

Ana Catarina da Mota Mendes Andrade Silva

VII I - Novas e Futuras Perspectivas Terapêuticas

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

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Catarina da Mota Mendes Andrade Silva

VIH I - Novas e Futuras Perspectivas Terapêuticas

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

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Catarina da Mota Mendes Andrade Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010143515, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 10 de Julho de 2015.

(Ana Catarina Silva)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento.

Cinco anos. Anos culminados nestas páginas. Páginas com grande significado e valor pessoal, que não seria de igual modo verdadeiro, sem a presença e o apoio de algumas pessoas, a quem dedico parte destas páginas.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos por toda a disponibilidade, apoio e simpatia que sempre demonstrou. Obrigada pelo seu à vontade e por ter contribuído para o meu gosto por esta área.

Aos meus Pais, ao Nuno e Vera, e aos meus Irmãos, Miguel, Carla, Pedro, Cesário, Mariana e Rita, por todo o carinho, força e paciência. Muito do que sou hoje o devo a vocês, pelo que nada disto seria possível sem a vossa presença.

À minha MAdrinha e amiga de longa data, por estares sempre presente, até quando não estavas. Obrigada por me passares muito do teu conhecimento e gosto por este curso.

À Daniela “Foquinha” Hoogveld, Joana Olim, Sofia Leal, por me acompanharem desde o primeiro dia, mais cedo ou mais tarde. Viver estes cinco anos com vocês foi, sem dúvida, uma grande aventura. Obrigada pela vossa presença e apoio incondicional.

À minha Pessoa, Octavian Tuca, por estares sempre do meu lado e me dares a força para continuar todos os dias. Obrigada por tudo o que és e tudo o que somos, sem Ti nada disto teria o mesmo valor, nem seria de igual modo tão importante.

Um Muito Obrigada a todos!

NOTA INTRODUTÓRIA

No âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular, que decorre no 5º ano, 2º semestre do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, foi proposto a redacção de uma Monografia, enquadrada no âmbito do percebido no Acto Farmacêutico.

As áreas a meu dispor para o desenvolvimento da Monografia foram inúmeras, tendo optado pela área da virologia. O meu interesse pelas áreas relacionadas com microrganismos advém desde o primeiro contacto com as mesmas, aquando as diferentes unidades curriculares ao longo do ciclo de estudos. Ainda que o contacto com a virologia tenha sido apenas no último ano do MICF, na Unidade Curricular de Virologia, esta área sobrepôs-se, sem dúvida, a todas as outras, nomeadamente pela sua complexidade e beleza.

Neste contexto, será apresentado, nas próximas páginas, a Monografia – VIH 1: Novas e Futuras Perspectivas Terapêuticas. A incidência no Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1, em prol do tipo 2, deve-se ao facto de este último se restringir a uma zona geográfica (África Ocidental), sendo, por isso, menos frequente e menos estudado.

De referir ainda, que esta Monografia não se encontra redigida de acordo com o (novo) Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, por decisão pessoal, ao entender que um trabalho tão importante como este, representativo do término dos meus anos de escolaridade, deve ser escrito em Língua Portuguesa de Portugal, aquela que me foi ensinada e instituída desde os primeiros anos de aprendizagem.

ÍNDICE

Abreviaturas e Siglas	2
Resumo	3
Abstract	3
Vírus da Imunodeficiência Humana.....	4
Classificação	4
Morfologia	4
Genoma	5
Replicação Viral.....	5
Novas Perspectivas Terapêuticas na Infecção por VIH.....	6
I. Vacinas contra o VIH.....	7
Imunidade Humoral	7
Imunidade Celular	9
Vacinas - Quais e Que Obstáculos?	9
II. Terapia Génica.....	10
Interferência com o Ciclo de replicação do VIH - siRNA	10
Transplante de Células Estaminais com Mutação CCR5 Δ 32	11
Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas Geneticamente Modificadas	12
Terapia com CD4-Ig/eCD4-Ig	13
Conclusão.....	15
Bibliografia	16

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV – Adenovirus-Associated Virus
CCDA – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
ADCVI – Antibody-dependent Cell-mediated Virus Inhibition
bNAbs –Broadly Neutralizing Antibodies
CCR5 – Receptor Citocina C-C tipo 5
CCR5mimI – Small CCR5-mimetic Sulfopeptide
CXCR4 – Receptor Citocina C-C-C tipo 4
CD4bs – CD4-binding-site
LTC – Linfócitos T Citotóxicos
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dsRNA – RNA de Dupla Cadeia
Env – Envelope
HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy
HLA – Sistema Antígeno Leucocitário Humano
HSC – Hematopoietic Stem Cells
Ig – Imunoglobulina Humana
IL-2 – Interleucina 2
IN – Integrase viral
MPER – Região Proximal Externa da Membrana da gp41
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
P – Protease viral
RISC – RNA-induced silencing complex
RNA – Ácido Ribonucleico
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
siRNA – Small Interfering RNA
TR – Transcriptase Reversa
VIS – Vírus da Imunodeficiência Símia
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
V1/V2 – Primeiro e Segundo Domínio Variável da Proteína gp120
V3 – Terceiro Domínio Variável da Proteína gp120
ZFN – Nucleases *zinc-finger*

RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Humana e a manifestação da sua infecção, a SIDA, são a sexta causa de morte em todo o mundo, afectando milhões de pessoas globalmente. A existência da terapia HAART veio contribuir para o controlo da infecção, assim como para a redução da mortalidade e morbilidade em indivíduos infectados com VIH I. Contudo, apesar destes avanços, esta terapia não elimina o vírus do organismo e a adesão à terapêutica necessária durante toda a vida, assim como os vários efeitos secundários, são problemas a ser ultrapassados.

