replicação do HIV-1. Culturas de MDM infectadas foram expostas à HA na condição de pré e pós tratamento. O pré-tratamento foi realizado 24 h antes da infecção. O pós-tratamento foi feito em dose única (12 horas p.i.) e dose dupla (12 h e 7 dias p.i.). A replicação do HIV-1 foi avaliada 14 dias p.i.

Na infecção humana pelo influenza A existem três subtipos virais que circulam mais nas infecções humanas, formados pelas hemaglutininas H1, H3 e H5. Dessa forma, fomos



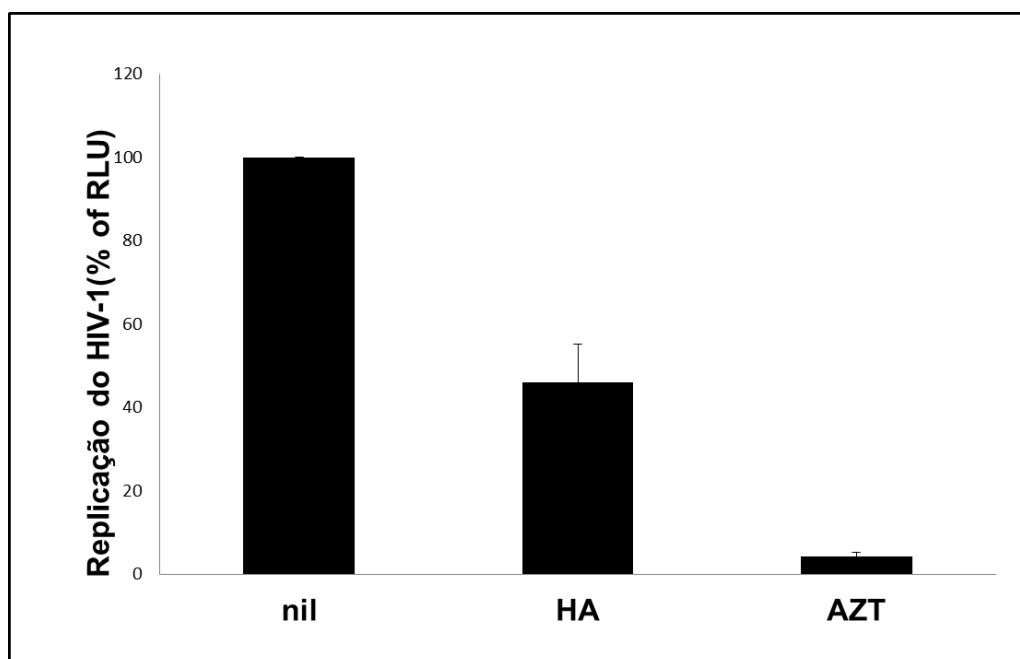
testar o potencial inibitório desses 3 subtipos da HA. Para isso, culturas de TZM-bl foram infectadas com HIV-1 (10 ng/mL) por 1 h e em seguida, expostas aos 3 subtipos de HA (H1, H3 e H5) ou IFN $\gamma$  em diluições semilogarítmicas (500 a 0,02 ng/mL).

Podemos observar na **Figura 21**, através dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração de proteína capaz de inibir em 50% a replicação do HIV-1) em comparação com IFN $\gamma$ , molécula classicamente inibidora da replicação do HIV-1, que H1 apresentou o mais potente efeito inibitório contra o HIV-1, seguida dos subtipos H5 e H3, respectivamente. Sendo assim, concluímos que tanto o vírus influenza como sua proteína de membrana também inibem a replicação do HIV-1. A partir desses resultados selecionamos a proteína H1 para continuar nossos estudos.



**Figura 21: A replicação de HIV-1 é inibida pela exposição aos diferentes subtipos de HA.** Culturas de TZM-bl infectadas com HIV-1 (10 ng/mL) por 24h foram tratadas com H1, H2, H3, em diferentes concentrações, ou IFN $\gamma$ . A inibição da replicação foi medida por ensaio de luminescência. Observamos que todas as HAs inibem a replicação do HIV-1 com diferente potência, sendo a H1 a que apresenta menor valor de IC<sub>50</sub>.

Levando em consideração o fato das células T CD4+ serem o principal alvo do HIV-1 e que a HA presente na vacina antiinfluenza tem maior chance de atuar nessas células quando infectadas pelo HIV, avaliamos o efeito da HA na replicação do HIV-1 em PBMCs de doadores saudáveis. PBMCs infectados com HIV-1 (10 ng/ml) foram tratados com HA e AZT, como controle da inibição (concentrações baseadas em seus valores de IC<sub>50</sub>). Após cinco dias de infecção o sobrenadante foi recolhido e os títulos virais analisados, através do ensaio de leitura de luminescência em células TZM-bl. A partir desse ensaio, confirmamos que o tratamento com HA, assim como AZT, inibiram a replicação do HIV-1 em PBMCs (**Figura 22**).

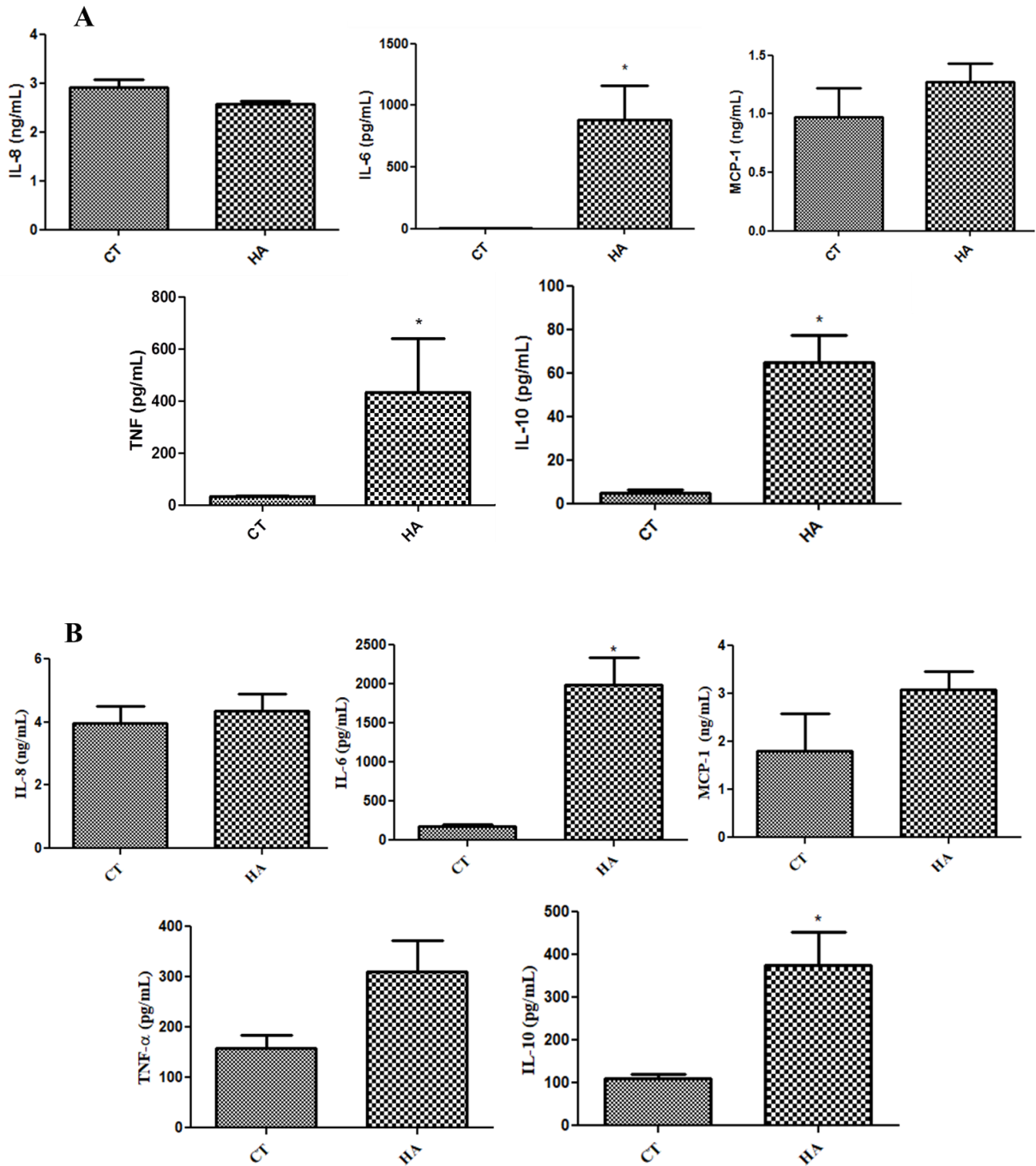


**Figura 22: A HA inibe a replicação do HIV-1 em cultura de PBMC.** PBMCs foram infectados com HIV-1 (10 ng/mL) e tratados com HA (100 ng/mL) e AZT (1 nM), o composto de referência. Foi observado após 5 dias de infecção que a exposição a HA reduziu quase 60% da replicação do HIV-1 quando comparada as células não tratadas e tratadas com AZT. (n= 5 doadores)

