

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA**



**Papel da Carga Viral Celular na  
Imunodeficiência HIV/SIDA:  
Contributo do Estudo da Infecção pelo HIV-2**

**Rui Manuel da Silva Soares**

**Tese orientada por:  
Prof. Doutora Ana Espada de Sousa**

**DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**ESPECIALIDADE DE IMUNOLOGIA**

**2011**



**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de Fevereiro de 2011.**



**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.**



**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de Lisboa,  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Biomédicas.**





A presente dissertação foi realizada na Unidade de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

O trabalho aqui apresentado foi co-financiado pelo POCI 2010 e o FSE.

Bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia

(referência: SFRH/BD/23863/2005)





Aos meus pais

À minha irmã



# Índice geral

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Abreviaturas</b> .....	iii
<b>Sumário</b> .....	vii
<b>Summary</b> .....	xiii

## CAPÍTULO 1:

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Origem e distribuição geográfica da infecção pelo HIV</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Estrutura e organização genética do HIV</b> .....	<b>2</b>
2.1 <i>Estrutura do virião</i> .....	2
2.2 <i>Organização genética</i> .....	4
<b>3. Ciclo de vida do HIV</b> .....	<b>12</b>
3.1 <i>Entrada nas células alvo</i> .....	12
3.2 <i>Replicação do HIV</i> .....	16
3.2.1 <i>Transcrição reversa</i> .....	16
3.2.2 <i>Integração</i> .....	18
3.2.3 <i>Transcrição</i> .....	19
3.2.4 <i>Tradução, montagem e gemulação</i> .....	22
3.3 <i>Latência viral</i> .....	26
<b>4. História natural da infecção pelo HIV</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Reservatórios e santuários</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Activação Imunológica na patogénese da infecção por HIV</b> .....	<b>42</b>
<b>7. Mecanismos de controlo da replicação na infecção por HIV</b> .....	<b>48</b>
7.1 <i>Mecanismos celulares intrínsecos de resistência</i> .....	48
7.2 <i>Resposta imunitária</i> .....	52

<b>8. Terapêutica</b> .....	59
8.1 <i>Terapêutica na infecção HIV-1</i> .....	59
8.2 <i>Terapêutica na infecção HIV-2</i> .....	64
<b>Referências</b> .....	66

## **CAPÍTULO 2:**

<b>Objectivos e plano de trabalhos</b> .....	<b>105</b>
--	------------

## **CAPÍTULO 3:**

<b>Frequência aumentada de células T CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-2</b> .....	<b>111</b>
<i>(Increased frequency of circulating CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection)</i>	
Abstract .....	113
Text.....	114
References .....	121

## **CAPÍTULO 4:**

<b>Estratégias para a quantificação da expressão de mRNA <i>unspliced</i> e <i>multiply spliced</i> na infecção pelo HIV-2</b> .....	<b>127</b>
<i>(Strategies to quantify unspliced and multiply spliced mRNA expression in HIV-2 infection)</i>	
Abstract .....	129
Introduction .....	130
Materials and Methods .....	133
Results .....	142
Discussion .....	148
References .....	151

**CAPÍTULO 5:****Carga viral celular evidencia a existência de replicação viral persistente em doentes infectados pelo HIV-2 avirémicos .....155**

*(Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients)*

Abstract .....	157
Introduction .....	158
Materials and Methods .....	159
Results .....	164
Discussion .....	175
References .....	178

**CAPÍTULO 6:****Conclusões e perspectivas futuras .....185**

Referências .....	197
-------------------	-----





# Índice de figuras

## CAPÍTULO 1:

### Introdução

Figura 1. Estrutura do HIV-1 .....	3
Figura 2. Organização genética do HIV-1 e HIV-2 .....	5
Figura 3. Entrada do HIV nas células alvo .....	13
Figura 4. História natural da infecção pelo HIV-1 .....	36

## CAPÍTULO 3:

### Frequência aumentada de células T CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-2

*(Increased frequency of circulating CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection)*

Figure 1. CCR5 and CXCR4 expression in circulating CD4 <sup>+</sup> T-cells from HIV-2 and HIV-1 infected patients as well as healthy controls.....	117
---	-----

## CAPÍTULO 4:

### Estratégias para a quantificação da expressão de mRNA *unspliced* e *multiply spliced* na infecção pelo HIV-2

*(Strategies to quantify unspliced and multiply spliced mRNA expression in HIV-2 infection)*

Figure 1. One-step vs two-step RT-qPCR quantification of HIV-2 <i>gag</i> and <i>tat</i> mRNA transcripts upon <i>in vitro</i> HIV-2 ROD infection..	147
--	-----

## **CAPÍTULO 5:**

### **Carga viral celular evidencia a existência de replicação viral persistente em doentes infectados pelo HIV-2 avirémicos**

*(Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients)*

Figure 1. <i>tat</i> and <i>gag</i> mRNA expression and proviral DNA levels in untreated HIV-2 and HIV-1 infections.....	166
Supplemental Figure 1. <i>tat</i> mRNA expression in untreated HIV-2 and HIV-1 infections stratified accordingly to circulating CD4 T cell counts.....	167
Figure 2. Relationship between viremia, absolute CD4 T cell numbers and T cell activation in untreated HIV-2 infection.....	170
Figure 3. Impact of ART on HIV-2 plasma and cell-associated viral load, CD4 T cell frequency and T cell activation.....	172

# Índice de tabelas

## CAPÍTULO 3:

### **Frequência aumentada de células T CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-2**

*(Increased frequency of circulating CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection)*

Table 1. Cohort characterization.....	115
Table 2. Primers and probe sequences.....	119
Table 3. HIV-2 proviral DNA in CD4 naive and memory subsets .....	120

## CAPÍTULO 4:

### **Estratégias para a quantificação da expressão de mRNA unspliced e multiply spliced na infecção pelo HIV-2**

*(Strategies to quantify unspliced and multiply spliced mRNA expression in HIV-2 infection)*

Table 1. Characteristics of the HIV-2 strains.....	134
Table 2. Primers and probe tested for quantification of HIV-2 <i>tat</i> mRNA by one-step and two-step RT-qPCR.....	137
Table 3. Intra and inter-assay reproducibility of HIV-2 <i>gag</i> transcript quantification using one-step and two-step RT-qPCR assays.....	145
Table 4. Intra and inter-assay reproducibility of HIV-2 <i>tat</i> transcript quantification using one-step and two-step RT-qPCR assays.....	145
Table 5. Detection of <i>tat</i> and <i>gag</i> upon infection with HIV-2 primary isolates .....	148

## **CAPÍTULO 5:**

### **Carga viral celular evidencia a existência de replicação viral persistente em doentes infectados pelo HIV-2 avirémicos**

*(Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients)*

Table 1. Characterization of untreated HIV-2, untreated HIV-1 and seronegative cohorts .....	160
Table 2. Characterization of ART-treated HIV-2 cohorts. ....	161
Table 3. Correlations between virological parameters and levels of CD4 T cells and immune activation in untreated HIV-2 and HIV-1 infections.....	168
Table 4. Virological parameters and CD4 T cell levels of HIV-2+ patients under ART....	173

## Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Doutora Ana Espada de Sousa (Unidade de Imunologia Clínica), pelo tempo e esforço investido no meu projecto, pela orientação científica e disponibilidade com que sempre me recebeu.

Ao Prof. Doutor Rui Victorino, pelo apoio que sempre disponibilizou, pela ajuda na discussão dos resultados e na elaboração dos artigos científicos.

A todos os meus colegas na Unidade de Imunologia Clínica, pelo companheirismo e colaboração nos estudos elaborados, em especial às Doutoradas Helena Cabaço e Rita Cavaleiro pela especial amizade que sempre demonstraram, e ao Doutor Russell Foxall pela sua disponibilidade para rever os vários trabalhos apresentados ao longo do Doutoramento.

Aos clínicos que seguiram os doentes estudados neste trabalho, em especial à Prof<sup>a</sup> Doutora Emília Valadas, a Dr<sup>a</sup> Manuela Doroana e o Prof. Doutor Francisco Antunes da Clínica Universitária de Medicina 2, do Hospital de Santa Maria. Gostaria ainda de deixar um agradecimento à Dr<sup>a</sup>. Sara Sousa pela recolha de sangue e de dados clínicos dos doentes estudados e ao Dr. Luís França pela recolha de alguns dos dados epidemiológicos dos doentes infectados pelo HIV-2.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Perpétua Gomes do Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Medicina Transfusional do Hospital Egas Moniz, por ter quantificado a virémia nas amostras de plasmas de todos os doentes infectados pelo HIV-2 aqui estudados.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pelo apoio financeiro cedido através da Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/23863/2005), co-financiada pelo POCI 2010 e o Fundo Social Europeu.

À minha mãe e à minha irmã, pelo apoio incondicional que sempre demonstraram e pela sua compreensão quando prescindiram da minha presença em momentos familiares importantes.

## Abreviaturas

<b>AGM</b>	<i>African Green Monkeys</i>
<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i>
<b>APOBEC3G</b>	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i>
<b>ART</b>	<i>Anti-retroviral Therapy</i>
<b>CAF</b>	<i>CD8+ Cell anti-HIV Factor</i>
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB-binding protein</i>
<b>CCR</b>	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control Prevention</i>
<b>CDK9</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase 9</i>
<b>c/EBP</b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein. Also known as NF-IL-6</i>
<b>CIP</b>	<i>CBP interacting protein</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding</i>
<b>CRF</b>	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
<b>CTD</b>	<i>Carboxy-Terminal Domain</i>
<b>CXCR</b>	<i>Chemokine (CXC motif) Receptor</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>
<b>Env</b>	<i>Envelope protein</i>
<b>FI</b>	<i>Fluorescence intensity</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>

<b>Gag</b>	<i>Group-specific Antigen</i>
<b>GALT</b>	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<b>gp</b>	<i>Glicoproteína</i>
<b>HAART</b>	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HAT</b>	<i>Histone acetyltransferase</i>
<b>HDAC</b>	<i>Histone Deacetylase</i>
<b>HDACI</b>	<i>Histone Deacetylase Inhibitor</i>
<b>hGCN</b>	<i>Human general control of amino-acid synthesis (histone acetyltransferase)</i>
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>HSV</b>	<i>Herpes simplex virus</i>
<b>HTLV</b>	<i>Human-T-lymphotropic virus</i>
<b>IFN</b>	<i>Interferão</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina</i>
<b>KIR</b>	<i>Natural killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
<b>LAV</b>	<i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolissacárido</i>
<b>LTNP</b>	<i>Long Term Non Progressors</i>
<b>LTR</b>	<i>Long Terminal Repeat</i>
<b>MA</b>	<i>Matrix protein</i>
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal antibody</i>
<b>MALT</b>	<i>Mucosal Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>mDC</b>	<i>Myeloid dendritic cell</i>
<b>MFI</b>	<i>Median Fluoresence Intensity</i>
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>MIP-1</b>	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>
<b>miRNA</b>	<i>MicroRNA</i>



<b>Mo-DC</b>	<i>Monocyte-derived dendritic cell</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>NC</b>	<i>Nucleocapsid protein</i>
<b>Nef</b>	<i>Negative replication factor</i>
<b>NF-AT</b>	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>
<b>NF-IL-6</b>	<i>Nuclear factor NF-IL-6. c/EBP beta</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
<b>NK</b>	<i>Células Natural killer</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric oxid</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
<b>NNRTI</b>	<i>Non Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
<b>NRTI</b>	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i>
<b>NtRTI</b>	<i>Nucleotide reverse transcriptase inhibitor</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PD</b>	<i>Programmed death</i>
<b>pDC</b>	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PE-Cy7</b>	<i>Phycoerythrin-cyanine</i>
<b>PerCP</b>	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
<b>PI</b>	<i>Protease Inhibitor</i>
<b>Pol</b>	<i>Polimerase</i>
<b>p/CIP</b>	<i>p300/CBP interacting protein</i>
<b>PRR</b>	<i>Pathogen recognition receptor</i>
<b>PTB</b>	<i>Polypyrimidine tract-bindingprotein</i>
<b>P-TEFb</b>	<i>Positive Transcription elongation factor b</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RRE</b>	<i>Rev responsive element</i>

<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SDF-1<math>\alpha</math></b>	<i>Stromal cell Derived Factor 1 alpha</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SIDA</b>	<i>Síndrome da Imunodeficiência adquirida</i>
<b>SIV</b>	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
<b>SM</b>	<i>Sooty Mangabeys</i>
<b>Sp1</b>	<i>Specificity protein 1</i>
<b>Tat</b>	<i>Transactivator of transcription</i>
<b>TAR</b>	<i>Trans-activating Response Region / Tat responsive element</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
<b>Th</b>	<i>T helper cell</i>
<b>TIP</b>	<i>Tat interacting protein</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>TRIM5</b>	<i>Tripartite Motif Protein 5</i>
<b>Vif</b>	<i>Virion infectivity factor</i>
<b>Vpr</b>	<i>Viral-protein R</i>
<b>Vpu</b>	<i>Viral-protein U</i>
<b>Vpx</b>	<i>Viral-protein X</i>

## Sumário

A síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), descrita pela primeira vez em 1981, representa um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, estimando-se que já causou mais de 25 milhões de mortes em todo o mundo e mais de 2 milhões de mortes relacionadas com a doença em 2008. A SIDA é causada pela infecção pelos vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2). A infecção pelo HIV-1 é uma pandemia, calculando-se que mais de 33 milhões de pessoas em todo o mundo estejam actualmente infectadas, enquanto a infecção pelo HIV-2 manteve-se relativamente confinada a alguns países da África Ocidental, sendo Portugal o único país não-africano com uma prevalência significativa de infecção pelo HIV-2 (3,2% de casos de infecção reportados em 2009).

A infecção pelo HIV-2 é caracterizada por uma progressão para a SIDA mais lenta do que a infecção HIV-1, tendo um impacto muito mais limitado na sobrevivência da maioria dos adultos infectados. A taxa de declínio das células T CD4 é muito mais lenta do que na infecção pelo HIV-1 e os níveis de vírus em circulação (virémia) são significativamente mais baixos em todas as fases da infecção. Os baixos níveis de virémia nos doentes infectados pelo HIV-2 sugerem uma menor actividade replicativa. No entanto, apesar das marcadas diferenças na virémia, os nossos resultados, bem como os estudos de outros grupos, mostraram que os níveis de DNA proviral nas células mononucleadas do sangue periférico são semelhantes nas duas infecções sugerindo que um número idêntico de células é infectado.

O tropismo celular do HIV-2 e do HIV-1 é determinado pela expressão do receptor CD4 de receptores das quimiocinas nas células alvo, principalmente o CCR5 e o CXCR4 que

servem de co-receptores à entrada do vírus. Na infecção pelo HIV-1, a expressão destes co-receptores relaciona-se directamente com a susceptibilidade à infecção e com o ritmo de progressão da doença. Vários estudos sugerem que o HIV-2 pode utilizar *in vitro* um número maior de co-receptores em comparação com o HIV-1, no entanto, o impacto *in vivo* da utilização de outros co-receptores para além do CCR5 ou CXCR4 é pouco claro. É possível que diferentes níveis de expressão destes co-receptores resultem em diferentes padrões de infecção nas populações de células T e sejam determinantes da menor produção de vírus e progressão da doença que se observa nos indivíduos infectados pelo HIV-2.

Para testar esta hipótese estudámos a expressão de CCR5 e de CXCR4 em doentes infectados pelo HIV-2 e HIV-1 que apresentavam níveis semelhantes de depleção de linfócitos T CD4 e verificámos que os doentes infectados pelo HIV-2 apresentavam uma frequência aumentada de células que expressam CCR5 na população T CD4 memória-effectoras em relação aos indivíduos seronegativos. Documentámos ainda uma correlação significativa entre a frequência de células que expressam CCR5 na população T CD4 e o grau de depleção de células T CD4 nos indivíduos infectados pelo HIV-2 que não se observou nos indivíduos infectados pelo HIV-1. A expressão de CCR5 é induzida pela activação celular sendo habitualmente restrita à população de memória-effectora. Assim, documentámos a existência de uma correlação directa entre a frequência de células que expressam CCR5 e os níveis de activação imunitária, nos indivíduos infectados pelo HIV-2. Estes resultados evidenciam a associação entre a expansão das células que expressam CCR5 e a activação imunitária na infecção pelo HIV-2. A frequência mais baixa de células que expressam CCR5 nos indivíduos infectados pelo HIV-1 em comparação com indivíduos infectados pelo HIV-2 com um

grau de activação imunitária semelhante, pode estar relacionada com uma depleção contínua destas células pela infecção viral na presença de níveis mais elevados de virémia. Relativamente à frequência de células que expressam CXCR4 na população T CD4, não documentámos diferenças entre indivíduos infectados pelo HIV-2 ou HIV-1 e indivíduos seronegativos. A quantificação dos níveis de DNA proviral em células T CD4 naive e memória purificadas de doentes infectados pelo HIV-2 revelou que os níveis de DNA proviral nas células T naive de doentes infectados pelo HIV-2 são muito baixos, sendo a maioria das células infectadas células T CD4 memória. Estes resultados estão de acordo com o que se observa nos indivíduos infectados pelo HIV-1, sugerindo que a população de células T CD4 de memória é o principal alvo do HIV-2, e suportando a utilização do CCR5 como principal co-receptor utilizado pelo HIV-2 para a infecção *in vivo*. Estes dados sugerem também que a menor virémia encontrada dos doentes infectados pelo HIV-2 não está relacionada com a disponibilidade de co-receptores nas células alvo para a infecção.