Perante o panorama actual da infecção por VIH I e as limitações da terapia HAART, há cada vez mais a necessidade de uma procura de novas terapias. Como tal, novas abordagens terapêuticas têm emergido nos últimos anos, nomeadamente a nível da vacinação e da terapia génica, com resultados prometedores. No entanto, apesar destes resultados, há ainda um longo caminho a percorrer até à descoberta de terapêuticas de prevenção e cura contra a infecção por VIH.

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus and its syndrome AIDS, are the sixth cause of death in the whole world, affecting millions of people globally. Treatment with HAART contributes to the infection control, as well as to the reduction in mortality and morbidity among patients infected with HIV-I. Despite these advances, HAART doesn't eliminate the virus, and the need for lifelong adherence and its side effects are problems that have to be solved.

Giving the current perspective of the infection with HIV-I and the limitations of HAART, there's an increasing need of new therapeutics. Thus, new therapeutic approaches have been proposed, especially in the areas of vaccination and gene therapy, with promising results. However, despite these results, there's still a long way to go in the discovery of prevention therapies and cure against the infection by HIV.

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Classificação

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um vírus pertencente à família *Retroviridae*, uma família específica de vírus que possui a singularidade de converter o RNA genómico viral em dsDNA. Esta capacidade deve-se à actividade de uma enzima, a Transcriptase Reversa (TR) (Wagner e Hewlett, 2004), a qual usa o RNA viral como modelo para construir uma cópia de DNA, que irá ser integrado nos cromossomas da célula hospedeira (Collier e Oxford, 2000).

Esta família possui sete géneros, sendo que dois deles infectam seres humanos: o género *Deltaretrovirus* e o género *Lentivirus*. Este último é um género que inclui dois subtipos de vírus: o VIH tipo 1 e o VIH tipo 2 (Collier e Oxford, 2000).

Morfologia

A partícula do VIH possui um diâmetro de cerca de 120 nm (Wagner e Hewlett, 2004). É constituído por um envelope lipídico exterior, onde estão inseridas duas glicoproteínas virais (proteínas do envelope): a glicoproteína de superfície (gp120) e a glicoproteína transmembranar (gp41) (Collier e Oxford, 2000) [Figura 1]. Estas possuem uma elevada relevância na replicação viral, nomeadamente aquando a entrada do vírus (absorção e penetração) na célula hospedeira.

A superfície interior do envelope é delimitada pela proteína da matriz (p17) (Collier e Oxford, 2000), que, por sua vez, delimita a proteína da cápside (p24), que possui uma forma de cone truncado. O interior da cápside contém duas moléculas de (+)ssRNA, revestidas pela proteína da nucleocápside (p7), assim como três enzimas virais extremamente importantes: a TR, a protease (P) e a integrase (IN) (Wagner e Hewlett, 2004). Sem estas proteínas, o vírus nunca poderia tornar-se viável.

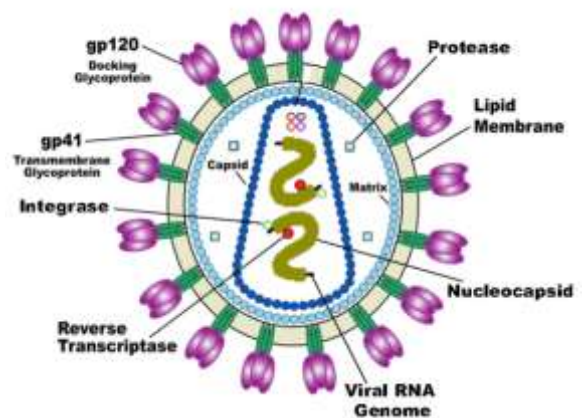


Figura 1: Morfologia do HIV

Genoma

O genoma do VIH é constituído por duas moléculas idênticas de RNA de cadeia simples, polaridade positiva [(+)ssRNA] (Wagner e Hewlett, 2004), ambas a codificarem a mesma informação, com um tamanho de 9,8 Kb. Possui uma organização complexa com três genes essenciais - *gag*, *pol* e *env* –, e cerca de seis genes reguladores.

O gene *gag* (group-specific antigen) codifica as proteínas estruturais da matriz, cápside e nucleocápside (p17, p24 e p7); o gene *pol* (polymerase) codifica as enzimas virais (TR, IN e P); e o gene *env* (envelope) codifica as proteínas do envelope (gp120 e gp41). De notar, que a protease é codificada pelo fim do gene *gag* e o início do gene *pol* (Collier e Oxford, 2000).

Estes genes são traduzidos numa poliproteína, que depois é clivada nas proteínas estruturais por uma protease, viral ou celular. Só após este processo ocorrer é que o vírus se torna infeccioso.

Replicação Viral

A infecção celular por VIH começa pela sua entrada na célula, após o reconhecimento específico de um receptor celular de superfície (Wagner e Hewlett, 2004). Este receptor – o receptor CD4 – é expresso na superfície de determinadas células, nomeadamente linfócitos T (mais especificamente linfócitos T_H) (Collier e Oxford, 2000).