Baseado as características da HA, fomos explorar seu possível efeito imunomodulatório sobre a inibição da replicação do HIV-1. Nesse contexto, as citocinas são fatores que conhecidamente possuem uma ampla influência sobre a modulação da replicação do HIV-1. Seus efeitos podem ser inibitórios, estimulatórios ou ambos. Dentre as citocinas capazes de favorecer a replicação do HIV-1 destacam-se: TNF- $\alpha$ , que estimula a transcrição de mRNA viral (161); IL-6, que potencializa o efeito do TNF- $\alpha$  sobre a replicação do HIV por

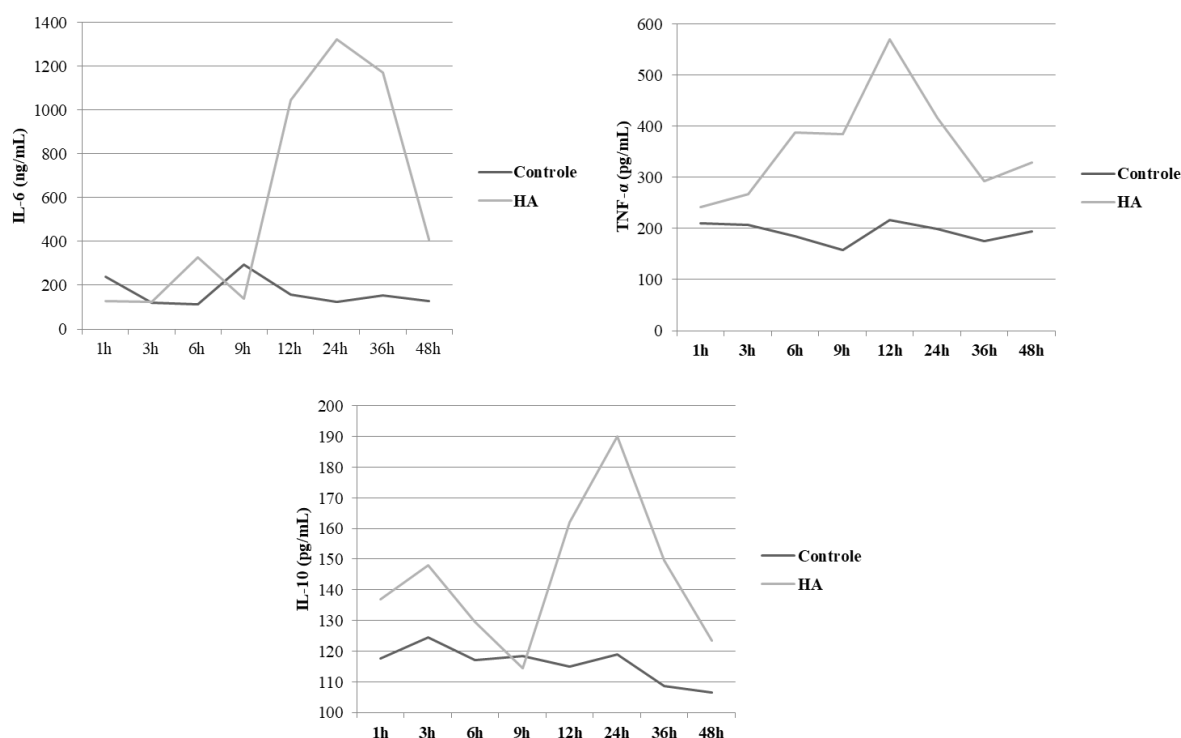
estimular a indução de NF- $\kappa$ B (162). Em contrapartida, as citocinas classicamente descritas por inibirem a replicação do HIV-1 são: interferons do tipo 1, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que possuem uma grande atividade inibitória da replicação viral e IL-10, que inibe a replicação viral, mesmo em estágios precoces da infecção, e tem seu efeito relacionado a sua capacidade de modular negativamente IL-6 e TNF- $\alpha$  (163, 164).

A fim de entender os efeitos da exposição da HA sobre a biologia celular realizamos um ensaio de dosagem de diferentes citocinas, em sobrenadantes de cultura de macrófagos e PBMCs tratados com HA por 24 h, através da técnica de ELISA, utilizando um kit comercial (BD e RD). A partir dos resultados gerados, observamos que, apesar da HA induzir uma sinalização em macrófagos, levando ao fenótipo inflamatório, com indução de TNF- $\alpha$  ( $p=0,0163$ ) e IL-6 ( $p=0,0009$ ), também promove o aumento dos níveis de IL-10 ( $p=0,0004$ ), que estaria mais associado a um perfil regulatório (**Figura 23A**). Da mesma forma, HA promoveu aumento significativo de IL-6 ( $p=0,0066$ ) e IL-10 ( $p=0,0158$ ) em PBMCs, e sugere leve aumento de TNF- $\alpha$  ( $p=0,0913$ ), apesar de não ser estatisticamente significativo (**Figura 23B**).



**Figura 23: Ensaio de dosagem de diferentes citocinas em macrófagos (A) e PBMCs (B) tratados com HA por 24 horas.** Na figura A observamos um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, assim como aumento dos níveis de citocinas regulatórias, como IL-10, enquanto na figura B aumento significativo de IL-6 e IL-10. (\* $p < 0,05$ ,  $n = 3$  doadores).

Em seguida, a fim de confirmar esse perfil de citocinas realizamos um ensaio de cinética em PBMCs de doadores saudáveis tratados com HA. PBMCs foram expostos a HA, na concentração equivalente ao seu IC<sub>50</sub>, o sobrenadante da cultura foi coletado em diferentes horários e a dosagem de citocinas foi realizada através da técnica de ELISA, utilizando um kit comercial (**Figura 24**). Nesse ensaio observamos inicialmente um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , seguido de IL-6, sugerindo um perfil pró-inflamatório e posterior aumento dos níveis de IL-10 sugerindo um perfil regulatório. TNF- $\alpha$  e IL-6 são classicamente associados ao aumento da replicação do HIV-1, portanto o efeito inibitório da HA possivelmente está associado ao aumento de IL-10.

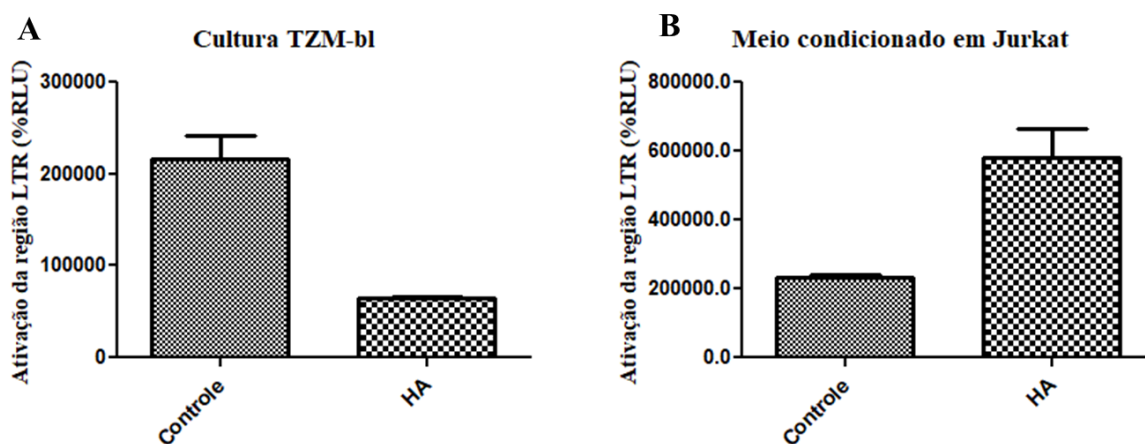


**Figura 24: Ensaio de cinética enzimática para dosagem de citocinas em PBMCs tratados com HA.** PBMCs de doadores saudáveis foram expostos a HA (100 ng/mL) por diferentes tempos. Em seus sobrenadantes foram dosados os níveis de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 e regulatória como IL-10.