O aparente paradoxo entre níveis baixos ou indetectáveis de virémia na presença de níveis significativos de DNA proviral na infecção pelo HIV-2 pode ser explicado por uma regulação ao nível da actividade transcricional do HIV-2. Para investigarmos esta possibilidade desenvolvemos metodologias baseadas em RT-qPCR em tempo real para a quantificação de mRNA dos transcritos *unspliced (gag)* e *multiply spliced (tat)* de HIV-2 e HIV-1. A optimização destas metodologias permitiu o desenvolvimento de ensaios com elevado nível de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade que foram utilizados na investigação da actividade transcricional em coortes de doentes infectados pelo HIV-2 e doentes infectados pelo HIV-1. Verificámos que o mRNA de *tat* é expresso em níveis significativamente mais baixos nos doentes infectados pelo HIV-2 em

comparação com a expressão deste transcrito nos doentes infectados pelo HIV-1, sendo no entanto a expressão de mRNA de *gag* semelhante nas duas coortes. Dado que o *tat* é preferencialmente expresso em células recentemente infectadas, os nossos resultados sugerem que a taxa de novas infecções ao nível celular é menor nos indivíduos infectados pelo HIV-2 em comparação com os indivíduos infectados pelo HIV-1. Por outro lado, os níveis idênticos de mRNA de *gag* nas duas infecções sugerem que há uma transcrição viral persistente significativa nos indivíduos infectados pelo HIV-2 apesar dos níveis reduzidos de virémia que se observam nestes doentes, frequentemente inferiores aos limites de detecção dos testes utilizados na clínica.

A infecção pelo HIV-2, tal como a infecção pelo HIV-1, caracteriza-se por uma hiperactivação crónica que determina o prognóstico da doença, pelo que investigámos o contributo da replicação viral avaliada pela virémia, dos níveis de DNA proviral e dos níveis de expressão dos transcritos virais *tat* e *gag* para a hiperactivação crónica em doentes infectados pelo HIV-2 e pelo HIV-1. Constatámos níveis significativamente mais elevados de activação das células T CD4 e T CD8 nos indivíduos infectados pelo HIV-2 com virémia detectável em comparação com os indivíduos avirémicos. Estes resultados sugerem uma contribuição dos níveis de vírus em circulação, mesmo em baixos níveis, para o estado de hiperactivação imunitária observado nestes indivíduos. Os nossos resultados revelam ainda uma associação directa entre os níveis de mRNA para *gag* e a activação das células T CD4, o que sugere a possibilidade que a replicação viral persistente contribua significativamente para a elevada activação imunitária observada nos doentes infectados pelo HIV-2 apesar da virémia ser reduzida. Para além disso verificámos uma associação directa entre os níveis de mRNA do *tat* e a activação das células T CD8, principalmente nos indivíduos infectados pelo HIV-1, sugerindo que

os níveis de Tat ou o número de células recentemente infectadas poderão ter um papel relevante na activação das células T CD8.

Efectuámos também pela primeira vez um estudo dos efeitos da terapêutica anti-retroviral nos níveis de transcritos virais e de DNA proviral em indivíduos infectados pelo HIV-2 tratados. Documentámos níveis de mRNA de *tat* significativamente mais elevados nos indivíduos tratados em comparação com os não tratados, o que sugere que os regimes terapêuticos utilizados não foram eficazes na redução da taxa de infecção de novas células. Por outro lado, na maioria dos doentes tratados identificámos a presença de mutações na transcriptase reversa e na protease o que indirectamente suporta a existência de replicação viral persistente, apesar da terapêutica anti-retroviral. O nosso estudo revelou ainda níveis elevados de activação das células T CD4 e T CD8 nestes doentes, e que estes níveis se correlacionavam negativamente com o número de células T CD4 em circulação, possivelmente contribuindo para o baixo nível de recuperação do número de células T CD4 frequentemente observado após terapêutica anti-retroviral na infecção pelo HIV-2.

Em conclusão, este estudo evidencia pela primeira vez níveis de replicação viral significativos nos doentes infectados pelo HIV-2 que se correlacionam com os níveis de activação imunitária reforçando a importância do controlo dos níveis de replicação viral persistente, mesmo em pequena quantidade e enfatizando a necessidade de se efectuarem ensaios clínicos e estudos sobre a eficácia da terapêutica anti-retroviral na infecção HIV-2.

**Palavras-chave:** HIV/SIDA; HIV-2; Co-receptores; DNA proviral; *gag* mRNA; *tat* mRNA; Replicação viral; Imunopatogénese da SIDA.





## Summary

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), first described in 1981, has caused more than 25 million deaths worldwide with an estimated 2 million deaths related to disease in 2008, representing one of the most important public health problems worldwide.

AIDS is caused by infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2). HIV-1 infection is pandemic, with more than 33 million people estimated to be infected, whilst HIV-2 infection remains relatively contained to a few West African countries, with Portugal representing the only non-African country with a significant HIV-2 prevalence (3.2% of infection cases reported in 2009).

HIV-2 infection is characterized by a slower progression to AIDS as compared to HIV-1 infection, with a limited impact on the survival of the majority of infected adults. The rate of CD4 T cell decline is much slower than in HIV-1 and the levels of circulating virus (viremia) are significantly lower irrespective of disease stage. The low levels of viremia in patients infected with HIV-2 suggest a lower replicative activity. However, despite the lower viremia in HIV-2, our results, as well as studies from other groups, showed that levels of proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells are similar in both infections, suggesting that a similar number of cells are infected.

The cell tropism of HIV-2 and HIV-1 is determined by the expression of chemokine receptors on target cells in addition to the expression of the CD4 molecule. CCR5 and CXCR4 are the major co-receptors that are used for HIV-1 entry, and their levels of expression were shown to be directly related to the susceptibility to infection and to the rate of disease progression in HIV-1 infected individuals. Several studies suggest that,

although HIV-2 can use a larger number of co-receptors as compared to HIV-1 *in vitro*, the major co-receptors used *in vivo* are also CCR5 and CXCR4. It is possible that different expression levels of these co-receptors lead to different patterns of infection in T cells populations determining the reduced production of virus and disease progression that is observed in individuals infected with HIV-2. We compared the expression of CCR5 and CXCR4 in patients infected with HIV-2 and HIV-1 that had similar levels of CD4 T cell depletion and found that patients infected with HIV-2 had an increased frequency of cells expressing CCR5 in the CD4 memory-effector population as compared to seronegative subjects. We also found a significant correlation between the frequency of cells expressing CCR5 in total CD4 T cells and the level of CD4 T cell depletion in individuals infected with HIV-2, but not in the ones infected with HIV-1. The expression of CCR5 is induced by cell activation and is usually restricted to the memory-effector population. We found the existence of a direct correlation between the frequency of cells expressing CCR5 and the levels of immune activation in individuals infected with HIV-2. These results demonstrate an association between the expansion of cells expressing CCR5 and immune activation in HIV-2. The lower frequency of cells expressing CCR5 in HIV-1 infected individuals, as compared with HIV-2<sup>+</sup> individuals may be related to a continuous depletion of these cells in the presence of the higher levels of viremia associated with HIV-1 infection. Regarding the frequency of cells that express CXCR4 within CD4 T cell population, we found that this frequency was similar in patients infected with HIV-2 or HIV-1 and HIV-negative individuals. We also investigated the possibility that the similar levels of proviral DNA in the presence of different levels of viremia could be due to differences in the target cells. The levels of proviral DNA were quantified in purified naive and memory CD4 T cells from patients

infected with HIV-2 and found to be very low in naive CD4 T cells, in marked contrast to the levels found in memory CD4 T cells. These results are in agreement with what is observed in individuals infected with HIV-1, suggesting that the memory CD4 T cell population is the main target for HIV-2, and further supporting the notion that CCR5 is the main co-receptor used by HIV-2 for infection *in vivo*. These data suggest that the lower viremia observed in patients infected with HIV-2 is not related to co-receptor availability on target cell populations.

The low to undetectable levels of viremia in the presence of significant levels of proviral DNA may be due to the regulation of HIV-2 at the transcriptional level. Therefore, we proceeded with the study of viral mRNA expression through the development of methodologies based on real-time RT-PCR for the quantification of unspliced (*gag*) and multiply spliced (*tat*) mRNA transcripts of HIV-2 and HIV-1. The optimization of these approaches allowed the development of assays with high sensitivity, specificity and reproducibility, which were used to investigate the transcriptional activity in cohorts of HIV-1 and HIV-2 infected patients. We found that HIV-2 infected patients expressed significantly lower levels of *tat* mRNA as compared to patients infected with HIV-1. However, *gag* mRNA expression was found to be similar in the two cohorts. Given that *tat* mRNA seems to be mainly expressed in recently infected cells, our data suggest that the rate of new infections at the cellular level is lower in individuals infected with HIV-2 as compared to their HIV-1 infected counterparts. On the other hand, the observation of similar levels of *gag* mRNA in the two infections suggest that there is significant ongoing viral transcription in individuals infected with HIV-2, despite the low levels of viremia that characterize this infection.

We further investigated the role of viremia, as well as levels of proviral DNA and *tat*

and *gag* viral transcripts on the chronic immune hyperactivation observed in HIV-2 and HIV-1 infections. We found significantly higher levels of CD4 and CD8 T cell activation in HIV-2 infected individuals with detectable viremia as compared with aviremic HIV-2<sup>+</sup> individuals. These results suggest a contribution of the circulating virus, even at low levels, to the state of immune activation found in these individuals. Our results further revealed a direct association between the levels of *gag* mRNA and the activation of CD4 T cells, supporting the possibility that persistent viral replication contributes significantly to the elevated immune activation levels observed in patients infected with HIV-2 despite the reduced viremia. In addition, we found a direct association between the levels of *tat* mRNA and CD8 T cell activation, particularly in individuals infected with HIV-1, suggesting that the levels of *tat*, or the number of newly infected cells, may have a role in CD8 T cell activation.

Next, we evaluated the impact of antiretroviral therapy on the levels of viral transcripts and proviral DNA levels in treated HIV-2 infected individuals. Studies in treated HIV-1 patients showed that antiretroviral therapy led to decreased levels of viral mRNA, as well as a progressive decrease in the levels of proviral DNA. However, there were no data regarding the effects of antiretroviral therapy on the levels of viral transcripts and proviral DNA in treated HIV-2 infected individuals. We found that these individuals featured significantly higher levels of *tat* mRNA than their untreated counterparts, suggesting that the regimens used were not effective in reducing the rate of infection of new cells. We also documented the presence of mutations in *reverse transcriptase* and *protease* in the majority of treated patients, which indirectly supports the existence of persistent viral replication despite antiretroviral therapy. We further noted that these patients showed elevated levels of CD4 and CD8 T cell activation that negatively

correlated with the number of CD4 T cells in circulation, possibly contributing to the reduced CD4 T cell recovery observed in these patients.

In conclusion, we provide evidence of significant levels of viral replication in patients infected with HIV-2, and of its relationship with the levels of immune activation in spite of the low levels of circulating virus. Our data reinforce the importance of monitoring levels of persistent viral replication, even at low levels and emphasize the need to pursue clinical trials and studies on the efficacy of antiretroviral therapy in HIV-2 infection.

**Keywords:** HIV/AIDS; HIV-2; Co-receptors; Proviral DNA; *gag* mRNA; *tat* mRNA; Viral replication; AIDS Immunopathogenesis.



# Capítulo 1:

## Introdução

### 1 Origem e distribuição geográfica da infecção pelo HIV

Estudos filogenéticos indicam que os vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) e do tipo 2 (HIV-2) tiveram origem em vírus da imunodeficiência símia (SIV). Vários subtipos de SIV têm sido identificados em mais de 3 dezenas de espécies de primatas não-humanos na África Subsaariana (Bibollet-Ruche, Bailes et al. 2004). Os vários estudos sugerem que dois desses subtipos, o SIVcpz que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) e o SIVsmm que infecta os macacos verdes africanos ou “sooty mangabeys” (*Cercocebus atys atys*), terão cruzado a barreira de espécie e estado na origem do HIV-1 e HIV-2 respectivamente (Hirsch, Olmsted et al. 1989; Gao, Bailes et al. 1999). A transmissão zoonótica dos vírus símios à espécie humana terá ocorrido em várias ocasiões dando origem às actuais variantes que infectam a espécie humana (Hahn, Shaw et al. 2000; Plantier, Leoz et al. 2009). No caso do HIV-1 estas variantes podem ser classificadas em 3 grupos: M, N e O (Gao, Bailes et al. 1999; Korber, Muldoon et al. 2000; Keele, Van Heuverswyn et al. 2006). Foi ainda proposta a criação de um possível grupo P que engloba uma variante de HIV-1 que apresenta maior homologia com um SIV recentemente descoberto em gorilas (SIVgor) do que com o SIVcpz (Plantier, Leoz et al. 2009). As infecções com vírus dos grupos N e O encontram-se principalmente confinadas ao Gabão e Camarões (Ayouba, Souquieres et al. 2000; Ayouba, Mauclore et al. 2001; Lemey, Pybus et al. 2004), enquanto o grupo M se propagou de forma pandémica (Peeters, Toure-Kane et al. 2003; Perrin, Kaiser et al.

2003). Este grupo subdivide-se em 9 subtipos A-D, F- H, J e K (Robertson, Anderson et al. 2000) dos quais o subtipo C é o mais prevalente afectando principalmente a África subsaariana, Índia e Nepal; seguido do subtipo A que é predominante na África Ocidental, e do subtipo B que afecta principalmente as Américas, Europa, Japão, Tailândia e Austrália. Têm sido descritos ainda vírus que resultam da recombinação entre vírus de diferentes subtipos formando as CRF (Circulating Recombinant Forms) (Butler, Pandrea et al. 2007; Ramirez, Simon-Loriere et al. 2008).

No caso do HIV-2, as variantes virais encontram-se actualmente classificadas em oito subtipos A-H (Damond, Worobey et al. 2004). Os subtipos A e B são os mais prevalentes infectando um grande número de pessoas em países da África Ocidental tais como Senegal, Guiné-Bissau, Gâmbia e Cabo Verde (Gao, Yue et al. 1994; Pieniasek, Ellenberger et al. 1999; Ishikawa, Janssens et al. 2001; Zeh, Pieniasek et al. 2005), enquanto os grupos C a H têm uma distribuição muito limitada (Gao, Yue et al. 1992; Chen, Luckay et al. 1997; Yamaguchi, Devare et al. 2000; Damond, Worobey et al. 2004). A infecção por HIV-2 é relativamente rara fora da África Ocidental sendo Portugal o único país não africano com uma prevalência significativa de infecção pelo HIV-2 (Schim van der Loeff and Aaby 1999; Soriano, Gomes et al. 2000; Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas 2010).

## **2 Estrutura e organização genética do HIV**

### ***2.1 Estrutura do virião***

Os viriões do HIV-1 e HIV-2 são bastante semelhantes do ponto de vista morfológico



apresentando uma estrutura esférica com cerca de 100 a 120 nm de diâmetro. A região mais externa destes viriões é formada por um invólucro constituído por uma membrana com bicamada lipídica de origem celular que inclui glicoproteínas virais e algumas proteínas celulares tais como proteínas do complexo de histocompatibilidade major de classe I e classe II (MHC-I e MHC-II) (Arthur, Bess et al. 1992; Montefiori, Cornell et al. 1994). Existem dois tipos de glicoproteínas virais associadas à membrana: a glicoproteína externa - gp120 (no HIV-1) ou a gp105 (no HIV-2), e a glicoproteína transmembranar - gp41 ou gp36 (no HIV-1 e HIV-2, respectivamente) (Rabson and Martin 1985; Clavel, Guyader et al. 1986; Gelderblom, Hausmann et al. 1987) (Figura 1). As glicoproteínas externa e transmembranar organizam-se em heterodímeros com estrutura trimérica formando as espículas virais (Zhu, Liu et al. 2006). O invólucro viral encontra-se revestido internamente pela proteína de matriz (MA ou p17) que envolve uma cápside em forma de cone formada pela proteína da cápside (CA) (p24 no HIV-1 ou p26 no HIV-2) (Figura 1).

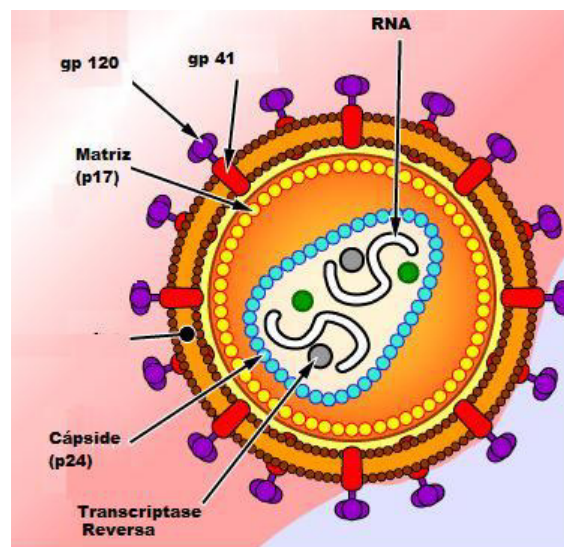


Figura 1: Estrutura do HIV-1 (Adaptado de Sierra *et al* 2005)

No interior da cápside existem duas moléculas de RNA genómico de cadeia simples associadas às proteínas da nucleocápside p6 e p9, formando um complexo ribonucleoproteico que estabiliza o RNA viral; as enzimas transcriptase reversa (RT ou p51), integrase (IN ou p31) e protease (PR ou p15).