A sua entrada nas células-alvo é mediada por um complexo glicoproteico do envelope, que consiste em três glicoproteínas de superfície gp120 e três glicoproteínas transmembranares gp41 [Figura 2]. A ligação da gp120 ao receptor CD4 induz alterações conformacionais nesta

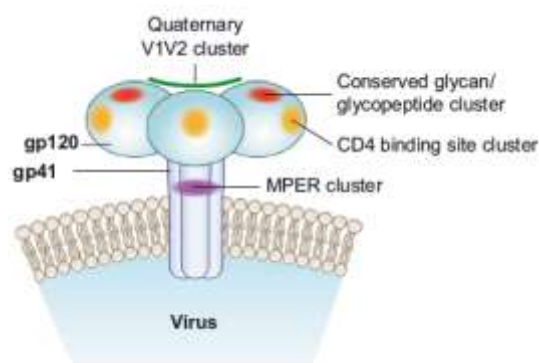


Figura 2: Diagrama esquemático do complexo glicoproteico do envelope do VIH-1 (Chiodi e Weiss, 2014)

glicoproteína do envelope, permitindo-lhe a ligação a um co-receptor, sendo os mais utilizados o CCR5 ou o CXCR4. Esta ligação prepara a gp41 para mediar a fusão das membranas celular e viral (Haim *et al.*, 2009), uma vez que permite a exposição do peptídeo de fusão. Ocorre, então, a fusão do envelope viral com a membrana celular, como

consequência da ligação do peptídeo de fusão exposto com o domínio de fusão da membrana celular.

De seguida, a nucleocápside entra para o citoplasma, havendo uma remoção parcial da mesma (Wagner e Hewlett, 2004), com libertação do RNA viral no interior da célula-alvo. Aqui, a acção da TR permite a formação de uma molécula de dsDNA a partir do RNA viral que, juntamente com outras proteínas virais, forma um complexo de pré-integração, que é transportado até ao núcleo. A dupla cadeia de DNA viral é integrada no genoma celular, originando um provírus (Kumar, Abbas e Herbein, 2014).

O processo de transcrição ocorre por acção de enzimas celulares e leva à formação de moléculas de mRNA viral e celular, que depois são transcritas em proteínas, virais e celulares. Os vários componentes virais reúnem-se espontaneamente e a sua libertação da célula-alvo ocorre por exocitose. Contudo, é só após a fase de maturação, onde há acção da protease viral sobre as poliproteínas do *gag* e do *pol*, que as partículas virais formadas se tornam infecciosas (Mattei *et al.*, 2014). Nesta altura, o vírus está apto para infectar novas células.

NOVAS PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS NA INFECÇÃO POR VIH I

A infecção por VIH representa um dos maiores problemas de saúde pública actual e afecta, globalmente, cerca de 35.3 (32.2 – 38.8) milhões de pessoas (Unaid, 2013). Actualmente, a terapêutica para a infecção por VIH I inclui uma combinação de fármacos que inibem vários passos do ciclo de replicação do vírus, designada por HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) (Hu *et al.*, 2014). Apesar de melhorar a qualidade de vida e de prolongar a hipótese de sobrevivência dos indivíduos infectados, esta terapia apenas permite a diminuição da progressão da doença e não a sua cura (Chung, Rossi e Jung, 2012). Este facto deve-se essencialmente a dois factores: o primeiro, remete para a capacidade do VIH I integrar o seu genoma no genoma das células hospedeiras; e o segundo, é uma consequência do mecanismo de acção da terapia HAART: é apenas eficaz contra o VIH I presente nos linfócitos T CD4 activados, ou seja, que se encontram em replicação, não havendo qualquer efeito sobre os reservatórios víricos. Estes formam-se imediatamente após a infecção e incluem os linfócitos T CD4 de memória e linfócitos T CD4 naive infectados (Yang, 2004).

Apesar dos avanços no controlo da infecção por VIH I, existem vários aspectos que permanecem por resolver, não só sociais, como económicos (García *et al.*, 2012). O tratamento anti-retroviral por si não irá reduzir a pandemia VIH/SIDA (Lema, Garcia e

Sanctis, De, 2014), pelo que existe a necessidade de novas alternativas terapêuticas para os indivíduos infectados com VIH.

I. VACINAS CONTRA O VIH

A vacinação tem sido uma opção eficaz, segura e económica para a prevenção e eliminação de doenças infecciosas (Lema *et al.*, 2014), como é o caso da vacina contra o vírus da hepatite B e contra a varíola, respectivamente (Chiodi e Weiss, 2014). Contudo, nem todos os vírus respondem a este tipo de terapêutica.

Para que uma vacina contra o VIH seja eficaz, esta deve ter a capacidade de induzir, não só, uma potente imunização, mas também um efeito duradouro, de modo a prevenir a infecção em indivíduos saudáveis e/ou a reduzir a replicação viral e a virémia em indivíduos infectados. (Lema *et al.*, 2014). Actualmente, a pesquisa centrada no desenvolvimento de vacinas sugere que uma vacina eficaz deve ter a capacidade de induzir imunidade humoral e imunidade celular (Stephenson e Barouch, 2013).

Imunidade Humoral

A maioria dos indivíduos infectados com VIH I desenvolve uma resposta humoral específica neutralizante dentro de semanas a meses, após a infecção primária (Gils, van e Sanders, 2013). Esta resposta humoral prima-se pelo desenvolvimento de anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs), que têm como alvo vários locais de vulnerabilidade do complexo glicoproteico do envelope (Klein *et al.*, 2012): o local de ligação do receptor CD4 (CD4bs) na gp120; o terceiro domínio variável (V3) da gp120; o primeiro e segundo domínio variável (V1/V2) da gp120; o domínio exterior da gp120; e a região da gp41 proximal externa da membrana (MPER) [Figura 2].

O CD4bs é um local protegido e, mesmo estando rebaixado e rodeado por glicanos e regiões variáveis, é acessível tanto ao receptor CD4, como aos bNAbs (Klein *et al.*, 2012). Estes têm a capacidade de bloquear o CD4bs, por mimetizarem a ligação do receptor CD4 (Gils, van e Sanders, 2013), impedindo, assim, a ligação do VIH I a este receptor de superfície da célula-alvo.

