

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Isabella Lima

Thatiany Paslar

**A ESTRUTURA DO HIV E SUA FORMA DE INFECÇÃO
ASSOCIADAS A NOVAS TERAPIAS**

São Paulo

2016

Isabella Lima - SP244989

Thatiany Paslar - SP244982

A estrutura do HIV e sua forma de infecção associadas a novas terapias

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2016

Isabella Lima
Thatiany Paslar

**A estrutura do HIV e sua forma de infecção associadas a novas
terapias**

São Paulo, 30 de maio de 2016

Professor Orientador – Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito

Professor Examinador – Profª Drª Dyana Alves Henriques

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus, pelo dom da vida.

Ao professor e orientador Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito, pelo convívio, apoio, compreensão, incentivo e paciência na orientação que tornou possível a conclusão desta monografia.

A todos os mestres e professores do Centro Universitário São Camilo que contribuíram grandemente para nossa formação acadêmica.

A nossos amigos e amigas, que tornaram esta jornada um pouco menos árdua, alegrando nossos dias com grande entusiasmo.

Dedicamos esta conquista a nossos amados familiares que sempre nos apoiaram. Obrigada pela confiança e paciência!

Sumário

RESUMO EM PORTUGÊS	6
RESUMO EM INGLÊS.....	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	25
3. MÉTODOS	26
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO EM PORTUGUÊS

LIMA, Isabella; PASLAR, Thatiany. **A relevância da estrutura do HIV e sua forma de infecção associadas a novas terapias.** 2016. X f. TCC (Graduação) – Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Introdução: A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é caracterizada por profunda imunossupressão, comprometendo principalmente células TCD4+. O HIV é classificado como retrovírus com genoma RNA, membro da Família Retroviridae, sua estrutura apresenta duas fitas de RNA e três enzimas envoltas por um capsídeo viral. Atualmente, a AIDS é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O Impacto da epidemia já é devastador, acredita-se que mais de 34 milhões de pessoas no mundo vivam com o vírus. Os medicamentos antirretrovirais surgiram na década de 1980, para impedir a multiplicação do vírus no organismo. Eles não eliminam o vírus, porém evitam o aniquilamento completo das células do sistema imune, tornando o indivíduo menos susceptível a doenças oportunistas. Seu uso é fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida do portador do HIV, tornando-a uma doença de característica crônica controlável. **Objetivo:** Realizar revisão bibliográfica por meio de bases de dados sobre o HIV e sua patofisiologia, com enfoque em novas terapias propostas e sua eficácia na cura e erradicação para a síndrome da imunodeficiência adquirida. **Metodologia:** Foi realizada revisão bibliográfica nas principais bases de dados como PubMed, Lilacs e Medline; Bibliotecas virtuais: Scielo e Bireme. **Discussão:** O desenvolvimento de uma forma de cura e erradicação do vírus parece ser a única forma de minimizar a pandemia global do HIV. Atualmente novos métodos estão em pesquisa e mostram resultados positivos nos testes experimentais, são estudadas duas formas de vacina e um medicamento que quando combinado aos retrovirais apresenta capacidade de impedir a replicação do reservatório viral dentro das células. Medicamentos que inibem a histona desacetilase estão sendo testados como forma principal de impedir a transcrição viral. A enzima suprime a expressão do vírus deixando-o em seu estado de latência, catalisando a

desacetilacao das caudas das histonas e assim mantendo-as compactas. Agentes inibidores de histonas deacetilase (HDACi), levam à acetilação das histonas, levando ao relaxamento da cromatina e início da transcrição. A produção de vacinas, por sua vez, apresenta duas linhas principais de pesquisa: uma visa induzir uma resposta imune estéril e a outra uma resposta imune parcial. Em particular, citosinas que desempenham um papel importante na proliferação e homeostase de células T, como a IL-2 e IL-7 estão sob estudos clínicos, a IL-7 em especial, exerce uma grande função contra a apoptose espontânea de células TCD4+ procedentes de indivíduos acometidos pelo vírus. A vacina HIVBr18 é um pool de 18 epítomos virais e imunogênicos, inseridos em um vetor modificado que apresenta capacidade de gerar uma resposta ampla para o vírus. A RV144, outra vacina, também parece demonstrar eficácia, porém por um curto período de tempo. **Conclusão:** A descoberta de uma terapia eficaz contra o vírus da deficiência humana é de grande importância para tratar os portadores, reduzir as taxas de transmissão e óbito. Ainda há muito a ser feito na área de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, porém estudos que ainda estão sendo realizados com o uso de novas tecnologias têm ajudado principalmente na elucidação de mecanismos do vírus ainda desconhecidos, assim auxiliando nas diretrizes de desenvolvimento das vacinas.

Palavras Chave: HIV; AIDS; HIVBR18; RV144; HDAC; VACINA; VORINOSTAT

ABSTRACT

LIMA, Isabella; PASLAR, Thatiany. **The relevance of the structure of HIV and their form of infection associated with new therapies.** 2016. X f. TCC (Graduation) – Course of Biomedicine, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Introduction: Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), caused by the human immunodeficiency virus (HIV) is characterized by profound immunosuppression, especially involving CD4 + T cells. HIV is classified as a retrovirus with RNA genome, a member of the Retroviridae family, its structure features two strands of RNA and three enzymes surrounded by a viral capsid. Currently, AIDS is a major problem of public health worldwide. The epidemic's impact is already devastating, it is believed that over 34 million people worldwide are living with the virus. Antiretroviral drugs emerged in the 1980s to prevent the virus from multiplying in the body. They do not eliminate the virus, but avoid the complete destruction of cells of the immune system, making the individual less susceptible to opportunistic diseases. The use of those pharmaceuticals is essential to increase the longevity and quality of life of HIV carrier, making it a manageable chronic disease. **Objective:** Conduct a literature review through databases about HIV and their pathophysiology, with a focus on new therapies proposed and its effectiveness in healing and eradication for acquired immunodeficiency syndrome. **Methodology:** The literature was reviewed in the major databases such as PubMed, Lilacs and Medline; Virtual libraries: Scielo and Bireme. **Discussion:** The functional healing and eradication of the virus seems to be the only way of minimizing the global HIV pandemic. New methods are currently under research and show positive results in experimental trials. Currently, two vaccines and a drug that when combined with the antiretrovirais drugs has the capacity to prevent viral replication are studied. Drugs that inhibit histone deacetylase are being tested as the main way to prevent viral replication. Histones are proteins that compound the nucleosome, these proteins are recognized for their involvement in the regulation of chromatin. The enzyme in question suppresses the expression of virus in its latent state, catalyzing the deacetylation of histone tails and thus keeping it compact. Histone deacetylase inhibitors agents (HDACi),

lead to the histone acetylation, relaxation of chromatin and increase the transcriptional activity. The production of vaccines presents two main research lines: one intended to induce a sterile immune response and the other a partial immune response. In particular, cytokines play an important role in the proliferation and homeostasis of T cells, such as IL-2 and IL-7. The IL-7 in particular seems to play a significant function against spontaneous apoptosis of CD4 + T of individuals affected by the virus. The HIVBr18 vaccine is a pool of 18 viral and immunogenic epitopes inserted into a modified vector that has the capacity to generate a comprehensive response to the virus. The RV144, another vaccine against the virus also appears to demonstrate efficacy, but for a short period of time. **Conclusion:** The discovery of an effective therapy against human deficiency virus is of great importance for treating patients, reducing transmission rates and death. There is much still to be done in this research field and development of vaccines, but studies are still being carried out with the use of new technologies have helped especially in the elucidation of the mechanisms yet unknown viruses, thus assisting in vaccine development guidelines.

Key words: HIV; AIDS; HIVBR18; RV144; HDAC; VACCINE; VORINOSTAT

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Estrutura do HIV. O HIV consiste em duas fitas idênticas de RNA e enzimas associadas, incluindo a transcriptase reversa, integrase e protease, envoltas em um núcleo em forma de cone composto de proteína capsídeo p24, rodeada por uma matriz de proteína p17, tudo envolto por um envelope de membrana fosfolipídica derivado de uma célula hospedeira..... Pág. 18

Figura 2: Mapa epidemiológico de pessoas infectadas com AIDS no mundo..... Pág. 20

Figura 3: Razão de sexo, segundo faixa etária por ano de diagnóstico, no Brasil, de 2004 a 2013. Pág. 22

Figura 4: Genoma do HIV. Os genes junto com o genoma linear são indicados como blocos coloridos de forma diferente. Alguns genes usam algumas das mesmas sequências de outros genes, conforme mostrado pelos blocos sobrepostos, mas são lidos de forma diferente pela polimerase do RNA das células hospedeiras. Da mesma forma, os blocos separados por linhas indicam genes cujas sequências codificadas são separadas no genoma e necessitam da união do RNA para produzir mRNA funcional.....Pág. 28

Figura 5: Esquema representativo da infecção de uma célula alvo pelo HIV-1. A) Ilustração da partícula viral e representação das glicoproteínas 120 e 41 do envelope viral; B) Ligação inicial da gp120 ao receptor CD4; C) Posteriormente, as glicoproteínas do envelope sofrem mudanças conformacionais e assim expõe os sítios de ligação para o co-receptor CCR5; D) Após a ligação inicial ao CD4 e ao CCR5 a glicoproteína do HIV sofre uma segunda mudança conformacional e assim a gp41 se funde a membrana da célula alvo; E) As moléculas de gp41 permitem a aproximação das membranas por meio de seu dobramento; F) O envelope vira funde-se a membrana celular e seu conteúdo deposita-se no citoplasma.....Pág. 30

Figura 6: partícula viral fundindo-se à célula alvo. Após a fusão do envelope viral com a membrana da célula alvo os componentes contidos em seu interior são liberados no citoplasma celular, liberando seu capsídeo. Pág. 31

Figura 7: infecção ativa do HIV em macrófagos e células TCD4+ com proliferação viral e liberação de vírus para o sangue. O provírus é ativado, controlando a síntese de novos vírus, que brotam da célula hospedeira. Pág. 32

Figura 8: Ciclo de vida e brotamento do HIV. A partícula viral sai da célula “roubando” uma parte da membrana da célula infectada, os vírions são mostrados em uma micrografia eletrônica em todos os estágios da morfogênese: brotamento inicial (A) e tardio (B), e os vírions maduros e livres da célula (C e D)..... Pág. 32

Figura 9: infecção latente do HIV em células macrófagos e células TCD4++. O vírus se mantém “dormente” no interior da célula. Pág. 33

Figura 10: Número de células por tempo de infecção nas diferentes fases da doença. Nota-se que o número de células TCD4+ (linha azul) é inversamente proporcional à viremia (linha azul). Quando a quantidade de linfócitos TCD4+ declina até o limite de 200 células por mL, a síndrome da imunodeficiência adquirida é instalada..... Pág. 34

Figura 11: Mecanismo de ação dos inibidores de histona deacetilase. No estado latente as HDACs suprimem a expressão do HIV. A inibição de HDACs promove a acetilação das histonas por HATs levando ao relaxamento da cromatina e a iniciação da transcrição..... Pág. 36

Figura 12: Comparação da expressão de RNA viral em diferentes condições. Número de cópias relativas de RNA do HIV-1 em células TCD4+ de 13 pacientes com HIV e em tratamento com antirretrovirais. As células foram cultivadas sozinhas, com Vorinostat 335 nM ou com 3 µg/ml de PHA por 6 horas..... Pág. 37

Figura 13: Quantificação de HIV-1 RNA após dose de 400mg de Vorinostat (VOR). O número de cópias relativas de RNA medidas em células TCD4+ de oito pacientes HIV+ é mostrado com uma única dose de VOR em comparação com tratamento com antirretrovirais..... Pág. 37

Figura 14: Efeitos protetores da IL-7 contra a apoptose de células cultivadas *ex-vivo* em pacientes infectados e não infectados em 7 dias

consecutivos. A porcentagem de ligação de anexina à células tratadas com IL-7 (verde) em indivíduos com HIV foi significativamente mais baixa quando comparadas à células não tratadas (rosa). Pág 41

Figura 15: análise da redução da ligação de anexina V mediada por IL-7 durante 7 dias de cultura *ex vivo* de células de pacientes infectados por HIV. Até o sexto dia a porcentagem de Anexina foi reduzida, porém no sétimo dia esta não apresentou importante redução. A redução da apoptose pela IL-7 foi calculada pela subtração da ligação da anexina V à células tratadas com IL-7 pela porcentagem de ligação da anexina V à células não tratadas..... Pág 42

Figura 16: análise da ligação de anexina V e a ativação de caspase 3 em células sanguíneas de um paciente com HIV-1 na presença ou ausência de IL-7 a 5 ng/mL. Os níveis de ativação de caspase 3 são idênticas às da anexina V na presença e na ausência de IL-7, demonstrando sua atuação contra a apoptose..... Pág 42

Figura 17: Estimulação da expressão do HIV através de CpG e Panobinostat. É possível deduzir que combinar CpG e Panobinostat induz consideravelmente a expressão do HIV, do que cada tratamento individualmente..... Pág 44

Figura 18: Curso natural da infecção pelo HIV. No gráfico superior a viremia é representada nas diferentes fases da doença, assim como o risco de transmissão, na parte inferior do gráfico estão sendo avaliadas, concomitantemente, os anticorpos específicos, células citotóxicas e TCD4..... Pág 47

Figura 19: Imunização com adenovírus que codifica o gene multiepítipo. Foram avaliadas por citometria de fluxo e células marcadas com o fluorocromo CFSE sensíveis para proliferação do antígeno específico. Os camundongos foram imunizados por via intramuscular e subcutânea, recebendo 3 doses da vacina DNA HIVBr18 e 2 doses com o adenovírus recombinante. Os controles receberam o plasmídeo pVAX1 sozinho ou com a Ad5-Bgal. ainda existe um grupo que recebeu um prime-boost, reforço de Ad5..... Pág 49

Figura 20: Imunização com Ad5-HIVBr18 induz um maior número de células T polifuncionais quando em comparação com os outros protocolos. Duas semanas após a última imunização as células do baço foram analisadas quanto suas respostas imunes específicas contra os peptídeos do HIV, a frequência de IFN-gama secretado foi medido por ELISPOT..... Pág 50

Figura 21: Imunização com Ad5-HIVBr18 induz um maior número de células T polifuncionais quando em comparação com os outros protocolos. As células do baço foram marcadas com CFSE para analisar a frequência de proliferação das células TCD4 e TCD8 produtoras de citocinas..... Pág 50

Figura 22: Amplitude das respostas imunes nos diferentes protocolos de imunização. Duas semanas após a ultima imunização, as células do baço foram analisadas quanto a resposta específica de IFN-gama. Foram avaliadas *in vitro* na presença dos 18 epítomos do HIV-1, os gráficos mostram a frequência de células T específicas e secretoras de IFN-gama para cada peptídeo..... Pág 52

Figura 23: Ad5-HIVBr18 induz respostas proliferativas mais elevadas até 28 semanas após a ultima imunização. Vinte e oito semanas após a ultima imunização, as células do baço dos animais imunizados foram reunidas, marcadas com CFSE e cultivadas durante 5 dias na presença de peptídeos de HIV-1 combinados..... Pág 52

Figura 24: Descrição das etapas importantes durante a infecção do vírus da imunodeficiência humana em células alvo. Papel das diferentes estruturas envolvidas na união da glicoproteína 120 aos receptores e co-receptores. 1) Estrutura trimérica funcional da glicoproteína 160 diagrama funcional estrutura trimérica glicoproteína 160. 2) Após a união da glicoproteína 120 ao receptor CD4, que induz alterações conformacionais, as regiões V1/V2 e V3 são abertas permitindo a ligação aos co-receptores. 3) Depois de alterações conformacionais V1 / V2 e V3 se ligam diretamente aos co-receptores, o que induz a outras alterações conformacionais que permitem a exposição da glicoproteína 41 e a formação do péptido de fusão..... Pág 54

Figura 25: Representação da estrutura da gp120, evidenciando os 5 loops variáveis (V1 a V5) e o sítio de ligação do CD4. Pág 55

Figura 26: Estrutura das regiões variáveis V1 e V2. O domínio V1 V2 contém epítomos lineares, caracterizados por composição muito heterogênea de aminoácidos; No entanto, apresenta um epítomo relativamente conservado, que é o alvo de anticorpos neutralizantes..... Pág 56

Figura 27: respostas de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do *env* do HIV-1 com a vacina RV144 e placebo. (A) respostas de anticorpos contra proteína gp120 recombinante MN, A244 e 92TH023 nas visitas 1, 8, e 9 determinadas por ELISA, usando amostras de plasma sanguíneo. (B) Respostas de anticorpos para as mesmas proteínas recombinantes e visitas com placebo..... Pág 57

Figura 28: Respostas de anticorpos contra peptídeos cíclicos do loop V2 por ELISA. As respostas na visita 8 de indivíduos vacinados foram significativamente maiores do que em indivíduos com placebo. Cyc V2 representa peptídeos cíclicos da região mediana do loop V2; Cyc V2 Scr Fl e Cyc V2 Scr MR representam os peptídeos das extremidades do loop V2..... Pág 58

Figura 29: Respostas de anticorpos ao peptídeo cíclico V2 nas visitas 1, 8 e 9. É possível observar que as repostas declinam com o tempo..... Pág 59

Figura 30: Respostas de anticorpos contra os loops V2 e V3 em comparação. Em indivíduos infectados pelo vírus da deficiência humana os anticorpos contra a região V3 da gp120 foram elevados quando relacionados com o loop V2 da mesma glicoproteína..... Pág 60

Figura 31: Comparação de respostas contra as regiões variáveis V2 e V3 em indivíduos que receberam doses da RV144. Nota-se que os anticorpos contra o loop V2 tiveram maior frequência quando comparados ao loop V3..... Pág 61

LISTA DE ABREVIATURAS

AD5	Adenovírus 5
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
CYC	Cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
E. COLI	<i>Escherichia coli</i>
GP	Glicoproteína
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
HDACi	Inibidores de histona deacetilase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Intérferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-7	Interleucina 7
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
ODN	Oligodeoxinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PHA	Fitohematoglutina
POL	Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TLR	Receptores semelhantes à <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREG	Células T regulatórias
UNAIDS	Programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
VOR	Vorinostat
VPA	Ácido Valpróico

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é causada pelo vírus da imunodeficiência humana e é caracterizada por profunda imunossupressão, normalmente associada às infecções oportunistas e o aparecimento de neoplasias malignas. Apesar de o HIV infectar uma grande variedade de células do sistema imunológico, a doença compromete principalmente os linfócitos TCD4⁺ (ABBAS, 2011; FILHO, 2011; FOCACCIA, 2011; GOLDMAN, 2009; LEVINSON, 2010).