A cápside engloba ainda as proteínas virais Vpu, Vif, Vpr e Nef e algumas proteínas celulares entre as quais se incluem proteínas que podem influenciar a infecciosidade viral entre as quais a ciclofilina A (Franke, Yuan et al. 1994; Yin, Braaten et al. 1998) e a APOBEC3G (Soros, Yonemoto et al. 2007) que constitui um dos mecanismos de imunidade intracelular contra o vírus (Mangeat, Turelli et al. 2003). O seu mecanismo de actuação será discutido no ponto 7.1 deste capítulo.

## **2.2 Organização genética**

Os genomas do HIV-1 e do HIV-2 apresentam uma organização genética semelhante sendo formados por duas moléculas idênticas de RNA de cadeia simples com cerca de 9,2 Kb que formam um genoma diploide. A homologia ao nível da sequência nucleotídica é variável, apresentando cerca de 60% para regiões conservadas de genes como o *pol* e *gag*, e de 30 a 40 % para outros genes (Guyader, Emerman et al. 1987). O RNA genómico viral é constituído por nove genes: *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (HIV-1) ou *vpx* (HIV-2), encontrando-se flanqueados pelas sequências LTR (Kuiken 2010) (Figura 2). Tal como no genoma típico dos retrovírus, três desses genes são considerados estruturais (*gag*, *pol* e *env*) dado que codificam para as proteínas estruturais das novas partículas virais e para as enzimas virais.

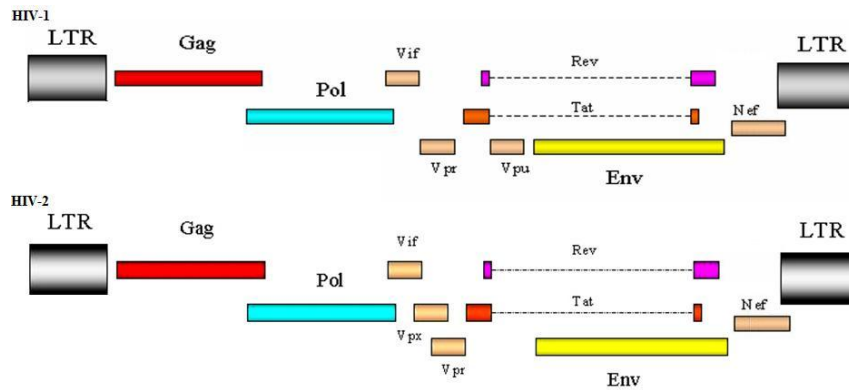


Figura 2: Organização genética do HIV-1 e do HIV-2

(Adaptado de: HIV disease multimedia - <http://emedicine.medscape.com/article/211316-media>)

O gene *gag* codifica para as proteínas da cápside. A transcrição deste gene dá origem a uma poliproteína precursora (p55 ou Pr55<sup>gag</sup>), que também é denominada assemblina, dada a sua função de se associar com a membrana plasmática nos locais de montagem das partículas virais. A proteína precursora p55 é processada por acção da protease viral, dando origem às proteínas da matiz, da cápside e da nucleocápside e da proteína p6 (Turner and Summers 1999). O gene *pol* (que inclui parte da sequência do gene *gag*) codifica para uma poliproteína precursora Gag-Pol (Pr160<sup>gag-pol</sup>) que é processada pela protease viral dando origem às enzimas protease, transcriptase reversa e integrase. O gene *env* codifica para o precursor polipeptídico (gp160) que é posteriormente processado originando um complexo formado pelas glicoproteínas de superfície e transmembranar (gp120 e gp41, ou gp105 e gp36, quer se trate do HIV-1 ou HIV-2, respectivamente).

O genoma viral é constituído ainda por dois genes reguladores (*tat*, *rev*) e quatro genes acessórios, três dos quais estão presentes quer no HIV-1 quer no HIV-2 (*nef*, *vif*, e *vpr*) e

o gene *vpu* que apenas está presente no HIV-1 e o gene *vpx* que se encontra apenas no HIV-2. Todos estes genes codificam para as proteínas virais com o mesmo nome com funções bastante diversas.

A proteína Tat (*Transactivator*) é essencial para a expressão genética viral, contribuindo para a transactivação de genes virais e celulares. Esta proteína localiza-se preferencialmente no núcleo e nucléolo e exerce a sua acção através do recrutamento e interacção com proteínas celulares que vão libertar a repressão da sequência LTR permitindo a iniciação da transcrição e o alongamento dos mRNAs virais (Mahlknecht, Dichamp et al. 2008; Ju, Song et al. 2009) (ver ponto 3.2 deste capítulo). A proteína Tat é também libertada para o meio extracelular, especialmente durante a infecção aguda, entrando nas células vizinhas (Ferrari, Pellegrini et al. 2003; Zheng, Yang et al. 2005) onde vai modular a expressão de vários genes celulares (Li, Lee et al. 2005), incluindo várias citocinas e quimiocinas que são importantes para uma infecção produtiva e que modulam significativamente a função imunitária (Ensoli, Buonaguro et al. 1993; Chang, Samaniego et al. 1997; Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002). Em particular, foi demonstrada recentemente a internalização de Tat por células dendríticas derivadas de monócitos, promovendo a sua maturação, apresentação de antígenos e direccionando a resposta imune para uma resposta do tipo Th1, activando a expressão genética de TNF- $\alpha$  (Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002; Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009). Para além disso é conhecido o papel desta proteína no aumento de expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Gandhi, Saiyed et al. 2009), IFN- $\alpha$  (Zagury, Lachgar et al. 1998; Gallo 1999), do correceptor CCR5 e da cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (CD25) em células infectadas pelo HIV-1 (Zheng, Yang et al. 2005; Mayol, Munier et al. 2007; Stettner, Nance et al. 2009). O efeito activador da produção de IFN- $\alpha$  em macrófagos,

poderá ter efeitos anti-proliferativos e imunossupressores em células não infectadas (Zagury, Lachgar et al. 1998; Gallo 1999). A Tat parece ter igualmente um efeito imunossupressor sobre as respostas específicas contra a gp-120 ao induzir o aumento da expressão da citocina IL-10 (Gupta, Boppana et al. 2008). Verificou-se também que a Tat pode inibir a expressão de outros genes tais como o da sintetase do óxido nítrico induzida pelo interferão, em macrófagos, promovendo desta forma um aumento da susceptibilidade a infecções dado que a produção de óxido nítrico pelos macrófagos constitui um dos primeiros mecanismos de defesa que são montados contra agentes microbianos patogénicos (Barton, Biggs et al. 1996). Foi igualmente mostrado que a proteína Tat pode ter efeitos indutores da apoptose através de vários mecanismos, incluindo o aumento da expressão de TGF- $\beta$  (Poggi and Zocchi 2006), de TRAIL (molécula que faz parte da família dos ligandos do TNF- $\alpha$  indutores de morte celular), e da activação das caspases 3 e 8 (Miura, Koyanagi et al. 2003; Giacca 2005), contribuindo para a indução de imunossupressão (Poggi and Zocchi 2006). Tem sido mostrado também o papel da Tat no desenvolvimento de patologias associadas à SIDA, nomeadamente na demência, dado o seu efeito neurotóxico (King, Eugenin et al. 2006), e no desenvolvimento de neoplasias, dada a diminuição na capacidade de reparação do DNA induzida pela Tat (Nunnari, Smith et al. 2008).

Relativamente à proteína Rev (Regulator of expression of virion proteins), esta tem sido reconhecida como essencial para as fases tardias do ciclo de replicação viral devido ao seu papel no aumento da expressão das proteínas virais estruturais Gag, Pol e Env a partir do DNA proviral integrado. Esta proteína localiza-se preferencialmente no núcleo e no nucléolo e encontra-se envolvida na exportação, estabilização e utilização dos mRNAs virais *unspliced* (*gag* e *gag-pol*) e *singly-spliced* (*env*) que contêm intrões.

Estes RNAs com intrões contêm uma estrutura secundária denominada Rev responsive element (RRE) na região 3' terminal do intrão. Uma interacção específica entre a Rev, RRE e vários cofactores celulares permite a formação de um complexo que dirige o mRNA para o poro nuclear e a exportação nuclear destes transcritos para o citoplasma (Malim, Hauber et al. 1989) aumentando a expressão das respectivas proteínas. Um estudo sobre as funções da proteína Rev do HIV-2 mostrou que esta tem um papel semelhante na exportação dos mRNAs virais com intrões para o citoplasma (Dillon, Nelbock et al. 1990). Foram no entanto recentemente descritas outras funções para a proteína Rev do HIV-1, nomeadamente no aumento dos níveis de tradução (Groom, Anderson et al. 2009) e na encapsidação do RNA genómico nos novos viriões (Brandt, Blissenbach et al. 2007; Blissenbach, Grewe et al. 2010). Recentemente foi-lhe igualmente reconhecido um papel na inibição da integração do genoma viral, ao interagir com a integrase viral e a proteína LEDGF/p75 (que funciona como cofactor na integração do HIV), o que sugere um papel desta proteína na prevenção da superinfecção (Levin, Hayouka et al. 2009; Levin, Rosenbluh et al. 2010).

A proteína Nef é uma proteína multifuncional, predominantemente citoplasmática, mas também se pode encontrar ligada à membrana e no núcleo. É uma das primeiras proteínas virais que são produzidas pelas células infectadas. A proteína Nef do HIV-1 provoca uma diminuição da expressão do receptor CD4 (Stoddart, Geleziunas et al. 2003), sendo um mecanismo que provavelmente impede a superinfecção (Benson, Sanfridson et al. 1993). A proteína Nef modifica o estado geral de activação celular promovendo a fosforilação de vários substratos, criando um ambiente intracelular mais favorável a replicação viral (Geleziunas, Miller et al. 1996). Para além disso, a proteína Nef promove também a remoção de moléculas de MHC classe I da superfície da célula,

dificultando a detecção e destruição das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (Blagoveshchenskaya, Thomas et al. 2002). Esta proteína aumenta ainda a infecciosidade das partículas virais (Chowers, Spina et al. 1994; Miller, Warmerdam et al. 1994) e estimula a replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico (Miller, Warmerdam et al. 1994; Spina, Kwoh et al. 1994). Relativamente à proteína Nef do HIV-2, foi mostrado que esta promove a diminuição da expressão de CD3 nas células T infectadas, podendo contribuir desta forma para diminuir a replicação viral induzida pela hiperactivação imunitária (Schindler, Munch et al. 2006). Através deste mecanismo, a proteína Nef do HIV-2 poderá contribuir para uma menor morte celular e conseqüentemente contribuir para a persistência das células infectadas pelo HIV-2 (Schindler, Munch et al. 2006).

A proteína Vif (Viral Infectivity Factor) promove a infecciosidade das partículas virais (Gabuzda, Li et al. 1994; Simon and Malim 1996). Esta proteína localiza-se na membrana plasmática (Goncalves, Jallepalli et al. 1994; Goncalves, Shi et al. 1995; Simon, Fouchier et al. 1997), no citoplasma (Michaels, Hattori et al. 1993; Goncalves, Jallepalli et al. 1994), no citoesqueleto (Karczewski and Strebel 1996) e no núcleo (Huvent, Hong et al. 1998) e actua induzindo a ubiquitinação e posterior degradação dos factores celulares anti-virais APOBEC3G (Marin, Rose et al. 2003; Sheehy, Gaddis et al. 2003; Mehle, Strack et al. 2004) e APOBEC3F (Wiegand, Doehle et al. 2004). As suas funções encontram-se descritas no ponto 7.1 deste capítulo. Ao nível genético, o *vif* do HIV-2 apresenta uma homologia de cerca de 25% com o *vif* do HIV-1 (Ribeiro, Moniz Pereira et al. 1998), e a proteína Vif do HIV-2, tal como a do HIV-1, inibe a incorporação de APOBEC3G e APOBEC3F nas partículas virais e pode reduzir a expressão daquelas enzimas nas células infectadas (Wiegand, Doehle et al. 2004). No

entanto, um estudo mostrou que isolados de HIV-2 que não expressam Vif podem replicar em linhas celulares que expressam APOBEC3G, o que parece indicar que o APOBEC3G apresenta uma menor capacidade de restrição da replicação do HIV-2 em comparação com o HIV-1 e que outros membros da família APOBEC, ou outros factores de restrição, poderão ter um papel mais importante na inibição da replicação do HIV-2 do que o APOBEC3G (Ribeiro, Maia e Silva et al. 2005).

A proteína Vpr (Viral Protein R) é incorporada nos viriões e interage com a porção p6 do precursor Pr55 da proteína Gag. Foram identificadas várias funções à Vpr do HIV-1 e HIV-2 incluindo o direccionamento e a importação para o núcleo dos complexos de pré-integração (Ueno, Shiota et al. 2003; Le Rouzic and Benichou 2005), a paragem do ciclo celular (Planelles, Jowett et al. 1996), regulação da apoptose (apenas para a Vpr do HIV-1) (Ayyavoo, Mahboubi et al. 1997; Stewart, Poon et al. 2000), a transactivação de genes virais e celulares (Amini, Saunders et al. 2004; Cui, Tungaturthi et al. 2006) e indução de diferenciação celular (Le Rouzic and Benichou 2005). Para além da sua presença nas partículas virais, esta proteína pode ser encontrada nos complexos virais de pré-integração e localiza-se preferencialmente junto ao núcleo (Fujita, Otsuka et al. 2010). Apesar das funções que lhes foram identificadas, as proteínas Vpr do HIV-1 e do HIV-2 têm sido referidas como dispensáveis à replicação viral (Fujita, Otsuka et al. 2010), e foi igualmente mostrado que isolados de HIV-2 aos quais foi retirado o gene *vpr* replicam de forma equivalente aos isolados com o genoma completo (Ueno, Shiota et al. 2003). No entanto, tem sido reconhecido que as proteínas Vpr do HIV-1 e do HIV-2 exercem um impacto significativo na fisiologia celular e provavelmente na patogénese associada a estas infecções (Fujita, Otsuka et al. 2010).

A proteína Vpu (Viral Protein U) encontra-se presente no HIV-1 e em algumas variantes



do SIV mas não no HIV-2, não existindo nenhum gene semelhante neste último vírus. A proteína Vpu é uma proteína transmembranar que induz a degradação do CD4 no retículo endoplasmático (Willey, Maldarelli et al. 1992) e aumenta da libertação de viriões a partir das membranas plasmáticas das células infectadas (Klimkait, Strebel et al. 1990; Van Damme, Goff et al. 2008). Esta proteína está envolvida na maturação da Env mas não é encontrada no virião. A proteína Vpu tem efeitos inibitórios sobre factores anti-virais celulares. A Vpu diminui a expressão da proteína BST-2 ou teterina nas células, facilitando a saída do vírus, a disseminação e a patogenicidade viral (Nomaguchi, Fujita et al. 2008; Kirchhoff 2009).

O gene *vpx* parece ter evoluído a partir de uma duplicação do gene *vpr* e codifica para a proteína Vpx apenas no HIV-2 e em algumas variantes do SIV, mas não no HIV-1 (Tristem, Marshall et al. 1992). A proteína Vpx é incorporada nas partículas virais através do domínio p6 da proteína Gag e está presente desde o início da infecção (Selig, Pages et al. 1999). Esta proteína parece localizar-se preferencialmente no núcleo (Pancio, Vander Heyden et al. 2000; Belshan and Ratner 2003), sendo a sua principal função, tal como a Vpr do HIV-1, a de promover a importação do DNA viral para o núcleo (Fletcher, Brichacek et al. 1996; Cheng, Belshan et al. 2008). No entanto foram também descritos efeitos desta proteína ao nível da transcrição reversa e na acumulação de DNA viral antes da sua importação nuclear (Goujon, Riviere et al. 2007; Fujita, Otsuka et al. 2008; Goujon, Arfi et al. 2008). O *vpx* parece ser dispensável para a replicação viral em linhas celulares e linfócitos primários (Ueno, Shiota et al. 2003), no entanto parece ser necessário para a importação nuclear do DNA viral em células que não estão em divisão como os macrófagos derivados dos monócitos e essencial para a replicação viral nessas células (Pancio, Vander Heyden et al. 2000).

O genoma viral é flanqueado pelas sequências LTR. Estas sequências encontram-se divididas em três regiões U3, R e U5, que contêm locais de ligação a factores de transcrição celulares (Chen-Park, Huang et al. 2002). Em conjunto contêm quatro domínios funcionais: a região transactivadora (TAR), que é o local de ligação da proteína Tat e de proteínas celulares e encontra-se portanto envolvida na transactivação mediada pela proteína viral Tat (Richter, Ping et al. 2002); a região do promotor; a região do *enhancer*, que contém os locais de ligação para o NF-kB; e os elementos reguladores. O número de locais de ligação para factores de transcrição pode variar. O HIV-1 subtipo B apresenta 2 locais de ligação ao NF-kB enquanto o subtipo C contém 3 (Montano, Nixon et al. 2000). Em comparação, o HIV-2 apresenta apenas um local de ligação a este factor de transcrição (Markovitz, Hannibal et al. 1990) assim como o HIV-1 subtipo E (Montano, Nixon et al. 1998). Para além disso, a sequência LTR do HIV-2 é mais longa em comparação com o tamanho destas sequências no HIV-1, podendo estar sujeita a *splicing* no 5'-LTR e apresentar uma estrutura secundária mais complexa podendo afectar a activação da transcrição deste vírus (Berkhout 1992; Chatterjee, Garzino-Demo et al. 1993).