O domínio V3 é um dos epítomos com menor alcance, dado que se encontra escondido, e em muitas estirpes do VIH I só é exposto após a interacção CD4-gp120 (Chiodi e Weiss, 2014). Os anticorpos contra este domínio são dos primeiros a serem produzidos na infecção contra o VIH I e, ainda que se pensasse que o seu papel na

neutralização humoral fosse mínimo, recentes descobertas de novos bNAbs indicam que são amplos e potentes. Por sua vez, e tal como o V3, o domínio VI/V2 aparenta ser um alvo no início da infecção (Gils, van e Sanders, 2013). Os anticorpos contra este domínio, penetram os glicanos com uma estrutura longa e aniónica (CDRH3) e, ao ligarem-se ao complexo glicoproteico, alteram a sua estabilidade, o que poderá contribuir para a sua potente actividade neutralizante (Klein *et al.*, 2012).

O domínio exterior da gp120 é um *cluster* de glicanos que, para além da sua presença ser um dos múltiplos mecanismos evasivos à imunidade, é também um alvo dos bNAbs (Gils, van e Sanders, 2013). Contrariamente a toda a gp120, este domínio exterior é estruturalmente estável e o único a manter-se inflexível após a ligação ao receptor, um factor importante para o desenvolvimento de imunidade (Chen *et al.*, 2008).

Por fim, a região MPER é uma região altamente conservada com um papel fundamental na fusão do vírus com a célula-alvo. Recentes descobertas revelam que os anticorpos contra esta região são amplos e muito potentes, podendo ser polirreactivos e reagir com a cardiolipina (Gils, van e Sanders, 2013) presente na membrana fosfolipídica viral (Cockburn *et al.*, 2004), o que leva a um aumento da afinidade para com o VIH I.

Perante estes factos, uma estratégia para a indução de uma resposta humoral poderá basear-se no desenho de uma vacina que permita o desenvolvimento de anticorpos específicos para o envelope capazes de neutralizar amplamente todos os subtipos do VIH I. Contudo, apesar da descoberta de vários anticorpos monoclonais amplamente neutralizantes, ainda não é certo como induzi-los por imunização (Stephenson e Barouch, 2013). Ocorreram inúmeras tentativas para induzir bNAbs por vacinação, mas sem sucesso. A quantidade de anticorpos necessários é demasiado elevada para ser atingida através desta terapêutica e, em humanos, nunca foi possível induzir esta imunização (Klein *et al.*, 2012).

Para além dos bNAbs, também os anticorpos não-neutralizantes podem ter um papel importante no controlo da infecção. Estes possuem várias funções efectoras, mediadas pela região Fc do anticorpo, através do recrutamento de células apresentadoras de antigénios, da promoção de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA) e da inibição da replicação via ADCVI (Lema *et al.*, 2014). Estes mecanismos activam o sistema imune inato, de modo a que este destrua o vírus ou as células infectadas pelo vírus.

Imunidade Celular

A indução de imunidade celular assenta na necessidade de controlar a replicação viral. Enquanto os anticorpos específicos para o envelope aparentam ser necessários para o bloqueio da entrada do VIH I, uma resposta imune celular específica para as proteínas codificadas pelo gene *gag*, aparenta ser importante para o controlo da replicação viral (Stephenson e Barouch, 2013).

O controlo da replicação viral tem sido associado a linfócitos T CD8 polifuncionais, que secretam múltiplas citocinas (ex. IL-2) e têm uma capacidade proliferativa, para além da sua capacidade de destruir células infectadas pelo VIH ou de suprimir a replicação do vírus *in vitro* (Koup, R. a. e Douek, 2011). A actividade dos linfócitos T citotóxicos (LCT) depende do subtipo isolado do VIH e a sua actividade contra as p17 e p24 é importante. A resposta dos LCT contra os epítomos imunodominantes da p24 está associado à diminuição dos títulos virais e retardamento da progressão da doença (Lema *et al.*, 2014).

Assim, os linfócitos T CD8 seriam um componente apropriado de uma vacina desenhada com base em células T, com o intuito de diminuir a carga viral ou até mesmo eliminar a infecção por VIH (Koup, R. A. e Douek, 2011).

Contudo, ainda que uma vacina indutora de uma resposta imune celular possa levar a efeitos biológicos imunologicamente relevantes em humanos, um controlo virológico ainda não foi alcançado em ensaios clínicos (Stephenson e Barouch, 2013).

Vacinas – Quais e Que Obstáculos?

Vários esquemas de vacinas contra o VIH I têm sido tentados: vacinas vivas atenuadas, vacinas inactivadas, vacinas de *virus like particles*, vacinas de sub-unidades e vacinas de DNA, todas elas desenvolvidas e testadas.

Dos vários ensaios clínicos desenvolvidos para estas vacinas (mais de 256 concluídos ou em fase I ou II), apenas seis (VAZ004, VAX003, Step, Phambili, RV144 e HVTN 505) atingiram eficácia clínica (Lema *et al.*, 2014), ou seja, entraram em fase II ou fase III para testar eficácia em populações de risco para a infecção por VIH I (Chiodi e Weiss, 2014). No entanto, destes seis, apenas um demonstrou alguma eficácia na protecção contra o vírus – o RV144, realizado na Tailândia. Neste ensaio clínico, a RV144, baseada num *prime-boost* de gp120, demonstrou uma eficácia estimada de cerca de 31.2% (Haynes *et al.*, 2014), mas o facto de a protecção ter durado menos de 6 meses, levou a que este resultado não tenha atingido significado estatístico (Chiodi e Weiss, 2014). Ainda que tenha sido um resultado

que fornece alguma esperança, é necessário haver uma forte melhoria e avanço neste campo.