O HIV é classificado como *retrovírus* com genoma RNA, membro da Família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae*. Pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos, necessitando, assim, de uma enzima denominada transcriptase reversa para sua multiplicação. Esta enzima é responsável pela transcrição do ácido ribonucleico viral em ácido desoxirribonucleico, o que pode se integrar ao genoma da célula hospedeira com o auxílio de outra enzima, denominada integrase (ABBAS, 2011; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2008).

A estrutura do vírion de HIV-1 (figura 1) consiste em duas fitas de RNA viral e enzimas associadas (transcriptase reversa, integrase e protease), envoltas por um capsídeo viral. Este capsídeo está rodeado por uma matriz estrutural, formada por proteínas da matriz e um envelope de membrana fosfolipídica derivado de uma célula hospedeira, a qual expõe em sua superfície glicoproteínas que são ancoradas no vírus por meio de interações com glicoproteínas transmembrana. São estas glicoproteínas que se fundem com a membrana da célula do hospedeiro durante a infecção. As moléculas gp120 e da gp41 mudam com frequência, originando novas cepas virais (MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; GOLDMAN, 2009; ABBAS, 2011).

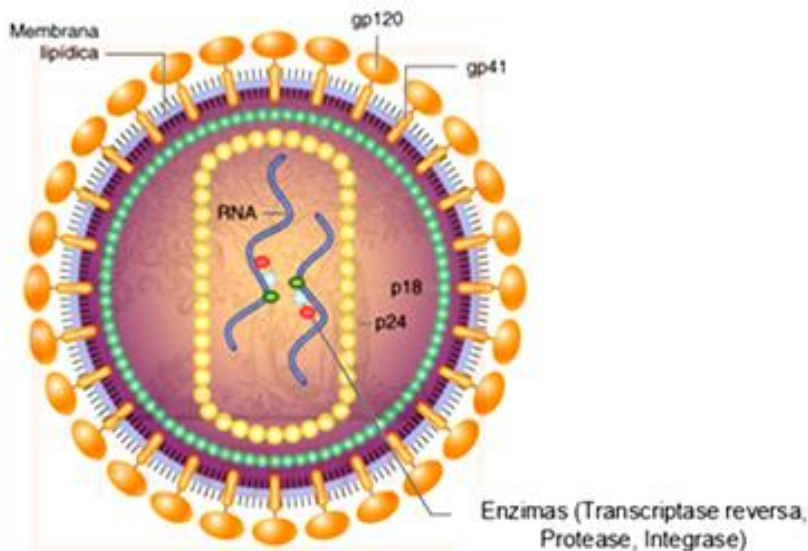


Figura 1: Estrutura do HIV. O HIV consiste em duas fitas idênticas de RNA e enzimas associadas, incluindo a transcriptase reversa, integrase e protease, envoltas em um núcleo em forma de cone composto de proteína capsídeo p24, rodeada por uma matriz de proteína p17, tudo envolto por um envelope de membrana fosfolipídica derivado de uma célula hospedeira. FONTE: GOLDMAN, 2009, MODIFICADA.

A organização genômica do HIV é bastante complexa, apresentando inúmeros genes codificantes específicos. Assim como os demais retrovírus, o HIV apresenta três principais genes que codificam as proteínas estruturais e enzimas virais: *gag*, *env* e *pol*. Somando-se a estes três principais genes, a estrutura genética do HIV inclui outros genes que regulam a expressão do vírus (MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2008).

Atualmente, a AIDS é um dos maiores problemas de saúde pública mundial e apresenta alta mortalidade e morbidade, principalmente nos países de renda baixa e média, onde vivem 95% das pessoas infectadas. O Impacto da epidemia já é devastador, com alta prevalência principalmente nos países da África subsaariana, onde somam-se ao colapso da saúde e de serviços essenciais, além da extrema pobreza (UNAIDS/WHO, 2010).

A epidemia causada pelo HIV é a mais importante das últimas décadas, acredita-se que mais de 34 milhões de pessoas no mundo vivam com o vírus. Entre os mais atingidos encontram-se jovens de 14 a 25 anos, correspondendo a 40% das novas infecções; foram relatados em 2011, 2,5 milhões de novas

infecções e, destes, 1,7 milhões foram a óbito em decorrência de doenças relacionadas à AIDS (UNAIDS/WHO, 2012).

Desde que a síndrome foi reconhecida nos Estados Unidos tornou-se epidêmica em todo o mundo. A AIDS é a principal causa de morte de mulheres e homens entre 15 a 59 anos (GOLDMAN, 2009).

Em dezembro de 2014, foram divulgadas as tendências da epidemia no mundo e no Brasil pelas Nações Unidas e pelo Ministério da Saúde onde foi evidenciado contradições e suscitaram interrogações. Em oposição ao panorama mundial, os dados nacionais apontaram que a AIDS está longe de ser controlada e que alcançou seus piores indicadores nesses mais de trinta anos da doença. Desde 2011 a barreira dos quarenta mil casos novos anuais foi excedida, sem sinais de que voltará a diminuir em um curto período de tempo. Voltou a acender o número de casos entre homossexuais, acompanhado da maior concentração da epidemia nos centros urbanos e do aumento da razão masculino/feminino devido à diminuição da transmissão do vírus por meio do uso compartilhado de drogas injetáveis e da desaceleração da transmissão heterossexual. Uma nova geração, nascida após meados da década de 1990, também começou a exibir taxas de incidência maiores do que as registradas entre aqueles que iniciaram sua vida sexual logo após o início da epidemia. Um perfil epidemiológico que volta a assumir características similares ao observado no início dos anos de 1980, quando a doença começou a fazer suas primeiras vítimas e apresentou uma incidência fortemente concentrada em segmentos sociais específicos. Agora com taxas de incidência e mortalidade mais alarmantes (GRANGEIRO et al., 2015; UNAIDS/WHO, 2013; MS/SVS/ DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014).

O recrudescimento da AIDS no Brasil incide em uma ocasião em que os conhecimentos científicos acumulados no campo lançam perspectivas positivas para o controle da epidemia no mundo. Estudos sobre os efeitos dos antirretrovirais utilizados no cotidiano dos serviços de saúde mostraram que pessoas tratadas nas fases iniciais da infecção apresentaram expectativa de vida próxima de pessoas não infectadas. Isso permite caracterizar um panorama onde a morte por AIDS deveria ser um evento cada vez menor.

Estudos mostram redução de mais de 90% da transmissão do HIV em pessoas com HIV tratadas por antirretrovirais e com supressão total da replicação viral. Uma taxa de proteção superior ao visto em programas de distribuição de preservativos. Com base nesse novo cenário, os estudos de modelagem matemática têm indicado que o diagnóstico e tratamento global de pessoas infectadas teria o potencial de abolir o episódio de novas infecções. Isso impeliu as Nações Unidas a solicitarem os países a inserir até 2020 programas audaciosos para diagnosticar 90% das pessoas com HIV, tratar 90% delas com antirretrovirais e fazer 90% das pessoas tratadas tenham carga viral indetectável. É a chamada meta 90-90-90 que, segundo as Nações Unidas, poderia levar ao fim da epidemia no mundo até 2030 (GRANGEIRO et al, 2015; DONNELL et. al, 2010).

A epidemia está totalmente globalizada, com importantes focos epidêmicos em todos os continentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, já morreram aproximadamente 30 milhões de homens, mulheres e crianças no mundo todo decorrente da infecção. Atualmente estima-se que vivam mais de 35 milhões de pessoas infectadas no mundo (Figura 2), segundo a UNAIDS estima-se que 0,8% dos adultos entre 15 a 49 anos, no mundo, são infectados com o vírus (UNAIDS/WHO, 2011).

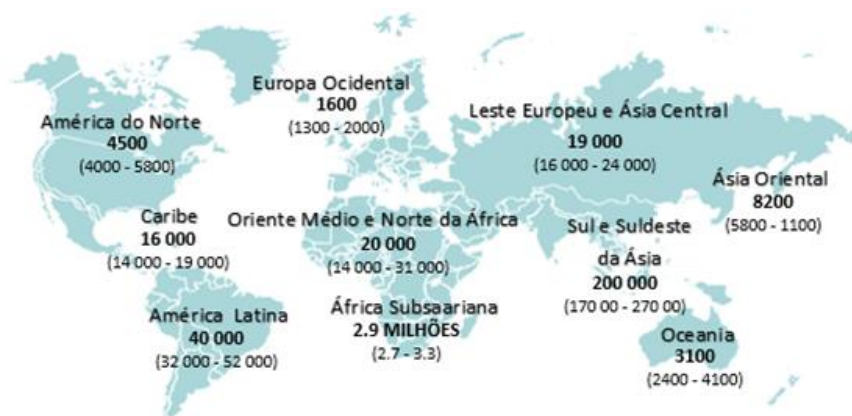


Figura 2: Mapa epidemiológico de pessoas infectadas com AIDS no mundo. FONTE: UNAIDS, 2010 MODIFICADA.

Na região da África subsaariana estima-se que para cada 20 adultos 1 contraiu o vírus, correspondendo a 4,9% da população. Quando comparada com o mundo todo, essa região corresponde a aproximadamente 69% das pessoas infectadas, a prevalência é quase 25 vezes maior do que na Ásia, onde 1% dos adultos vivem com HIV (UNAIDS/WHO, 2011).

Na população pediátrica, indivíduos menores de 15 anos de idade, estima-se que mais de 2,5 milhões estejam infectados no mundo. Por ano, aproximadamente três milhões de pessoas são infectadas, sendo que todos os dias ocorrem 7.400 novas infecções, especialmente em jovens de 15 a 24 anos. Por se tratar de uma doença que afeta primariamente jovens e adultos jovens, alicerces de uma sociedade, a AIDS aprofunda a pobreza e amplia crises demográficas e econômicas, além de ser uma das principais causas de orfandade no mundo. (GOLDMAN, 2009; UNAIDS/WHO, 2011; FERREIRA, 2010).

Ainda de acordo com a UNAIDS, 50 mulheres jovens se infectam com HIV por hora no mundo, sendo que existem 13 vezes mais mulheres profissionais do sexo neste índice, assim como homens homossexuais. Usuários de drogas também fazem parte do chamado grupo de vulnerabilidade da doença, estes por sua vez apresentam 22 vezes mais chances de terem contraído o vírus (UNAIDS/WHO, 2011).

No Brasil, a AIDS tem se disseminado de forma mais lenta nos últimos anos, graças às mudanças no comportamento nos seguimentos populacionais de elevado risco e a implementação de medidas preventivas, além do uso em maior escala dos medicamentos antiretrovirais. Apesar da tendência atual de redução no número de novas infecções, o índice de mortalidade se mantém como consequência ao acesso inadequado e limitado à prevenção e ao tratamento (APOSTOLICO, 2013).

Segundo o Boletim epidemiológico do departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais da secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2014), no Brasil existem aproximadamente 734 mil pessoas infectadas com o vírus, correspondendo 0,4% da população. As taxas de diagnóstico da doença em homens, nos últimos dez anos, têm apresentado tendência significativa de

crescimento. Em 2004, a taxa era de 25,8 casos para cada 100 mil habitantes, elevando-se para 26,9 em 2013, contabilizando um aumento de 4,3%. Entre as mulheres, observa-se uma queda nos casos diagnosticados nos últimos 10 anos, passando de 16,4 casos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 14,1 em 2013, representando uma queda de 14,0% (MS/SVS/ DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014).

De acordo com Ministério da Saúde, a faixa etária onde se concentram os casos de AIDS no Brasil mantém-se entre 25 a 39 anos de idade em ambos os sexos. Porém, é possível observar que nos últimos 10 anos diagnosticou-se grande número de homens com 60 anos e mulheres entre 55 a 59 anos. A taxa de detecção entre as crianças até nove anos não apresenta diferenças significativas segundo sexo (Figura 3) (MS/SVS/ DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014; KORROUSKI, 2008).

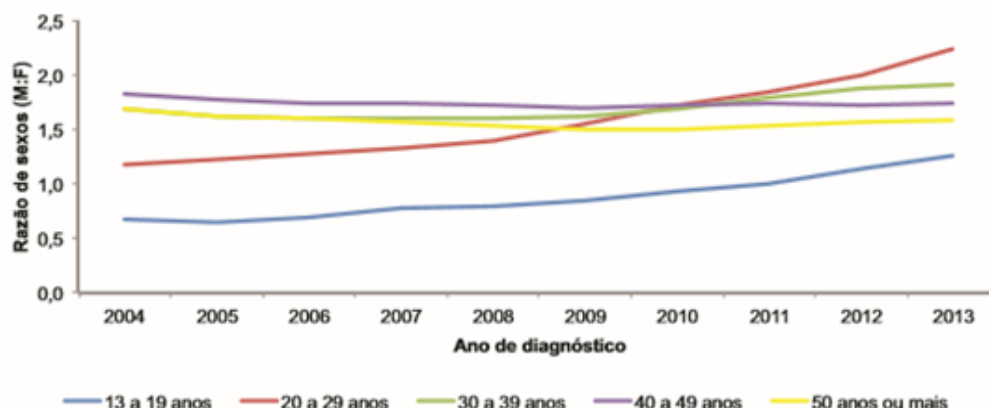


Figura 3: Razão de sexo, segundo faixa etária por ano de diagnóstico, no Brasil, de 2004 a 2013. FONTE: MS/SVS/DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014.

Em virtude dos números alarmantes, em 2001 foi realizada uma sessão especial da Assembleia Geral das Nações Unidas onde foi estabelecido um plano de ação em conjunto com a área da saúde e outras não ligadas para evitar novas infecções, fornecer tratamento e medidas de prevenção. Os países comprometeram-se a disponibilizar recursos para pesquisa de novas terapias e fornecimento das pré-existentes nas áreas mais afetadas do globo (GOLDMAN, 2009).

Segundo a OMS a principal forma de transmissão do HIV é por meio do contato sexual, sendo a transmissão homossexual mais frequente. Alguns fatores aumentam os riscos de transmissão do vírus, como elevada viremia, imunodeficiências, relação sexual anal e presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, como cancro mole, sífilis e herpes genital. O método mais eficaz de prevenção a este tipo de transmissão é o uso de preservativos. Algumas medidas simples podem ser tomadas, contribuindo para a prevenção, como campanhas de comportamento sexual mais seguro e distribuição de preservativos; tratamento precoce e eficaz de homens e mulheres; e campanhas de prevenção a outras DSTs (UNICEF,1998).

A transmissão sanguínea vem crescendo em várias partes do mundo. O uso compartilhado de agulhas e seringas torna a transmissão do HIV muito eficaz. Em contrapartida, a transmissão por meio de transfusão sanguínea e derivada é cada vez menor nos países que adotam medidas de controle como o Brasil. Usuários de drogas injetáveis também devem tomar alguns cuidados, como possuir seringas e agulhas de uso próprio e não reutilizá-las, além de não compartilhá-las com terceiros. O descarte dos materiais deve ser feito em local apropriado, dentro de uma caixa ou embalagem (MS/SVS/DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014; SOUZA, 2011; KORROUSKI, 2008).

A transmissão vertical (de mãe para filho, durante parto, gestação ou aleitamento) vem crescendo significativamente, devido à maior transmissão heterossexual. A África é a região onde são encontradas as maiores taxas deste tipo de transmissão. Estima-se que 12.456 recém-nascidos sejam expostos ao HIV a cada ano. Quando não realizadas intervenções de profilaxia adequadas, a transmissão vertical do vírus ocorre em cerca de 25% das gestações de mulheres infectadas pelo HIV. Porém, a administração da Zidovudina na gestação e seu uso no parto e no recém-nascido, reduz a taxa de transmissão vertical para cerca de 8,3% (MS/SVS/DEPARTAMENTO DE DST, AIDS, E HEPATITES VIRAIS, 2014).

Os antirretrovirais não eliminam o vírus, porém evitam o aniquilamento completo das células do sistema imune, tornando o indivíduo menos

susceptível a doenças oportunistas. Seu uso é fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida do portador do HIV, tornando-a uma doença de característica crônica controlável (ABBAS, 2011; RANG, 2012).

Mesmo com as terapias existentes, os cálculos de mortalidade e morbidade são alarmantes, além das reações de toxicidade dos medicamentos antirretrovirais e seu insuficiente acesso (MUDD et al., 2012).

Assim, o desenvolvimento de uma vacina e novos métodos de tratamento são necessários para freiar a pandemia global do HIV, tendo um enorme impacto na sociedade. À medida que a complexidade e os mecanismos pelos quais o HIV evade do sistema imune estão sendo descobertos e estudados, novos alvos terapêuticos para erradicação deste vírus estão sendo explorados (MUDD et al., 2012; DENG et al., 2015).

2. OBJETIVO

Realizar revisão bibliográfica por meio de bases de dados sobre o HIV e sua patofisiologia, com enfoque em novas terapias propostas e sua eficácia na cura e erradicação para a síndrome da imunodeficiência adquirida.

3. MÉTODOS

Foi realizada revisão bibliográfica nas principais bases de dados como PubMed, Lilacs e Medline; Bibliotecas virtuais: Scielo e Bireme. Foram utilizadas as palavras-chave: HIV, antirretrovirais, vacina para o HIV, AIDS, epidemiologia do HIV, CXCR4, CCR5, Pwax, HIVBr18, epítomos CD4, vorinostat, RV144.

4. DISCUSSÃO E DESENVOLVIMENTO

Entre os muitos objetivos das inúmeras pesquisas referentes ao HIV pelo mundo, o desenvolvimento de terapias que tentam curar paciente soropositivos para o HIV e assim promover a erradicação do vírus, tem avançado de maneira extraordinária nos últimos anos (ARCHIN, 2011).

O HIV é capaz de promover uma infecção latente a longo prazo e efeitos citopáticos em curto prazo. A persistência da infecção dentro de uma população de células TCD4+ é o principal obstáculo para o alcance de terapia eficaz que promova a erradicação do vírus no sangue dos indivíduos contaminados e assim impedir que esses portadores infectem mais pessoas (ABBAS, 2013; ARCHIN, 2013; MURPHY, 2010).

O vírus da imunodeficiência humana é classificado em 1 e 2 de acordo com propriedades estruturais e genômicas. Ambos causam síndromes similares, sendo que o HIV-1 é muito mais comum e o HIV-2 é endêmico na África Ocidental e se dissemina pela Índia. O HIV-1 é responsável por efeitos mais devastadores e com progressão mais rápida. Uma partícula viral consiste em duas fitas simples idênticas de RNA de polaridade positiva, proteínas e enzimas virais envoltos por um envelope de duas camadas de fosfolípidios derivado da membrana da célula hospedeira, incluindo as glicoproteínas de membrana codificada pelo vírus (ABBAS, 2011; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012).