Esse efeito contrário sobre a replicação do HIV-1, ou seja, TNF- $\alpha$  promovendo o aumento da replicação enquanto a IL-10 desempenharia papel na inibição da replicação do HIV-1 nos levaram a investigar a possibilidade de a exposição à HA poder ser utilizada na estratégia “Shock and Kill”. Essa estratégia busca a cura da infecção através do despertar dos vírus latentes das células reservatórios. A exposição à HA poderia levar ao aumento dos

níveis de TNF- $\alpha$  que poderia atuar, despertando o vírus latente nos reservatórios e, em seguida, a IL-10 atuaria com o efeito de inibição da replicação, juntamente com a terapia antirretroviral.

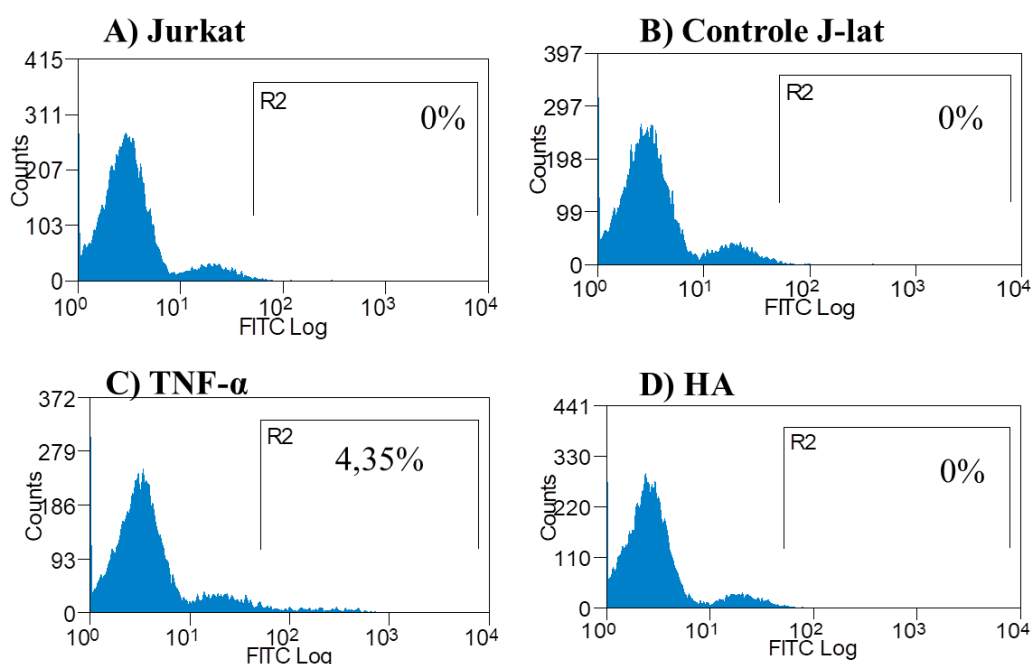
Sendo assim, fomos avaliar a possibilidade da HA em ativar a região LTR do HIV-1. Para isso, utilizamos inicialmente como modelo a linhagem de células TZM-bl e dividimos o ensaio em duas partes: o primeiro envolvia o tratamento direto das células TZM-bl com a hemaglutinina por 24 horas, seguido da leitura em luminômetro, através do kit da luciferase; o segundo envolvia o tratamento prévio de células Jurkat com HA por 24 horas, seguido da exposição das células TZM-bl por 24 h ao meio condicionado retirado da cultura de células Jurkat, para posterior quantificação do estímulo. (**Figura 25**). Esse ensaio nos mostrou que o tratamento com o meio condicionado das células Jurkat sugere aumento da ativação da região LTR, quando comparada com o controle, enquanto o tratamento direto das células TZM-bl com HA não ativou o promotor do HIV. Esse resultado nos leva a pensar que a exposição a HA provavelmente não tem atuação direta sobre o promotor e precisa de outras moléculas liberadas especificamente pelo tipo celular que alberga o vírus.



**Figura 25: Tratamento com HA poderia ativar a região LTR do HIV-1 em células TZM-bl.** Células TZM-bl que apresentam a região LTR do HIV-1 como promotora do gene da luciferase foram tratadas por 24h diretamente com HA e com meio condicionado do tratamento da Jurkat com HA. O tratamento com meio condicionado sugere aumento da ativação da região LTR quando comparada com controle ( $p=0,053$ ).

Em seguida, a fim de confirmar o possível potencial da HA na reativação da latência do HIV, nós optamos por realizar um experimento com outro tipo celular, utilizado como modelo para ativação da latência. Nós escolhemos as células J-lat, que são células Jurkat

modificadas, que apresentam em seu genoma o a região LTR do HIV-1, como promotora do gene para codificar GFP. As células foram tratadas com HA na concentrações do seu IC<sub>50</sub>, por 24 horas. Posteriormente, as células foram analisadas através de citometria. Nesse caso, a quantidade de GFP presente estaria relacionada a ativação da região LTR, e consequentemente a reversão da latência. Entretanto, o resultado não foi exatamente o esperado, afinal não encontramos diferenças entre as células não tratadas e as expostas a HA, somente encontramos um pequeno aumento nas células tratadas com o controle TNF- $\alpha$ , clássico ativador da replicação viral (**Figura 26**).



**Figura 26: Tratamento com HA não ativa a região LTR do HIV-1 no modelo de células J-lat.** As J-lat foram tratadas por 24 h com HA e TNF- $\alpha$ , como controle de ativação da replicação viral. A ativação da região LTR foi medida pelos níveis de GFP por citometria. Observamos que o tratamento com HA não ativou a região LTR, enquanto o tratamento com TNF- $\alpha$  mostrou um leve aumento da ativação.

Dessa forma, até o momento nossos resultados demonstram que a exposição de PBMCs e macrófagos à HA leva ao aumento dos níveis de IL-10 e TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  ativa a região LTR em células produtoras de vírus, como observado nos ensaios com cultura de TZM-bl, que apresenta ativação basal da região LTR mesmo na ausência de estímulo. No entanto, foi insuficiente para ativação da região LTR em um modelo de latência, como observado no ensaio com as células J-lat. Esse fato corrobora o que foi observado no estudo

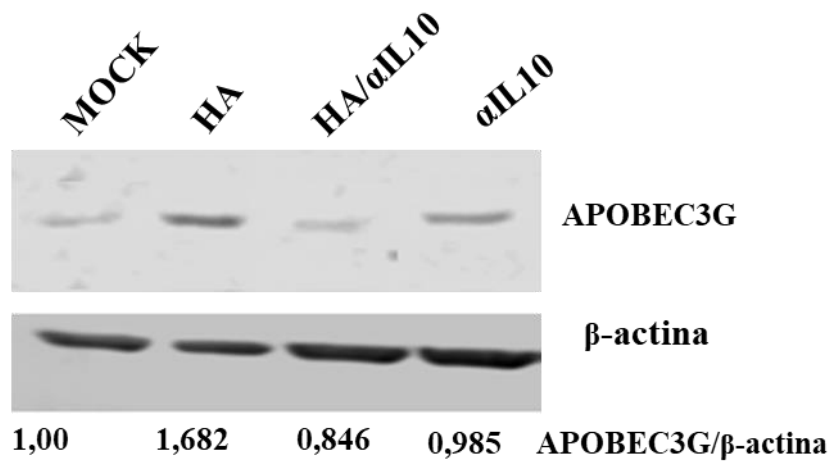
de vacina (Figura 18), no qual 4 dos 14 pacientes analisados apresentaram aumento da carga viral, o que é esperado após a vacinação de pacientes HIV-1.