O desenvolvimento de uma vacina, assim como a demonstração sua eficácia apresenta vários obstáculos e, muitas destas dificuldades assentam nas propriedades distintas do vírus, destacando o facto de ser um vírus com uma grande variabilidade genética (Gils, van e Sanders, 2013). A sua capacidade de escapar ao sistema imunitário do indivíduo infectado, leva a uma constante evolução do vírus entre as populações ou mesmo no próprio indivíduo (*quasiespécies*). Esta capacidade é adquirida no decurso das várias mutações genéticas, as quais se devem aos seguintes factores: actividade da TR, que comete vários erros durante a retrotranscrição e não é capaz de os corrigir; associada ao elevado número de ciclos de replicação; influência dos sistemas imunes humoral e celular e, por fim, a capacidade do próprio vírus tolerar esta diversidade. Deste modo, perante tal diversidade genética, o desenvolvimento de uma vacina imunologicamente relevante para o VIH I não é tarefa fácil de realizar (Stephenson e Barouch, 2013).

II. TERAPIA GÉNICA

A terapia génica é uma abordagem que se tem vindo a destacar como método alternativo para o desenvolvimento de uma cura em indivíduos infectados pelo VIH I (Younan, Kowalski e Kiem, 2014). A introdução deliberada de genes estranhos ou de fragmentos de DNA/RNA modificados (Yang, 2004), tem como objectivo reconstituir um sistema imunitário resistente ao vírus, com o potencial de curar a doença. Uma terapia génica pode então retardar a progressão da doença, interferindo com a replicação do VIH, assim como prevenir uma infecção inicial ou mesmo erradicar o vírus que se encontra integrado no genoma (Chung *et al.*, 2012).

Interferência com o Ciclo de replicação do VIH - siRNA

O siRNA (small interfering RNA) consiste numa pequena molécula dupla cadeia de RNA (dsRNA), que pode ser utilizada para interferir com a translação de proteínas através da ligação e degradação de mRNA em sequências específicas. Deste modo, com base em sequências nucleotídicas específicas, estas moléculas conseguem prevenir a produção de proteínas específicas (Westerhout *et al.*, 2005), pois a sua acção permite o silenciamento directo dos genes pós-transcripcionais. É um dos *small RNAs* mais comuns, cujo mecanismo

de acção vai ter interferência no ciclo de replicação do VIH I (Chung *et al.*, 2012), ao induzir uma degradação prematura do RNA viral (Yang, 2004).

Após a entrada do siRNA na célula, por meio de vectores, e a sua transformação numa cadeia simples, este composto vai ser incorporado num complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC). Neste, vai servir como guia até ao RNAm complementar, com base no sistema de complementaridade de bases. Deste modo, a porção do mRNA com perfeita complementaridade para com o siRNA é alvo de degradação (Yeung *et al.*, 2005) e assim ocorre o silenciamento do gene do mRNA (França *et al.*, 2010). Os genes alvo do VIH são o *gag*, os factores de infecciosidade *vif* e *nef* e o gene que codifica uma proteína reguladora pós-transcricional, *rev* (Yeung *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a replicação e a infecção pelo VIH pode ser inibida pelo siRNA, quer este seja desenhado contra o RNA viral, quer seja para componentes celulares, como o mRNA que codifica o CCR5 (Yang, 2004).

No entanto, nem todos os siRNA possuem a mesma eficácia no silenciamento dos genes, uma vez que a interferência do RNA é um processo com várias etapas, e a sua capacidade de silenciar o gene irá depender também da sua abundância (Chung *et al.*, 2012). Idealmente, o VIH deveria ser alvo de vários siRNA para várias sequências essenciais (Westerhout *et al.*, 2005).

Transplante de Células Estaminais com Mutação CCR5 Δ 32

A possibilidade de uma terapia génica eficaz foi demonstrada pela primeira vez com o “Paciente Berlim” (Chung *et al.*, 2012). Este paciente, infectado com o VIH há cerca de 10 anos, encontrava-se com uma recaída de leucemia mielóide aguda quando recebeu um transplante de células estaminais alogénicas. Estas células, células estaminais CD34⁺ do sangue periférico, eram provenientes de um dador compatível para com o sistema antigénio leucocitário humano (HLA), que era homocigótico para a mutação CCR5 Δ 32 (Hütter *et al.*, 2009). A mutação presente nestas células, causada por uma deleção no par de bases 32 do gene CCR5 (Chung *et al.*, 2012), permite uma resistência natural do indivíduo contra as estirpes de VIH que possuem o CCR5 como co-receptor (R5 VIH). A sua falta de expressão na superfície das células levou a que as células T CD4⁺, quer do sangue periférico, quer da mucosa, ficassem resistentes à infecção contra o R5 VIH. Durante 45 meses após o transplante, foram examinados vários tecidos compartimentais distintos para a presença de RNA e DNA viral e nenhuma das sequências virais foi detectada nas amostras testadas

(Allers *et al.*, 2011). Assim, poderá afirmar-se que é a primeira cura de um indivíduo infectado com VIH (Younan *et al.*, 2014).

No entanto, este caso foi o único de sucesso usando esta terapia. Para além de ser uma terapia de risco, dispendiosa (Yin, Shao e Ma, 2014) e de dever ser apenas considerada para indivíduos infectados com VIH que se encontram em tratamento para situações malignas (Younan *et al.*, 2014), não é uma opção para a maioria dos indivíduos infectados com o vírus. As possibilidades de encontrar um dador com genes homocigóticos CCR5 Δ 32 e HLA compatível é extremamente raro (Stone, Kiem e Jerome, 2013), além de que existe uma ausência deste alelo em indivíduos africanos e asiáticos, os quais compõem a maioria da população onde o VIH possui maior prevalência (Chung *et al.*, 2012). Por outro lado, em indivíduos do norte da Europa, apenas 0,8% a 1% dos mesmos possuem o genótipo com esta mutação (Petz, 2013) (Lawrence *et al.*, 2012). Deste modo, é necessário explorar outras abordagens mais viáveis.

Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas Geneticamente Modificadas

As células estaminais hematopoiéticas (HSC) podem ser modificadas de modo a que, elas próprias e as suas células progenitoras, sejam resistentes à infecção contra o VIH (Kiem *et al.*, 2012). O facto de estas células serem capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em qualquer célula do sistema imune, leva a que as suas células progenitoras possam, teoricamente, providenciar uma cura para a infecção contra o VIH (Chung *et al.*, 2012).

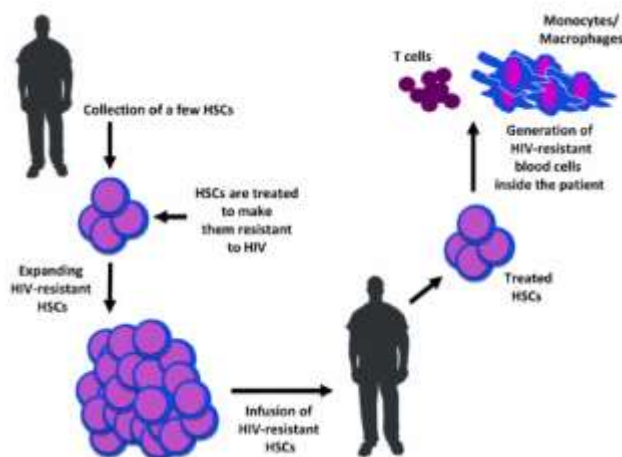


Figura 3: Imunização intracelular com HSC geneticamente modificadas (Kiem *et al.*, 2012)

A utilização deste tipo de terapia génica implica as seguintes etapas: identificação; purificação e/ou expansão das HSC; introdução do novo gene, com função de introduzir resistência ao VIH, em células progenitoras das células T e células mielóides; introdução, de forma segura e eficiente, das células geneticamente modificadas no indivíduo; e, por último, ensaios clínicos que demonstrem eficácia [Figura 3] (Kiem *et al.*, 2012).

Uma das maneiras de conferir resistência ao VIH, tal como falado anteriormente, baseia-se na modificação do gene CCR5. A quebra deste gene tem como intuito a redução

da susceptibilidade ao vírus (Stone *et al.*, 2013), onde os genes deste co-receptor podem ser clivados nas células estaminais hematopoiéticas CD34+, usando nucleases *zinc-finger* (ZFN) (Yin *et al.*, 2014). Estas enzimas, ao actuarem no gene do CCR5, podem introduzir a mutação CCR5 Δ 32 em células embrionárias e em células estaminais pluripotentes, tal como podem clivar o *locus* do CCR5 em células T CD34+ primárias (Stone *et al.*, 2013). Todavia, é necessário uma rigorosa compatibilidade do HLA entre o dador e o receptor. Este rigor pode, no entanto, ser contornado caso se utilize células estaminais do sangue do cordão umbilical de dadores homocigóticos para o gene com a mutação CCR5 Δ 32, pois deixa de ser necessário uma compatibilidade tão grande (Petz, 2013).

Uma terapia com base no transplante de HSC pode, então, ser uma estratégia curativa para a infecção por VIH (Kiem *et al.*, 2012). Contudo, estudos clínicos têm que avançar para uma fase de eficácia, de modo a determinar o limite da modificação genética das HSC necessário para um resultado clínico com benefícios (Younan *et al.*, 2014).

Terapia com CD4-Ig / eCD4-Ig

Desde o conhecimento da importância do receptor CD4 para a entrada do VIH nas células, que várias formas para estabilizar este receptor, por ligação a imunoglobulinas humanas (CD4-Ig), têm vindo a ser propostas e testadas como potenciais terapêuticas. O objectivo desta terapêutica tem por base a ligação do vírus a estes compostos, o que levará à sua “neutralização” e, como consequência, à prevenção da sua ligação e entrada nas células-alvo (Haigwood, 2015).

O CD4-Ig resulta da fusão do receptor CD4 com uma Ig, onde os domínios D1 e D2 do receptor CD4 estão ligados à região Fc da Ig (Barbian *et al.*, 2015). Estudos realizados (com CD4-IgG2 - PRO 542) demonstraram a sua capacidade em reduzir a virémia e o RNA viral plasmático, indicando que este possui uma actividade anti-viral em humanos, assim como uma boa segurança e tolerabilidade (Jacobson *et al.*, 2000). Contudo, a sua afinidade para o envelope é mais baixa que os bNAbs e existe a possibilidade de promover infecção (Gardner *et al.*, 2015), por exposição do local de ligação do CCR5 (Haigwood, 2015), havendo, assim, a necessidade de ultrapassar estes obstáculos.

Gardner *et al.* (2015) construíram uma outra proteína – eCD4-Ig –, onde um *small*

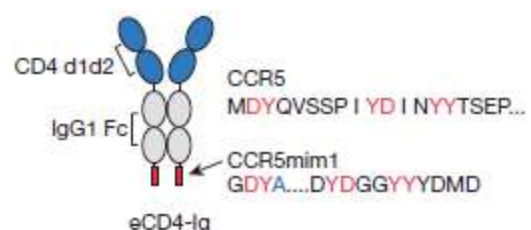


Figura 4: Representação esquemática do eCD4-Ig (Gardner *et al.*, 2015)

CCR5-mimetic sulfopeptide (CCR5mimI) é inserido na região terminal carboxi do CD4-Ig [Figura 4]. Este novo composto liga-se às proteínas do envelope com uma avidéz maior do que qualquer uma das moléculas separadas, e demonstrou ter a capacidade de neutralizar isolados virais possuindo co-receptores CCR5 e CXCR4.