O HIV-1 é subdividido em quatro grupos, sendo eles: M, O, N e P; destes, o primeiro grupo denominado *major* (M) apresenta uma subdivisão: A, B, C, D, F, G, H, J e K. A filogenia deste tipo do vírus sugere que pode ter sido originário de chimpanzés, já que mostra a existência da co-evolução de linhagens relacionadas aos dois primeiros subtipos do grupo M com o vírus SIV. Neste caso, a rota de transmissão teria sido por meio do contato de sangue contaminado devido a prática da caça, principalmente na região Equatorial (APOSTOLICO, 2013; MIRANDA, 2005; KEELE *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2010; SANTANA, 2014).

O genoma do HIV-1 (figura 4) apresenta genes comuns aos retrovírus, como: repetições de terminais longos nas extremidades, regulando a expressão genética viral, integração viral no DNA hospedeiro e a replicação

viral, e os genes *gag*, *env* e *pol*. O gene *gag* dá origem a proteínas estruturais, p6, p9, p17, p24. A p 17 constitui a matriz proteica e a p24 é responsável pelo o capsídeo viral. O gene *env*, por sua vez, é responsável pela codificação das glicoproteínas do envoltório, gp120 e gp41. O gene *pol* codifica proteínas, p66, p51, p31, p10, pertencentes as enzimas virais. Além dos genes típicos o vírus apresenta seis outros genes reguladores: *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e o *vpu*, cujo os produtos são responsáveis pela regulação da reprodução viral e métodos de evasão imunológica (ABBAS, 2011; GOLDMAN, 2009; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2008).

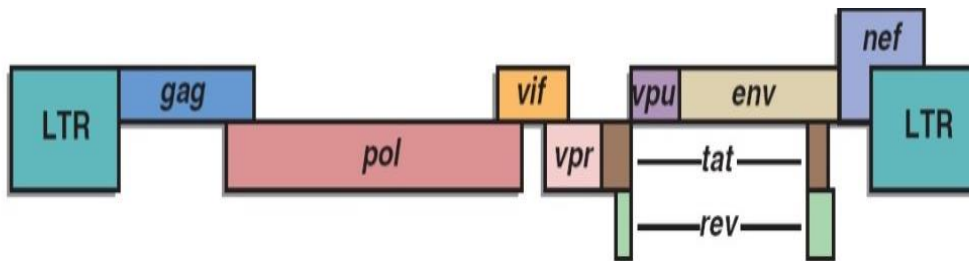


Figura 4: Genoma do HIV. Os genes junto com o genoma linear são indicados como blocos coloridos de forma diferente. Alguns genes usam algumas das mesmas sequências de outros genes, conforme mostrado pelos blocos sobrepostos, mas são lidos de forma diferente pela polimerase do RNA das células hospedeiras. Da mesma forma, os blocos separados por linhas indicam genes cujas sequências codificadas são separadas no genoma e necessitam da união do RNA para produzir mRNA funcional. FONTE: GREENE, 1993 MODIFICADA.

O HIV possui dois genes regulatórios de extrema importância na replicação viral: o gene *tat*, é o gene de transativação da transcrição, ou seja, ativa a transcrição de outros genes do mesmo DNA proviral; o gene *rev* controla a passagem de mRNA tardio no núcleo para o citoplasma (ABBAS, 2011; LEVINSON, 2010; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; TRABULSI, 2008; KONEMAN, 2008).

Os genes regulatórios nem sempre são necessários para o processo de replicação viral: o gene *nef* codifica uma proteína que reduz consideravelmente a quantidade de proteínas CD4 e MHC-I na superfície das células infectadas; o gene *vif* codifica a proteína acessória de mesmo nome, esta é capaz de intensificar a infectividade inibindo a ação de APOBEC3G, enzima apoliproteína B de edição de RNA, importante componente da defesa inata do

hospedeiro. O HIV contrapõem-se a esta impedindo a hipermutação resultante da desaminação de citosinas do mRNA e do DNA retroviral. O gene *vpr* e *vpu* são responsáveis pelas proteínas que aumentam a replicação viral e aumentam da liberação do vírus pela célula, respectivamente (ABBAS, 2011; LEVINSON, 2010).

Três enzimas são encontradas no interior do nucleocapsídeo: transcriptase reversa, formada por duas subunidades proteicas, a p66 e p51; integrase, formada pela p31; e a protease, formada pela p10. A primeira é uma DNA polimerase RNA-dependente, capaz de sintetizar uma fita de DNA a partir de uma de RNA, transcrevendo o genoma no DNA proviral. Outra atividade da transcriptase reversa é a de ribonuclease, degradando o RNA quando este encontra-se em uma molécula híbrida de RNA-DNA, etapa essencial na síntese de DNA. A integrase medeia a integração do DNA proviral ao da célula hospedeira e a protease viral cliva as poliproteínas precursoras em polipeptídeos funcionais (LEVINSON, 2010).

A infecção se inicia quando partículas virais presentes no sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um portador são introduzidas em outro indivíduo, por contato sexual, agulhas contaminadas ou transmissão vertical. O vírus ultrapassa a barreira epitelial, chega aos linfonodos e faz com que suas glicoproteínas de superfície interajam com as moléculas de superfície CD4 presente em linfócitos T auxiliares, células dendríticas e macrófagos (ABBAS, 2011; FOCACCIA, 2011).

Os efeitos deletérios do vírus sobre as células TCD4 são acarretados pela constante perda de membrana, síntese de proteínas virais que acabam por incapacitar a célula e a formação de sincícios celulares decorrente da expressão de glicoproteínas. O envelope viral apresenta glicoproteínas tipo-específicas: gp120 e gp41. A gp120 projeta-se da superfície externa e interage com receptor CD4, que promove alteração na sua conformação facilitando a ligação da glicoproteína com o receptor de quimiocina da célula-alvo. Esta ligação, por sua vez, induz uma alteração conformacional na gp41, resultando na exposição do peptídeo de fusão permitindo que a membrana viral se funda com a membrana celular (figura 5) (ABBAS, 2011; LEVINSON, 2010; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012).

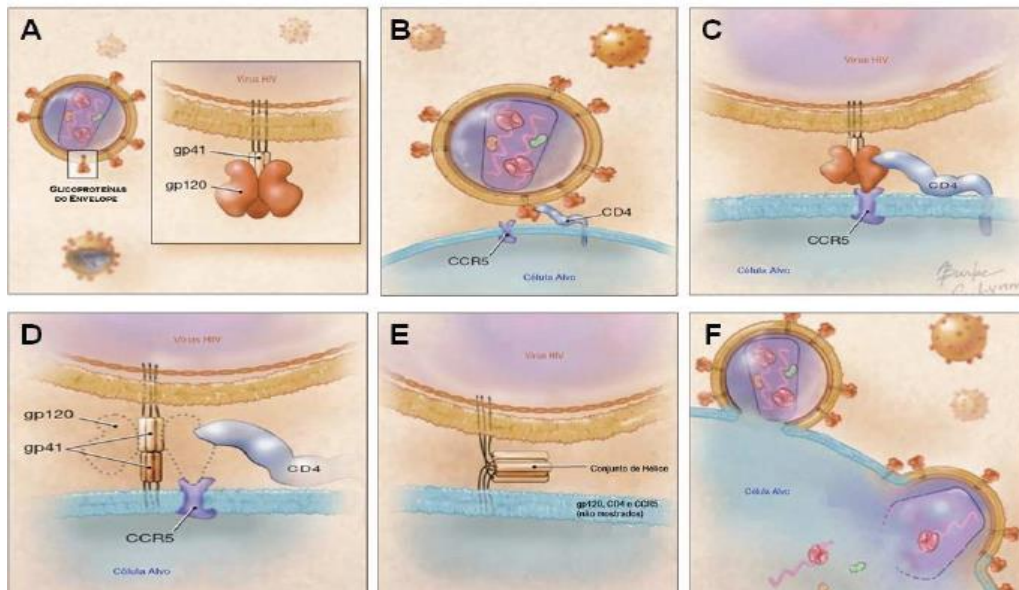


Figura 5: Esquema representativo da infecção de uma célula alvo pelo HIV-1. A) Ilustração da partícula viral e representação das glicoproteínas 120 e 41 do envelope viral; B) Ligação inicial da gp120 ao receptor CD4; C) Posteriormente, as glicoproteínas do envelope sofrem mudanças conformacionais e assim expõe os sítios de ligação para o co-receptor CCR5; D) Após a ligação inicial ao CD4 e ao CCR5 a glicoproteína do HIV sofre uma segunda mudança conformacional e assim a gp41 se funde a membrana da célula alvo; E) As moléculas de gp41 permitem a aproximação das membranas por meio de seu dobramento; F) O envelope vira funde-se a membrana celular e seu conteúdo deposita-se no citoplasma. FONTE: LEDERMAN *et.al.*, 2006 MODIFICADA

Receptores de quimiocina CXCR4 e CCR5 são necessários para a entrada do HIV em células do hospedeiro. Linhagens virais com tropismo por macrófagos, chamados R5, ligam-se ao CCR5, expressos principalmente em macrófagos, porém encontram-se também em células dendríticas, monócitos, células NK e linfócitos T de memória. Macrófagos expressam níveis mais baixos de CD4 que linfócitos T auxiliares, porém com a elevada expressão de correceptores de quimiocinas estas tornam-se susceptíveis a infecção por HIV; já as linhagens com tropismo para células TCD4+, chamados X4, ligam-se ao CXCR4. Esta linhagem tende a ser mais virulenta, pois infectam e destroem célula de maneira muito mais eficaz do que as cepas R5, que normalmente tornam-se reservatórios virais (ABBAS, 2011; LEVINSON, 2010; MURRAY, 2010; TORTORA, 2012; VANNI, 2011).

Após todas as interações necessárias para a fusão do envelope viral e da célula-alvo o vírus libera o capsídeo e todos os seus componentes no citoplasma da célula (Figura 6) (TORTORA, 2012; FLINT, 2012).

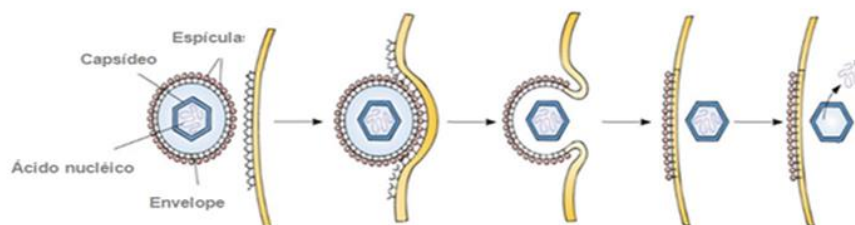


Figura 6: partícula viral fundindo-se à célula alvo. Após a fusão do envelope viral com a membrana da célula alvo os componentes contidos em seu interior são liberados no citoplasma celular, liberando seu capsídeo. FONTE: FLINT, 2004.

A partir desse momento inicia-se a síntese de uma dupla fita de DNA a partir do RNA viral, a transcriptase reversa é responsável por esse processo. Simultaneamente ocorre o desnudamento do capsídeo viral onde as proteínas serão transportadas através do núcleo. A enzima integrase une de forma covalente o DNA viral ao DNA genômico da célula invadida como um próvirus e assim permite que o genoma viral comece a expressar suas funções (DIAZ, 2012; FOCACCIA, 2011).

O processo de tradução gera proteínas virais e polipeptídeos do capsídeo, que sofrerão maturação e brotamento pela célula hospedeira e serão liberados na corrente sanguínea, desta forma aumentando a viremia e também sofrendo ações do sistema imunológico, gerando uma infecção ativa (figura 7) (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; TORTORA, 2012).

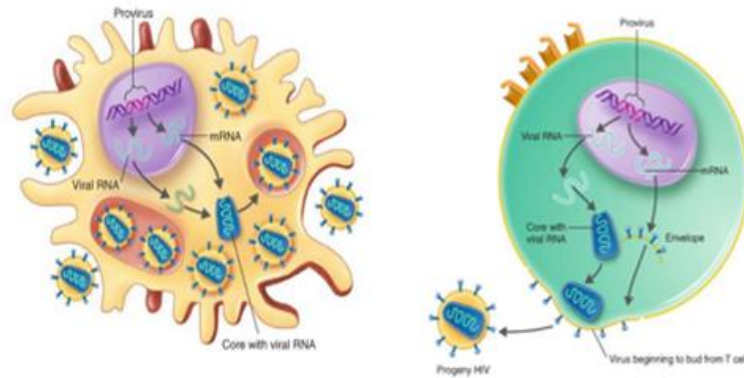


Figura 7: infecção ativa do HIV em macrófagos e células TCD4+ com proliferação viral e liberação de vírus para o sangue. O provírus é ativado, controlando a síntese de novos vírus, que brotam da célula hospedeira. FONTE: TORTORA, 2012. MODIFICADA.

O processo de maturação é importante para formação de partículas completas e com capacidade infecciosa, ocorrendo à associação entre o ácido nucleico viral e as proteínas do capsídeo, clivadas pela protease para formar produtos proteicos. A liberação da partícula ocorre por meio de brotamento (figura 8), onde o envelope viral será formado por parte da membrana celular, este processo só ocorre em locais onde proteínas específicas do vírus foram inseridas, as proteínas presentes forçam a partícula viral a atravessar a membrana (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; JANEWAY, 200; TORTORA, 2012).

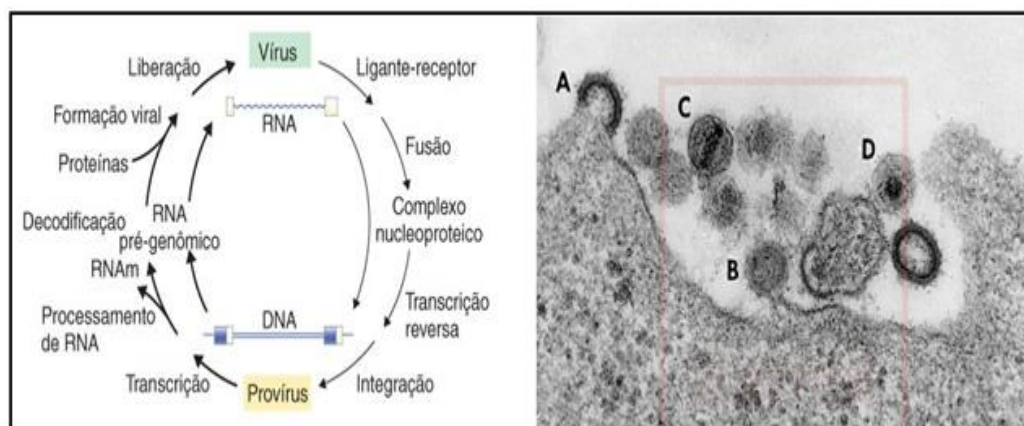


Figura 8: Ciclo de vida e brotamento do HIV. A partícula viral sai da célula “roubando” uma parte da membrana da célula infectada, os vírions são mostrados em uma micrografia eletrônica em todos os estágios da morfogênese: brotamento inicial (A) e tardio (B), e os vírions maduros e livres da célula (C e D). FONTE: GOLDMAN, 2009. MODIFICADA.

Em um caminho alternativo, o vírus promove uma infecção latente, onde o DNA integrado pode, ou não gerar novos vírus; caso ocorra a formação de novos vírus, estes serão armazenados no interior da célula, em vacúolos, denominando-se *Virion Latente* (figura 9). Desta forma, haverá células T de memória onde o vírus permanecerá por tempo indeterminado protegido da atuação do sistema imunológico (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; TORTORA, 2012).

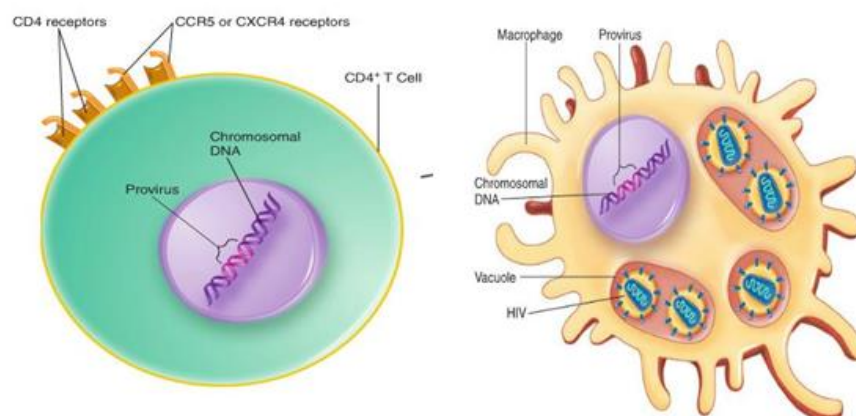


Figura 9: infecção latente do HIV em células macrófagos e células TCD4++. O vírus se mantém “dormente” no interior da célula. FONTE: TORTORA, 2011. MODIFICADA.

Outro modo de afetar o número de células do hospedeiro está ligado a capacidade, das células TCD4+ infectadas, de apresentar antígenos virais e assim sofrerem com o ataque das células do sistema imune, como as células TCD8+ e células NK (TORTORA, 2012).

O progresso da infecção normalmente é dividido em três fases clínicas. Na primeira, que ocorre aproximadamente dois meses após a infecção inicial, ocorre um pico de partículas virais no sangue, podendo atingir mais de 10 milhões na primeira semana. Essa fase é chamada de aguda, a população de célula TCD4 diminui em um primeiro momento, porém se recupera a medida que a resposta imune acontece; anticorpos anti-HIV são detectáveis neste período causando um declínio da população viral em um segundo momento. A infecção nesta fase apresenta sintomas indefinidos, como febre, cefaleia e perda de peso (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; TORTORA, 2012).

A segunda fase é caracterizada por uma taxa viral relativamente baixa no sangue, sendo definida como latência clínica e crônica da doença. Os números de células TCD4 apresentam-se baixos também, sendo assim nesta fase a doença é controlada, principalmente, pelas células citotóxicas, TCD8. Poucos vírus são liberados nessa fase e sintomas quase não são detectados (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; TORTORA, 2012).