### **3 Ciclo de vida do HIV**

#### ***3.1 Entrada nas células alvo***

O processo de entrada inicia-se de um modo geral com a interacção entre as espículas do invólucro viral e receptores presentes na membrana plasmática das células alvo (Clapham and McKnight 2002). No caso do HIV-1, cada espícula é composta por três

moléculas de gp120 e três moléculas de gp41 (Weiss, Levy et al. 1990) que se mantêm unidas por determinantes na gp41 (Earl, Doms et al. 1990). A gp120 inclui um domínio de ligação ao receptor CD4 (Lasky, Nakamura et al. 1987), tendo este sido descrito como o principal receptor utilizado quer pelo HIV-1 quer pelo HIV-2 para a entrada nas células (Sattentau, Clapham et al. 1988; Bour, Geleziunas et al. 1995). Para além do local de ligação ao CD4 a gp120 apresenta ainda um local de ligação para um co-receptor (Hoffman, Seillier-Moiseiwitsch et al. 2002). A interacção da gp120 com o CD4 conduz a alterações conformacionais que resultam na exposição da região que contém o local de ligação ao co-receptor (Lapham, Ouyang et al. 1996; Trkola, Dragic et al. 1996; Wu, Gerard et al. 1996; Hill, Deng et al. 1997). Nessa alteração conformacional ocorre ainda a exposição de uma região altamente hidrofóbica da gp41, também chamada de péptido de fusão, que leva à formação de poros na membrana plasmática e permite a fusão do invólucro viral com a membrana citoplasmática (Srinivas, Srinivas et al. 1992; Chan and Kim 1998; Tilton and Doms 2010) (Figura 3).

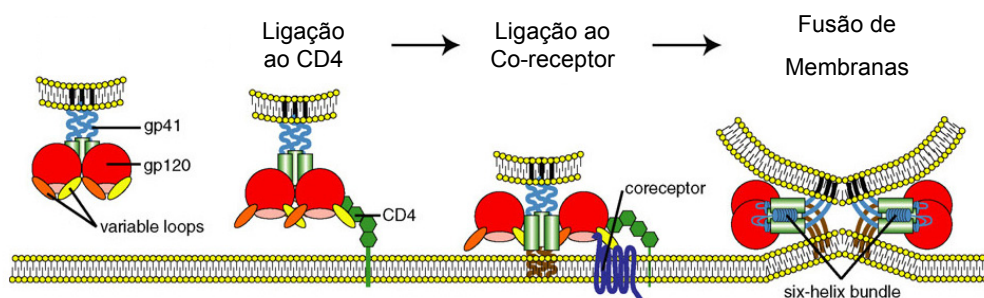


Figura 3: Entrada do HIV nas células alvo (Adaptado de Tilton *et al*, 2010)

Apesar da interacção da gp120 com o CD4 e a posterior fusão de membranas ser reconhecida como a principal forma de entrada do vírus nas células alvo, encontram-se descritas outras formas de entrada do vírus independentes do receptor CD4 que podem

ser relevantes em células que apresentam baixa expressão de CD4 tais como macrófagos, microglia e células dendríticas (Permanyer, Ballana et al. 2010). Estas formas alternativas de entrada podem envolver interações entre as glicoproteínas do envoltório e domínios *lectin-like* em receptores celulares (Larkin, Childs et al. 1989; Lambert, Gilbert et al. 2008), receptores do tipo sindecanos em células dendríticas e macrófagos (Saphire, Bobardt et al. 2001; de Witte, Bobardt et al. 2007) e o estabelecimento de ligações de alta afinidade entre a gp120 e a proteína DC-SIGN, expressa por algumas populações de células dendríticas (Curtis, Scharnowske et al. 1992; Geijtenbeek, Kwon et al. 2000). Este último processo não resulta em infecção produtiva das células dendríticas mas permite a transmissão de vírus para linfócitos T através do contacto célula-célula (Kwon, Gregorio et al. 2002). Encontra-se ainda descrito que o HIV-1 pode também entrar nas células através do processo de endocitose (Pauza and Price 1988), tendo sido recentemente reconhecida a relevância deste processo como mecanismo eficiente de entrada do vírus nas células resultando em infecções produtivas (Miyachi, Kim et al. 2009). No caso do HIV-2, encontra-se igualmente descrita a entrada nas células por isolados que não utilizam o receptor CD4 (Reeves, Hibbitts et al. 1999).

Os principais co-receptores descritos para o HIV-1 e HIV-2 *in vivo* são os receptores das quimiocinas CCR5 e CXCR4 (Clapham and McKnight 2002; Morner, Bjorndal et al. 2002). No entanto, estudos *in vitro* mostraram que, especialmente no caso da infecção HIV-2, podem ser usados outros co-receptores como o CCR1, CCR2b, BOB entre outros, (McKnight, Dittmar et al. 1998; Morner, Bjorndal et al. 1999).

Têm sido descritos polimorfismos no gene CCR5 que mostraram ter implicações para a patogénese da infecção pelo HIV-1. Uma deleção de 32bp no exão do gene (CCR5-

Δ32) resulta numa protecção quase total contra a infecção pelo HIV-1 e uma menor taxa de progressão para SIDA em indivíduos heterozigóticos para o alelo (Dean, Carrington et al. 1996; Huang, Paxton et al. 1996; Liu, Paxton et al. 1996; Samson, Libert et al. 1996; Michael, Chang et al. 1997). Alterações na sequência do receptor para as quimiocinas CCR2 foram também associadas com uma progressão mais lenta para SIDA (Smith, Dean et al. 1997; Kostrikis, Huang et al. 1998). Este receptor é no entanto utilizado por variantes raras do HIV-1, sendo o efeito benéfico que a mutação tem na progressão da doença provavelmente devido ao facto de mediar o decréscimo da expressão do CCR5 (Nakayama, Tanaka et al. 2004).

O perfil de utilização dos co-receptores tem um papel importante na patogénese do HIV. No caso do HIV-1 a infecção é iniciada por vírus geralmente monotrópicos que usam o receptor para CCR5 (variantes R5). Estas variantes replicam de forma eficiente em células T CD4 activadas e de memória que expressam elevados níveis de CCR5 e que são particularmente abundantes no tecido linfoide associado ao intestino, que tem sido reconhecido como um dos principais locais onde ocorre a replicação do HIV (Veazey, DeMaria et al. 1998; Brenchley, Hill et al. 2004). No entanto, em cerca de 50 – 60% dos doentes, com a progressão da doença, emergem variantes virais com capacidade para usar o co-receptor CXCR4 (variantes X4), que é um receptor das quimiocinas expresso numa gama alargada de células, incluindo células T CD4 naive e quiescentes. Esta mudança de fenótipo parece ser promovida pela pressão selectiva das quimiocinas com afinidade para o CCR5 (Lusso 2006). A presença de variantes X4 encontra-se directamente correlacionada com o ritmo de progressão para SIDA (Asjo, Morfeldt-Manson et al. 1986; Tersmette, de Goede et al. 1988; Tersmette, Gruters et al. 1989; Schuitemaker, Koot et al. 1992; Koot, Keet et al. 1993; Connor, Sheridan et al. 1997;

Kupfer, Kaiser et al. 1998). No entanto, verifica-se que uma grande parte dos doentes infectados pelo HIV-1 progride para um estado de SIDA sem que ocorra a mudança de fenótipo de R5 para X4. As variantes X4 emergem geralmente apenas depois do desenvolvimento da imunodeficiência, parecendo haver uma selecção negativa para a sua emergência nas fases iniciais da infecção (Lusso 2006). Essa pressão selectiva parece ser mediada por mecanismos imunológicos humorais (Cornelissen, Mulder-Kampinga et al. 1995; Lathey, Pratt et al. 1997; Lusso, Earl et al. 2005) e celulares (Harouse, Buckner et al. 2003) e, pelo menos em parte, pela secreção constitutiva da quimiocina SDF-1 com afinidade para o CXCR4 ao nível das mucosas (Agace, Amara et al. 2000). No caso do HIV-2, a utilização de diferentes co-receptores não parece correlacionar-se com o prognóstico da infecção (Fenyo 2001), embora este aspecto não esteja ainda clarificado.

## ***3.2 Replicação do HIV***

### **3.2.1 Transcrição reversa**

Uma vez no interior da célula, o genoma viral é retro-transcrito pela transcriptase reversa viral dando origem a DNA viral de cadeia dupla. A transcriptase reversa catalisa a formação de uma cadeia de DNA de sentido negativo, tendo como modelo a cadeia de RNA genómico de sentido positivo. Através da actividade de RNase e de DNA polimerase da transcriptase reversa, a cadeia de RNA genómico vai ser degradada e é sintetizada a segunda cadeia de DNA, originando o DNA proviral de cadeia dupla. Esta molécula de DNA viral vai formar um complexo de ácido nucleico-proteína denominado complexo de pré-integração. O complexo de pré-integração liga-se

posteriormente à membrana nuclear direccionado pela proteína Vpr (Popov, Rexach et al. 1998) e entra no núcleo através dos poros nucleares (Le Rouzic and Benichou 2005). O DNA viral não integrado no genoma celular pode ser encontrado no núcleo na forma linear, ou circularizar formando moléculas com 1 ou 2 LTR (1-LTR ou 2-LTR) (Wu 2004). Durante a fase assintomática da infecção os níveis de DNA viral não integrado podem atingir 99% do total de DNA viral (Chun, Carruth et al. 1997). As formas circulares de DNA viral têm sido consideradas instáveis e temporárias no núcleo tendo uma semi-vida de menos de 16 horas em células em proliferação (Pauza, Trivedi et al. 1994). Com base nestes dados, os níveis 2-LTR têm sido propostos como um marcador de replicação viral activa nos doentes infectados (Pauza, Trivedi et al. 1994; Zazzi, Romano et al. 1997; Panther, Coombs et al. 1998; Sharkey, Teo et al. 2000). No entanto, a sua utilização com aquele fim não é consensual dado que outros estudos sugeriram que estas moléculas circulares são estáveis e a sua concentração diminui apenas em função da divisão celular (Butler, Johnson et al. 2002; Pierson, Kieffer et al. 2002). Encontra-se descrito que, apesar do DNA proviral integrado ser essencial para uma replicação viral produtiva, a transcrição e posterior tradução de proteínas virais é possível a partir do DNA viral não integrado. Quantidades basais das proteínas Nef, Tat e Rev podem produzidas por estas formas de DNA viral após activação do promotor no LTR por factores de transcrição celulares tais como o NF- $\kappa$ B (Aiken and Trono 1995; Wu 2004), no entanto, não está ainda esclarecido qual o seu impacto na patogénese da infecção por HIV.

### 3.2.2 Integração

Após a entrada do complexo de pré-integração no núcleo, a integrase viral vai catalisar a integração da cadeia dupla de DNA viral linear no DNA cromossomal da célula hospedeira (Bushman 2002; Schroder, Shinn et al. 2002; Van Maele and Debyser 2005). Esta integração é considerada um passo essencial para a manutenção do genoma viral e obrigatório para a replicação do HIV (Engelman, Englund et al. 1995; Wiskerchen and Muesing 1995). O processo de integração inicia-se com uma reacção de processamento das extremidades 3' na qual a integrase retira alguns nucleótidos da extremidade 3' de ambas as cadeias de DNA viral linear. Alguns estudos mostraram que as extremidades do DNA viral encontram-se associadas a complexos compostos por proteínas virais e celulares denominados intassomas (Wei, Mizuuchi et al. 1997; Chen, Wei et al. 1999). A integrase cataliza também uma reacção de transferência de cadeias (*strand transfer*) na qual ocorre o corte do DNA cromossomal e a ligação das extremidades 3' nas cadeias de DNA viral às extremidades do DNA cromossomal. O processo é depois completado por enzimas celulares de reparação que preenchem os espaços entre o DNA viral integrado e o DNA celular (Freed 2001).

A integração do HIV-1 e do HIV-2 parece ocorrer preferencialmente junto a genes transcripcionalmente activos e de genes que são activados após a infecção (Schroder, Shinn et al. 2002; MacNeil, Sankale et al. 2006). Um factor envolvido no direccionamento da integração para unidades transcripcionais é a proteína PSIP/LEDGF/p75 a qual se liga à integrase do HIV e é necessária para uma infecção eficiente (Cherepanov, Maertens et al. 2003; Maertens, Cherepanov et al. 2003; Llano, Saenz et al. 2006; Vandegraaff, Devroe et al. 2006). Outros factores podem influenciar os locais de integração incluindo a estrutura dos nucleossomas, a presença de



modificações pós-tradução das histonas como acetilações e metilações, associadas a uma transcrição activa (Wang, Ciuffi et al. 2007). Uma vez integrado, o DNA viral ou provírus serve de molde para a transcrição dos genes virais.

### **3.2.3 Transcrição**

A expressão genética a partir do DNA proviral integrado depende de vários factores entre os quais a estrutura e a actividade transcripcional da cromatina envolvente à zona de integração (Jordan, Defechereux et al. 2001), a presença de factores de transcrição celulares (Nabel and Baltimore 1987; Cron, Bartz et al. 2000) e do activador da transcrição viral, Tat (Taube, Fujinaga et al. 1999). Em células T CD4 latentemente infectadas, a transcrição do HIV encontra-se maioritariamente reprimida num processo mediado pelas enzimas desacetilases das histonas (HDACs). A desacetilação das histonas ocorre por acção de um complexo composto pela subunidade p50 do NF- $\kappa$ B e a enzima HDAC1 que se liga ao LTR do HIV e provoca modificações na estrutura da cromatina resultando na repressão da transcrição. Nesta situação, e na ausência de Tat, a transcrição viral pode ser iniciada pela RNA polimerase II mas a eficiência do processo é bastante baixa (Williams, Chen et al. 2006), sendo produzida uma pequena quantidade de transcritos não processados e uma quantidade relativamente mais elevada de transcritos curtos não codificantes (Feinberg, Baltimore et al. 1991) que serão degradados (Pagans, Pedal et al. 2005). Na presença de estimulação induzida, por exemplo por TNF- $\alpha$ , os níveis de factores de transcrição celulares tais como o NF- $\kappa$ B vão aumentar, promovendo o recrutamento de acetiltransferases das histonas (HATs). Estas enzimas provocam múltiplas acetilações e a remoção do complexo composto pela

p50 e HDAC1, permitindo o acesso da RNA polimerase II ao LTR e tornando possível a transcrição dos primeiros mRNA virais como o *tat*. A acumulação progressiva da proteína Tat permite um aumento da associação entre esta e acetiltransferases das histonas tais como p300/CBP, p/CAF (Benkirane, Chun et al. 1998; Marzio, Tyagi et al. 1998; Wong, Sharma et al. 2005), Tip60 (Kamine, Elangovan et al. 1996) e hGCN5 (Col, Caron et al. 2001). Essa associação promove igualmente múltiplas acetilações, reorganização do nucleosoma posicionado no local de iniciação da transcrição viral (Jeang, Chun et al. 1993; Jordan, Bisgrove et al. 2003) e o acesso de vários factores de transcrição à região 5' do LTR, levando à activação mais eficiente do promotor LTR e aumento dos níveis de transcrição viral (Demarchi, D'Agaro et al. 1993; Deng, de la Fuente et al. 2000; Pereira, Bentley et al. 2000; Pumfery, Deng et al. 2003). A Tat também interage directamente e recruta alguns factores de transcrição tais como Sp1 (Jeang, Chun et al. 1993; Sune and Garcia-Blanco 1995; Rossi, Mukerjee et al. 2006), TBP (Kashanchi, Shibata et al. 1994), NF- $\kappa$ B (Demarchi, Gutierrez et al. 1999; Mahlknecht, Dichamp et al. 2008), NF-IL-6 (c/EBPbeta) (Mukerjee, Sawaya et al. 2007) e CREB (Zauli, Milani et al. 2001), conduzindo à activação da transcrição viral. Para além de aumentar os níveis de transcrição viral através da promoção da reorganização da cromatina e da interacção directa com factores de transcrição, a Tat interage também com o complexo P-TEFb composto pela ciclina T1 e pela CDK9 (Zhou, Deng et al. 2003) de forma recrutar e a ligar-se posteriormente às estruturas TAR (sequência de RNA localizada na extremidade 5' dos RNA nascentes) que actuam como elemento promotor. Este complexo activa a RNA polimerase II permitindo a síntese de transcritos virais de tamanho completo (Feinberg, Baltimore et al. 1991; Williams, Chen et al. 2006). Na presença de Tat, a eficiência da transcrição dos genes do HIV é

aumentada em cerca de cem vezes (Cann, Rosenblatt et al. 1985).