Neste estudo, foi comparada a acção do CD4-Ig com o eCD4-Ig relativamente à sua capacidade de ligação e de causar infecção. Através da incubação destes compostos com células T transfectadas para expressarem proteínas do envelope, foi possível concluir que, em pequenas concentrações, o eCD4-Ig possui uma maior capacidade de ligação a estas proteínas, assim como é menos eficiente a promover infecção. Posteriormente, foram utilizados ratos humanizados para verificar a capacidade do eCD4-Ig em neutralizar diversas estirpes resistentes ao VIH e VIS (vírus da imunodeficiência símia). Concluiu-se que, quer o eCD4-Ig, quer as suas variantes, superaram substancialmente o composto CD4-Ig para todos os vírus testados, neutralizando eficazmente vários dos isolados resistentes. Por fim, foram tratados macacos rhesus com *adenovirus-associated virus* (AAV) (Gardner *et al.*, 2015). Estes vírus, com a funcionalidade de vectores, permitem a contínua expressão das proteínas desejadas, ao integrarem os seus genes no genoma dos macacos, sendo que, neste caso, os genes codificam uma versão para os macacos rhesus do eCD4-Ig (rh-eCD4-Ig), assim como uma enzima para promover a devida sulfatação do CCR5 (Haigwood, 2015). Verificou-se, então, que todos os macacos inoculados com este vector ficaram protegidos contra as múltiplas doses infecciosas administradas, as quais, provavelmente, são muito maiores das presentes em humanos durante a transmissão. Esta protecção durou cerca de 34 semanas após a inoculação e a sua potência sugere que baixas concentrações de eCD4-Ig serão suficientes para a protecção contra a maioria dos vírus em circulação.

Ainda que os resultados observados no estudo de Gardner *et al.* (2015) indiquem que a expressão do eCD4-Ig através de vectores AAV pode providenciar uma protecção eficaz, de longo-termo e quase universal contra o vírus VIH I (Gardner *et al.*, 2015), existem ainda muitas questões por responder. Uma das principais questões é compreender qual o melhor modo de administração destes vectores, assim como permanece a questão se esta terapia será segura em humanos (Haigwood, 2015) e se poderá ser utilizada para prevenir, numa população, novas infecções por VIH (Gardner *et al.*, 2015).

CONCLUSÃO

O VIH, perante as suas características complexas e uma diversidade global de estirpes, leva a que uma terapêutica preventiva ou mesmo curativa seja um grande obstáculo. Nos últimos anos, com o crescente conhecimento da estrutura do vírus, da sua replicação e infecção, foi possível o desenvolvimento de abordagens diversificadas.

A vacinação, embora muito eficaz na prevenção de outros vírus, tem tido pobres resultados na eliciação de uma resposta imune adequada e o seu desenvolvimento é particularmente difícil. Uma vacina com sucesso será aquela que promove o desenvolvimento de uma imunidade humoral e celular, de modo a produzir anticorpos, quer efectores, quer de memória, assim como terá que controlar a virémia no indivíduo infectado. Para tal, é necessário, cada vez mais, um maior conhecimento na área da imunologia, dos mecanismos de protecção e de controlo virológico (García *et al.*, 2012).

Por outro lado, resultados mais prometedores têm sido atingidos com a terapia génica. Várias terapias com diferentes técnicas e diferentes alvos têm sido desenvolvidas, todas elas com bons resultados, mas permanece a questão da sua acção em humanos e de como irá reagir o nosso organismo. Para além deste facto, ainda não é considerada uma terapia de rotina, devido à possibilidade de surgirem mutações e consequente progressão da doença, assim como o desenvolvimento de tumores, dado haver um balanço entre uma expressão génica com potencial tóxico e com efeito terapêutico (Chung *et al.*, 2012).

Ainda que muitos mais estudos sejam necessários, a realização de ensaios clínicos será, em muitas das terapias recentes, o próximo passo. A cada ano que passa e a cada descoberta feita, a esperança de encontrar um modo de prevenir e curar a infecção por HIV aumenta.

BIBLIOGRAFIA

ALLERS, K. *et al.* - Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 DELTA 32 / DELTA 32 stem cell transplantation. **Blood**. . ISSN 00064971. 117:10 (2011) 2791–2799. doi: 10.1182/blood-2010-09-309591.An.

BARBIAN, H. J. *et al.* - Neutralization Properties of Simian Immunodeficiency Viruses Infecting Chimpanzees and Gorillas. 6:2 (2015) 1–22. doi: 10.1128/mBio.00296-15.Editor.

CHEN, H. *et al.* - Mapping the immune response to the outer domain of a human immunodeficiency virus-1 clade C gp120. **Journal of General Virology**. . ISSN 00221317. 89:10 (2008) 2597–2604. doi: 10.1099/vir.0.2008/003491-0.

CHIODI, F.; WEISS, R. A. - Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. **Journal of Internal Medicine**. . ISSN 13652796. 275:5 (2014) 444–455. doi: 10.1111/joim.12225.

CHUNG, J.; ROSSI, J.; JUNG, U. - Current progress and challenges in HIV gene therapy. **Future Virology**. 6:11 (2012) 1319–1328. doi: 10.2217/fvl.11.113.Current.

COCKBURN, J. J. B. *et al.* - Membrane structure and interactions with protein and DNA in bacteriophage PRD1. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 432:7013 (2004) 122–5. doi: 10.1038/nature03053.