A terceira fase é a mais alarmante, estudos demonstram que a AIDS clínica demora dez anos em média para “aparecer”. As contagens de célula TCD4 decaem tanto que foi estipulado um limite para definir a síndrome da imunodeficiência adquirida e seus sintomas no paciente infectado, a contagem inferior a 200 células/ μ L define AIDS. Concomitantemente, a viremia aumenta de forma descontrolada e condições clínicas características da doença aparecem (figura 10) (ABBAS, 2011; DIAZ, 2012; TORTORA, 2012).

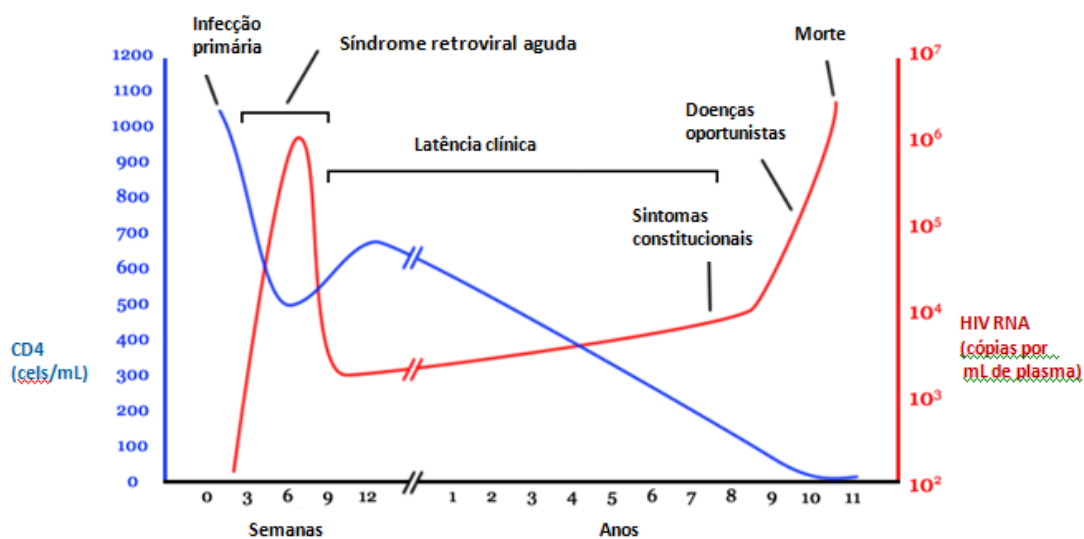


Figura 10: Número de células por tempo de infecção nas diferentes fases da doença. Nota-se que o número de células TCD4+ (linha azul) é inversamente proporcional à viremia (linha vermelha). Quando a quantidade de linfócitos TCD4+ declina até o limite de 200 células por mL, a síndrome da imunodeficiência adquirida é instalada.

A persistência da infecção pelo HIV dentro de uma população de células T CD4+ é o principal obstáculo para o alcance de uma terapia eficaz que promova a erradicação do vírus no sangue dos indivíduos contaminados, e

assim impedir que esses portadores infectem mais pessoas (ABBAS, 2013; ARCHIN, 2013).

Atualmente, algumas estratégias terapêuticas têm sido estudadas para a cura da infecção pelo HIV. Eliminar a infecção latente reativando a expressão do vírus usando agentes como disulfiram, IL-7 e inibidores de histona deacetilase como o vorinostat, é uma dessas principais estratégias (ARCHIN, et. al 2008; RASMUSSEM, et. al, 2013).

Histonas são proteínas básicas que compõe o nucleossomo. Sua estrutura contém um domínio globular, em que o filamento de DNA se enrola, e uma cauda aminoterminal, carregada positivamente. Atualmente, essas proteínas são reconhecidas por seu envolvimento na regulação da cromatina. Existem algumas principais modificações pós-traducionais que acontecem na cauda das histonas, como acetilação e metilação, que ativam e reprimem a transcrição. Em combinação com o DNA, as histonas formam uma rede sinalizadora que permitem modular a expressão gênica (MENDITI, 2007).

De acordo com Menditi (2007) e Archin (2008), a acetilação das histonas é controlada essencialmente por duas enzimas, histonas acetiltransferases e histonas deacetilases. A oscilação entre a acetilação e desacetilação destas proteínas em regiões promotoras tem sido intimamente associada à carcinogênese, uma vez que estas desempenham papel chave na regulação da expressão de genes. As HDACs removem o grupo acetil de um aminoácido das histonas, condensando a cromatina e consequente levando a repressão transcricional, opondo-se a histonas acetiltransferases.

Existem 11 HDACs, divididas em 4 classes dependendo de sua sequência homóloga e de sua localização: classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8); classe IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9) classe IIb (HDAC 6 e 10) e classe IV (HDAC 11). No estado de latência do HIV, as histonas deacetilase suprimem a expressão do vírus, por catalisar a desacetilação das caudas das histonas, mantendo-as compactas. Agentes inibidores de histonas deacetilase (HDACi), levam à acetilação das histonas, levando ao relaxamento da cromatina e início da transcrição, conforme mostra a figura 11. Desta maneira, conforme importante

papel desempenhado pela histona deacetilase, os agentes inibidores de HDAC parecem suspender o estado de latência do HIV, induzindo a expressão do vírus em células infectadas (RASMUSSEN, 2013).

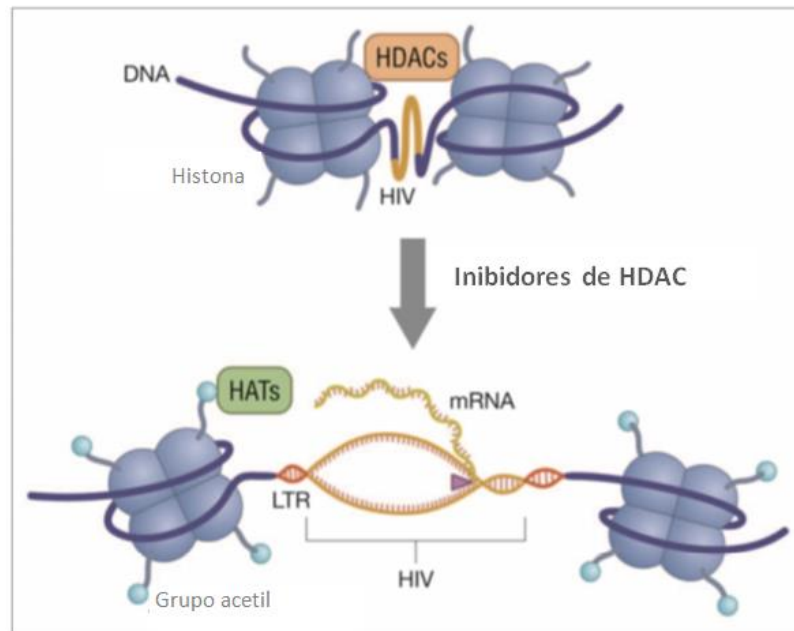


Figura 11: Mecanismo de ação dos inibidores de histona deacetilase. No estado latente as HDACs suprimem a expressão do HIV. A inibição de HDACs promove a acetilação das histonas por HATs levando ao relaxamento da cromatina e a iniciação da transcrição. FONTE: RASMUSSEN, 2013 MODIFICADA.

Estudos clínicos realizados por Archin e colaboradores (2008) corroboram com este conceito. Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram o efeito do Vorinostat (potente inibidores de histonas deacetilase) na infecção latente *in vivo*. Foram recrutados pacientes com HIV-1 com menos de 50 cópias por ml de RNA por pelo menos 6 meses, contagem de células TCD4+ acima de 300/ μ L e em uso constante de antirretrovirais. Após algumas horas de exposição ao Vorinostat, a expressão de RNA viral foi significativamente regulada em 8 de 9 pacientes. Além disso, a expressão também aumentou após exposição à fitohemaglutinina, lectina que possui excelente grau de atividade mitogênica, estimulando a mitose de linfócitos T (figura 12).

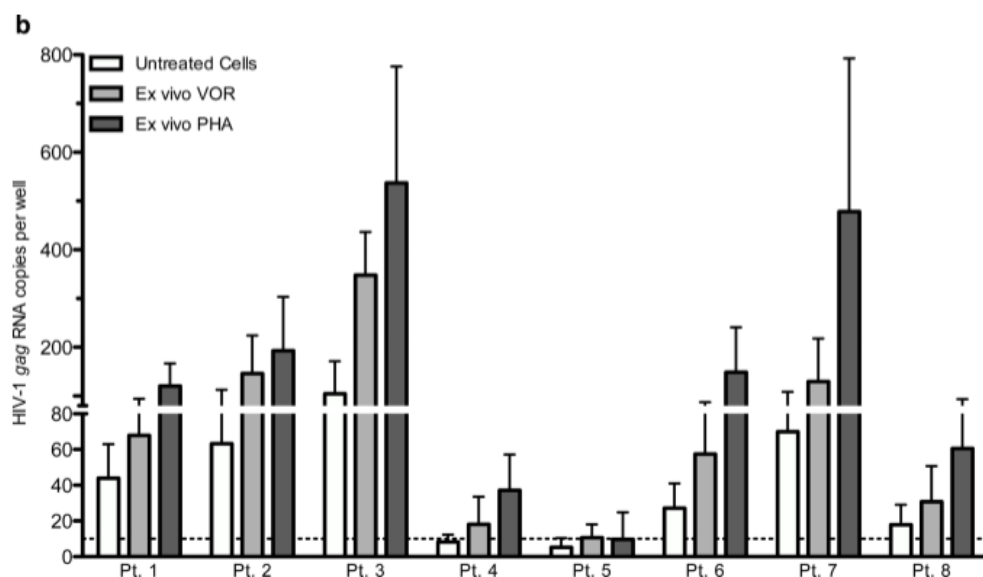


Figura 12: Comparação da expressão de RNA viral em diferentes condições. Número de cópias relativas de RNA do HIV-1 em células TCD4+ de 13 pacientes com HIV e em tratamento com antirretrovirais. As células foram cultivadas sozinhas, com Vorinostat 335 nM ou com 3 µg/ml de PHA por 6 horas. Nota-se que as células tratadas tiveram maior expressão de RNA quando comparadas à células não tratadas. FONTE: ARCHIN, 2008.

Após algumas semanas de exposição ao Vorinostat, a expressão de RNA foi medida novamente, e esta foi ainda mais significativa, como mostra a figura 13:

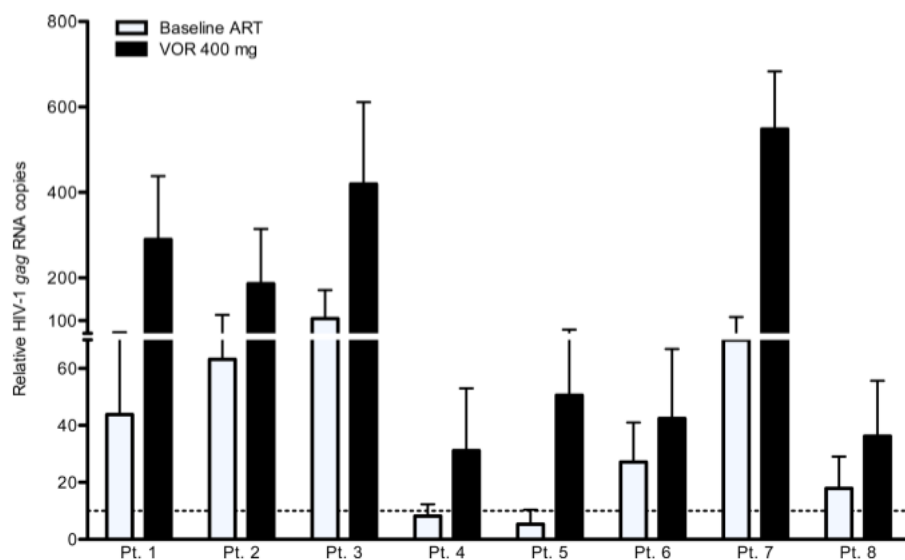


Figura 13: Quantificação de HIV-1 RNA após dose de 400mg de Vorinostat (VOR). O número de cópias relativas de RNA medidas em células TCD4+ de oito pacientes HIV+ é mostrado com

uma única dose de VOR em comparação com tratamento com antirretrovirais, onde as células tratadas com VOR possuem maiores quantidades de cópias de RNA viral. FONTE: ARCHIN, 2008.

Todas essas observações sustentam a teoria de que o aumento da expressão do RNA do HIV em células latentes está intimamente relacionado à exposição ao Vorinostat. Contudo, enquanto a desacetilação de histonas está associada à expressão de RNA viral, os mecanismos moleculares pelos quais o Vorinostat medeia esta ação, não estão totalmente elucidados. Outrossim, mais estudos são necessários para determinar a dose ideal e tolerável de HDACi, para que estes tenham o efeito biológico esperado (ARCHIN, 2008; SHIOZAWA, 2009).

Além do Vorinostat, existem outros eficientes HDACi em estudos clínicos, como o Givinostat e o Panobinostat. Inicialmente comparado ao ácido valpróico, o Givinostat é um potencial fármaco em propriedades anti-inflamatórias e antineoplásicas. Este parece induzir a expressão do HIV aproximadamente 10 vezes mais do que o VPA, sendo mais potente do que o Vorinostat, além de reduzir a expressão de CXCR4 e CCR5. Contudo, este fármaco pode favorecer a persistência da infecção viral, por meio da indução da proliferação de células latentemente infectadas e inibir a função de células T efectoras específicas contra o HIV. Mais pesquisas são necessárias para esclarecer completamente o papel deste inibidor de histonas deacetilase (RASMUSSEN, 2013).

Segundo estudos, o Panobinostat também demonstra eficiência em reativar a expressão do HIV em células em estado latente quando comparado a outros HDACi. Seu tempo de eliminação é relativamente longo, prolongando a acetilação das histonas por cerca de 7 dias após sua segunda dose. Esta é uma vantagem, pois isso permite doses intermitentes, reduzindo o risco de trombocitopenia, reação observada com todos os inibidores de HDAC (RASMUSSEN, 2013).

Os efeitos imunomodulatórios dos HDCAi envolvem tanto sinais epigenéticos quanto inflamatórios, como regulação de NF- κ B/p65, fator de

transcrição que participa da resposta inflamatória, sendo inativo no citoplasma e ativo no núcleo, promovendo a transcrição de genes. A maioria dos efeitos é anti-inflamatório, porém cada isoforma própria possui seus mecanismos inibidores diferentes, mostrando grande diversidade (RASMUSSEN, 2013; LAWRENCE, 2009).

A ação dos inibidores de HDAC sobre os linfócitos T, e principalmente sobre as células T reguladoras, altamente relevante no cenário do HIV. A progressão da doença está diretamente ligada à hiperativação imune, reduzindo o número e a função dos linfócitos Treg (RASMUSSEN, 2013; LAWRENCE, 2009).

As células Treg são componentes importantes na tolerância imunológica, induzindo a supressão de células T efectoras e bloqueando a ativação destes linfócitos, controlando assim a resposta imunológica (RASMUSSEN, 2013).

A terapia com HDACi, como por exemplo Vorinostat e Panobinostat, pode estimular a produção de Foxp3+ pelo timo. O fator nuclear Foxp3+ desempenha um importante papel no desenvolvimento e função de células do sistema imune. Desta forma, estes fármacos possuem importante papel na diferenciação de células em Treg, além de aumentarem a acetilação do Foxp3+, protegendo-o da degradação por proteossomos (RASMUSSEN, 2013).

Assim, a supressão imunitária induzida por meio de Tregs pode impactar no decurso da infecção pelo HIV. É importante destacar que a expansão de Treg causada por HDCAi pode ser benéfica, suprimindo a ativação generalizada de linfócitos T, ou prejudicial, enfraquecendo respostas específicas para o HIV, impedindo a depuração de células TCD4+ infectadas de forma latente. Pesquisas e estudos estão em andamento para avaliação do exato papel dos HDACi exercido sobre o Treg, e seus desdobramentos (RASMUSSEN, 2013).

Há no mínimo 20 anos cientistas do mundo todo tentam achar um antígeno que seja eficiente em promover de diferentes maneiras a proteção do organismo contra o HIV e assim criar uma vacina eficaz. Dentre as possíveis estratégias para produção de vacinas existem duas linhas principais de pesquisa, uma delas visa induzir uma resposta imune estéril e a outra uma

resposta imune parcial. No primeiro caso, a ideia seria induzir anticorpos que fossem capazes de neutralizar de forma ampla peptídeos do envelope viral e assim impedir a infecção; no segundo caso, o foco é a indução de resposta imune celular (WAWER *et.al.*, 2005; RIBEIRO, 2010; ROSA *et al.*, 2011).

Vacinas compostas por anticorpos monoclonais dirigidos a determinados epítomos virais apresentam grande capacidade de neutralizar de forma isolada o HIV-1. A indução destes poderia bloquear a infecção pelo vírus gerando uma imunidade estéril, porém a criação de uma vacina esterilizante contra o HIV-1 capaz de induzir de maneira rápida a produção de anticorpos neutralizantes é um grande desafio. Alguns ensaios realizados mostram que os anticorpos induzidos pela vacinação não apresentam capacidade de neutralização e não exercem nenhuma pressão imunológica sobre o vírus, confirmando assim a necessidade de um imunógeno (RIBEIRO, 2010; FLYNN *et.al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2011).

Em particular, citosinas que desempenham um papel importante na proliferação e homeostase de células T, como a IL-2 e IL-7 estão sob estudos clínicos. A apoptose é um dos principais mecanismos de depleção de células TCD4⁺ em pacientes infectados pelo HIV. De acordo com Vassena e colaboradores (2007), a IL-7 exerce uma grande função contra a apoptose espontânea de células TCD4⁺ procedentes de indivíduos acometidos pelo vírus.

Para avaliar os efeitos da IL-7, Vassena e colaboradores (2007) realizaram um estudo de coorte com pacientes com HIV em diferentes estágios da doença. As células mononucleares do sangue periférico destes indivíduos foram cultivadas *ex vivo* na presença e na ausência de IL-7. Com o objetivo de obter-se um patamar, a apoptose foi medida no primeiro dia de cultura, e posteriormente a cada dia, durante 7 dias. Como marcadores de apoptose, foram usadas as técnicas de ligação de anexina V e ativação da caspase 3. A anexina V é uma proteína que possui grande afinidade com fosfatidilserina, presente no folheto intracelular da membrana plasmática das células. Quando a célula entra em processo de apoptose, a fosfatidilserina é deslocado para o folheto extracelular da membrana, permitindo sua ligação com a anexina V. As caspases são proteínas que também possuem ação diretamente ligada à

apoptose. Quando há alguma alteração intracelular, a mitocôndria libera substâncias pró-apoptóticas no citoplasma, ativando as capases, culminando na apoptose celular.