A IL-10 está associada a inibição da replicação do HIV-1, como foi observado no estudo que avaliou a redução da carga viral nos pacientes HIV-1 vacinados contra influenza (10 dos 14 pacientes analisados, Figura 18), portanto em seguida nós fomos avaliar o efeito da IL-10 na inibição da replicação do HIV-1.

Ainda no contexto da avaliação das citocinas, sabe-se que essas moléculas são responsáveis por estimular uma resposta imune específica ao patógeno responsável pela infecção, como por exemplo, interferon tipo 1 que induz diferentes fatores celulares de restrição ao HIV-1. Em 2009, um estudo demonstrou que culturas de células infectadas com influenza A apresentavam aumento da transcrição de APOBEC3G (165). Dentre os diferentes fatores celulares já descritos, o APOBEC3G é bastante estudado apesar de seu mecanismo de inibição ainda não estar totalmente estabelecido.

Desta forma, fomos investigar se a exposição a HA poderia levar a alteração dos níveis de APOBEC3G da célula. Para isso, culturas de PBMCs, infectadas com HIV-1 (10 ng/ml) por 5 dias, foram expostas a HA (100 ng/mL), e tratadas com anticorpo para o receptor de IL-10 (1 $\mu$ g/mL), tratamento realizado 30 minutos antes da adição da HA. Em seguida, a monocamada foi lisada para obtenção das proteínas, que foram analisadas pela técnica de western blotting. As bandas obtidas foram analisadas por densitometria pelo programa ImageJ software 1.6.0, e comparadas com controle interno pela  $\beta$ -actina (**Figura 27**). Observamos que a exposição a HA aumenta os níveis de A3G, quando comparadas as células não tratadas e infectadas (Mock). Além disso, ao bloquearmos o receptor de IL-10 e tratarmos com HA, o efeito parece ser prevenido, ou seja, a IL-10 parece ter participação no aumento dos níveis de APOBEC3G pela HA.





**Figura 27: A HA aumenta os níveis de APOBEC3G de maneira dependente do receptor para IL-10.** O tratamento com HA de PBMCs infectados com HIV-1, aumentou os níveis de A3G. O bloqueio do receptor de IL-10 previne o efeito de aumento do A3G pela HA. (n=3 doadores)

## 5 DISCUSSÃO

Como discutido anteriormente, durante a pandemia do vírus influenza em 2009, portadores do HIV apresentaram desfecho clínico da infecção por influenza semelhante a população em geral, ou seja, mesmo sendo considerados imunocomprometidos não foram especialmente afetados com o novo subtipo viral. Nesse contexto, o Ministério da Saúde recomenda a vacinação contra influenza de portadores HIV como grupo preferencial, a fim de evitar possíveis complicações causadas pela infecção de influenza.

Em geral, os indivíduos portadores de HIV devem ser vacinados, porém com cautela, pois a vacinação pode ocasionar uma ativação da resposta imune, com aumento de células T CD4+, que conseqüentemente podem levar ao aumento da carga viral. Surpreendentemente, observamos que a vacina contra influenza, composta pela hemaglutinina do vírus, manteve ou reduziu a carga viral da maioria de indivíduos de uma coorte de pacientes portadores do HIV acompanhados pelo INI. Sendo assim, buscamos entender o efeito da HA na replicação do HIV-1, *in vitro*. A partir daí observamos que esse efeito é observado experimentalmente, ou seja, o tratamento com HA inibiu a replicação do HIV-1 em diferentes tipos celulares e em seguida, buscar quais possíveis moléculas poderiam estar envolvidas nessa inibição. Assim, observamos que moléculas clássicas da resposta imune estão envolvidas nessa inibição como a citocina regulatória IL-10 e o fator de restrição viral APOBEC3G.

A IL-10 é uma citocina conhecida como anti-inflamatória/regulatória e tem função classicamente associada na prevenção da resposta inflamatória exacerbada e doenças autoimunes, além de ser uma ferramenta importante na regulação de diferentes infecções, por bactérias, fungos, helmintos. Pode ser expressa por uma vasta fonte de células tanto do sistema imune inato como adaptativo, como por exemplo, células T CD4+, Treg, células T CD8+, células B, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células natural killers.

A atuação da IL-10 na patogênese do HIV é amplamente discutida, porém não está totalmente definida, diferentes grupos estudam a relação entre a doença e a citocina, alguns grupos defendem sua inocência, enquanto outros a julgam culpada. Estudos mostraram que os níveis de IL-10 aumentam com a progressão da doença e diminuem em virtude da terapia antirretroviral (166); que a expressão de IL-10 em indivíduos HIV+ é muito maior que indivíduos não infectados (167); e que os níveis de IL-10 possam estar relacionados

positivamente com a viremia (168). Entretanto, pesquisadores analisaram amostras de sangue de mulheres portadoras do HIV grávidas e mostraram que IL-10 bloqueia a replicação do HIV em células T CD4+ policlonais ativadas (169). Nesse mesmo contexto, recentemente estudos associam a presença de polimorfismos no gene codificador da IL-10 na progressão de doenças. O polimorfismo -592C>A está associada a baixos níveis de produção de IL-10, enquanto que a variante -1082A>G com um aumento em sua produção (170). A variante -592C>A parece estar relacionada com uma progressão mais rápida da doença em estágios mais avançados da infecção pelo HIV-1 (171), enquanto que o polimorfismo-1082A>G parece estar associado ao declínio mais lento das células T CD4+, e ao aumento da sobrevivência em indivíduos portadores do HIV (172), o que sugere que a IL-10 tenha um efeito protetor na progressão da doença.

Finalmente, a via de IL-10 parece ser bastante complexa, e regulada de forma diferente de acordo com os tecidos, o momento da infecção e pode ter efeito pleiotrópico no sistema imune (173).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com HA em diferentes tipos celulares, como macrófagos e PBMCs, leva o aumento dos níveis de IL-10, assim como outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Além disso, o bloqueio do receptor de IL-10 em células infectadas com HIV-1 e tratadas com HA preveniu o aumento dos níveis de A3G, fator de restrição clássica ao HIV-1, não sendo observada a inibição da replicação do HIV-1 pela HA. Esses dados nos mostram a participação da IL-10 nessa imunomodulação da replicação do HIV-1 pela HA, no entanto não nos permite identificar o mecanismo exato pelo qual a inibição acontece.

Um estudo brasileiro demonstrou que em pacientes portadores de HIV idosos, a IL-10 inibe a replicação do HIV-1, através de seu papel regulatório, na diminuição de liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 $\beta$  (174). Nesse estudo, as células T, tanto CD4+ e CD8+, desses pacientes estimuladas com a proteína Env secretavam IL-10 e não expressavam os marcadores FoxP3, todas eram CD152+. O marcador CD152/CTLA-4 é expresso em células T geralmente associadas a um sinal inibitório, restringindo a resposta dessas células. No caso, por exemplo, das células Treg a ausência do receptor CD152 também leva a resposta imune exacerbada e aumento da proliferação celular (175). As Tregs denominadas adaptativas liberam IL-10 e sua função supressiva está associada a doenças alérgicas e autoimunes, ou seja, tem relação com controle de resposta imune exacerbada (176). Nos pacientes infectados

pelo HIV a progressão da doença está diretamente relacionada a um estado de hiperativação imune, e nestes casos há uma redução no número e na função das Tregs (177, 178).

Dessa forma, o aumento dos níveis de IL-10 pode estar associado principalmente a regulação inflamatória, representada pelo aumento de TNF- $\alpha$  e IL-6 pela infecção pelo HIV-1. Como dito anteriormente, apesar do sucesso da terapia antirretroviral, os pacientes ainda podem apresentar níveis residuais de inflamação e aumento da ativação imune. Segundo Kwon e colaboradores (2012) (173) a IL-10, produzida principalmente por monócitos e células Treg, tem efeito de desativar a resposta tipo TH1 e reduzir a apresentação de antígeno por regulação negativa de MHC classe II nas APCs, além disso, o bloqueio do receptor de IL-10 resulta na proliferação celular. Nesse contexto, a ativação imune crônica e característica da progressão da infecção pelo HIV, pode estar mais relacionada ao declínio das células T CD4+, via apoptose, do que diretamente a viremia (179). Desta forma, acreditamos que o aumento de IL-10 por exposição a HA possa atuar na regulação inflamatória, assim como no “aumento” das células T CD4+, não necessariamente por aumento da proliferação celular, mas talvez por controle da morte e manutenção das células pré existentes.