A transcrição do HIV gera cerca de 30 transcritos virais diferentes. Todos estes transcritos têm origem num único transcrito de tamanho completo que pode não ser processado (*unspliced*) e ter a função de RNA genómico ou codificar para proteínas estruturais. O mRNA *unspliced* pode também ser processado através de *splicing* alternativo gerando os mRNA *multiply spliced* e *singly spliced* que codificam para as proteínas reguladoras. Quer os RNAs *singly-spliced* quer o *unspliced* são RNAs que contêm intrões e tal como a maior parte dos transcritos celulares com intrões, estes transcritos virais são retidos no núcleo pela interacção com factores de *splicing* até que o processo de *splicing* esteja terminado ou que sejam degradados. Assim, a expressão genética do HIV para além de ser regulada ao nível da taxa de transcrição é também regulada ao nível da exportação nuclear de transcritos contendo intrões, os quais contêm uma estrutura secundária denominada Rev responsive element (RRE) na região 3' terminal. Este processo é mediado pela proteína viral Rev (revisto em (Pollard and Malim 1998). A interacção específica entre o Rev, RRE e vários co-factores celulares forma um complexo que dirige o mRNA para o poro nuclear e permite a exportação nuclear dos transcritos virais que sofreram *splicing* incompleto (Malim, Hauber et al. 1989).

Em estudos sobre a análise da cinética da expressão de mRNA virais mostrou-se que o mRNA viral é expresso de acordo com um padrão que se caracteriza por na fase inicial haver uma maior expressão de transcritos *multiply spliced* em relação aos transcritos que não foram sujeitos a *splicing* (*unspliced*), enquanto que em fases mais tardias do ciclo de replicação, os mRNA *unspliced* passam a ser os mais frequentes (Pomerantz, Trono et al. 1990; Michael, Morrow et al. 1991) (Kim, Byrn et al. 1989; Klotman, Kim

et al. 1991; Ranki, Lagerstedt et al. 1994; Sonza, Mutimer et al. 2002). Alguns estudos mostraram também uma associação entre o padrão de expressão dos mRNA virais e o estadio da infecção, mostrando uma maior expressão de mRNA *multiply spliced* em indivíduos assintomáticos relativamente aos sintomáticos (Seshamma, Bagasra et al. 1992). A proporção da quantidade de expressão de mRNA *unspliced* relativamente aos mRNA *multiply spliced* tem sido também utilizada como marcador de replicação viral tendo-se demonstrado estar directamente associada com os níveis de virémia e a rapidez de progressão para a doença (Furtado, Kingsley et al. 1995; Michael, Mo et al. 1995). De um modo geral, a expressão dos diferentes mRNAs virais apresenta-se fortemente relacionada com o prognóstico da doença (Saksela, Stevens et al. 1994; Saksela, Stevens et al. 1995; Saltarelli, Hadziyannis et al. 1996; Vesanen, Stevens et al. 1996).

Quer os transcritos virais *unspliced*, quer os *singly* e *multiply spliced* codificam para as várias proteínas virais com funções quer estruturais (poliproteína Gag-Pol, no caso do mRNA *unspliced*), quer reguladoras (Vpu, Vpr, Vif e Env, no caso dos mRNA *singly spliced*; e Tat, Nef e Rev no caso dos mRNA *multiply spliced*), sendo todas elas produzidas por processos dependentes dos mecanismos de tradução celulares (Balvay, Lopez Lastra et al. 2007).

#### **3.2.4 Tradução, montagem e gemulação**

A tradução das proteínas virais ocorre no citoplasma, e dada a sua dependência dos mecanismos de tradução celulares, os mRNA virais possuem estruturas que permitem uma eficiente expressão das proteínas virais tais como, estruturas 5'-cap, 5'-UTR (*untranslated regions*) e 3'-poly(A) (Balvay, Lopez Lastra et al. 2007). O controlo da

tradução é normalmente determinado por complexos proteicos que reconhecem elementos que estão geralmente presentes nas regiões não traduzidas (UTR) presentes na extremidade 5' e/ou 3' dos mRNAs (Kean 2003).

Foram também identificados elementos importantes para a tradução na região 5'-UTR e na região codificante do RNA genômico viral denominados IRES (*Internal Ribosome Entry Segment*) (Brasey, Lopez-Lastra et al. 2003). No HIV-1, foram identificados dois locais IRES, localizados antes do codão de iniciação do *gag* e na própria região codificante desse gene (Brasey, Lopez-Lastra et al. 2003). A poliproteína precursora Gag (Pr55<sup>gag</sup>) é sintetizada por um processo a partir do qual a maquinaria celular de tradução tem acesso à região IRES. A tradução a partir destas sequências permite que a tradução de Pr55<sup>gag</sup> possa ocorrer durante a fase G2-M, fase durante a qual a tradução dependente das estruturas 5'-cap se encontra bloqueada (Pyronnet and Sonenberg 2001; Brasey, Lopez-Lastra et al. 2003). Este mecanismo é importante para a tradução das proteínas do HIV dado que a proteína viral Vpr tende a bloquear o ciclo celular das células infectadas na fase G2-M (He, Choe et al. 1995; Goh, Rogel et al. 1998). A poliproteína Pr55<sup>gag</sup> recém sintetizada tende a acumular-se no local de síntese sendo provável que se ligue ao RNA viral *unspliced* através de interação específica com locais de alta afinidade presentes na região IRES (Clever, Sasseti et al. 1995) ou numa sequência denominada sinal de empacotamento (packaging signal), elemento de encapsidação ou  $\psi$ -site, localizada na região 5' do codão de iniciação do *gag* (Berkowitz, Fisher et al. 1996). Estudos sugerem que esta ligação de Pr55<sup>gag</sup> ao RNA viral *unspliced* promova rearranjos estruturais que o tornam inacessível aos ribossomas (Huthoff and Berkhout 2001) permitindo que funcione como RNA genômico e seja redirecionado para o processo de montagem (Butsch and Boris-Lawrie 2002).

Relativamente aos mRNA *multiply spliced*, encontra-se descrito que promovem a síntese das proteínas reguladoras por um processo de tradução que ocorre em ribossomas ligados a membranas, ao contrário do mRNA *unspliced* que são traduzidos em ribossomas livres, (Balvay, Lopez Lastra et al. 2007).

Após a síntese das proteínas virais inicia-se o processo de montagem dos novos viriões. Neste processo, a poliproteína Pr55<sup>gag</sup>, produzida a partir da proteína precursora Pr160<sup>GagPol</sup>, desempenha um papel fulcral (Freed 1998). A poliproteína Pr55<sup>gag</sup> é constituída pelos domínios da proteína da matriz (MA), da proteína da cápside (CA), da proteína da nucleocápside, e da proteína p6 (Turner and Summers 1999). Durante o processo de montagem, esta poliproteína migra para junto da membrana plasmática e liga-se a esta através do domínio da matriz em resultado de modificações induzidas pelo ácido mirístico na sua região N-terminal (Freed 2001). Como foi referido anteriormente a Pr55<sup>gag</sup> promove a encapsidação do RNA genómico viral. A encapsidação específica dos RNAs virais é mediada por interações entre o sinal de empacotamento e motivos do tipo *zinc finger* no domínio da nucleocápside na Pr55<sup>gag</sup> (Freed 2001).

A poliproteína Pr55<sup>gag</sup> associa-se ainda com as glicoproteínas Env (Freed 1998; Freed 2001). Estas glicoproteínas são sintetizadas sob a forma de proteína precursora gp160 (Freed and Martin 1995) que é transportada para a membrana plasmática através da via secretória que envolve o aparelho de Golgi. Durante a passagem pelo Golgi a gp160 é clivada pela protease celular furina dando origem à glicoproteína de superfície gp120 e à glicoproteína transmembranar gp41. Após a clivagem a gp41 fica ancorada no complexo Env na membrana e associa-se não-covalentemente com a gp120. Os complexos glicoproteicos Env que chegam à membrana celular são rapidamente incorporados nas novas partículas virais através da interacção entre a porção

citoplasmática da gp41 e o domínio da matriz na proteína Gag (Freed 1998; Freed 2001).

Durante a montagem, a porção N-terminal do domínio da cápside liga-se à proteína celular ciclofilina A que é empacotada nos novos viriões (Luban, Bossolt et al. 1993; Franke, Yuan et al. 1994). Pensa-se que a ciclofilina A funcione como uma chaperona impedindo a agregação das proteínas da cápside (Grattinger, Hohenberg et al. 1999). Este complexo será posteriormente rodeado pela membrana plasmática projectando-se para o exterior por um processo de gemulação, dando origem ao invólucro viral (Freed 1998) e acabando por se libertar da célula sob a forma de partícula viral imatura.

Foram identificadas sequências específicas na proteína p6 denominadas domínios L (*late domains*) que promovem a libertação das partículas virais (Gottlinger, Dorfman et al. 1991; Huang, Orenstein et al. 1995). Estes domínios interagem com factores do hospedeiro e parecem funcionar através de um processo de ubiquitinização (Vogt 2000). Após a libertação das partículas virais, estas vão ainda ser sujeitas a um processo de maturação que é essencial para a formação de viriões infecciosos. Neste processo a protease viral processa os precursores poliproteicos Gag e Gag-Pol dando origem às proteína da matriz p17, cápside p24, da nucleocápside p7 e à proteína p6 (Freed 1998). Os produtos desta clivagem vão depois passar por um processo de rearranjos estruturais nos quais a proteína da cápside forma uma estrutura cónica que envolve o complexo RNA/proteína na nucleocápside (Freed 2001).

### ***3.3 Latência viral***

A introdução da terapêutica anti-retroviral altamente eficaz (HAART) na prática clínica e a constatação de que este tipo de combinação terapêutica permite diminuir a virêmia para valores indetectáveis na maioria dos doentes veio levantar a possibilidade de erradicação do vírus nos indivíduos infectados pelo HIV (ver ponto 8 deste capítulo). No entanto, essa erradicação não tem sido possível devido fundamentalmente à persistência do vírus num estado de latência, em células infectadas com um longo tempo de vida.

A latência viral é caracterizada pela inexistência de expressão genética a partir do DNA proviral. Essa latência pode gerar-se antes da integração (latência pré-integracional) ou depois desta integração (latência pós-integracional) (Colin and Van Lint 2009). Entre os mecanismos que têm sido propostos para a geração de uma latência pré-integracional encontram-se a baixa actividade da RT, baixos níveis de dNTPs, a hipermutação do DNA induzida pelo factor de restrição APOBEC3, e a impossibilidade de importação nuclear do complexo de pré-integração (Bukrinsky, Sharova et al. 1992; Zack, Haislip et al. 1992; Korin and Zack 1999; Chiu, Soros et al. 2005). Esta forma de latência é frequentemente observada em células T CD4 com DNA viral não integrado (Zack, Arrigo et al. 1990), mas é discutível qual a sua relevância do ponto de vista clínico dado que estas células parecem ter tempos de vida curtos (cerca de 1 dia) não parecendo ser as principais responsáveis pela latência de longa duração que se observa durante a terapêutica (Zhou, Zhang et al. 2005). No entanto, outros estudos descreveram esta forma de latência na população de monócitos-macrófagos, podendo esta população celular contribuir para a formação de reservatórios com maior tempo de vida e de maior dimensão. A população de macrófagos pode apresentar grandes quantidades de DNA



proviral não integrado na forma circular (Pang, Koyanagi et al. 1990; Gillim-Ross, Cara et al. 2005), que pode permanecer estável durante mais de dois meses em células que não entram em divisão celular (Gillim-Ross, Cara et al. 2005). Pensa-se que nestes macrófagos infectados possa ocorrer transcrição viral persistente a partir do DNA proviral não integrado e que os produtos virais produzidos, em conjunto com factores inflamatórios libertados por esta população celular, tenham um impacto importante na patogénese associada à infecção pelo HIV (Kelly, Beddall et al. 2008).

Na latência pós-integracional ocorre a transcrição reversa e a integração do genoma viral mas a expressão genética viral encontra-se inibida. Vários factores podem contribuir para este estado de latência (Colin and Van Lint 2009). Tem sido mostrado em linfócitos T activados que o tipo de locais do genoma onde ocorre a integração do DNA viral influencia os níveis de transcrição viral e que a conformação da cromatina nesses locais é um factor muito importante para a activação da transcrição viral (Jordan, Defechereux et al. 2001). Alguns estudos mostraram que a integração do DNA proviral do HIV-1 em zonas de heterocromatina pode resultar na repressão da expressão genética e no estabelecimento de um estado de latência viral. Neste caso, a estrutura da heterocromatina poderá limitar o acesso de factores de transcrição ao LTR viral impedindo uma transcrição eficiente (Jordan, Defechereux et al. 2001; Jordan, Bisgrove et al. 2003; Lewinski, Bisgrove et al. 2005). Este mecanismo poderá contribuir para o estabelecimento de latência nos indivíduos infectados pelo HIV-2 tendo sido descrito que uma maior proporção de doentes infectados pelo HIV-2 apresenta DNA proviral integrado em zonas de heterocromatina em comparação com a proporção de doentes infectados pelo HIV-1 em que isso se verifica (MacNeil, Sankale et al. 2006). Apesar desta possibilidade, tem sido descrito que a integração do DNA viral do HIV-1 ocorre

preferencialmente em zonas de eucromatina, em intrões de genes transcripcionalmente activos (Katz, Gravuer et al. 1998; Schroder, Shinn et al. 2002; Han, Lassen et al. 2004). Este facto sugere a possibilidade de nas células latentemente infectadas poder ocorrer um período inicial de transcrição viral mas que mecanismos de interferência transcripcional conduzam a um estado de latência (Eszterhas, Bouhassira et al. 2002; Lassen, Han et al. 2004; Han, Lin et al. 2008; Lenasi, Contreras et al. 2008) . Pode ocorrer interferência transcripcional quando o vírus e os genes celulares se encontram em competição para factores de transcrição necessários para a actividade dos respectivos promotores. Nas células T activadas, os factores de transcrição NF-AT e NF-kB, entre outros, são recrutados para o núcleo onde têm um efeito activador da transcrição viral (Nabel and Baltimore 1987; Osborn, Kunkel et al. 1989; Kinoshita, Su et al. 1997; Qi, Koya et al. 2007). A interacção do NF-kB com os seus locais de ligação no LTR do HIV-1 tem um papel importante não só no aumento da taxa de transcrição dos genes virais como também para o alongamento transcripcional pelo recrutamento do P-TEFb. Foi descrito que níveis de NF-kB abaixo de um dado limiar levariam à integração do vírus num estado transcripcionalmente silencioso (Duverger, Jones et al. 2009), e que oscilações na expressão de NF-kB podem despoletar um estado de latência em células T CD4 (Nelson, Ihekweba et al. 2004) sugerindo que uma infecção em células pouco activadas ou mesmo em células T CD4 quiescentes poderá resultar num estado de latência viral (Swiggard, Baytop et al. 2005; Agosto, Yu et al. 2007). Para além disso o LTR do HIV-1 tem três locais de ligação para o factor de transcrição Sp-1 que é ubíquo, e locais de ligação potenciais para outros factores de transcrição. Como anteriormente referido, no caso do HIV-2, sabe-se que o LTR é significativamente maior do que no HIV-1, pode estar sujeito a *splicing* no 5'-LTR e apresenta uma estrutura

secundária complexa (Berkhout 1992; Chatterjee, Garzino-Demo et al. 1993). Para além disso, em comparação com o HIV-1, o LTR do HIV-2 tem apenas um local de ligação ao NF-kB e apresenta também diferentes elementos reguladores na região do promotor que respondem de forma diferente a vários estímulos celulares e que podem contribuir para afectar a activação da transcrição (Hannibal, Markovitz et al. 1993).

Outro factor que se encontra envolvido na regulação do estado de latência viral é a concentração de Tat. A Tat liga-se ao elemento TAR localizado na extremidade 5' dos transcritos virais nascentes recrutando a cinase do factor de alongamento P-TEFb, o qual permite o alongamento transcripcional através da hiperfosforilação da RNA polimerase II celular (Kao, Calman et al. 1987; Zhou, Halanski et al. 2000). Na presença de Tat o complexo da RNA pol II gera transcritos de tamanho completo (Marshall and Price 1995; Zhou, Chen et al. 1998), enquanto que na sua ausência, o complexo da RNA pol II ligado ao promotor do HIV-1 constitutivamente activa a síntese de pequenos transcritos de RNA que são abortivos (Kao, Calman et al. 1987; Laspia, Rice et al. 1989; Yankulov, Blau et al. 1994). Tem sido proposto que flutuações na expressão de *tat* possam estar envolvidas na indução de um estado de latência (Weinberger, Burnett et al. 2005).

Encontra-se ainda descrita a ocorrência de transferência transcricional através da expressão de microRNA (miRNA). Os miRNA são pequenas moléculas de RNA (entre 15 a 25 nucleótidos) de cadeia simples, não codificantes, que funcionam como reguladores da expressão genética e que podem actuar como mecanismos celulares intrínsecos de defesa contra vírus de RNA e DNA (Bartel 2004; Voinnet 2005; Obbard, Gordon et al. 2009). Os miRNA actuam através da sua interacção com a sequência complementar na região 3' não-traduzida dos RNA alvo, conduzindo à degradação do

mRNA e/ou inibição ao nível da tradução (Bartel 2004). Os miRNA podem ainda regular a expressão genética ao nível epigenético pela indução específica de metilações ao longo da região do promotor ou promovendo directamente a remodelação da estrutura da cromatina envolvente à zona de ligação (Obbard, Gordon et al. 2009). Foi encontrado um grupo de miRNA, expresso a níveis mais elevados especificamente em células T CD4 quiescentes, que pode inibir a tradução de várias proteínas expressas pelo HIV-1, parecendo assim desempenhar um papel importante na indução de latência (Huang, Wang et al. 2007; Ahluwalia, Khan et al. 2008).