Como mostra a figura 14, a proporção de ligação de anexina V no dia zero foi similar no controle e nos pacientes infectados, mas aumentou significativamente na cultura *ex vivo* com pacientes soropositivos. O acréscimo de IL-7 provocou uma dramática redução nos níveis de apoptose espontânea em células de todos os pacientes infectados testados (VASSENA, 2007).

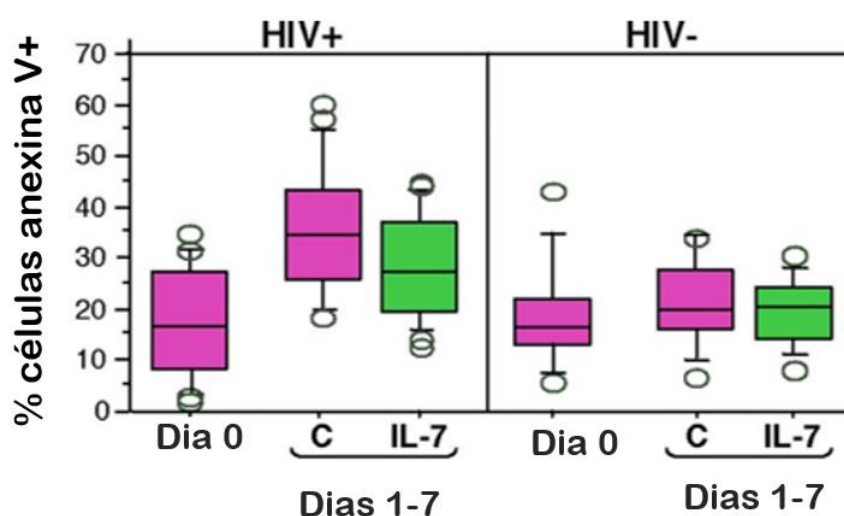


Figura 14: Efeitos protetores da IL-7 contra a apoptose de células cultivadas *ex-vivo* em pacientes infectados e não infectados em 7 dias consecutivos. A porcentagem de ligação de anexina à células tratadas com IL-7 (verde) em indivíduos com HIV foi significativamente mais baixa quando comparadas à células não tratadas (rosa). C representa controles não tratados. FONTE: VASSENA, 2007 MODIFICADA.

Do primeiro ao sexto dia de cultura com IL-7, a anexina V reduziu significativamente, enquanto que no dia 7, não houve diferença significativa, como é possível observar no figura 15. A redução da apoptose foi calculada pela subtração da porcentagem de anexina V de células tratadas com IL-7 a partir da porcentagem de anexina V em células controle não tratadas (VASSENA, 2007).

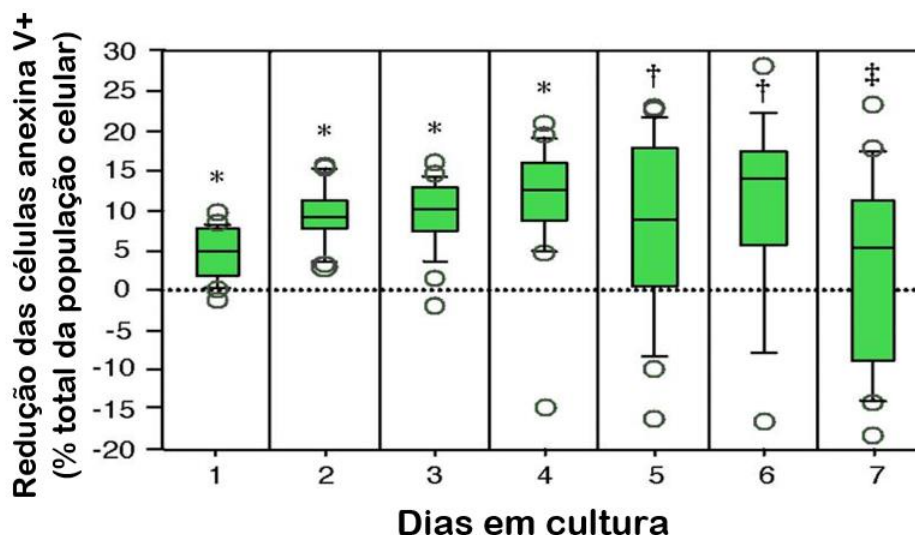


Figura 15: análise da redução da ligação de anexina V mediada por IL-7 durante 7 dias de cultura ex vivo de células de pacientes infectados por HIV. Até o sexto dia a porcentagem de Anexina foi reduzida, porém no sétimo dia esta não apresentou importante redução. A redução da apoptose pela IL-7 foi calculada pela subtração da ligação da anexina V à células tratadas com IL-7 pela porcentagem de ligação da anexina V à células não tratadas. FONTE: VASSENA, 2007 MODIFICADA.

Os efeitos anti-apoptóticos da IL-7 também foi investigados através medindo a ativação da caspase 3. Os níveis médios da sua ativação durante os 7 dias de cultura foram significativamente mais baixos nas células tratadas com IL-7 do que em células não tratadas (figura 16) (VASSENA, 2007).

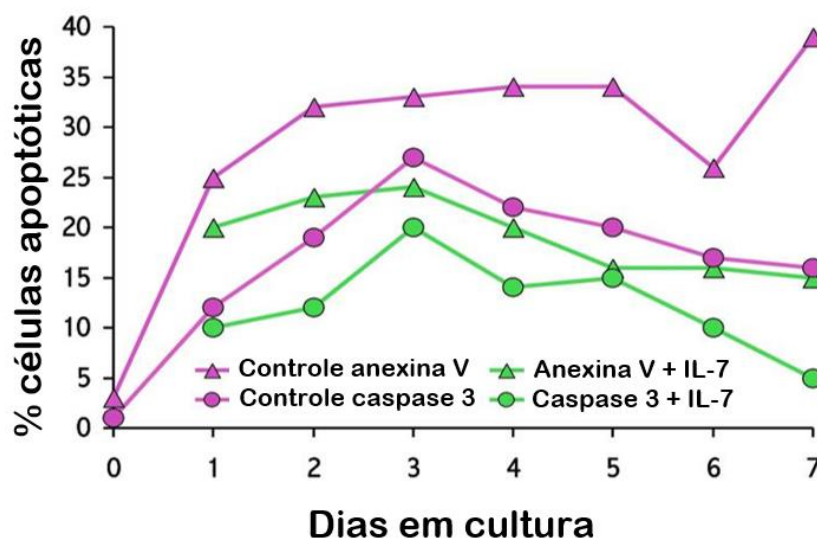


Figura 16: análise da ligação de anexina V e a ativação de caspase 3 em células sanguíneas de um paciente com HIV-1 na presença ou ausência de IL-7 a 5 ng/mL. Os níveis de ativação

de caspase 3 são idênticas às da anexina V na presença e na ausência de IL-7, demonstrando sua atuação contra a apoptose. FONTE: VASSENA, 2007 MODIFICADA.

Outra descoberta realizada por Vassena e colaboradores (2007), evidencia que a redução de apoptose mediada por IL-7 foi inversamente correlacionada com o nível de células TCD4+ em circulação. Desta maneira, embora possuam uma disfunção imune mais grave, os pacientes com baixa contagem de linfócitos TCD4+ mostraram maior sensibilidade para a interleucina 7, ao passo que aqueles com maiores contagens de células T CD4+, cujos níveis de apoptose geralmente são menores, exibiram menor sensibilidade.

É importante ressaltar que a IL-7 não interrompe a latência viral em células TCD4+, mas a terapia com essa citosina aumenta significativamente o número de TCD4+ de memória circulantes (RASMUSSEM, 2013).

Apesar do comportamento da IL-7 *in vivo* no desenrolar da infecção por HIV ainda ser mal compreendida, esta interleucina pode ter potencial como terapia adjuvante em indivíduos soropositivos em associação com antirretrovirais e outras terapias (RASMUSSEM, 2013; VASSENA, 2007).

Outra terapia em estudo compreende o uso de agonistas de receptores semelhantes a *Toll*. Os TLR constituem uma família de receptores que reconhecem padrões moleculares, frequentemente associados a agentes infecciosos. Estas moléculas estão presentes na superfície das células do hospedeiro, e quando reconhecem patógenos geram sinais que levam a produção de citosinas pró-inflamatórias cruciais na ativação de respostas imunes inatas. Até o momento, 10 diferentes famílias de TLR foram identificadas. Os TLR 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, contendo domínios intracelular e extracelular. Os receptores semelhantes a *Toll* 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente nos endossomos e não possuem domínio extracelular (FERRAZ, 2011).

A estimulação não específica do sistema imune inato via TLRs é utilizada para tratar algumas doenças virais. Alguns ligantes de TLR parecem modular infecção latente pelo HIV. A flagelina, agonista do TLR-5, resulta na ativação de NF- κ B, além de induzir a expressão de células T de memória em

repouso. Oligodeoxinucleotídeos CpG (CpG ODNs) sintéticos, agonistas do TLR-9, parecem induzir a reativação do HIV *in vitro*. Estudos demonstram que há um efeito sinérgico entre CpG ODNs e os HDACi em combinação. O tratamento de células infectadas de forma latente, com concentrações crescentes de CpG ODNs gerou aumentos significativos da produção de HIV após estimulação com baixas concentrações do HDACi Panobinostat, como mostra a figura 17 (RASMUSSEN, 2013).

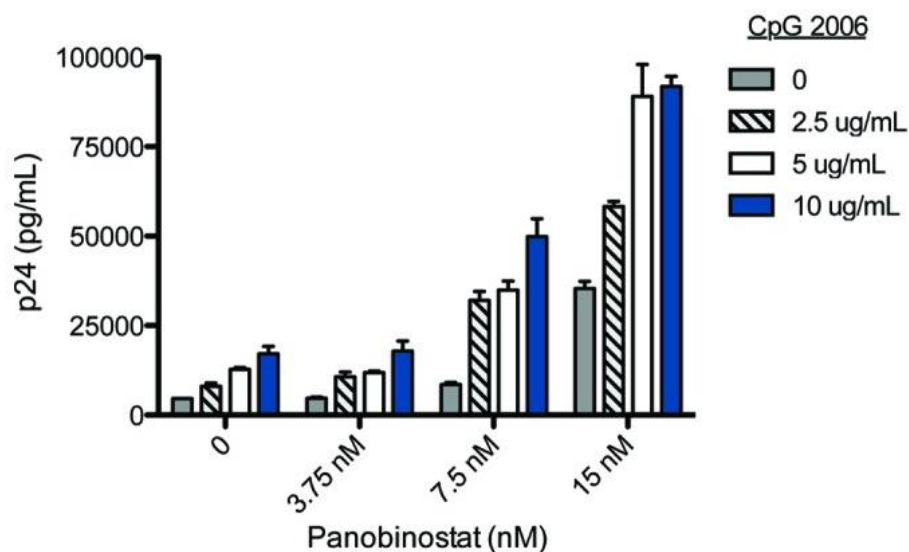


Figura 17: Estimulação da expressão do HIV através de CpG e Panobinostat. É possível deduzir que combinar CpG e Panobinostat induz consideravelmente a expressão do HIV, do que cada tratamento individualmente. FONTE: RASMUSSEN, 2013.

De alguns anos para cá, pesquisadores intensificaram estudos e ensaios clínicos com a finalidade de criar um imunógeno que fosse capaz de induzir resposta imune celular específica e amplamente eficaz, incluindo uso de vacinas de DNA e vetores virais recombinantes. Um desses projetos, batizado de vacina HIVBr18, visa retardar a instalação da imunodeficiência e reduzir a transmissão, já que não impede a infecção e sim melhora a resistência dos sistemas imunológico (ROSA *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2010).

A vacina HIVbr18 foi idealizada por pesquisadores brasileiros e inicialmente testada em camundongos geneticamente modificados. Os animais utilizados na pesquisa foram modificados para expressar moléculas do

complexo principal de histocompatibilidade humano de classe dois, para verificar a imunogenicidade dos antígenos. Os camundongos transgênicos para HLA de classe dois foram modificados para quatro diferentes moléculas, sendo elas: DR2, DR4, DQ6 e DQ8. Estas são mais comuns, estando presente em aproximadamente 50% da população (ROSA *et al.*, 2011, APOSTOLICO, 2013; BISCASSI, 2013; MIRANDA, 2015).

A HIVBr18 mostrou-se eficaz em produzir respostas imunes de linfócitos T nos quatro diferentes genótipos de camundongos BALB-c. Dos 18 epítomos presentes no teste, a maioria se ligou a, pelo menos 50% das moléculas HLA-DR testadas, principalmente DR2, DR4 e DQ6; cada molécula se ligou a múltiplos peptídeos, um indicativo de que o indivíduo pode apresentar uma resposta ampla (ROSA *et al.*, 2011; APOSTOLICO, 2013; SANTANA, 2014).

O estudo demonstrou a eficácia da HIVbr18 que tem por objetivo ampliar a resposta de linfócitos T auxiliares e induzir proliferação de linfócitos T citotóxicos. A HIVbr18 é composta por 18 epítomos provenientes de diferentes regiões de algumas proteínas virais por meio de uma sequência de nucleotídeos codificadas por meio de DNA recombinante inserido em um vetor viral adequado. Diferente dos outros estudos essa vacina selecionou, com a ajuda de um programa de computador, fragmentos antigênicos que tivessem maior chance de serem reconhecidos. Foram selecionadas nas proteínas virais as partes mais preservadas, ou seja, que não eram mutáveis, com resposta mais ampla na população celular em geral, e mais comuns nos diferentes subtipos virais. As regiões utilizadas foram das proteínas: p17, p24, p6; da enzima: integrase; das glicoproteínas: gp41, gp160; e dos genes: *ver*, *vpr*, *vif*, *vpu* e *nef*. Essas proteínas foram selecionadas devido a sua conservação e por serem frequentemente reconhecidas em amostras de indivíduos infectados como importantes imunógenos (ROSA *et al.*, 2011; APOSTOLICO, 2013; SANTANA, 2014).

O estudo demonstrou que ocorre uma grande proliferação de células TCD4+, a maioria dos peptídeos se ligou a pelo menos 50% das moléculas HLA-DR de classe II testadas em animais, e cada molécula se ligou a múltiplos peptídeos, no caso responderam a 11 epítomos ou mais da vacina. A resposta

de TCD8⁺ foi menor quando comparada a TCD4⁺, porém houve o reconhecimento de 6 epítomos; sete epítomos causaram a secreção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico, sendo assim houve resposta positiva à vacina, mas os autores acreditam que em humanos as respostas deverão ser maiores e mais eficazes (RIBEIRO et al., 2010).

Em seguida, foi produzido um gene sintético com otimização de códon para expressão dos epítomos em células de mamífero. Esta sequência foi clonada em um vetor chamado p-VAX1. Com o êxito na primeira etapa dos testes em camundongos, nos anos seguintes foram testados em macacos Rhesus, pois seu sistema imune assemelha-se muito ao do humano. A resposta observada foi 10 vezes mais intensa do que a vista nos camundongos, tendo em vista a capacidade o próximo passo foi testar a inserção do DNA, que codifica os fragmentos, em várias vacinas com vírus atenuado para verificar qual seria o melhor vetor (RIBEIRO, 2010; ROSA, 2011; SANTANA, 2014).

O grande efeito dessa vacina seria reduzir a transmissão, já que uma viremia baixa apresenta efeito direto na progressão da AIDS e sua transmissão. Já foi observado em pacientes portadores do vírus HIV que o sistema imune combate naturalmente o vírus (figura 18), principalmente por meio de células citotóxicas. Porém, ao longo do tempo, com o aumento da replicação viral essas respostas vão diminuindo levando a progressão da doença; indivíduos infectados que conseguem controlar a viremia sem ajuda de terapia antirretroviral apresentam uma resposta persistente e vigorosa de linfócitos TCD4 específicos e assim acabam por produzir mais IFN- γ (ROSA et al., 2011; CONNOLLY et al., 2008; MUDD et al., 2012; APOSTOLICO, 2013; SANTANA, 2014).

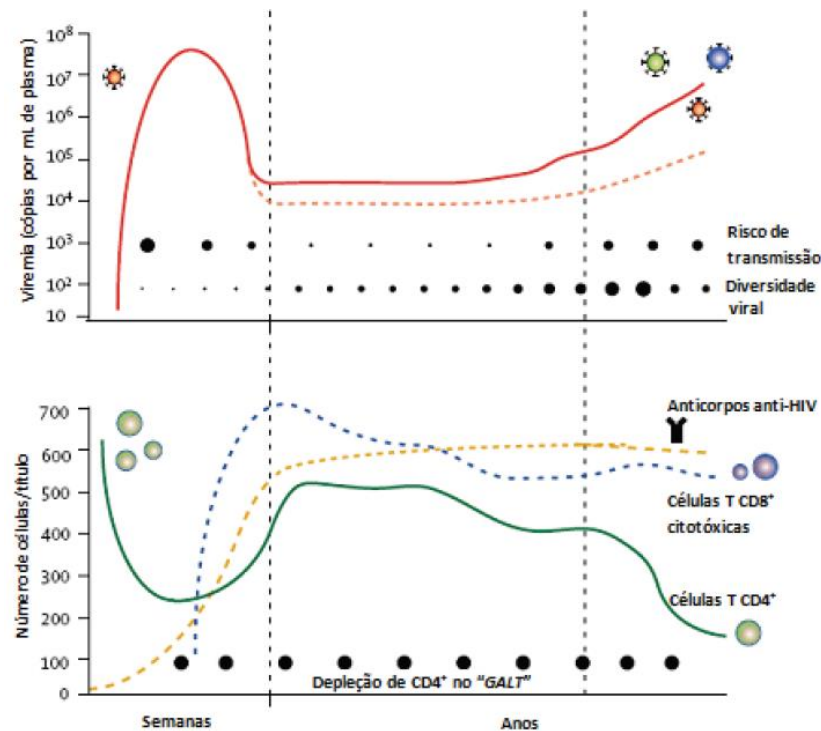


Figura 18: Curso natural da infecção pelo HIV. No gráfico superior a viremia é representada nas diferentes fases da doença, assim como o risco de transmissão, na parte inferior do gráfico estão sendo avaliadas, concomitantemente, os anticorpos específicos, células citotóxicas e TCD4. FONTE: SIMON *et al.*, 2006.