Corroborando essa hipótese, um estudo recente descreveu indivíduos infectados que, apesar de apresentar níveis elevados de viremia, tinham perfil de infecção não progressora (180). Esses indivíduos se assemelham aos Sooty Mangabees, primatas que são reservatórios para HIV-2 e diferentes cepas de SIV, que não apresentam a doença e não desenvolvem resposta imune exacerbada, mesmo vivendo com altos níveis de viremia (181). Em humanos, correlacionaram diminuição dos níveis de IL-10 com aumento da ativação celular e rápida progressão para Aids (182, 183). Além disso, controladores de elite, com viremia indetectável, que apresentam níveis elevados de ativação das células T tem menor contagem de células T CD4+(184).

Sendo assim, definir o papel da IL-10 na infecção pelo HIV-1, de forma geral, provavelmente será impossível, pois diferentes fatores podem influenciar sua função, desde o tipo celular produtor, a fase da infecção, o uso de TARV, o perfil inflamatório, e características genéticas do hospedeiro. No caso do tratamento de PBMCs infectados, *in vitro*, com HA do vírus influenza, a IL-10 participa da inibição da replicação do HIV-1.

Como descrito anteriormente, o estudo de Pauli e colaboradores (2009) (165) mostrou que culturas de células infectadas com influenza A apresentaram aumento da transcrição de

APOBEC3G. Esse aumento foi dependente de NF- $\kappa$ B, entretanto não apresentou ação antiviral, ou seja, não promoveu inibição da replicação do influenza. Nossos resultados demonstraram que a exposição a HA leva aumento dos níveis de A3G em cultura de PBMCs, infectados pelo HIV-1 e, no caso dos nossos resultados, o aumento de A3G provavelmente está associado a inibição da replicação viral.

Em humanos, a família APOBEC encontra-se expressa em diferentes tecidos e, além disso, pode ser induzida por mediadores da inflamação, corroborando seu papel como primeira linha de defesa contra vírus. Em adição, um estudo mostrou a atuação de A3G na imunidade adaptativa pela ativação de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTLs). As CTLs são essenciais no controle da infecção pelo HIV e atuam reconhecendo antígenos apresentados por MHC classe I, presente na superfície de células infectadas. Um estudo demonstrou que A3G aumenta o reconhecimento das células infectadas com HIV-1 pelas CTLs (185). Neste trabalho discute-se que vírus hipermutados, editados por A3G, podem expressar proteínas truncadas que representariam uma fonte de antígenos. Afinal, células mutantes para A3G não promoveram a ativação de CTLs, demonstrando que as proteínas truncadas representam a maior fonte de antígeno para ativação de CTLs.

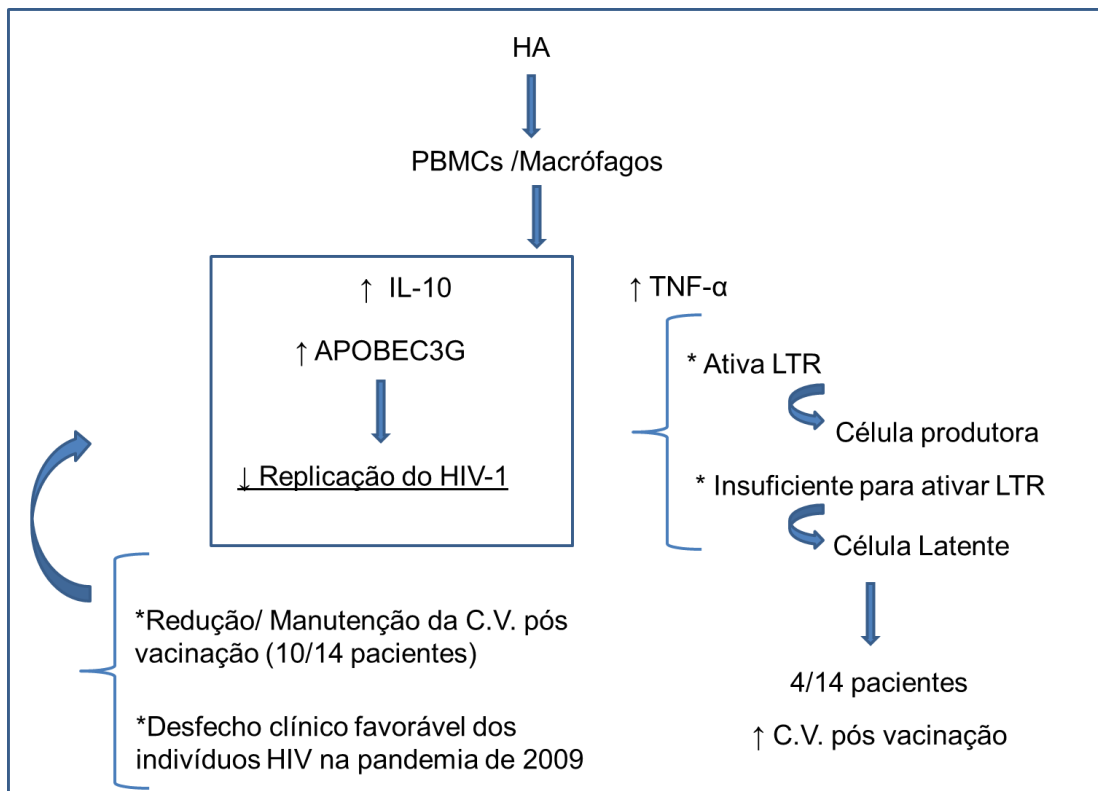
Durante o curso clínico da infecção pelo HIV-1, a fase aguda é caracterizada pelo aumento da viremia com redução transitória dos níveis de células TCD4<sup>+</sup>. A fase aguda é finalizada após a montagem de uma resposta imune que envolve células T CD8<sup>+</sup>. De acordo com esses dados, a hemaglutinina poderia ao aumentar os níveis de A3G, indiretamente, favorecer o reconhecimento das células infectadas pelas CTLs, e conseqüentemente inibir a replicação do HIV-1 por vias diferentes.

Até o momento observamos que a exposição de células, infectadas com HIV-1 ou não, à HA promove aumento dos níveis de APOBEC3G, aumento dos níveis de IL-10 e inibição da replicação do HIV-1. Não sabemos ao certo se há uma ligação entre todos esses efeitos ou se resultam de diferentes mecanismos. Entretanto, acreditamos que independente dos mecanismos, a análise da resposta dos pacientes HIV positivos a vacina antiinfluenza adjuvada que mostrou diminuição da carga viral, assim como desfecho clínico favorável desses indivíduos durante a pandemia de 2009, corroboram nossos achados *in vitro* sobre o potencial modulatório da HA na replicação do HIV-1.

## 6 CONCLUSÕES

Até o momento podemos concluir que a exposição de PBMCs e macrófagos à HA do influenza leva ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10. O TNF- $\alpha$  promove ativação da região LTR do HIV-1 em células produtoras de vírus, como foi visto nos ensaios utilizando a linhagem de células TZM-bl, que apresenta produção basal de ativação mesmo na ausência de qualquer estímulo. Entretanto no modelo de latência, onde foi utilizada a linhagem J-lat a liberação de TNF- $\alpha$  foi insuficiente para ativação da região LTR. Esse cenário pode refletir a análise realizada do estudo de pacientes HIV-1 vacinados contra influenza que apresentaram redução ou manutenção da carga viral, na qual quatro pacientes apresentaram aumento da carga viral após vacinação. Nesse caso, a presença de TNF- $\alpha$  sobrepujou o efeito de inibição da replicação do HIV pela vacina e aumentou a carga viral dos pacientes. Diferentes fatores podem estar relacionados a esse desfecho, como por exemplo, características genéticas do hospedeiro, que não nos cabe definir no momento.