COLLIER, L.; OXFORD, J. - **Human Virology**. Second ed. New York : Oxford University Press Inc., 2000

FRANÇA, N. R. De *et al.* - Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**. . ISSN 0482-5004. 50:6 (2010) 695–702. doi: 10.1590/S0482-50042010000600008.

GARCÍA, F. *et al.* - Therapeutic vaccines against HIV infection. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**. . ISSN 2164554X. 8:5 (2012) 569–581. doi: 10.4161/hv.8.5.19555.

GARDNER, M. R. *et al.* - AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. 2015). doi: 10.1038/nature14264.

GILS, M. J. VAN; SANDERS, R. W. - Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine. **Virology**. . ISSN 00426822. 435:1 (2013) 46–56. doi: 10.1016/j.virol.2012.10.004.

HAIGWOOD, N. L. - HIV: Tied down by its own receptor. **Nature**. . ISSN 0028-0836. 2015) 5–6. doi: 10.1038/nature14205.

HAIM, H. *et al.* - Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. **PLoS Pathogens**. . ISSN 15537366. 5:4 (2009). doi: 10.1371/journal.ppat.1000360.

HAYNES, B. F. *et al.* - Progress in HIV-1 vaccine development. **The Journal of allergy and clinical immunology**. . ISSN 1097-6825. 134:1 (2014) 3–10. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.025.

- HU, W. *et al.* - RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 111:31 (2014) 11461–11466. doi: 10.1073/pnas.1405186111.
- HÜTTER, G. *et al.* - Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. **The New England journal of medicine**. . ISSN 1533-4406. 360:7 (2009) 692–8. doi: 10.1056/NEJMoa0802905.
- JACOBSON, J. M. *et al.* - Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. **The Journal of infectious diseases**. . ISSN 0022-1899. 182:1 (2000) 326–329. doi: 10.1086/315698.
- KIEM, H. *et al.* - Hematopoietic-stem-cell-based gene therapy for HIV disease. **Cell Stem Cell**. 10:2 (2012) 137–147. doi: 10.1016/j.stem.2011.12.015.Hematopoietic.
- KLEIN, F. *et al.* - Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. **Changes**. . ISSN 15378276. 29:6 (2012) 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- KOUP, R. A.; DOUEK, D. C. - Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. . ISSN 21571422. 1:1 (2011) 1–15. doi: 10.1101/cshperspect.a007252.
- KOUP, R. A.; DOUEK, D. C. - Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. . ISSN 2157-1422. 1:1 (2011) a007252. doi: 10.1101/cshperspect.a007252.
- KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. - HIV-1 Latency in Monocytes/Macrophages. **Viruses**. . ISSN 1999-4915. 6:4 (2014) 1837–1860. doi: 10.3390/v6041837.
- LAWRENCE, P. *et al.* - Hematopoietic Cell Transplantation with Cord Blood for Cure of HIV Infections. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. . ISSN 10838791. 19:3 (2012) 393–397. doi: 10.1016/j.bbmt.2012.10.017.
- LEMA, D.; GARCIA, A.; SANCTIS, J. B. DE - HIV vaccines: A brief overview. **Scandinavian Journal of Immunology**. . ISSN 13653083. 80:1 (2014) 1–11. doi: 10.1111/sji.12184.
- MATOS, A. M. - **[Família Retroviridae - Vírus da Imunodeficiência Humana]**. [Coimbra] : [FFUC], 2015
- MATTEI, S. *et al.* - Induced Maturation of Human Immunodeficiency Virus. **Journal of Virology**. . ISSN 0022-538X. 88:23 (2014) 13722–13731. doi: 10.1128/JVI.02271-14.
- PETZ, L. - Cord blood transplantation for cure of HIV infections. **Stem cells translational medicine**. . ISSN 2157-6564. 2:9 (2013) 635–7. doi: 10.5966/sctm.2012-0089.
- STEPHENSON, K. E.; BAROUCH, D. H. - A global approach to HIV-1 vaccine development. 2013) 295–304.

STONE, D.; KIEM, H.-P.; JEROME, K. R. - Targeted gene disruption to cure HIV. **Current opinion in HIV and AIDS**. . ISSN 1746-6318. 8:3 (2013) 217–23. doi: 10.1097/COH.0b013e32835f736c.

UNAIDS - **GLOBAL REPORT: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013**
[Em linha] Disponível em
WWW:URL:www.unaids.org/.../unaids/.../2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013. ISBN 9789292530327.

WAGNER, E. K.; HEWLETT, M. J. - **Basic Virology**. Second ed. [S.l.] : Blackwell Publishing, 2004

WESTERHOUT, E. M. *et al.* - HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. **Nucleic acids research**. . ISSN 1362-4962. 33:2 (2005) 796–804. doi: 10.1093/nar/gki220.

YANG, Q. - Eradication of HIV in infected patients: some potential approaches. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**. . ISSN 1234-1010. 10:7 (2004) RA155–A165.

YEUNG, M. L. *et al.* - siRNA , miRNA and HIV : promises and challenges. 1:2005) 935–946.

YIN, Q. Q.; SHAO, Y. M.; MA, L. Y. - HIV cure and HIV reservoirs. **Biomedical and environmental sciences: BES**. . ISSN 0895-3988. 27:6 (2014) 478–80. doi: 10.3967/bes2014.078.

YOUNAN, P.; KOWALSKI, J.; KIEM - Genetically Modified Hematopoietic Stem Cell Transplantation for HIV-1–infected Patients: Can We Achieve a Cure? **Molecular Therapy**. . ISSN 1525-0024. 22:2 (2014) 257–264. doi: 10.1038/mt.2013.264.