Esse tipo de vacina prolongaria a sobrevivência da doença nos indivíduos vacinados mesmo que não sejam capazes de bloquear a replicação viral. Com o tempo, mesmo que esta não impeça os pacientes de adquirirem a doença, não haveria novos casos e assim seria reduzido a zero o índice de pessoas infectadas (ROSA *et al.*, 2011; CONNOLLY *et al.*, 2008; MUDD *et al.*, 2012; APOSTOLICO, 2013; SANTANA, 2014).

Os ensaios realizados até hoje demonstram que as vacinas precisam ser capazes de induzir uma resposta imune ampla e funcionalmente relevante contra epítopos conservados do vírus na maioria dos indivíduos. Não se sabe de fato quais antígenos são mais reativos, o vírus varia rapidamente e apresenta alguns subtipos. Em um paciente pode haver a cada dia vírus com sequências gênicas diferentes (RIBEIRO, 2010; ROSA *et al.*, 2011).

Vacinas de DNA normalmente apresentam imunogenicidade elevada quando testadas em camundongos e modelos menores, mas em primatas e,

principalmente em humanos, sua eficácia é limitada. A eficiência das vacinas pode ser aumentada com uso de adjuvantes, cujos têm por objetivo aumentar a resposta a uma vacina na população em geral, já que aumenta os títulos de anticorpos e/ou porcentagens de indivíduos protegidos; aumentar a taxa de soro conversão na população com capacidade de resposta reduzida devido à idade; reduzir a quantidade do antígeno a ser usado e o número de doses da vacina (SANTANA, 2014; COFFMAN *et al.*, 2010).

Os adjuvantes apresentam variados mecanismos de ação e devem ser escolhidos de acordo com a rota de administração e efeito desejado. Os mecanismos podem incluir: aumento de meia-vida dos componentes da vacina, ação direta ou indireta das células apresentadoras de antígenos, indução de citocinas imunomoduladoras, auxilia no direcionamento do antígeno nos órgãos linfoides, entre outros. Adjuvantes podem ser sais de alumínio, polímeros sintéticos e até mesmo glicoproteínas (SANTANA, 2014; COFFMAN *et al.*, 2010; APOSTOLICO, 2014).

Para vacina em questão foi usado um adenovírus de sorotipo 5 (Ad5) e foi inserido neste a sequência de DNA que codifica a enzima galactosidase da bactéria *E. coli* como forma de controle, o adenovírus recombinante foi denominado como rAdlacZ. Inicialmente, era necessário verificar se a vacina Ad5-HIVBr18 poderia ser mais imunogênica que a vacina com a sequência de DNA contendo HIVBr18 sozinha, para isso avaliaram células do baço quanto a proliferação de TCD4 e TCD8. Os animais que receberam duas doses de Ad5-HIVBr18 apresentaram proliferação significativamente maior do que o grupo que foi imunizado com a vacina de DNA de HIVBr18, a proliferação específica para o HIV era acima de 20% nas células TCD4 e acima de 10% nas células TCD8 (figura 19) (ROSA *et al.*, 2011).

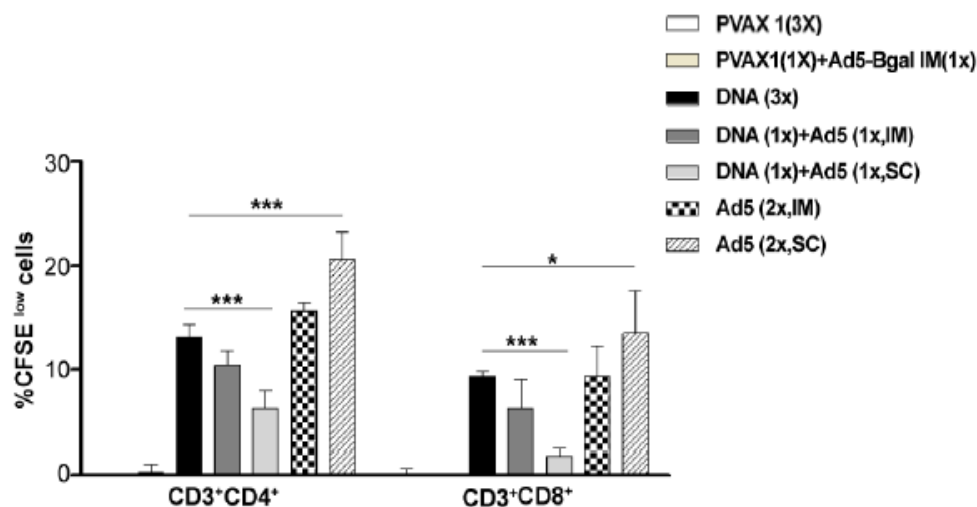


Figura 19: Imunização com adenovírus que codifica o gene multiepítipo. Foram avaliadas por citometria de fluxo e células marcadas com o fluorocromo CFSE sensíveis para proliferação do antígeno específico. Os camundongos foram imunizados por via intramuscular e subcutânea, recebendo 3 doses da vacina DNA HIVBr18 e 2 doses com o adenovírus recombinante. Os controles receberam o plasmídeo pVAX1 sozinho ou com a Ad5-Bgal. ainda existe um grupo que recebeu um prime-boost, reforço de Ad5. FONTE: ROSA *et al.*, 2011.

Com uso do ensaio ELISPOT de IFN- γ , foi analisado o perfil e a produção de citocinas nas células T específicas, observou-se nas células do baço que os animais que receberam a vacina com adenovírus por via subcutânea apresentaram uma diferença significativa na secreção de IFN- γ quando comparados com que receberam a vacina sem o adenovírus (figura 20) (ROSA *et al.*, 2011).

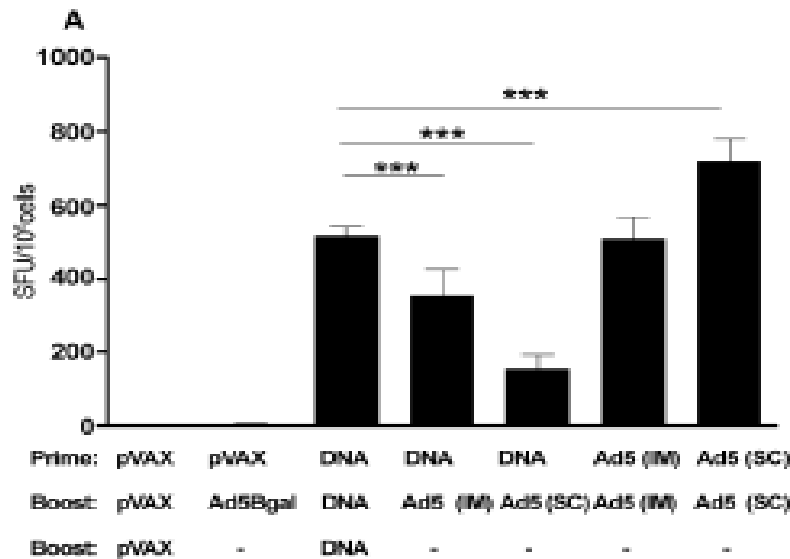


Figura 20: Imunização com Ad5-HIVBr18 induz um maior número de células T polifuncionais quando em comparação com os outros protocolos. Duas semanas após a última imunização as células do baço foram analisadas quanto suas respostas imunes específicas contra os peptídeos do HIV, a frequência de IFN-gama secretado foi medido por ELISPOT. FONTE: ROSA *et al.*, 2011.

Foi analisado também o perfil funcional das células, por citometria de fluxo multiparamétrica, este método possibilitou caracterizar as células T específicas do antígeno com base na sua capacidade proliferativa e de produzir citocinas como IFN-gama, TNF-alfa, e IL-2. A imunização subcutânea com Ad5-HIVBr18 induziu TCD4 a secretarem mais citocinas com tais perfis, superando TCD8 (figura 21) (ROSA *et al.*, 2011).

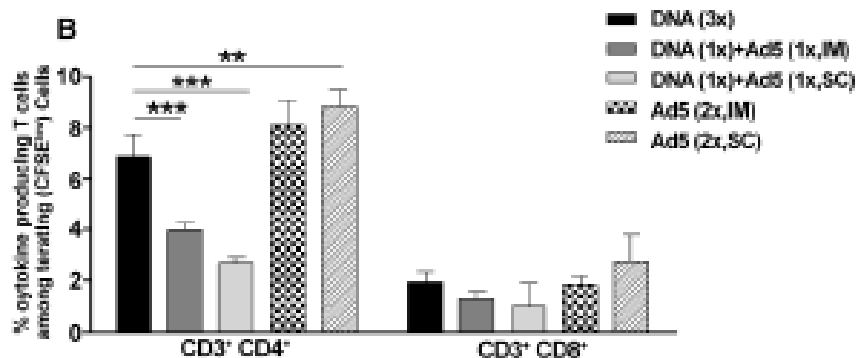


Figura 21: Imunização com Ad5-HIVBr18 induz um maior número de células T polifuncionais quando em comparação com os outros protocolos. As células do baço foram marcadas com CFSE para analisar a frequência de proliferação das células TCD4 e TCD8 produtoras de citocinas. FONTE: ROSA *et al.*, 2011.

Uma análise booleana possibilitou avaliar o perfil polifuncional das células T induzidas com base na capacidade funcional, com um método para detectar proliferação celular e produção de citosinas por citometria de fluxo foi observado a partir da população de citocinas que a população de células TCD4 apresentava um perfil semelhante polifuncional em todos os grupos imunizados. No entanto o grupo imunizado com a vacina contendo o adenovírus 5 induziu um número maior de células TCD4 capazes de proliferar e produzir IFN-gama e TNF-alfa, sozinho ou combinado, quando comparada com o grupo imunizado com HIVBr18. Também foi possível observar que para as células TCD8 houve uma maior prevalência na produção de IFN-gama e TNF-alfa, juntas ou separadas, em todos os grupos imunizados, sendo que o grupo que foi imunizado com Ad5-HIVBr 18 apresentou maiores percentuais de células produtoras de citocinas do que o grupo que foi imunizado com a vacina de DNA (ROSA *et al.*, 2011).

Para verificar se o protocolo de vacinação com o Ad5 seria capaz de apresentar uma resposta imune específica ampla foi feita um teste ELISA com IFN-gama estimulado com cada um dos 18 peptídeos codificados. A imunização com HIVBr-18 induz resposta para sete deles; a imunização subcutânea com a vacina que contém o adenovírus induz resposta para dois peptídeos a mais (figura 22), o vetor viral selecionado foi capaz de aumentar a imunogenicidade e em menor grau também apresentou impacto na amplitude das respostas imunes contra os epítomos (ROSA *et al.*, 2011).

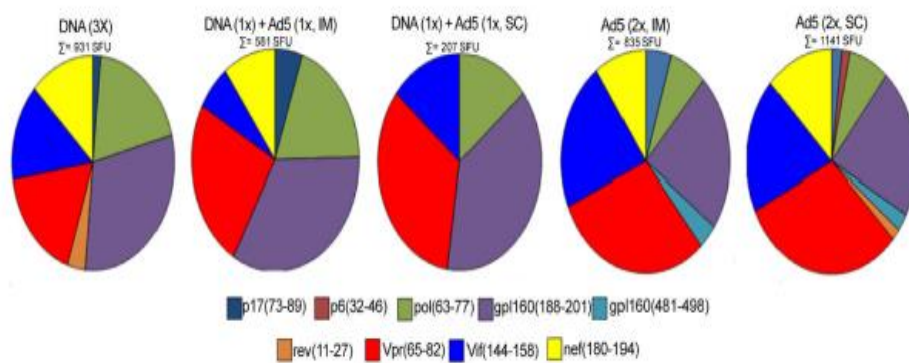


Figura 22: Amplitude das respostas imunes nos diferentes protocolos de imunização. Duas semanas após a ultima imunização, as células do baço foram analisadas quanto a resposta especifica de IFN-gama. Foram avaliadas *in vitro* na presença dos 18 epítomos do HIV-1, os gráficos mostram a frequência de células T especificas e secretoras de IFN-gama para cada peptídeo. FONTE: ROSA *et al.*, 2011.

Dada a importância das respostas induzidas pela vacina em longo prazo, foi possível avaliar a presença de células T especificas após 28 semanas (figura 23), as respostas proliferativas foram mensuráveis ate este período. Porem muito maiores no grupo imunizado por via subcutânea com Ad5HIVBr18 (ROSA *et al.*, 2011).

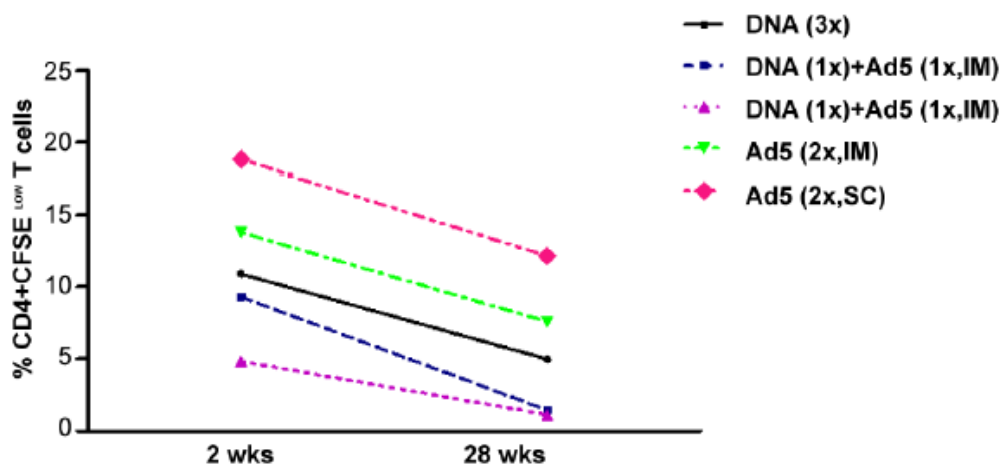


Figura 23: Ad5-HIVBr18 induz respostas proliferativas mais elevadas até 28 semanas após a ultima imunização. Vinte e oito semanas após a ultima imunização, as células do baço dos

animais imunizados foram reunidas, marcadas com CFSE e cultivadas durante 5 dias na presença de peptídeos de HIV-1 combinados. FONTE: ROSA *et al.*, 2011.

A capacidade das células secretarem citosinas ao longo do tempo também foi avaliada, por ELISPOT, foi detectável a secreção de IFN-gama em todos os grupos imunizados até 28 semanas e foi significamente maior no grupo imunizado com Ad5-HIVBr18. A análise mostrou que diferentes protocolos de imunização induzem de 4-9% de células TCD4 que proliferaram e produziram pelo menos uma citosina em resposta aos peptídeos do HIV. Quando analisado o período de tempo, é possível observar que a Ad5-HIVBr18 induziu um número muito maior de células específicas do peptídeo TCD4 proliferativas e capazes de produzir IFN-gama e TNF-alfa simultaneamente, mostrando que os protocolos de imunização a base do Ad5, principalmente por vias subcutâneas, geram uma resposta específica mais durável do que a imunização feita por DNA (ROSA *et al.*, 2011).

Por fim, foi avaliada na semana 28 a amplitude das respostas imunes para todos os grupos imunizados, foi possível avaliar que o número de peptídeos reconhecidos variaram de 2-9. A resposta mais ampla foi vista no grupo que recebeu a vacina HIVBr18, a comparação das semanas 2 e 28 mostraram que diferentes epítomos foram alvos. Com exceção da p17 todas as respostas foram maiores nos grupos imunizados por via subcutânea quando usado o Ad5, esses mostram que o impacto na magnitude da resposta imune induzida com o tempo foi maior (ROSA *et al.*, 2011).

No âmbito de pesquisas por vacinas, a RV144 se destaca. Este estudo conduzido por pesquisadores da US Military HIV research program localizada em Bethesda, combina duas vacinas que não mostraram eficácia quando administradas separadamente, a ALVAC-HIV e AIDSVAX B/E. A ALVAC-HIV é uma vacina baseada em um pox-vetor de clonagem viral recombinante (canarypox), contendo o domínio Gag-pro e as glicoproteínas 41 e 120 da cepa viral 92TH023, e a AIDSVAX B/E é uma vacina bivalente contendo a GP-120 da cepa MN. Desta forma, combinando uma vacina contendo DNA com outra vacina de proteínas, a RV144 induz tanto resposta imune celular quanto humoral (KARASAVVAS *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014).

Tanto a gp120 quanto a gp41 apresentam grande variabilidade em sua sequência primária entre os diferentes subtipos de HIV-1 descritos. Tal variabilidade genética é fundamental para que a evasão da resposta imune ocorra, assim como o desenvolvimento da resistência a antirretrovirais (GRANADOS-GONZALES et al, 2009).

A entrada do HIV-1 na célula hospedeira envolve a união da gp120 com o receptor de membrana CD4. Essa união leva a modificações tanto na gp120 como da CD4, facilitando a interação com os correceptores CCR5 e CXCR4 (Figura 33). A união dos correceptores produz novas mudanças conformacionais e permite a dissociação entre a gp120 e a gp41, levando a fusão das membranas viral e celular (GRANADOS-GONZALES et al, 2009).

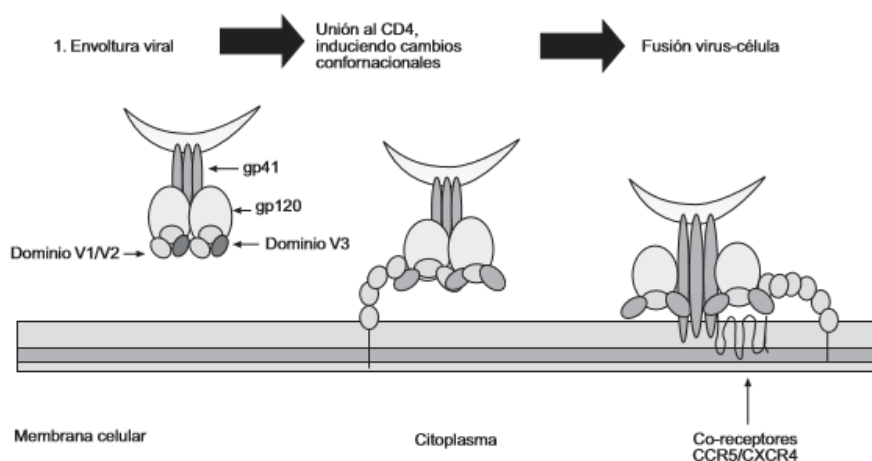


Figura 24: Descrição das etapas importantes durante a infecção do vírus da imunodeficiência humana em células alvo. Papel das diferentes estruturas envolvidas na união da glicoproteína 120 aos receptores e co-receptores. 1) Estrutura trimerica funcional da glicoproteína 160 diagrama funcional estrutura trimerica glicoproteína 160. 2) Após a união da glicoproteína 120 ao receptor CD4, que induz alterações conformacionais, as regiões V1/V2 e V3 são abertas permitindo a ligação aos co-receptores. 3) Depois de alterações conformacionais V1 / V2 e V3 se ligam diretamente aos co-receptores, o que induz a outras alterações conformacionais que permitem a exposição da glicoproteína 41 e a formação do péptido de fusão.