O aumento dos níveis de IL-10 está associado a inibição da replicação do HIV-1 e reprime na maioria dos casos o efeito do TNF- $\alpha$ , clássico ativador da replicação do HIV-1. Esse fato é observado quando analisamos os 10 pacientes HIV-1 que apresentaram redução ou manutenção da carga viral após a vacinação contra influenza. A partir dos nossos resultados, mostramos que a IL-10 participa do aumento dos níveis de APOBEC3G, fator de restrição viral, que culmina na inibição da replicação do HIV-1. Fato esse, que pode ser confirmado pelo desfecho clínico favorável dos indivíduos portadores do HIV-1 durante a pandemia de 2009, mesmo sendo considerados imunossuprimidos (**Figura 28**).



**Figura 28: Esquema representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento do projeto e sua consequente conclusão.**

## **7 OUTRAS PRODUÇÕES DURANTE O DOUTORADO**

**7.1 Influenza virus RNA polymerase may be activated inside the virion to enhance diagnostic sensitivity.**

Carolina Q. Sacramento #, Natalia Fintelman-Rodrigues #, Milene Miranda, Marilda M. Siqueira, Thiago Moreno L. Souza.

# As autoras contribuíram igualmente para este trabalho

Periódicos: O trabalho foi submetido para publicação no periódico Journal of General Virology

**7.2 The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika vírus replication.**

Autores: Carolina Q. Sacramento, Gabrielle R. de Melo, Natasha Rocha, Lucas Villas Bôas Hoelz, Milene Mesquita, Caroline S. de Freitas, Natalia Fintelman- Rodrigues, Andressa Marttorelli, André C. Ferreira, Giselle Barbosa-Lima, Mônica M. Bastos, Eduardo de Mello Volotão, Diogo A. Tschoeke, Luciana Leomil, Fernando A. Bozza, Patrícia T. Bozza, Nubia Boechat, Fabiano L. Thompson, Ana M. B. de Filippis, Karin Brüning e Thiago Moreno L. Souza

Periódico: Scientific Reports. DOI: 10.1038/srep40920 – **Janeiro de 2017.**

**7.3 1,2,3-Triazolyl-4-oxoquinolines: A feasible beginning for promising chemical structures to inhibit oseltamivir-resistant influenza A and B viruses.**

Boechat F da C, Sacramento CQ, Cunha AC, Sagrillo FS, Nogueira CM, Fintelman-Rodrigues N, Santos-Filho O, Riscado CS, Forezi Lda S, Faro LV, Brozeguini L, Marques IP, Ferreira VF, Souza TM, de Souza MC.

Periódico: Bioorg Med Chem. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.11.028 - **2015.**

**7.4 Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm2009 strains found in Brazil are endowed with permissive mutations, which compensate the loss of fitness imposed by antiviral resistance.**



Lopes e Souza TM, Fintelman-Rodrigues N, Resende PC, Mesquita M, Gregianini TS, Bozza FA, Pecego AC, Fernandes SB, Cury AL, Riediger IN, Siqueira MM.

Periódicos: Mem Inst Oswaldo Cruz. DOI: 10.1590/0074-02760140330. **2015**

**7.5 HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion.**

Mesquita M, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, Temerozo JR, Siqueira MM, Bou-Habib DC, Souza TM.

Periódicos: PLoS One. DOI: 10.1371/journal.pone.0101056. **2014.**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981;305(24):1425-31.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-71.
3. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):865-7.
4. Cavallo G, Cavallo R. [Retroviruses: current classification system]. *G Bacteriol Virol Immunol.* 1986;79(7-12):288-94.
5. Goncalves AP, De Sa CA, Rubini N. [HIV/AIDS infection. The Brazilian view. AIDS in Brazil]. *An R Acad Nac Med (Madr).* 1996;Spec No:145-56.
6. Galvao-Castro B, Ivo-Dos-Santos J, Couto-Fernandez JC, Bongertz V, Chequer-Bou-Habib D, Sion FS, et al. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987;82(4):453-6.
7. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:223-48.
8. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(2):143-55.
9. Barre-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet.* 1996;348(9019):31-5.
10. Shanmugam V, Switzer WM, Nkengasong JN, Garcia-Lerma G, Green TA, Ekpini E, et al. Lower HIV-2 plasma viral loads may explain differences between the natural histories of HIV-1 and HIV-2 infections. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;24(3):257-63.
11. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2009;15(8):871-2.
12. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008;358(15):1590-602.
13. Saúde Md. Manual Técnico para Diagnóstico da Infecção pelo HIV. 2017.
14. Alcantara KC, Reis MN, Cardoso LP, Bello G, Stefani MM. Increasing heterosexual transmission of HIV-1 subtype C in Inland Central Western Brazil. *J Med Virol.* 2013;85(3):396-404.
15. Brasil U. Estatísticas - UNAIDS Brasil. @UNAIDSBrasil; 2017.
16. Saúde SdVeS-Md. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2016. 2017.
17. UNAIDS. Ending AIDS: progress towards the 90–90–90 targets. 2017.
18. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700.
19. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory PressCold Spring Harbor Laboratory Press.; 1997.
20. Hottiger M, Hubscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996;377(2):97-120.
21. Brown PO. Integration. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory PressCold Spring Harbor Laboratory Press.; 1997.

22. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:1-25.
23. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 10. England2012. p. 279-90.
24. Petroll AE, Hare CB, Pinkerton SD. The essentials of HIV: a review for nurses. *J Infus Nurs.* 2008;31(4):228-35.
25. Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, et al. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology.* 2007;4:65.
26. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity.* 2007;27(3):406-16.
27. Bartlett JG, Moore R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1999;29(1):50-5.
28. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet.* 2006;368(9534):489-504.
29. Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009;4(10):1363-79.
30. Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol.* 6. United States2005. p. 430-2.
31. Cavarelli M, Scarlatti G. HIV-1 infection: the role of the gastrointestinal tract. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):537-42.
32. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-59.
33. Pandrea I, Silvestri G, Onanga R, Veazey RS, Marx PA, Hirsch V, et al. Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences. *J Med Primatol.* 2006;35(4-5):194-201.
34. Bahia MS, Silakari O. Tumor necrosis factor alpha converting enzyme: an encouraging target for various inflammatory disorders. *Chem Biol Drug Des.* 2010;75(5):415-43.
35. Leghmari K, Bennasser Y, Tkaczuk J, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cell Immunol.* 2008;253(1-2):45-53.
36. Cheung R, Ravyn V, Wang L, Ptasznik A, Collman RG. Signaling mechanism of HIV-1 gp120 and virion-induced IL-1beta release in primary human macrophages. *J Immunol.* 2008;180(10):6675-84.
37. Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature.* 2001;410(6831):988-94.
38. Cheng SM, Li JC, Lin SS, Lee DC, Liu L, Chen Z, et al. HIV-1 transactivator protein induction of suppressor of cytokine signaling-2 contributes to dysregulation of IFN{gamma} signaling. *Blood.* 2009;113(21):5192-201.
39. Salgame P, Guan MX, Agahtehrani A, Henderson EE. Infection of T cell subsets by HIV-1 and the effects of interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18(7):521-8.
40. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb j.* 2004;18(7):816-27.
41. Poggi A, Zocchi MR. HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B. *Clin Dev Immunol.* 2006;13(2-4):369-72.
42. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007;204(2):239-43.
43. Naicker DD, Werner L, Kormuth E, Passmore JA, Mlisana K, Karim SA, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms influence HIV-1 susceptibility and primary HIV-1 pathogenesis. *J Infect Dis.* 2009;200(3):448-52.