Um outro mecanismo que também parece ser importante para a indução de um estado de latência é a oclusão do promotor viral. Neste processo, o complexo da polimerase do promotor de um gene celular que se encontra a montante do promotor do vírus integrado lê sobre o promotor viral, impedindo que este funcione como um ponto de início transcripcional (Lenasi, Contreras et al. 2008). Pode também ocorrer que duas unidades transcripcionais formadas pelo promotor de um gene celular e pelo promotor viral se encontrem orientadas de forma convergente ocorrendo uma regulação da transcrição do HIV dependente da orientação da unidade transcripcional de um gene celular (Han, Lin et al. 2008). Para além destes factores foi mostrado que em células recentemente infectadas a redução progressiva da expressão de HIV-1 pode resultar de modificações epigenéticas que afectem a compactação da cromatina e limitem desta forma a transcrição do HIV (Pearson, Kim et al. 2008; Tyagi, Pearson et al. 2010).

O estabelecimento e manutenção de um estado de latência viral permite que o vírus persista em populações celulares com tempo de vida longo, impedindo a sua erradicação, e funcionando como reservatórios competentes para replicação viral e produção de novos vírus durante o curso natural da infecção.

## 4 História natural da infecção pelo HIV

O curso normal da infecção pelo HIV pode ser dividido em três fases com características distintas: infecção primária ou fase aguda, infecção crônica e SIDA. Após a exposição ao vírus da imunodeficiência humana, cerca de metade dos indivíduos infectados desenvolve uma síndrome clínica caracterizada por sintomas idênticos aos da mononucleose infecciosa e que se pode prolongar em média por uma a três semanas (Tindall and Cooper 1991). Durante esta fase aguda da infecção, o vírus replica activamente e a produção de novos viriões provoca uma subida da virémia que pode atingir valores elevados (podem ser da ordem de  $10^8$  cópias de RNA/mL de plasma) (Kahn and Walker 1998; Forsman and Weiss 2008), ocorrendo a disseminação do vírus e o estabelecimento da infecção em vários tipos de células incluindo células dendríticas, células T CD4 e macrófagos; vários tecidos linfóides, tais como o sistema reticulo-endotelial do baço e gânglios linfáticos; e tecidos linfóides associados às mucosas intestinal e genital (Haase 2005; Wu and KewalRamani 2006). As células dendríticas desempenham um papel particularmente importante na disseminação do vírus, uma vez que fazem a sua captura e transporte para os gânglios linfáticos. Os gânglios linfáticos constituem locais preferenciais de contacto entre células dendríticas e células T, promovendo a infecção de novas células através da formação de sinapses infecciosas (Donaghy, Wilkinson et al. 2006; Wu and KewalRamani 2006; Piguet and Steinman 2007). Por outro lado, a infecção de células do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) provoca uma depleção local de células T CD4 de memória/efectoras que se mantém durante todas as fases da doença (Brenchley, Price et al. 2006; Paiardini, Frank et al. 2008). Simultaneamente, no sangue

periférico, ocorre uma descida significativa das contagens de células T CD4, assim como descidas menos marcadas do número de células T CD8 e células B (Piatak, Saag et al. 1993). No final da fase aguda verifica-se uma recuperação lenta e apenas parcial das contagens de células T CD4, enquanto que o número de células T CD8 em circulação regressam a níveis semelhantes ou superiores aos existentes antes da infecção (Tindall, Barker et al. 1988; Gaines, von Sydow et al. 1990). A quantidade de vírus em circulação estabiliza num valor que é variável de indivíduo para indivíduo (*set-point* da virémia), tendo sido verificado que os valores de virémia encontrados entre 6 a 12 meses após a detecção de anticorpos específicos contra o vírus (seroconversão) têm valor prognóstico da evolução da doença (Mellors, Kingsley et al. 1995; Mellors, Rinaldo et al. 1996). Estes valores deverão depender de vários factores, entre os quais a capacidade replicativa do vírus (Troyer, McNevin et al. 2009), a resposta imunitária celular e humoral (Aasa-Chapman, Holuigue et al. 2005; Huber, Fischer et al. 2006; Streeck and Nixon 2010), a quantidade de células alvo infectadas (Graziosi, Pantaleo et al. 1993) e a presença de características genéticas do hospedeiro com influência naqueles factores (Cohen, Kinter et al. 1997; Hogan and Hammer 2001).

Após a fase aguda, a infecção entra num período de infecção crónica geralmente assintomática. Apesar de muitas células infectadas serem destruídas pela resposta imunitária contra o vírus, outras persistem de forma estável no organismo mantendo o provirus integrado mas sem expressar proteínas virais, escapando desta forma à eliminação e dando origem aos chamados reservatórios virais (Pantaleo, Graziosi et al. 1991; Chun, Carruth et al. 1997; Blankson, Persaud et al. 2002; Alexaki, Liu et al. 2008) (ver ponto 5 deste capítulo). Apesar disso, durante esta fase é característica a existência de replicação viral persistente e a depleção progressiva de células T CD4

nomeadamente no GALT e nos gânglios linfáticos (Brenchley, Price et al. 2006; Paiardini, Frank et al. 2008) tendo um impacto importante na arquitectura destes tecidos (Pantaleo, Graziosi et al. 1993; Pantaleo, Cohen et al. 1998; Lederman and Margolis 2008). Dada a importância destes tecidos para as interações entre vários tipos de células do sistema imunitário, as alterações na sua estrutura vão dificultar progressivamente o desenvolvimento de respostas imunitárias competentes (Lederman and Margolis 2008). Ao mesmo tempo que ocorrem estas alterações ao nível dos tecidos linfóides, é também característico um decréscimo progressivo do número de células T CD4 em circulação, sendo este valor considerado um importante marcador clínico de progressão da infecção pelo HIV (Forsman and Weiss 2008).

Na ausência de terapêutica anti-retroviral, a fase crónica tem uma duração média de cerca de 9 anos nos doentes infectados pelo HIV-1 (Forsman and Weiss 2008). Existem no entanto grupos de doentes em que a esta fase decorre mais rapidamente, podendo durar apenas 2 anos, durante a qual se verifica um ritmo de perda de linfócitos T CD4 acelerado, denominados *Rapid Progressors* (RP) (Phair 1994; Anzala, Nagelkerke et al. 1995), e outros em que decore de uma forma mais lenta, nos quais o número de linfócitos T CD4 em circulação se mantém estável (superior a 500 células/ $\mu$ l, na maioria dos estudos) durante períodos superiores a cerca de 8 anos, sendo denominados de *Long Term Non-Progressors* (LTNP) (Pantaleo, Menzo et al. 1995; Easterbrook 1999; Grabar, Selinger-Leneman et al. 2009). Os LTNP têm constituído um importante grupo para o estudo dos factores associados ao controlo do ritmo de progressão da doença tais como factores genéticos (Fellay, Shianna et al. 2010), eficiência da resposta imunitária humoral (Cao, Qin et al. 1995) e celular (Rinaldo, Huang et al. 1995; Martinez, Costagliola et al. 2005) e a presença de factores antivirais solúveis (Chun, Justement et

al. 2001). No entanto, este grupo de doentes infectados pelo HIV-1 parece ser bastante heterogéneo no que respeita aqueles factores (Strathdee, Veugelers et al. 1996; Lefrere, Morand-Joubert et al. 1997) e na capacidade de controlar a virémia (Barker, Mackewicz et al. 1998).

Existe igualmente variabilidade na capacidade de controlo da replicação viral. A definição dos grupos de doentes com melhor capacidade para controlar a replicação viral varia na literatura devido a diferenças de critérios entre os vários estudos. Dependendo do grau de controlo da replicação viral estes doentes têm sido classificados como *Viremic controllers* quando os níveis de virémia se encontram consistentemente entre 50 a 2000 cópias/ml (Okulicz, Marconi et al. 2009), e *HIV controllers* (Lambotte, Boufassa et al. 2005; Saez-Cirion, Pancino et al. 2007) ou *HIV elite controllers* quando a virémia se mantém indetectável, correspondendo estes doentes a menos de 1% dos doentes infectados pelo HIV-1 (Deeks and Walker 2007; Okulicz, Marconi et al. 2009). Tem sido constatado que o risco de progressão da doença é significativamente mais baixo nestes doentes (Grabar, Selinger-Leneman et al. 2009). Apesar do aparente controlo da progressão da doença, uma grande maioria destes indivíduos parece estar infectada com um vírus com capacidade replicativa (Blankson 2010) indicando que factores do hospedeiro podem desempenhar um papel importante no controlo da virémia.

Nos doentes infectados pelo HIV-2, os sinais e sintomas clínicos associados à infecção são geralmente idênticos aos observados na infecção pelo HIV-1, no entanto, na grande maioria dos casos, a fase crónica da doença é mais prolongada que nos doentes infectados pelo HIV-1 (Marlink, Kanki et al. 1994; Whittle, Morris et al. 1994; Poulsen, Aaby et al. 1997), tendo sido estimado num estudo prospectivo realizado em França que



a perda anual de linfócitos T CD4 é em média de 9 células/  $\mu\text{l}$  nos doentes infectados pelo HIV-2 em comparação com 49 células/  $\mu\text{l}$  nos infectados pelo HIV-1 (Drylewicz, Matheron et al. 2008). Os níveis de vírus em circulação são também bastante diferentes dos descritos na infecção pelo HIV-1. Na grande maioria dos doentes infectados pelo HIV-2 os valores de virémia são significativamente mais baixos do que nos doentes infectados pelo HIV-1, em todas as fases da infecção (Simon, Matheron et al. 1993; Berry, Ariyoshi et al. 1998; Popper, Sarr et al. 1999; Andersson, Norrgren et al. 2000; Soriano, Gomes et al. 2000).

Na maioria dos doentes infectados pelo HIV, o número de células T CD4 em circulação diminui continuamente ao longo da fase crónica. Quando as contagens de linfócitos T CD4 em circulação atingem valores baixos (geralmente inferiores a 200 células/ $\mu\text{L}$ ), inicia-se uma fase da doença denominada de SIDA, que se caracteriza pela incapacidade do doente desenvolver respostas imunitárias adequadas contra um número crescente de microrganismos e neoplasias. Em simultâneo ocorre um aumento dos níveis de replicação viral que se traduz em valores de virémia geralmente mais elevados do que os detectados durante a fase crónica da infecção (Figura 4).

Os actuais critérios definidores de SIDA baseiam-se em contagens de linfócitos T CD4 inferiores a 200 células/ $\mu\text{L}$  ou uma frequência daquelas células na população de linfócitos totais inferior a 14%, e/ou o diagnóstico clínico de infecções oportunistas e tumores definidoras de imunodeficiência grave que se encontram listadas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Schneider, Whitmore et al. 2008). Na ausência de terapêutica anti-retroviral, um diagnóstico de SIDA geralmente à morte dos doentes infectados pelo HIV num período de cerca de 2 anos na infecção pelo HIV-1.

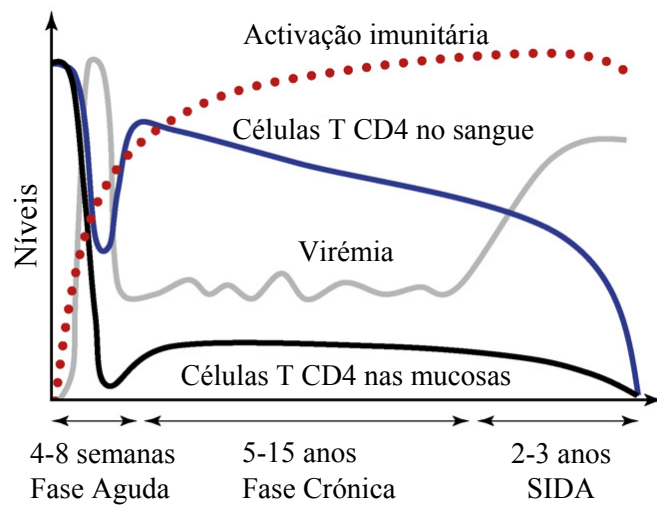


Figura 4: História natural da infecção pelo HIV1 (Adaptado de Forsman *et al*, 2008)

No caso da infecção pelo HIV-2, encontra-se descrito que aquela infecção pode igualmente causar SIDA (Brun-Vezinet, Rey et al. 1987; Clavel, Mansinho et al. 1987; Marlink, Ricard et al. 1988; Poulsen, Kvinesdal et al. 1989; Le Guenno, Barabe et al. 1991; Norrgren, Da Silva et al. 1998), no entanto, dado que o ritmo de progressão para SIDA ocorre mais lentamente, os indivíduos infectados pelo HIV-2 apresentam geralmente uma maior taxa de sobrevivência em comparação com os doentes infectados pelo HIV-1 (Ancelle, Bletry et al. 1987; Whittle, Egboga et al. 1992; Markovitz 1993; Marlink, Kanki et al. 1994; Whittle, Morris et al. 1994; Poulsen, Aaby et al. 1997; Rowland-Jones and Whittle 2007; de Silva, Cotten et al. 2008).

## 5 Reservatórios e santuários

Um reservatório viral pode ser definido como um tipo de células ou um compartimento anatómico no qual o vírus com capacidade replicativa persiste de uma forma mais estável do que nas principais populações celulares onde normalmente replica (Blankson,

Persaud et al. 2002). A existência de reservatórios tornou-se evidente após a introdução da terapêutica anti-retroviral altamente activa (Chun, Stuyver et al. 1997; Finzi, Hermankova et al. 1997; Wong, Hezareh et al. 1997). Apesar de este tipo de terapêutica permitir, na maioria dos doentes tratados, a redução da virémia para valores abaixo do limite de detecção dos testes em uso (Cavert, Notermans et al. 1997; Gulick, Mellors et al. 1997; Perelson, Essunger et al. 1997), a suspensão da terapêutica em doentes com virémias indetectáveis durante vários anos conduz invariavelmente a um restabelecimento da replicação viral, provocando uma subida dos níveis de virémia para valores semelhantes aos anteriores ao início da terapêutica (Harrigan, Whaley et al. 1999; Zhang, Chung et al. 2000). Por outro lado, recorrendo a métodos quantitativos com grande sensibilidade, verificou-se que é possível detectar uma virémia residual nos doentes tratados (Dornadula, Zhang et al. 1999). Estes estudos sugerem que as terapêuticas actuais não permitem eliminar completamente as células infectadas pelo HIV e revelam a existência de reservatórios de longa duração para o HIV (Chun, Stuyver et al. 1997; Finzi, Hermankova et al. 1997; Wong, Hezareh et al. 1997).

A primeira população celular identificada como potencial reservatório foi a população de células T CD4 quiescentes (Chun, Finzi et al. 1995; Chun, Carruth et al. 1997; Finzi, Hermankova et al. 1997; Perelson, Essunger et al. 1997; Wong, Hezareh et al. 1997). A formação de um reservatório viral nesta população ocorre logo na infecção primária (Finzi, Hermankova et al. 1997; Chun, Engel et al. 1998; Strain, Gunthard et al. 2003). Aparentemente este reservatório é composto por um número reduzido de células infectadas ( $1-10 \times 10^6$  células) (Chun, Carruth et al. 1997). A população de células T CD4 quiescentes é formada por células naive e de memória. A infecção e estabelecimento de latência em células T naive pode ocorrer durante a timopoiese, processo durante o qual

os timócitos imaturos encontram-se num estado transcricionalmente activo e expressam simultaneamente o receptor CD4 e o receptor CD8 (CD4+CD8+), para além dos co-receptores necessários para infecção destas células pelo HIV (Kitchen and Zack 1997; Berkowitz, Beckerman et al. 1998; Pedroza-Martins, Gurney et al. 1998). Nesta fase é possível que algumas células CD4+CD8+ infectadas sobrevivam ao processo de diferenciação originando células T CD4 e T CD8 latentemente infectadas (Livingstone, Moore et al. 1996; Brooks, Kitchen et al. 2001). A infecção de células T CD4 naive é difícil na periferia dado que a infecção pelo HIV é geralmente iniciada por variantes que utilizam o CCR5 e essas células não expressam esse co-receptor (Pierson, Hoffman et al. 2000) ou expressam-no a um nível muito baixo (Chanel, Staropoli et al. 2002). Desta forma, a infecção de células T CD4 naive não parece ter um impacto significativo na formação do reservatório de longa duração que é característico da infecção pelo HIV. Em comparação, tem sido demonstrada a presença de um reservatório viral latente em células T CD4 de memória (Chun, Carruth et al. 1997). Pensa-se que o estabelecimento de latência nestas células ocorre em células activadas que estão num processo de transição para um estado quiescente (Persaud, Zhou et al. 2003). Foi recentemente mostrada a existência de duas sub-populações de células de memória que se pensa funcionarem como principais reservatórios para o HIV: as células Tcm (*central memory*) e as células Ttm (*transitional memory*) que se mantêm por sobrevivência celular e proliferação a muito baixo nível podendo persistir durante décadas através de mecanismos provavelmente dependentes da IL-7 (Chomont, El-Far et al. 2009).