A gp120 (figura 25) é composta por 5 regiões variáveis (V1 a V5) e 5 regiões constantes (C1 a C5) que tendem a ser similares entre os diferentes vírus isolados. As regiões V1, V4 e V5 não possuem funções claramente definidas, entretanto sabe-se que mutações no loop V1 pode afetar a formação

de sincícios virais, mas mais estudos são necessários para elucidar as corretas funções de tais regiões. A região V3 possui função pouco mais elucidada, e estudos demonstram que a supressão desta região anula completamente a infectividade do HIV. (GRANADOS-GONZALES et al, 2009).

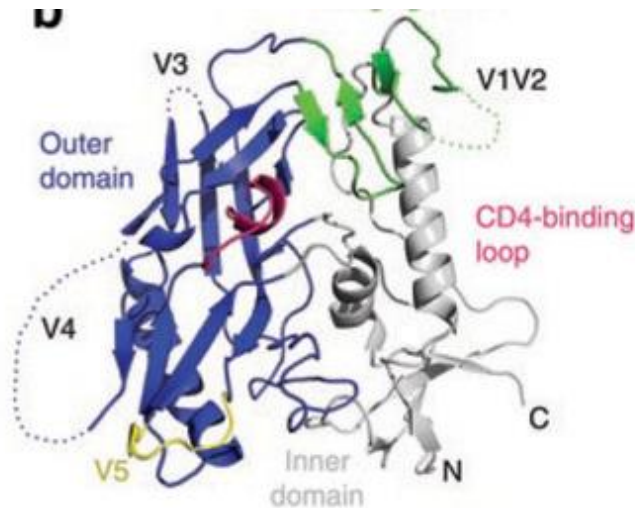


Figura 25: Representação da estrutura da gp120, evidenciando os 5 loops variáveis (V1 a V5) e o sítio de ligação do CD4. FONTE: DISKIN et al, 2010 (ADAPTADA).

As regiões V1 e V2 encontram-se unidas por pontes de dissulfeto, formando o domínio V1V2 (Figura 26). Epítomos encontrados no segundo loop variável (V2) foram associados com funções do envelope do HIV que são importantes na infectividade, escape de anticorpos neutralizantes, formação de trímeros de *env*, e proteção do sítio de ligação de correceptores. Utilizando análises como *microarray* e ELISA, foi demonstrado que os imunógenos usados no estudo induzem anticorpos contra o loop V2 da glicoproteína 120 de diversos subtipos de HIV-1 (KARASAVVAS et al, 2012; KIM et al, 2014).

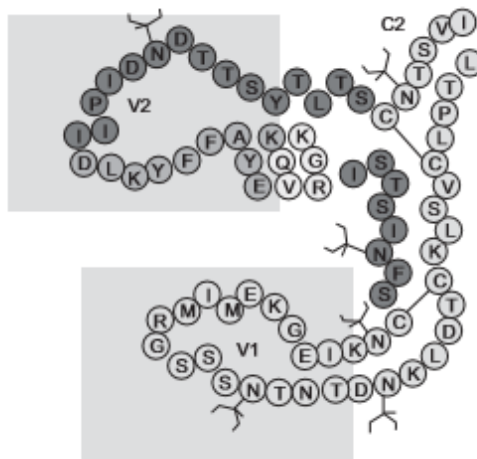


Figura 26: Estrutura das regiões variáveis V1 e V2. O domínio V1 V2 contém epítomos lineares, caracterizados por composição muito heterogênea de aminoácidos; No entanto, apresenta um epítipo relativamente conservado, que é o alvo de anticorpos neutralizantes. FONTE: GRANADOS-GONZALES et al, 2009.

Cerca de 16 mil voluntários tailandeses, em um ensaio randomizado e duplo cego, receberam doses da ALVAC-HIV nos meses 0, 1, 3 e 6 e AIDSVAX B/E no terceiro e sexto mês. Pesquisadores descobriram que anticorpos contra subtipo B da gp120, mais especificamente contra o loop V2, parecem diminuir o risco de infecção com a RV144 (KARASAVVAS et al, 2012; KIM et al, 2014).

Para melhor investigar as respostas induzidas pela vacina RV144, foram realizados testes de ELISA, usando a vacina com três proteínas recombinantes da gp120 de diferentes cepas do HIV-1: MN, 92TH023 e A244. A244 e MN compreendem o *boost* de proteína (AIDSVAX B/E), e 92TH023 o vetor canarypox. Amostras do plasma sanguíneo dos voluntários foram testadas em 9 momentos: visita 1, na pré-vacinação; visita 8, duas semanas após a vacinação, e visita 9, 28 semanas após a vacinação. Os testes foram feitos com o objetivo de avaliar a resposta de anticorpos contra proteínas da gp120, como mostra a figura 27. Como se pode observar no gráfico, as respostas na visita 1 foram negativas. Dos 32 vacinados, 31 (97%) obtiveram uma ampla resposta contra as três proteínas recombinantes na visita 8, com reatividade contra MN e A244 maiores, seguida pela 92TH023. Apesar de a frequência de respostas positivas na visita 9 não ter mudado após 6 meses da administração da última vacina, as repostas contra as três proteínas gp120 declinaram (KARASAVVAS et al, 2012; GRANADOS-GONZALES et al, 2009).

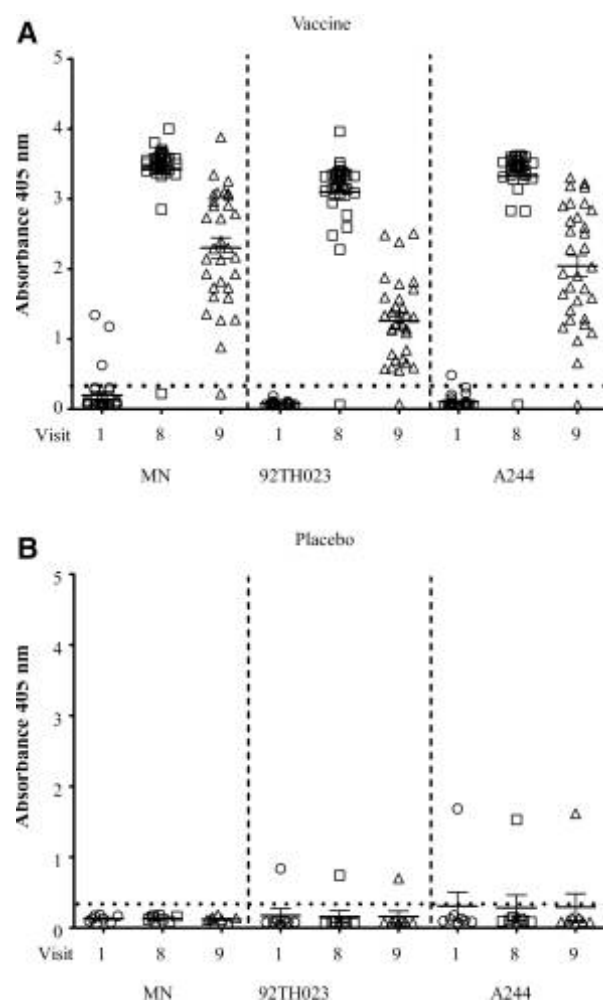


Figura 27: respostas de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do *env* do HIV-1 com a vacina RV144 e placebo. (A) respostas de anticorpos contra proteína gp120 recombinante MN, A244 e 92TH023 nas visitas 1, 8, e 9 determinadas por ELISA, usando amostras de plasma sanguíneo. (B) Respostas de anticorpos para as mesmas proteínas recombinantes e visitas com placebo. FONTE: KARASAVVAS ET AL, 2012.

Com base nas respostas de anticorpos para os peptídeos lineares inseridos no loop V2, Karasavvas e colaboradores (2012) concluíram que os anticorpos interagem com a região mediana do loop V2, região esta que contem aminoácidos altamente conservados.

Para analisar a indução de anticorpos específicos para o loop V2 com a RV144, pesquisadores sintetizaram peptídeos cíclicos (Cyc) do V2 baseados na glicoproteína 92TH023. Para verificar as respostas de anticorpos contra as extremidades e do meio do loop V2, dois peptídeos cíclicos adicionais foram

usados (Scr FI e Scr MR). Amostras de plasma das visitas 1 e 8 foram testadas contra estes peptídeos cíclicos pelo método de ELISA (Figura 28). Nenhuma resposta de anticorpos a estes peptídeos foi observada na pré-vacinação (visita 1). Dos 32 indivíduos vacinados na visita 8, 31 destes tiveram respostas positivas de IgG contra os peptídeos cíclicos. As respostas contra o peptídeo Scr FI foram praticamente iguais às respostas contra o peptídeo V2, diferentemente do peptídeo Scr MR, que teve suas respostas significativamente reduzidas. Isto indica que a maioria dos anticorpos contra o loop V2 ataca a região mediana do loop (KARASAVVAS et al, 2012).

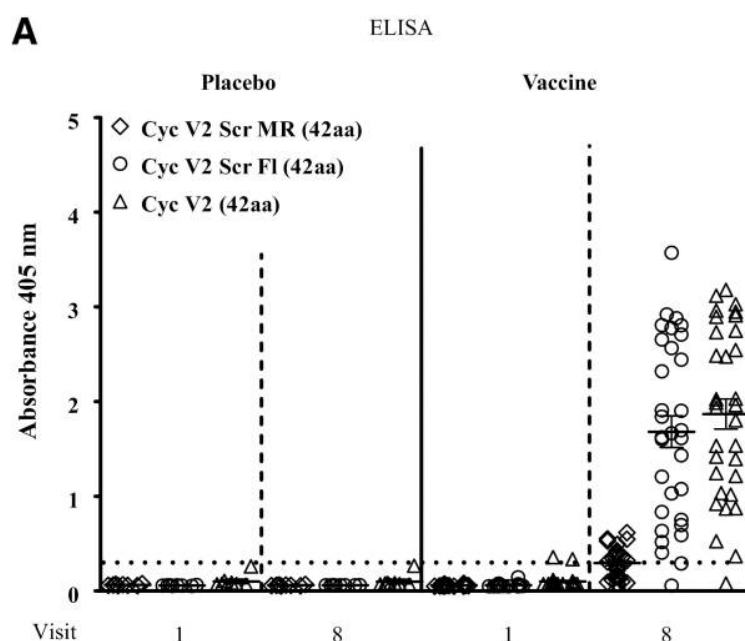


Figura 28: Respostas de anticorpos contra peptídeos cíclicos do loop V2 por ELISA. As respostas na visita 8 de indivíduos vacinados foram significativamente maiores do que em indivíduos com placebo. Cyc V2 representa peptídeos cíclicos da região mediana do loop V2; Cyc V2 Scr FI e Cyc V2 Scr MR representam os peptídeos das extremidades do loop V2. FONTE: KARASAVVAS ET AL, 2012.

Com o objetivo de determinar a durabilidade das respostas contra o loop V2, os níveis de anticorpos nas visitas 8 e 9 foram comparados usando o peptídeo cíclico do V2. A frequência de anticorpos na visita 8 foi alta em 31 dos 32 indivíduos vacinados, como mostra a figura 29. A frequência e a magnitude

das respostas de anticorpos decaiu significativamente na visita 9 (KARASAVVAS et al, 2012).

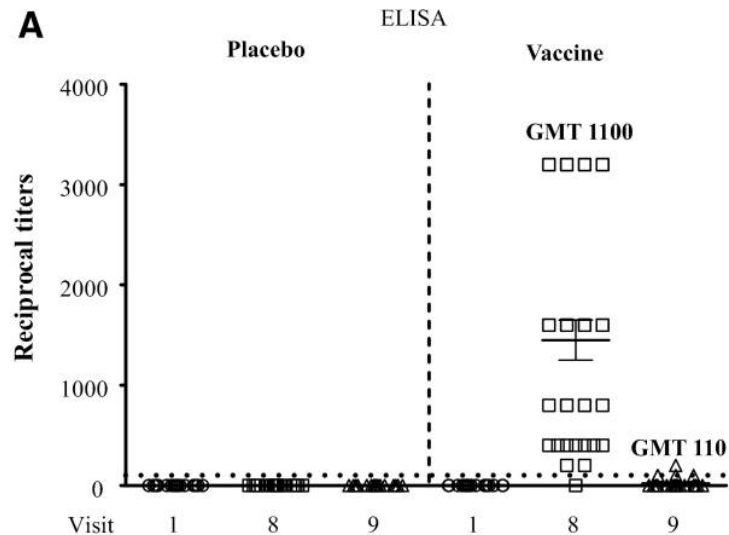


Figura 29: Respostas de anticorpos ao peptídeo cíclico V2 nas visitas 1, 8 e 9. É possível observar que as repostas declinam com o tempo. KARASAVVAS ET AL, 2012.

Os níveis de respostas dos anticorpos contra os loops V2 e V3 foram comparados em indivíduos naturalmente infectados pelo HIV (Figura 30). Sete em cada vinte (35%) indivíduos testados tinham uma ampla resposta contra a região V3, mas níveis indetectáveis contra o loop V2. Em 3 indivíduos de 20 (15%), a resposta contra V2 foi alta, mas ainda abaixo das respostas de anticorpos contra a região variável V3. Todos os indivíduos infectados tiveram respostas mais elevadas para V3 do que para V2. Dos 20 sujeitos infectados, um (5%) não tinha resposta de anticorpos nem para V2 e nem para V3 (KARASAVVAS et al, 2012).

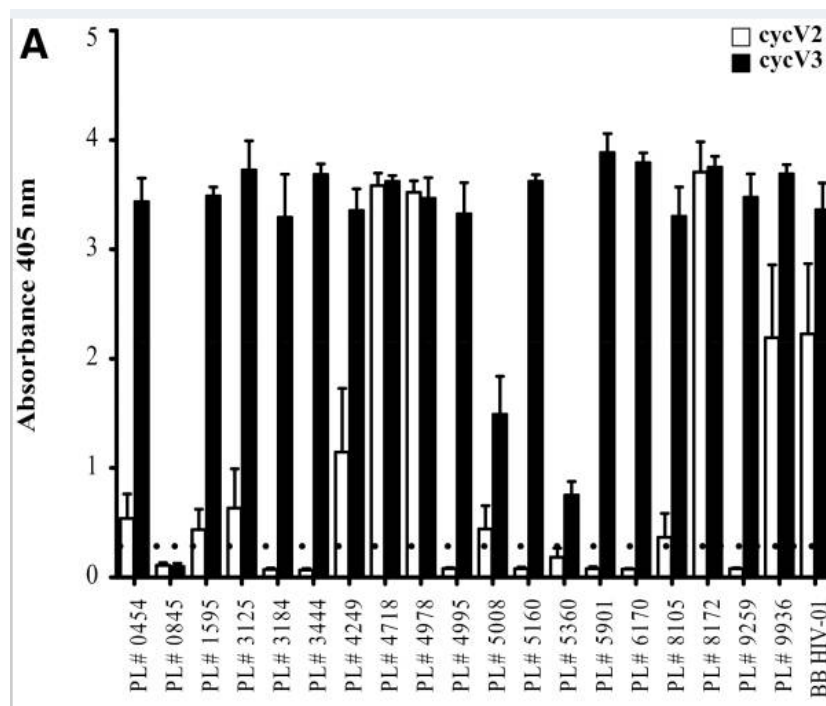


Figura 30: Respostas de anticorpos contra os loops V2 e V3 em comparação. Em indivíduos infectados pelo vírus da deficiência humana os anticorpos contra a região V3 da gp120 foram elevados quando relacionados com o loop V2 da mesma glicoproteína. FONTE: KARASAVVAS et al, 2012.

Dos indivíduos vacinados com a RV144, 31 de 32 (97%) tiveram resposta de anticorpos para o peptídeo cíclico V2, mas apenas 18 de 32 (56%) tinham respostas de anticorpos para o peptídeo cíclico V3 (figura 31). Nenhum dos 32 indivíduos vacinados tinha uma resposta de anticorpos contra o loop V3 que fosse maior do que a de V2. Um dos indivíduos vacinados não teve resposta contra nenhum dos loops variáveis testados (KARASAVVAS et al, 2012).

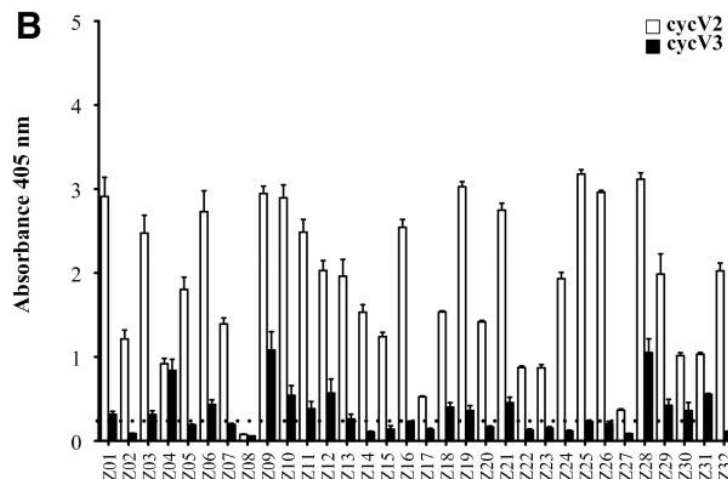


Figura 31: Comparação de respostas contra as regiões variáveis V2 e V3 em indivíduos que receberam doses da RV144. Nota-se que os anticorpos contra o loop V2 tiveram maior frequência quando comparados ao loop V3. FONTE: KARASAVVAS et al, 2012.

Em contraste com as respostas específicas de anticorpos IgG contra o loop V2 induzidos pela vacina RV144, as respostas contra o loop V3 com a RV144 tiveram menor magnitude e frequência (56%), indicando assim, que o RV144 não induziu intensa resposta contra a região V3. No entanto, as respostas para o loop V3 em indivíduos infectados pelo HIV-1, foram superiores em magnitude e frequência (95%). Indivíduos infectados tinham amplas respostas de anticorpos contra V3, mas, 35% destes não possuíam respostas contra V2. Houve uma resposta 18 vezes superior ao loop V3 em indivíduos infectados pelo HIV-1 em comparação com a vacina RV144. No entanto, os anticorpos específicos do loop V2 em indivíduos infectados eram muito menos frequentes (50%) do que as induzidas pela de vacina. Porém, permanece-se desconhecido se esta observação de respostas elevadas contra V2 e baixas contra V3 em indivíduos vacinados em comparação com indivíduos com HIV está relacionado com o antígeno da vacina (KARASAVVAS et al, 2012).