44. Krishnan S, Wilson EM, Sheikh V, Rupert A, Mendoza D, Yang J, et al. Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J Infect Dis.* 2014;209(6):931-9.
45. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 1987;317(4):185-91.
46. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(20):7096-100.
47. Magiorkinis E, Paraskevis D, Magiorkinis G, Chryssou S, Chini M, Lazanas M, et al. Mutations associated with genotypic resistance to antiretroviral therapy in treatment naive HIV-1 infected patients in Greece. *Virus Res.* 2002;85(1):109-15.
48. Rodriguez-Arenas MA, Jarrin I, del Amo J, Iribarren JA, Moreno S, Viciano P, et al. Delay in the initiation of HAART, poorer virological response, and higher mortality among HIV-infected injecting drug users in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006;22(8):715-23.
49. Saúde Md. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. In: Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância PeCdIST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, editor. 2017.
50. UANIDS. Get on the Fast-Track — The life-cycle approach to HIV. 2016.
51. Administration F-FaD. HIV/AIDS Treatment - Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. 2017.
52. Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 11. England2013. p. 877-83.
53. Chun TW, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol.* 2015;16(6):584-9.
54. Deeks SG. HIV: Shock and kill. *Nature.* 487. England2012. p. 439-40.
55. Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang HC, et al. Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity.* 2012;36(3):491-501.
56. Graf EH, Pace MJ, Peterson BA, Lynch LJ, Chukwulebe SB, Mexas AM, et al. Gag-positive reservoir cells are susceptible to HIV-specific cytotoxic T lymphocyte mediated clearance in vitro and can be detected in vivo [corrected]. *PLoS One.* 2013;8(8):e71879.
57. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(7):692-8.
58. Cannon P, June C. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(1):74-9.
59. Lim JK, Louie CY, Glaser C, Jean C, Johnson B, Johnson H, et al. Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis.* 2008;197(2):262-5.
60. Kindberg E, Mickiene A, Ax C, Akerlind B, Vene S, Lindquist L, et al. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J Infect Dis.* 2008;197(2):266-9.
61. Diaz-Griffero F, Gallo DE, Hope TJ, Sodroski J. Trafficking of some old world primate TRIM5alpha proteins through the nucleus. *Retrovirology.* 2011;8:38.
62. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E, et al. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature.* 2011;480(7377):379-82.
63. Liberatore RA, Bieniasz PD. Tetherin is a key effector of the antiretroviral activity of type I interferon in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(44):18097-101.

64. Chernomordik LV, Kozlov MM. Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell*. 2005;123(3):375-82.
65. Goujon C, Moncorge O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013;502(7472):559-62.
66. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology*. 2015;479-480:131-45.
67. Koning FA, Newman EN, Kim EY, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Malim MH. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *J Virol*. 2009;83(18):9474-85.
68. Navarro F, Bollman B, Chen H, Konig R, Yu Q, Chiles K, et al. Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology*. 2005;333(2):374-86.
69. Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K, Levin JG. Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J Virol*. 2006;80(12):5992-6002.
70. Newman EN, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol*. 2005;15(2):166-70.
71. Bishop KN, Holmes RK, Malim MH. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol*. 2006;80(17):8450-8.
72. Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J, et al. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol*. 2007;81(13):7238-48.
73. Okada A, Iwatani Y. APOBEC3G-Mediated G-to-A Hypermutation of the HIV-1 Genome: The Missing Link in Antiviral Molecular Mechanisms. *Front Microbiol*. 2016;7:2027.
74. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6895-900.
75. Xu H, Svarovskaia ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebel K, et al. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5652-7.
76. Simon V, Bloch N, Landau NR. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol*. 2015;16(6):546-53.
77. Kim EY, Lorenzo-Redondo R, Little SJ, Chung YS, Phalora PK, Maljkovic Berry I, et al. Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(7):e1004281.
78. Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, Siliciano RF, Blankson JN. Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol*. 2008;82(6):3125-30.
79. Sasada A, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Kobayashi M, Abudu A, Hishizawa M, et al. APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology*. 2005;2:32.
80. Saúde Md. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para profilaxia pré-exposição (PrEP) de risco à infecção pelo HIV. In: Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância PeCdIST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, editor. 2017.
81. Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Campbell JD, Wangisi J, et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N Engl J Med*. 2012;367(5):399-410.
82. Prevention CfDCa. PEP | HIV Basics | HIV/AIDS | CDC. 2017.
83. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):e1003176.

84. White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *J Clin Virol.* 2016;81:31-3.
85. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:499-522.
86. Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol.* 2000;74(24):11538-47.
87. Mikulasova A, Vareckova E, Fodor E. Transcription and replication of the influenza A virus genome. *Acta Virol.* 2000;44(5):273-82.
88. Murti KG, Webster RG. Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy. *Virology.* 1986;149(1):36-43.
89. Ison MG. Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr Opin Virol.* 2011;1(6):563-73.
90. Nakada S, Creager RS, Krystal M, Aaronson RP, Palese P. Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *J Virol.* 1984;50(1):118-24.
91. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657.
92. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1374-85.
93. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1888-97.
94. Shen HQ, Yan ZQ, Zeng FG, Liao CT, Zhou QF, Qin JP, et al. Isolation and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses from chickens in South China from 2012 to 2013. *J Vet Sci.* 2015;16(3):317-24.
95. Wang G, Deng G, Shi J, Luo W, Zhang G, Zhang Q, et al. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. *J Virol.* 2014;88(8):3953-64.
96. Prevention CfDCA. Transmission of Influenza Viruses from Animals to People | Seasonal Influenza (Flu) | CDC 2017 [updated 2017-07-19T06:31:04Z. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm>.
97. CDC CfDCAp-. Types of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. 2017.
98. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 2009;459(7250):1122-5.
99. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2605-15.
100. WHO | Pandemic influenza preparedness and response. WHO. 2014.
101. Organization WH. WHO | Influenza update - 302. WHO: World Health Organization; 2017.
102. Saúde Md. Situação Epidemiológica de influenza SE 40 de 2017. 2017.
103. M PPaS, editor. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. Lippincott Williams and Wilkins: DM Knipe and PM Howley; 2007.
104. Kollerova E, Betakova T. Influenza viruses and their ion channels. *Acta Virol.* 2006;50(1):7-16.
105. Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* 2004;106(2):147-65.
106. Fodor E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol.* 2013;57(2):113-22.
107. Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):590-603.

108. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28403-9.
109. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(6):226-49.
110. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 4:D49-53.
111. Kim JI, Park MS. N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses. *Yonsei Med J.* 2012;53(5):886-93.
112. McHardy AC, Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000566.
113. Settembre EC, Dormitzer PR, Rappuoli R. H1N1: can a pandemic cycle be broken? *Sci Transl Med.* 2010;2(24):24ps14.
114. Organization W-WH. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(4):21-2.
115. Leekha S, Zitterkopf NL, Espy MJ, Smith TF, Thompson RL, Sampathkumar P. Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(9):1071-6.
116. Souza TM, Salluh JI, Bozza FA, Mesquita M, Soares M, Motta FC, et al. H1N1pdm influenza infection in hospitalized cancer patients: clinical evolution and viral analysis. *PLoS One.* 2010;5(11):e14158.
117. SUS SÚdS-. Nota informativa e recomendações sobre a sazonalidade da Influenza em 2017 2017 [Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/414-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/influenza/22873-informacoes-sobre-gripe>.
118. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 2011;162(1-2):19-30.
119. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell.* 2009;139(7):1243-54.
120. Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1004048.
121. Adachi M, Matsukura S, Tokunaga H, Kokubu F. Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by influenza virus A. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;113(1-3):307-11.
122. Saúde Md. Informe Técnico, 19ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza. Coordenações Estaduais de Imunizações; 2017.
123. Organization WH. WHO | Pandemic influenza preparedness and response. WHO. 2009.
124. Couch RB, Kasel JA, Glezen WP, Cate TR, Six HR, Taber LH, et al. Influenza: its control in persons and populations. *J Infect Dis.* 1986;153(3):431-40.
125. Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimov AI, et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1102-10.
126. von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(12):967-74.
127. Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Ballenger K, Nguyen HT, Mishin VP, Sheu TG, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses.* 2010;2(10):2269-89.