As células T CD8 também têm sido sugeridas como um potencial reservatório viral, apesar de não estar completamente esclarecida a sua importância relativa neste processo (Tsubota, Ringler et al. 1989; Potter, Dwyer et al. 2003; Gulzar, Diker et al. 2008).

Como referido acima, é possível que as células T CD8 sejam infectadas durante a sua maturação no timo, na fase em que expressam simultaneamente os receptores CD4 e CD8 (Brooks, Kitchen et al. 2001). Também é possível que estas células sejam infectadas através do contacto directo com células infectadas (Demaria, Pantaleo et al. 1991; Demaria, Colombini et al. 1994) ou através da expressão do receptor CD4, embora em baixos níveis, após a sua activação durante a resposta imunitária (Imlach, McBreen et al. 2001; Sullivan, Landay et al. 2001; Cochrane, Imlach et al. 2004).

Têm sido descritas várias populações celulares que podem funcionar como reservatórios virais e que podem ser responsáveis pela disseminação do vírus por compartimentos anatómicos privilegiados, por isso chamados de santuários virais, onde ocorrem condições propícias à replicação viral e infecção de novas células e onde a detecção e eliminação pelo sistema imunitário se encontra dificultada. Entre essas populações celulares encontram-se os monócitos no sangue periférico (Zhu, Muthui et al. 2002), as células dendríticas e macrófagos nos órgãos linfóides (Keele, Tazi et al. 2008; Coleman and Wu 2009), as células estaminais hematopoiéticas na medula óssea (Zhu, Muthui et al. 2002; Bailey, Sedaghat et al. 2006; Alexaki, Liu et al. 2008; Alexaki and Wigdahl 2008) a micróglia no sistema nervoso central (Williams and Hickey 2002), e vários tipos de células nos tecidos genitais, incluindo células T CD4 e macrófagos (Paranjpe, Craigo et al. 2002).

A população de células da linhagem monocitos-macrófagos tem sido referida como um potencial reservatório e uma importante fonte de viriões (Chun, Davey et al. 2000; Zhu, Muthui et al. 2002).

Apenas uma pequena proporção de monócitos do sangue periférico (0,001% - 1%) parece estar infectada, independentemente da fase da infecção (Orenstein, Fox et al.

1997; Kedzierska and Crowe 2002). No entanto, os monócitos do sangue periférico migram para vários tecidos onde se diferenciam em macrófagos e têm sido descritos como responsáveis pela disseminação do HIV em santuários tais como o cérebro (Lambotte, Taoufik et al. 2000; Aquaro, Calio et al. 2002; Zhu, Muthui et al. 2002; Crowe, Zhu et al. 2003), e em compartimentos anatómicos tais como o trato gastrointestinal, onde após a diferenciação em macrófagos formam um reservatório viral (Veazey, DeMaria et al. 1998; Smith, Meng et al. 2003). Pensa-se que durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos ocorram processos que facilitem a infecção das células e que promovam um aumento da actividade replicativa do HIV (Kalter, Nakamura et al. 1991; Rich, Chen et al. 1992; Schrier, McCutchan et al. 1993; Orenstein, Fox et al. 1997; Sharova, Swingler et al. 2005). Entre estes encontram-se a modificação da expressão de CCR5 (Di Marzio, Tse et al. 1998; Naif, Li et al. 1998), de moléculas que funcionam como factores de restrição da replicação viral como o APOBEC3G e 3F (Chiu, Soros et al. 2005) e de miRNA celulares (Wang, Ye et al. 2009). Estes mecanismos contribuem para que os macrófagos sejam um importante alvo celular para o HIV. A infecção destas células pelo HIV-1 geralmente não resulta em lise das células ao contrário do que acontece com as células T CD4, provavelmente devido à sua maior resistência aos efeitos citopáticos e por serem mais resistentes à apoptose em comparação com as células T CD4, podendo produzir e manter o vírus durante longos períodos (Ho, Rota et al. 1986; Nicholson, Cross et al. 1986). No entanto, ainda não está clarificado qual o papel que estas células desempenham na latência viral (Collman, Hassan et al. 1989; Coleman and Wu 2009). Nos doentes tratados, apenas um número residual de macrófagos foi estimado como permanecendo infectado (cerca de 0,005%), no entanto, a replicação viral é activada nestas células em resposta a infecções

oportunistas o que sugere um papel como reservatórios para o HIV (Orenstein, Fox et al. 1997; Caselli, Galvan et al. 2005). Por outro lado é possível que os macrófagos dos tecidos, tais como as células da microglia no cérebro, quando infectados, produzam vírus durante todo o seu período de vida (Williams, Corey et al. 2001). A infecção latente dos macrófagos residentes do sistema nervoso central e a replicação viral persistente nestas células parece ter um papel importante na patogênese da demência associada à infecção pelo HIV (Williams and Hickey 2002).

As células dendríticas são consideradas muito importantes para o estabelecimento da infecção pelo HIV uma vez que são uma das primeiras populações celulares a entrar em contacto com o vírus. Após a captura do vírus no local de entrada, migram para os tecidos linfóides secundários, onde promovem a disseminação da infecção nestes tecidos e transmissão do HIV a células T CD4 (Smed-Sorensen, Lore et al. 2005).

Nas áreas foliculares dos tecidos linfóides encontra-se um outro tipo de células, as células foliculares dendríticas, que parecem desempenhar um papel importante na retenção e disseminação do vírus após a infecção destes tecidos (Burton, Keele et al. 2002). Pensa-se que nos tecidos linfóides secundários as células foliculares dendríticas funcionem como um dos principais reservatórios para o HIV (Pantaleo, Graziosi et al. 1991), podendo aprisionar o vírus na superfície das células através da formação de imunocomplexos constituídos por anticorpos específicos e/ou proteínas do complemento (Smith, Gartner et al. 2001; Burton, Keele et al. 2002). As células foliculares dendríticas podem também ser infectadas e manter um estado de replicação viral reduzida desempenhando, também desta forma, um papel potencial na latência e/ou replicação persistente nestes tecidos (Drosten, Muller-Kunert et al. 2005).

As células precursoras hematopoiéticas têm também sido propostas como reservatórios

do HIV dado que a subpopulação de células hematopoiéticas CD34+ expressa CD4 e CCR5 e/ou CXCR4 e são desta forma susceptíveis à infecção pelo HIV (Stanley, Kessler et al. 1992; Slobod, Bennett et al. 1996).

## **6 Activação Imunológica na patogénese da infecção por HIV**

Um estado de hiper-activação imunológica é característico das infecções por HIV-1 e HIV-2 (Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2002; Sousa, Carneiro et al. 2002; Appay and Sauce 2008). Reconheceu-se desde cedo no estudo da infecção HIV que a activação imunológica é um factor determinante para a imunodeficiência característica desta infecção (Ascher and Sheppard 1988) sendo hoje consensual o seu papel fulcral na patogénese da SIDA. Esta activação imunitária caracteriza-se, por um aumento da expressão de marcadores típicos de um fenótipo activado em células T CD4 e T CD8, B, NK e monócitos; elevados níveis de citocinas proinflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ; de quimiocinas tais como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (Appay and Sauce 2008); da presença de hipergamaglobulinemia como resultado de uma activação policlonal de células B (Moir and Fauci 2008), um aumento do número de células T em ciclo celular, hiperplasia dos gânglios linfáticos (Lederman and Margolis 2008) e aumento dos níveis de marcadores séricos de activação tais como  $\beta$ 2-microglobulina e neopterin (Fuchs, Jager et al. 1990; Boasso and Shearer 2008).

Verifica-se que os elevados níveis de activação encontrados nos indivíduos infectados se correlacionam melhor com o ritmo de perda de linfócitos T CD4 do que o nível de vírus em circulação (Liu, Cumberland et al. 1997; Giorgi, Hultin et al. 1999; Giorgi, Lyles et al. 2002; Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2002; Sousa, Carneiro et al. 2002;



Deeks, Kitchen et al. 2004). Na infecção pelo HIV-2, esta associação é particularmente evidente dado que têm sido documentados níveis semelhantes de activação imunológica, relativamente aos encontrados nos indivíduos infectados pelo HIV-1 com o mesmo grau de depleção de células T CD4, apesar dos níveis de vírus em circulação serem significativamente mais baixos nos indivíduos infectados pelo HIV-2 (Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2002; Sousa, Carneiro et al. 2002). Uma evidência indirecta para o papel fulcral da activação imunitária na patogénese da SIDA é encontrada nos estudos da infecção SIV em hospedeiros naturais, nos quais se verifica que os elevados níveis de replicação viral não são suficientes para induzir a progressão para SIDA na ausência de elevados níveis de activação imunitária (Chakrabarti, Lewin et al. 2000; Broussard, Staprans et al. 2001; Silvestri, Sodora et al. 2003; Silvestri, Fedanov et al. 2005; Sumpter, Dunham et al. 2007).

Não estão completamente esclarecidas as causas da activação imunológica associada à infecção HIV. Parte dos factores que podem potencialmente contribuir para a activação imunológica crónica e generalizada que se observa durante a infecção pelo HIV relacionam-se com a acção directa do próprio vírus. Alguns estudos têm mostrado que as glicoproteínas do invólucro podem influenciar directamente os níveis de activação imunológica. No caso do HIV-1, a ligação das proteínas gp120/gp160 ao receptor CD4 e/ou ao CCR5 resulta na activação de processos de sinalização intracelular (Sailaja, Skountzou et al. 2007). Por outro lado, foi mostrado que a gp105 do HIV-2 pode modular a activação de células T num mecanismo dependente do contacto entre células T e monócitos, envolvendo provavelmente a via de sinalização de TLR4 (Cavaleiro, Brunn et al. 2007). A produção de proteínas virais pode também induzir activação celular, como é o caso da proteína Nef que pode induzir essa activação de uma forma

directa (Wang, Kiyokawa et al. 2000; Simmons, Aluvihare et al. 2001) ou indirectamente através da indução da produção de quimiocinas por macrófagos infectados (Swingler, Mann et al. 1999). Estudos indicam também que após o início da terapêutica anti-retroviral, com a redução acentuada da virémia para níveis indetectáveis na maioria dos doentes, se verifica frequentemente uma diminuição dos níveis de activação imunitária (Franco, Rubio et al. 1999; Amirayan-Chevillard, Tissot-Dupont et al. 2000; Almeida, Price et al. 2002). Por outro lado, a presença de virémia residual em doentes tratados encontra-se associada a um aumento dos níveis de activação imunitária (Ostrowski, Katzenstein et al. 2008; Mavigner, Delobel et al. 2009), sugerindo uma associação entre os níveis de replicação viral e os níveis de activação imunitária. No entanto, a replicação viral não parece, por si só, ser suficiente para justificar os elevados níveis de activação que se observam durante a infecção pelo HIV (Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2002; Sousa, Carneiro et al. 2002; Appay and Sauce 2008; Sodora and Silvestri 2008).

Durante a infecção HIV verificam-se também elevados níveis de proliferação celular e de *turnover* das células T que podem ser resultado de proliferação homeostática em resposta à perda de células induzida pelo vírus, ou em alternativa, proliferação em resposta à estimulação antigénica e outros estímulos pró-inflamatórios (Grossman, Min et al. 2004).

A resposta imunitária contra o HIV pode contribuir também para os níveis de activação imunitária. Esta resposta inicia-se provavelmente ao nível da imunidade inata, particularmente envolvendo as células dendríticas mieloides e plasmocitoides, e estimulação por via dos TLR, (Fonteneau, Larsson et al. 2004; Beignon, McKenna et al. 2005; Mandl, Barry et al. 2008) resultando na posterior activação da resposta imunitária

específica (humoral e celular). As respostas adaptativas específicas contra o vírus, principalmente a resposta das células T citotóxicas específicas para o HIV, suprimem a replicação viral mas contribuem igualmente para o aumento da activação imunitária crónica (Kottlilil, Gamberg et al. 2000).

Para além destes mecanismos, estudos recentes têm mostrado que a infecção pelo HIV encontra-se associada a uma progressiva depleção das células T CD4 ao nível da lâmina própria da mucosa do trato gastrointestinal (Brenchley, Schacker et al. 2004), resultando numa perda de integridade da barreira intestinal. Esta perda de integridade da mucosa permite que ocorra uma maior translocação microbiana e a entrada de antigénios microbianos para a circulação sanguínea, tendo este processo sido associado a elevados níveis de activação imunitária (Brenchley, Price et al. 2006; Gordon, Cervasi et al. 2010). Os factores que contribuem para as alterações da mucosa e o aumento da translocação microbiana ainda não foram totalmente esclarecidos mas podem estar relacionados com vários factores que incluem a perda ou desregulação de células Th17, células NK, neutrófilos, o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório, e o aumento da apoptose das células epiteliais (Mela, Steel et al. 2007; Nilsson, Kinloch-de-Loes et al. 2007; Schulbin, Bode et al. 2008; Dandekar, George et al. 2010). A translocação de antigénios microbianos tais como o lipopolissacárido bacteriano (LPS) (Brenchley, Price et al. 2006) e DNA bacteriano (Jiang, Lederman et al. 2009) do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, podem activar o sistema imunitário através da ligação a vários TLR (ex. TLR-2, 4, 5 e 6) (Tesselaar, Arens et al. 2003; Brenchley, Price et al. 2006). Esta activação dos mecanismos de imunidade inata provoca um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em circulação conduzindo a um estado pró-inflamatório que promove a activação das células T.

Outros agentes patogénicos, mesmo antes das fases tardias da doença e da ocorrência de infecções oportunistas com expressão clínica, também contribuirão para os níveis de activação imunitária verificados durante a infecção por HIV (Lawn, Butera et al. 2001; Bafica, Scanga et al. 2004; Borkow and Bentwich 2006).

A activação crónica do sistema imunitário contribui para a imunodeficiência a vários níveis. Dado que o HIV replica mais eficientemente em linfócitos T CD4 activados (Cullen and Greene 1989), a activação crónica do sistema imunitário parece ser importante para manter a replicação viral ao tornar as células competentes para a replicação viral. A activação, a infecção e a morte preferencial de linfócitos T CD4 específicos para o HIV (Douek, Brenchley et al. 2002) terá também um papel importante dado que resulta na perda de ajuda dos linfócitos T CD4 específicos para o HIV, contribuindo potencialmente para a exaustão e perda das respostas citotóxicas contra o vírus mediadas pelos linfócitos T CD8. Outra consequência da activação crónica é a expansão das células T CD4 e CD8 efectoras activadas (Hazenbergh, Hamann et al. 2000; Grossman, Meier-Schellersheim et al. 2002; Silvestri and Feinberg 2003). Esta expansão das células T CD4 efectoras pode ocorrer por diferenciação das populações de células naive e de memória. Uma perda progressiva destas células pode resultar numa capacidade mais reduzida de gerar respostas primárias e secundárias contra antígenos. A activação crónica do sistema imunitário também parece estar envolvida numa senescência precoce das populações de células T, principalmente ao nível das células T CD4 de memória centrais (Okoye, Meier-Schellersheim et al. 2007). Por outro lado, a expansão das células T CD4 efectoras é acompanhada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-apoptóticas que contribuem para manter a activação generalizada do sistema imunitário. O ambiente pró-inflamatório tem também efeitos

supressores a vários níveis, interferindo com a função de vários tipos de células do sistema imunitário tais como células B, NK, células T  $\gamma\delta$ , células dendríticas e monócitos (Lane, Masur et al. 1983; Martinez-Maza, Crabb et al. 1987; Braun, Kessler et al. 1988; Crowe and Kornbluth 1994; Poccia, Boullier et al. 1996) podendo comprometer igualmente a capacidade regenerativa do sistema imunitário ao nível da medula óssea, timo, e gânglios linfáticos (Haynes, Hale et al. 1999). Parte desta activação dos linfócitos T e B é não antígeno-específica sendo causada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (ex TNF- $\alpha$ , IL-1 entre outras), particularmente por células que participam na resposta imunitária inata.

Os mecanismos de activação levam a um aumento de expressão de moléculas envolvidas na apoptose (CD95, TRAIL, DR4/5) na superfície das células T, tornando-as mais susceptíveis à morte celular induzida pela activação (Estaquier, Idziorek et al. 1994; Katsikis, Wunderlich et al. 1995; Muro-Cacho, Pantaleo et al. 1995; Gougeon, Lecoœur et al. 1996; Badley, Pilon et al. 2000; Herbeuval, Hardy et al. 2005).

Dada a associação clara entre um estado de hiper-activação crónica do sistema imunitário e a progressão da doença, tem sido dada crescente atenção aos mecanismos que podem contribuir para o controlo desse estado de hiper-activação, como é o caso da acção das células T CD4 reguladoras (Treg). Esta população celular tem um papel importante na homeostasia dos linfócitos T e no controlo da imunopatologia associada às respostas imunitárias (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Shevach 2009). O contributo relativo desta população celular na infecção pelo HIV não está completamente clarificado, no entanto poderá desempenhar um duplo papel, contribuindo por um lado para o controlo da activação imunitária associada à progressão da doença, e por outro para limitar a resposta imunitária específica contra o

vírus, dificultando o controlo da replicação viral (Boasso, Vaccari et al. 2006; Fazekas and Landay 2008; Holmes, Jiang et al. 2008).