A eficácia estimada no teste com a RV144 foi de cerca de 31.2% em 42 meses, mas dados nos meses 12 e 18 estimam a sua eficácia em 60 % e 44%, respectivamente. Estudos iniciais demonstraram que a ligação do anticorpo a antígenos da gp120 foi encontrada em 95% dos vacinados 2 semanas após a

vacinação, mas diminuiu substancialmente nos 6 meses subsequentes (KARASAVVAS et al, 2012; KIM et al, 2014).

A geração de resposta imune humoral por ALVAC-HIV e AIDSVAX B/E para a região mediana do loop V2 levanta hipóteses a serem testadas em relação a indicadores de proteção contra a infecção por HIV. O loop V2 contém muitas características conservadas, e vários anticorpos monoclonais anti-V2 mostram ampla reatividade, sugerindo que os anticorpos podem atingir elementos conservados no V2 e que esta região do *Env* pode ser essencial para a indução de anticorpos protetores em vacinas bem sucedidas. Uma vez que a substituição dos diversos aminoácidos no loop V2 pode alterar a estrutura e a função do *Env* tornando o HIV menos infeccioso ou menos mais sensível à neutralização, a escolha da utilização do envelope e particularmente o loop V2 na concepção racional de vacina deve ser cuidadosamente considerada. É provável que os anticorpos RV144 possuam múltiplos epítomos de ligação dentro da região mediana do loop V2, e mais estudos são necessários para caracterizar as suas especificidades de ligação. (KARASAVVAS et al, 2012; KIM et al, 2014).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de uma terapia eficaz contra o vírus da deficiência humana é de grande importância para tratar os portadores, reduzir as taxas de transmissão e óbito. Atualmente, a única forma de tratar a doença é paliativa, uma vez que os antirretrovirais não erradicam o vírus do organismo, além de trazerem consigo inúmeros efeitos adversos.

O uso de medicamentos inibidores da histona deacetilase ainda apresenta-se incerto, uma vez que as doses toleráveis pelo sistema imunológico necessitam de ajustes e estudos. Além disso, cada organismo apresenta respostas diferentes tanto às drogas quanto ao vírus. A mutatividade viral é um obstáculo para este tratamento, já que este depende de uma resposta rápida e eficaz do sistema imunológico, sendo capaz de controlar a viremia, com a ajuda dos antirretrovirais.

Anticorpos neutralizantes desenvolvem-se durante o curso da infecção, e anticorpos amplamente neutralizantes desenvolvem-se em 20% das pessoas dentro de dois anos após a infecção, porém a capacidade do HIV-1 para escapar da neutralização significa que mesmo pessoas com tais anticorpos eventualmente progridem para AIDS e morte.

A tarefa de desenvolvimento de vacinas também é dificultada por constantes desafios científicos. A ausência de resposta imune do hospedeiro, o limitado entendimento de correlatos de proteção induzidos pela vacina e modelos animais imperfeitos limitam o progresso de desenvolvimento de vacinas contra o HIV. Além disso, a enorme variação da sequência genômica do vírus complica a escolha de imunógenos para a criação da vacina. Associado a isto, está o fato de que a infecção e destruição de linfócitos TCD4+ prejudicam respostas imunes eficazes.

O nível de eficácia final de 31% demonstrado na vacina RV144 é modesto. Porém, é a primeira vez que um sinal de êxito em estudos em humanos de qualquer vacina contra o HIV demonstra eficácia. É difícil concluir sobre o quão real é esta eficácia sem antes realizar análises seguintes, já que a capacidade máxima da vacina pode mudar com o decorrer do tempo. Inicialmente a vacina demonstrou eficácia de 50 a 60%, declinando em

seguida. Supõe-se que se mais doses de reforço da RV144 fossem administradas, o resultado pode ser mais extenso.

Um dos maiores focos é usar este primeiro sinal positivo em humanos para aperfeiçoar os ensaios utilizados atualmente para avaliar a imunogenicidade das vacinas testadas.

A Ad5-HIVBr18 apresentou resultados satisfatórios em mais de 10 anos de pesquisas em modelos animais. O imunizante mostrou-se capaz de controlar a carga viral nos organismos infectados. Os testes mostraram que a vacina apresenta eficácia elevada e duradoura, sendo reconhecida por 90% das células imunológicas dos camundongos imunizados. O grande desafio é buscar os mesmos resultados em organismos mais complexos como o dos seres humanos.

Ainda há muito a ser feito na área de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, porém estudos que ainda estão sendo realizados com o uso de novas tecnologias têm ajudado principalmente na elucidação de mecanismos do vírus ainda desconhecidos, assim auxiliando nas diretrizes de desenvolvimento das vacinas.

Ainda que até o momento não exista a cura para esta síndrome, uma vez que as novas terapias com medicamentos, interleucinas e vacinas não se mostram totalmente eficazes e eficientes, muitas descobertas relevantes foram feitas para que no futuro ocorra a extinção do vírus da imunodeficiência humana.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Técnicas de laboratório comumente utilizadas em imunologia. In: _____. **Imunologia: Celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AIRES, Margarida de Mello. Fisiologia. 3ª edicao, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2011

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). [online] **Banco de Dados de Medicamentos**. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/base>>, (2000).

APOSTOLICO, Juliana S. **Influência da imunização inicial com a vacina codificando epítomos para linfócitos T CD4+ do HIV na resposta imune direcionada a proteína env**. 2013, p. 188, F. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, 2013.

ARCHIN, N. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. **Nature**, v. 487, p.482-485, jul. 2013.

AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. **Hematologia Básica**. 4. ed. São Paulo: Luana, 2008

BAIN, Barbara J. **Células sanguíneas: Um guia prático**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2007.

BAYER. **Manual Versant HIV-1 RNA Assay(bDNA)**. São Paulo: [s.n.], 2007.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica**. 3ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BISCASSI, Juliana R. **Os avanços nas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**. 2013. p.29. Monografia- Curso de Biomedicina , Faculdade de Americana, Americana, 2013.

FILHO, Geraldo B. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e hepatites virais, Brasília-DF. disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/efeitos-colaterais>>, acesso em: 10/01/2016.

BRITO, M.A. **Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, p. 159-168, 2011.

CASKEY, Marina et. al. **Viraemia suppressed in HIV-1-Infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117**. Letter, Nova York, p.1-6, 2015.

COFFMAN, Robert L. et. al. **Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to work**. Immunity, oct. 29, 2010.

COIRADA, Fernanda C. **Imunogenicidade de uma vacina codificando epítomos para linfócitos CD4+ do HIV (HIVBr18) na forma de partículas vírus-símile (VLP)**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.36, ago.2015.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNEL, M.. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

CONNOLLY, N.C., et al., **Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenic city in HIV-1infected individuals**. Clinical and Vaccine Immunology vol. 15, n.2, 2008.

CURI, Rui; PROCOPIO, Joaquim. Fisiologia Básica. p. 857. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DENG, Kai et. al. **Broad CTL responses is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations**. Letter, 2015.

DE ROBERTS, E. M. F.; HIB, Jose. **Bases da biologia celular e molecular**. Tradução por Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade; Sérgio Ferreira de OLIVEIRA; Telma Maria Tenório Zorn. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Tradução da 6ªed. Americana. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2006.

DIAZ, Ricardo S.; VÁZQUEZ, Vicente S. **Infecção pelo Hiv e terapia antirretroviral em 2012**. Permayer Brasil Publicações São Paulo, 2012.

DONNEL, Deborah et. al. **Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analyses**. Lancet (2010); p.1-15; apr. 2016.

DOUGLAS, Carlos Roberto. **Tratado de Fisiologia**: Aplicada às ciências da saúde. 4. ed. São Paulo: Robe editorial, 1999.

DOUDNA, Jennifer A.; COX, Michael M. **Biologia Molecular**: Princípios e técnicas. Porto Alegre: Artmed, 2012.

DISKIN, Ron; MARCOVECCHIO, Paola; BJORKMAN, Pamela. Structure of a clade C HIV-1 gp120 bound to CD4 and CD4-induced antibody reveals anti-CD4 polyreactivity. **Nature Structural & Molecular Biology**, California, v. 17, p.608-6013, mar. 2010.

FERRAZ, Eduardo Gomes et al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Rio Grande do Sul, v. 59, n. 3, p.483-490, jul. 2011.

FLINT, Jane S. et. al. **Principles of virology**. 3 ed. ASM Press, 2008.

FLYNN, Neil et al. Placebo-Controlled Phase 3 Trial of a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine to Prevent HIV-1 Infection. **The Journal Of Infectious Diseases**. Brisbane, p. 654-665. mar. 2005.

FOCACCIA, Roberto. Salmoneloses. In: _____. **Tratado de infectologia**. 4.ed. vol.1. São Paulo: Atheneu, 2010.

GARDNER, Matthew R. et. al. **AAV- expressed e CD4-IG provides durable protection from multiple SHIV challenges**. Letter, New Jersey, v.519, p.84-91, mar. 2015.

GOLDMAN, Lee; AUSIELLO, Dennis. **Cecil Medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. GOLDMAN L, B. C. **Imunologia relacionada a AIDS/SIDA**. 21 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

GUEDES, R. **Imunologia celular e molecular**. 7 Ed. Elsevier, 2011.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

GRANGEIRO, Alexandre; CASTANHEIRA, Elen Rose; NEMES, Maria Inês Battistella. A re-emergência da epidemia de aids no Brasil: desafios e perspectivas para o seu enfrentamento. **Interface (Botucatu)**, Botucatu , v. 19, n. 52, p. 5-8, Mar. 2015 .

GRANGEIRO, Alexandre et. al. **Novos métodos preventivos para o HIV: reconhecendo as fronteiras entre a autonomia dos indivíduos e as políticas públicas**. Revista Brasileira de Epidemiologia. Vol.1, p.1-4,set.2015.

HANSEL, Donna E.; DINTZIS, Renee Z.. **Fundamentos de Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais de Henry**. 21ªed. Rio de Janeiro: Manole, 2012.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Joint UNITED Nations Programme on HIV/AIDS. 90-90-90: an ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2014. p. 33

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global Report: **UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013** Geneve: Word Heath Organization; 2013.

JULIEN, Jean-Philippe. Origins of a Vaccine-Induced, Human Anti-HIV-1 Antibody. **EBioMedicine**. Toronto, 04/2015. Caderno p. 632-633.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

KARASAVVAS, Nicos et al. The Thai Phase III HIV Tyoe 1 Vaccine Trial (RV144) Regimen Induces Antibodies That Target Conserved Regions Within the V2 loop pg gp120. **AIDS Research and Human Retroviruses**. Bangkok, 11/2012. Caderno p. 1444-1455.

KEELE, BF et. al. **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1**. Science, jul. 2006.

KIM, Jerome et al. Lessons From the RV144 Thai Phase III HIV-1 Vaccine Trial and the Search for the Correlates of Protection. **The Annual Review Of Medicine**. Austrália, p. 1-15. out. 2014.

KOURROUSKI, Maria F. C. **Adesão ao tratamento: vivências de adolescentes com HIV/AIDS**. 2008, p. 111. Dissertação(Mestrado) – Escola de enfermagem de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2008.

KONEMAN, Elmer W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KUMAR, Vinay et al. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAWRENCE, Toby. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 1.6 (2009): a001651. *PMC*.

LEDERMAN, M. M. et. al. **Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment**. JAMA, 2006.

LEHNINGER, Albert L. et al. Traduzido por SIMÕES, Arnaldo Antonio, LODI, Wilson Roberto. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed, São Paulo: Sarvier, 1995.

LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. 10 ed. São Pulo: Artmed, 2010.

LIMA, A. Oliveira et. al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: Técnica e interpretação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 5, p. 1-5.

LORENZI, Therezinha Ferreira. **Manual de hematologia: Propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LORENZI, Therezinha Ferreira. **Atlas de hematologia: Clínica hematológica ilustrada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

MARMORSTEIN, Ronen. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p.422-432, jun. 2001.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo B.. **Bioquímica Básica.**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386p.

MENDITI, Karla Baptista da Cunha; KANG, Hye Chung. O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 4, p.453-460, abr. 2007.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento Nacional de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico Aids/DST**. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014.

MIRANDA, Daniella D. et. al. **Origem e evolução do HIV**. Ciencias biológicas, 2005.

MOTTA, Valter T.. **Bioquímica Clínica para o laboratório: Princípios e interpretações**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

MUDD, Philip A. et al. **Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication**. Letter, Wisconsin, v.0, n.1, p.1-7, 2012.

MURRAY, Patrick R.; ROANTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A.. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

PEREIRA, G. F. M. et al. **Boletim epidemiológico HIV e DST**. 2006.

PETERLIN, B.M., Trono, D. **Hide, Shield and Strike Back: how HIV-infected cells avoid immune eradication**. Nature Reviews Immunology, vol 3, 97-107, 2003.

Disponível em: <http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_HIV.htm>

acesso em: 08/01/2016.

Organização Mundial de Saúde, Global summary AIDS of the epidemic 2011, disponível em: < <http://www.who.int/hiv/en/>> acesso em: 15/09/2015.

RAMUSSEN, Thomas A, et. al. **Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies: Advancing to clinical trials.** Human vaccines e immunotherapeutics. Denmark, v.9, p.790-799, abr. 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; Farmacologia, 6ª edicao, Rio de Janeiro, Elsevier, 2007.

RIBEIRO, S.P., ROSA, D.S. et al. **A Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules.** Plos One vol. 5, nº 6.

RIBEIRO, Susan P. **Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas de HLA classe II.** 2010, p.247, Tese Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

ROBERTS, E. de; HIB, J.. **Bases da biologia celular e molecular.** 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

ROSA, D.S. et. al. **A recombinant Adenovirus Enconding Multiple HIV-1 Epitopes Induces Stronger CD4+ T cell Responses than a DNA Vaccine in Mice.** J. Vaccines Vaccin, vol.2, jun. 2013.

ROSA, D.S. et al. **A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits.** Plos one, jan. 2011.

vigorous polyfunctional, long-lived CD4+ and CD8+ T cell responses. Plos One vol. 6, n.2, 2011.

RUBBERT, A. et al. HIV Medicine. Patogênese da Infecção pelo HIV-1. Disponível em:

<http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/03_Pathophys.html> acesso em: 10/01/2015.

RUTHERFORD, George W.. **A epidemiologia da AIDS no mundo.** JB DST, Rio de Janeiro, v.6, n.9, p.6-11,1997.

SANTOS, Paulo Caleb Júnior de Lima. **Hematologia - métodos e interpretação.** São Paulo: Rocca, 2012. SILVA, Penildon. Metronidazol. In: _____. **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SANTANA, Vinicius C. **Desenvolvimento de estratégias para aumento da imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr-18 baseadas na fusão com a glicoproteína D do herpes vírus humano tipo 1 e na coadministração de citocinas.** 2014, p. 114. Tese – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

SAUNDERS, Kevin et al. Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection. **Journal Of Virology**. Massachusetts, p. 8334-8345. ago. 2015.

SHIN, So Youn. Recent update in HIV vaccine development. **Clinical and Experimental Vaccine Research**. Seo-gu, 01/2016. Caderno p. 6-11.

SHIOZAWA, K et al. Preclinical studies of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) combined with cytosine arabinoside and etoposide for treatment of acute leukemias. **Clinical Cancer Research**. fev. 2009.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003.

SMITH, Colleen; MARKS, Allan; LIEBERMAN, Michael. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SOUZA, Deise. **Educação continuada em saúde para a prevenção do HIV/AIDS no local de trabalho**. 2011, Monografia- Faculdade de medicina de São Paulo; São Paulo, 2011.

SOUZA, Mark de et al. The Thai Phase III Trial (RV144) Vaccine Regimen Induces T Cell Responses that Preferentially Target Epitopes within the V2 Region of HIV-1 Envelope. **Journal Of Immunology**. Bangkok, p. 5166-5176. maio 2012.

TORTORA, Gerard; CASE, Christine; FUNKE, Berdell. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

Unicef- HUGHES – d'Aeth, A. **1998 Zambia: Evaluation of HIV/AIDS Peer Education Programs.** 1998

UNAIDS – **Joint United National Programme on HIV/AIDS (2010) Report on the Global AIDS epidemic 2010.** Geneva. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/globalreport/2009/jc1510_2009globalreport_en.pdf. Acesso em: 15/01/2016.

UNAIDS – **Joint United National Programme on HIV/AIDS (2011) Report on the Global AIDS epidemic 2011.** Geneva.

UNAIDS – **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (2012) Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012.** Geneva. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2012/20121123_globalreport_en.pdf. Acesso em: 15/01/2016.

UNAIDS. **Declaração política sobre HIV/VIH/AIDS/SIDA: intensificando nossos esforços para eliminar o HIV/vih /AIDS/sida.** p.19, 2013

UNAIDS. **AIDS by the numbers.** p. 1-7, 2013.

VANNI, Andréa Cristina. **Análise das características genéticas da região V3 e do tropismo pelos co-receptores CCR5 e CXCR4 do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 subtipos B, C e recombinantes BC através de ferramentas genotípicas.** 2011. p. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de genética e biologia molecular, departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

VASSENA, Lia et al. Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4+ and CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.** Bethesda, p. 2355-2360. fev. 2007.

VIRGIN, H.W.; WALKER, B.D., **Imunology and the elusive AIDS vaccine.** Nature, vol. 464, pg. 224-31, 2010.

WALDMAN, Eliseu Alves *et al.* **Vigilância de eventos adversos pós-vacinação e segurança de programas de imunização.** Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 45, n. 1, p.173-184, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rsp/v45n1/1884.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

WATSON, JD. **Biologia molecular do gene**. 5^a. ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.

WAWER, Maria J. et. al. **Rates of HIV-1 transmission per Coital Act, by Stage of HIV-1 Infection , in Rakai, Uganda**. The Journal of Infections Diseases, 2005.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.. **Biologia Molecular Básica**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ZOLLA-PAZNER, Susan; CARDOZO, Tomothy. **Structure-function relationships oh HIV-1 envelope sequence-variable regions provide a paradigm for vaccine design**. National Review of Immunology, Nova York, v. 10, n. 7, p. 527-535.