128. Pandemic (H1N1) 2009 briefing note 1 Viruses resistant to oseltamivir (Tamiflu) identified. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009;84(29):299-399.
129. Souza TM, Resende PC, Fintelman-Rodrigues N, Gregianini TS, Ikuta N, Fernandes SB, et al. Detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1)pdm2009 in Brazil: can community transmission be ruled out? *PLoS One.* 2013;8(11):e80081.
130. Brooks MJ, Burtseva EI, Ellery PJ, Marsh GA, Lew AM, Slepushkin AN, et al. Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions. *J Med Virol.* 2012;84(1):170-81.
131. Leneva IA, Russell RJ, Boriskin YS, Hay AJ. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 2009;81(2):132-40.
132. Safety and Protective Efficacy of FF-3 Dry Powder in Healthy Subjects Infected With Influenza Challenge Strain - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. 2017. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02423577>.
133. Saúde Md. Protocolo de Tratamento de Influenza. 2015.
134. Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med.* 2007;15(4):114-7.
135. Garcia M, Yu XF, Griffin DE, Moss WJ. In vitro suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by measles virus. *J Virol.* 2005;79(14):9197-205.
136. Mendes Wda S, Branco Mdos R, Medeiros MN. Clinical case report: Dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(5):905-7.
137. Pomerantz RJ. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials.* 2003;4(2):137-43.
138. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77(21):11708-17.
139. Heath L, Fox A, McClure J, Diem K, van 't Wout AB, Zhao H, et al. Evidence for limited genetic compartmentalization of HIV-1 between lung and blood. *PLoS One.* 2009;4(9):e6949.
140. Wagner TA, Tobin NH, McKernan JL, Xu M, Melvin AJ, Mohan KM, et al. Increased mutations in Env and Pol suggest greater HIV-1 replication in sputum-derived viruses compared with blood-derived viruses. *Aids.* 2009;23(8):923-8.
141. Bergamaschi A, Pancino G. Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Retrovirology.* 2010;7:31.
142. Montaner LJ, Crowe SM, Aquaro S, Perno CF, Stevenson M, Collman RG. Advances in macrophage and dendritic cell biology in HIV-1 infection stress key understudied areas in infection, pathogenesis, and analysis of viral reservoirs. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):961-4.
143. Holtzman MJ, Byers DE, Benoit LA, Battaile JT, You Y, Agapov E, et al. Immune pathways for translating viral infection into chronic airway disease. *Adv Immunol.* 2009;102:245-76.
144. Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):13-21.
145. Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):97-106.
146. Herold S, von Wulffen W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, et al. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. *J Immunol.* 2006;177(3):1817-24.



147. Yu WC, Chan RW, Wang J, Travanty EA, Nicholls JM, Peiris JS, et al. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J Virol.* 2011;85(14):6844-55.
148. Barchi E, Prati F, Parmeggiani M, Tanzi ML. Pandemic (H1N1) 2009 and HIV co-infection. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1643-4.
149. Feiterna-Sperling C, Edelmann A, Nickel R, Magdorf K, Bergmann F, Rautenberg P, et al. Pandemic influenza A (H1N1) outbreak among 15 school-aged HIV-1-infected children. *Clin Infect Dis.* 2010;51(11):e90-4.
150. Ormsby CE, de la Rosa-Zamboni D, Vazquez-Perez J, Ablanedo-Terrazas Y, Vega-Barrientos R, Gomez-Palacio M, et al. Severe 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection and increased mortality in patients with late and advanced HIV disease. *Aids.* 2011;25(4):435-9.
151. Mesquita M, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, Temerozo JR, et al. HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. *PLoS One.* 2014;9(6):e101056.
152. Crum-Cianflone NF, Wallace MR. Vaccination in HIV-infected adults. *AIDS Patient Care STDS.* 2014;28(8):397-410.
153. Infectologia SBdIeSBd. Guia de Imunização SBIIm/SBI – HIV/Aids 2016/2017. 2017.
154. Prevention CfDCa. CDC H1N1 Flu | Interim Guidance - HIV-Infected Adults and Adolescents: Considerations for Clinicians Regarding Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus. 2009.
155. Saúde Md. Nota Técnica nº 67/2010\_ Informações sobre a vacinação para H1N1 para quem vive com HIV/aids. 2010.
156. Bickel M, Wieters I, Khaykin P, Nisius G, Haberl A, Stephan C, et al. Low rate of seroconversion after vaccination with a split virion, adjuvanted pandemic H1N1 influenza vaccine in HIV-1-infected patients. *Aids.* 2010;24(9):F31-5.
157. Tebas P, Frank I, Lewis M, Quinn J, Zifchak L, Thomas A, et al. Poor immunogenicity of the H1N1 2009 vaccine in well controlled HIV-infected individuals. *Aids.* 2010;24(14):2187-92.
158. Santini-Oliveira M, Camacho LA, Souza TM, Luz PM, Vasconcellos MT, Giacoia-Gripp CB, et al. H1N1pdm09 adjuvanted vaccination in HIV-infected adults: a randomized trial of two single versus two double doses. *PLoS One.* 2012;7(6):e39310.
159. Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol.* 2006;Chapter 15:Unit 15G.1.
160. Souza TM, Santini-Oliveira M, Martorelli A, Luz PM, Vasconcellos MT, Giacoia-Gripp CB, et al. Immunogenicity and sustainability of the immune response in Brazilian HIV-1-infected individuals vaccinated with inactivated triple influenza vaccine. *J Med Virol.* 2016;88(3):426-36.
161. Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression. *Res Virol.* 1991;142(2-3):233-8.
162. Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med.* 1990;172(1):151-8.
163. Weissman D, Poli G, Fauci AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10(10):1199-206.
164. Naif HM, Chang J, Ho-Shon M, Li S, Cunningham AL. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in differentiating monocytes by interleukin 10 occurs in

- parallel with inhibition of cellular RNA expression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12(13):1237-45.
165. Pauli EK, Schmolke M, Hofmann H, Ehrhardt C, Flory E, Munk C, et al. High level expression of the anti-retroviral protein APOBEC3G is induced by influenza A virus but does not confer antiviral activity. *Retrovirology*. 2009;6:38.
166. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 1999;116(1):115-20.
167. Clerici M, Balotta C, Salvaggio A, Riva C, Trabattoni D, Papagno L, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) phenotype and interleukin-2/ interleukin-10 ratio are associated markers of protection and progression in HIV infection. *Blood*. 1996;88(2):574-9.
168. Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood*. 2009;114(2):346-56.
169. Bento CA, Hygino J, Andrade RM, Saramago CS, Silva RG, Silva AA, et al. IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *Aids*. 2009;23(1):9-18.
170. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*. 1999;30(2):526-30.
171. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14467-72.
172. Erikstrup C, Kallestrup P, Zinyama-Gutsire RB, Gomo E, Butterworth AE, Pedersen BK, et al. Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. *Aids*. 2007;21(17):2283-91.
173. Kwon DS, Kaufmann DE. Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis. *Eur Cytokine Netw*. 2010;21(3):208-14.
174. Andrade RM, Hygino J, Kasahara TM, Vieira MM, Xavier LF, Blanco B, et al. High IL-10 production by aged AIDS patients is related to high frequency of Tr-1 phenotype and low in vitro viral replication. *Clin Immunol*. 2012;145(1):31-43.
175. Krummey SM, Ford ML. Braking bad: novel mechanisms of CTLA-4 inhibition of T cell responses. *Am J Transplant*. 2014;14(12):2685-90.
176. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):227-35; quiz 36-7.
177. Ndhlovu LC, Loo CP, Spotts G, Nixon DF, Hecht FM. FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. 2008;83(2):254-62.
178. KM M. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. In: BTC C, editor. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 2009. p. 184-8.
179. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids*. 2003;17(13):1881-8.
180. Choudhary SK, Vrisekoop N, Jansen CA, Otto SA, Schuitemaker H, Miedema F, et al. Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease. *J Virol*. 2007;81(16):8838-42.
181. Rey-Cuille MA, Berthier JL, Bomsel-Demontoy MC, Chaduc Y, Montagnier L, Hovanessian AG, et al. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol*. 1998;72(5):3872-86.
182. O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet*. 2004;36(6):565-74.

183. Carrington M, Nelson G, O'Brien SJ. Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1. *Immunol Lett.* 2001;79(1-2):131-40.
184. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(1):126-33.
185. Casartelli N, Guivel-Benhassine F, Bouziat R, Brandler S, Schwartz O, Moris A. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med.* 2010;207(1):39-49.