## **7 Mecanismos de controlo da replicação na infecção por HIV**

### ***7.1 Mecanismos celulares intrínsecos de resistência.***

Têm sido identificados recentemente um conjunto de factores que podem conferir resistência intracelular à infecção ao interferir com vários passos da replicação viral sendo denominados de um modo geral como factores de restrição. Entre esses factores encontram-se a APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , ciclofilina A, BST-2, e miRNA celulares (Neil and Bieniasz 2009; Strebel, Luban et al. 2009; Kirchhoff 2010).

As APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme 3) são proteínas celulares que fazem parte da família de desaminases da citidina e têm sido reconhecidas como tendo actividade antiviral bastante abrangente, fazendo parte do sistema de imunidade intrínseca celular envolvido no controlo da replicação de vários vírus incluindo HPV (Vartanian, Guetard et al. 2008), HBV (Cullen 2006; Vartanian, Henry et al. 2010) e de retrovirus (Harris and Liddament 2004), em particular do HIV (Cowan, Hatzioannou et al. 2002; Sheehy, Gaddis et al. 2002). Das várias APOBEC descritas, a APOBEC3G é a que têm sido melhor caracterizada na sua actividade de restrição da replicação do HIV, no entanto outras APOBEC têm sido descritas nomeadamente a APOBEC3F que também parece ter actividade anti-HIV (Goila-Gaur and Strebel 2008; Ross 2009). Estas proteínas são incorporadas nas partículas virais recém-formadas através de interacções com a proteína viral Gag e com o RNA, sendo transportadas no virião até à infecção de

uma célula alvo (Alce and Popik 2004; Svarovskaia, Xu et al. 2004). Após a infecção, e durante a síntese da primeira cadeia de DNA viral, a APOBEC3G catalisa a desaminação dos resíduos de citosina, formando-se uracilo. Dado que o uracilo é reconhecido como timina pela transcriptase reversa viral, esta desaminação leva a que adenina seja incorporada na segunda cadeia de DNA em vez de guanina, o que provoca lesões pré-mutagénicas no DNA viral (Harris, Bishop et al. 2003). Apesar de haver evidência que esta actividade catalítica é importante para os efeitos antivirais atribuídos a estas proteínas (Miyagi, Opi et al. 2007; Browne, Allers et al. 2009), existem estudos que sugerem que a inibição da replicação do HIV-1 por estas enzimas também pode ocorrer de uma forma independente da actividade de desaminação (Newman, Holmes et al. 2005; Bishop, Holmes et al. 2006). A actividade das APOBEC na restrição da replicação do HIV é no entanto subvertida pela acção da proteína viral Vif (Sheehy, Gaddis et al. 2002). Vif neutraliza a actividade antiviral da APOBEC 3G através da indução de poli-ubiquitinização e degradação mediada por proteosomas, reduzindo a sua expressão e a incorporação nos novos viriões (Sheehy, Gaddis et al. 2003; Mehle, Strack et al. 2004). A proteína Vif pode também neutralizar a actividade antiviral da APOBEC3G através de outros mecanismos independentes da degradação, tais como competição pela ligação a um sinal de empacotamento comum a Vif e APOBEC, e por indução de alterações da conformação e actividade enzimática de APOBEC (Goila-Gaur and Strebel 2008). Foi no entanto descrita recentemente um outro membro da família APOBEC, a APOBEC3B que é expressa constitutivamente a baixo nível nas células alvo do HIV (Koning, Newman et al. 2009; Refsland, Stenglein et al. 2010) mas, ao contrário do APOBEC3G, é resistente à degradação mediada pela Vif (An, Johnson et al. 2009). Relativamente à infecção pelo HIV-2, foi reportado que a APOBEC3G é menos

activa contra aquele vírus do que contra o HIV-1 (Ribeiro, Maia e Silva et al. 2005) sugerindo que outros factores deverão ter uma maior importância relativa no controlo dos níveis de replicação.

Um outro factor de restrição conhecido é o TRIM5 $\alpha$  (Tripartite motif-5 $\alpha$ ). Este factor parece exercer a sua acção antiviral numa fase inicial da infecção, após a fusão do invólucro viral com a membrana plasmática e a entrada da cápside viral (Nakayama and Shioda 2010). O mecanismo de acção envolve a ligação do TRIM5 $\alpha$  a domínios específicos da cápside viral, provocando a sua desmontagem rápida e prematura, expondo provavelmente o RNA viral ou as enzimas virais aos processos de degradação celulares (Sebastian and Luban 2005; Stremlau, Perron et al. 2006). Verificou-se que a capacidade de inibição da replicação depende da sequência proteica do TRIM5 $\alpha$  específica para cada espécie e para as sequências presentes nas cápsides retrovirais. As variantes de TRIM5-alpha presentes nas células de macacos do “velho mundo” associam-se com grande especificidade à cápside do HIV-1, levando à restrição da replicação do HIV-1 nestas espécies, enquanto que as variantes humana e dos macacos do “novo mundo” associam-se com menor eficiência à cápside deste vírus resultando numa restrição mais fraca da replicação viral (Song, Gold et al. 2005; Song, Javanbakht et al. 2005; Stremlau, Perron et al. 2006). Um estudo recente onde foram estudadas as sequências das cápsides virais em doentes infectados pelo HIV-2 com elevadas cargas virais plasmáticas em comparação com doentes que apresentavam cargas virais baixas ou indetectáveis sugeriu que variações nas sequências da cápside do HIV-2 e a consequente variabilidade na sensibilidade ao TRIM5 $\alpha$  podem estar relacionadas com os níveis de replicação viral encontrados nos doentes infectados com HIV-2 (Onyango, Leligdowicz et al. 2010). Sayah e colaboradores identificaram uma variante do gene



TRIM5 resultante de uma fusão deste com o gene da Ciclofilina (CypA) resultando na produção da proteína TRIM5 $\alpha$ -CypA (Sayah, Sokolskaja et al. 2004). Verificou-se que esta variante TRIM5 $\alpha$ -CypA apresenta maior capacidade de inibir a replicação do HIV-1, possivelmente devido a um aumento da afinidade desta proteína para as cápsides do HIV-1 (Luban, Bossolt et al. 1993; Gamble, Vajdos et al. 1996). Existem também evidências a favor da ciclofilina promover a restrição ao HIV-1 mediada pelo TRIM5 $\alpha$  actuando em trans (Berthoux, Sebastian et al. 2005; Keckesova, Ylinen et al. 2006), bem como através de outros mecanismos independente de TRIM5 $\alpha$  (Nakayama, Maegawa et al. 2006). Relativamente à infecção pelo HIV-2 foi sugerido que o vírus é mais susceptível ao TRIM5 $\alpha$  em comparação ao HIV-1 (Ylinen, Keckesova et al. 2005), podendo este mecanismo de restrição contribuir para o menor ritmo de progressão para a doença característico dos doentes infectados pelo HIV-2. Não existem no entanto estudos conclusivos sobre a interacção entre o TRIM5 $\alpha$  e a cápside viral do HIV-2.

A proteína BST-2 (*Bone marrow stromal cell antigen 2*), ou teterina, é uma proteína membrana que se localiza nos *lipid rafts* da membrana plasmática (Kupzig, Korolchuk et al. 2003; Masuyama, Kuronita et al. 2009) e de outras membranas tais como as associadas ao complexo de Golgi e endossomas (Kupzig, Korolchuk et al. 2003). A produção da proteína BST-2 é aumentada em resposta a interferões do tipo I e do tipo II e IL-6 (Blasius, Giurisato et al. 2006; Neil, Zang et al. 2008) e tem um efeito inibitório na produção daquelas moléculas e de TNF- $\alpha$  (Cao, Bover et al. 2009). Para além desta função na regulação da resposta imunitária inata, foi identificada igualmente uma acção antiviral (revisto em (Douglas, Gustin et al. 2010) ). A presença de BST-2 induz a retenção dos viriões maturados ligados à membrana plasmática, impedindo dessa forma a sua libertação das células infectadas (Neil, Zang et al. 2008). No entanto a sua

acção é inibida pela proteína viral Vpu que induz a diminuição de BST-2 associada a membrana celular, facilitando a libertação dos viriões das células infectadas (Bartee, McCormack et al. 2006; Van Damme, Goff et al. 2008).

Para além destas proteínas tem sido recentemente sugerido que os miRNA celulares poderão desempenhar um papel importante na defesa celular contra infecções virais (Yeung, Benkirane et al. 2007). No caso da infecção pelo HIV-1 têm sido descritos grupos de miRNA celulares cuja expressão se encontra aumentada e outros cuja expressão se encontra diminuída em resposta à infecção, tendo como alvos quer mRNA virais quer mRNA celulares envolvidos directa ou indirectamente na regulação da replicação viral (Yeung, Bennasser et al. 2005; Huang, Wang et al. 2007; Triboulet, Mari et al. 2007; Houzet, Yeung et al. 2008).

## **7.2 Resposta imunitária**

Para além dos mecanismos celulares intrínsecos de resistência à infecção, a infecção pelo HIV induz várias formas de resposta por parte dos componentes do sistema imunitário, sendo estas geralmente classificadas em respostas específicas e inespecíficas.

Os indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam geralmente níveis elevados de IFN do tipo I em circulação (von Sydow, Sonnerborg et al. 1991) que são induzidos ainda durante a fase aguda da infecção (Stacey, Norris et al. 2009). As células dendríticas plasmacitóides (pDC) são as principais produtoras de IFN- $\alpha$  *in vivo* (Borrow and Bhardwaj 2008) e pensa-se que esta indução possa ser mediada pela activação de moléculas do tipo “*pattern recognition receptors*” (PRR) que pertencem ao sistema de

imunidade inata tais como os TLR e os *Retinoic acid inducible gene I (RIG-I) -like receptors* (Kumagai, Takeuchi et al. 2008). O grupo dos IFN de classe I pode inibir quer as fases iniciais quer as fases tardias do ciclo de replicação viral (Meylan, Guatelli et al. 1993). Pensa-se que essa inibição possa ser mediada por um conjunto de mecanismos que incluem a diminuição da síntese proteica, a degradação de ácidos nucleicos não celulares (Stetson and Medzhitov 2006; Kumagai, Takeuchi et al. 2008) e o aumento da expressão de vários factores celulares de resistência tais como o TRIM5 $\alpha$ , APOBEC3 e Teterina (Neil and Bieniasz 2009). Para além disso encontra-se descrito que os IFN de classe I podem igualmente diminuir a infecção de vários tipos celulares e reduzir a transmissão do HIV das células dendríticas às células T CD4 (Thibault, Fromentin et al. 2009). A produção crónica de elevados níveis de IFN- $\alpha$  pode no entanto contribuir para a progressão da doença na medida em que também promove o aumento da expressão de CCR5 (Stoddart, Keir et al. 2010) e contribui para a actividade de vários tipos de células, e desta forma para elevados níveis de activação imunitária (Herbeuval and Shearer 2007; Sedaghat, German et al. 2008). No entanto, a população de pDC encontra-se diminuída quer na infecção pelo HIV-1 (Soumelis, Scott et al. 2001; Cavaleiro, Baptista et al. 2009) quer na infecção crónica pelo HIV-2 (Cavaleiro, Baptista et al. 2009), e *in vitro* a sua capacidade de produzir IFN- $\alpha$  também parece estar afectada em ambas as infecções (Hosmalin and Lebon 2006; Cavaleiro, Baptista et al. 2009).

Uma das características principais do controlo da replicação do HIV é a presença de células T CD8 específicas com elevada capacidade proliferativa (Migueles, Laborico et al. 2002). Durante a infecção primária e geralmente antes da seroconversão ocorre a activação dos linfócitos T CD8 citotóxicos ou CTLs (*Cytotoxic T Lymphocytes*). A

resposta CTL parece ser mais eficiente no controle da replicação viral do que as respostas específicas mediadas por anticorpos, tendo sido descrita uma associação inversa entre a frequência de linfócitos T CD8 específicos contra o HIV e a virémia (Ogg, Jin et al. 1998). Esta supressão da replicação viral parece ser mediada por células T CD8 com respostas específicas principalmente contra Gag (Saez-Cirion, Sinet et al. 2009; Julg, Williams et al. 2010). A inibição da replicação mediada pelos CTL pode ocorrer através de vários mecanismos, relacionados quer com a sua capacidade citolítica, quer com a produção de moléculas não citotóxicas com actividade antiviral. Entre os mecanismos que envolvem a sua capacidade citolítica e que resultam na apoptose das células infectadas encontram-se a libertação de proteases, perforina e granzima B (após o reconhecimento das moléculas de MHC classe I associadas aos péptidos virais por parte do receptor das células T) (McMichael and Rowland-Jones 2001; Migueles, Osborne et al. 2008), e a interacção do ligando da molécula Fas (FasL) na superfície dos CTL com as moléculas de Fas nas células alvo (Hadida, Vieillard et al. 1999). Entre os compostos antivirais não-citotóxicos produzidos por estas células encontram-se o IFN- $\alpha$  (Meylan, Guatelli et al. 1993), o factor antiviral solúvel das células citotóxicas (CAF) (Walker, Moody et al. 1986), e as quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (Wagner, Yang et al. 1998) que são ligandos naturais do co-receptor CCR5 e inibem a infecção dos linfócitos T CD4 pelas variantes R5 do HIV-1 (Cocchi, DeVico et al. 1995). O papel chave dos linfócitos T CD8 no controlo da replicação viral foi também evidenciado em estudos com indivíduos não progressores (*Long Term Non-Progressors* (LTNP) (Migueles, Laborico et al. 2002) e em indivíduos expostos mas não infectados, os quais apresentam frequentemente respostas CTL específicas de magnitude significativa do ponto de vista qualitativo e quantitativo, que são no entanto

transitórias (Bernard, Yannakis et al. 1999). O papel importante da resposta T CD8 no controlo da replicação viral tem sido também evidenciado em estudos com indivíduos infectados pelo HIV que mantêm a virémia baixa ou indetectável por longos períodos de tempo (HIV *controllers*). Os estudos indicam que nestes indivíduos as células T CD8 apresentam uma maior polifuncionalidade, que se traduz na sua capacidade para produzir múltiplas citocinas e quimiocinas tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, e MIP-1 $\beta$ , e na capacidade para sofrerem desgranulação após uma estimulação específica pelo HIV (Betts, Nason et al. 2006; Ferre, Hunt et al. 2009). Apesar disso, nem todos os HIV *controllers* apresentam respostas T CD8 potentes o que sugere o envolvimento de outros mecanismos de controlo.

Relativamente à infecção HIV-2, vários estudos têm salientado a ausência de diferenças significativas na magnitude das respostas das células T CD8 específicas para HIV entre as infecções pelo HIV-1 e pelo HIV-2 (Jaye, Sarge-Njie et al. 2004; Gillespie, Pinheiro et al. 2005; Leligidowicz, Yindom et al. 2007), no entanto as respostas específicas T CD8 parecem reconhecer uma gama mais alargada de proteínas virais (Zheng, Kiviat et al. 2004) e terem maior flexibilidade funcional (Lopes, Jaye et al. 2003).

Relativamente às respostas específicas mediadas por linfócitos T CD4, estas desempenham também um papel importante na resposta imunitária contra o HIV, proporcionando a ajuda necessária para a persistência de uma actividade citotóxica mediada pelas células T CD8 (Rosenberg, Billingsley et al. 1997; Gloster, Newton et al. 2004; Dyer, Zaunders et al. 2008), possivelmente permitindo a manutenção desta população através da produção de IL-2 (Younes, Yassine-Diab et al. 2003; Lichterfeld, Kaufmann et al. 2004). Existe também evidência a favor de uma actividade citotóxica directa por parte das células T CD4 específicas para o HIV que poderá ter um papel no

controlo da replicação (Norris, Moffett et al. 2004). Alguns estudos sugerem que a IL-21 poderá desempenhar um papel de mediador para esta ajuda dado que esta citocina produzida principalmente pelas células T CD4 é um indutor potente da formação de grânulos citotóxicos nas células T CD8 (Yi, Cox et al. 2010). Curiosamente, a produção desta citocina e os seus níveis séricos encontram-se diminuídos em doentes com um ritmo de progressão habitual para esta infecção mas não em HIV *controllers* (Iannello, Boulassel et al. 2010). O papel das respostas específicas mediadas por linfócitos T CD4 no controlo da replicação viral foi também evidenciado em estudos com HIV *controllers* os quais apresentam geralmente uma população de células T CD4 específicas que não apresenta sinais de exaustão imunitária, tais como a perda de polifuncionalidade e expressão aumentada de moléculas reguladoras supressoras tais como o CTLA-4 e o PD-1, que é típica nos HIV *progressors* (Deeks and Walker 2007; Kaufmann, Kavanagh et al. 2007). No caso da infecção pelo HIV-2, as respostas específicas T CD4 têm sido descritas como superiores quer em função quer em magnitude, em comparação com as encontradas na infecção HIV-1 (Duvall, Jaye et al. 2006), indicando um papel importante das respostas T *helper* no controlo da replicação viral. Foi mostrada uma associação entre fortes respostas T CD4 específicas para HIV-2 e a não-progressão (Duvall, Jaye et al. 2006). Os indivíduos infectados pelo HIV-2 apresentam também uma correlação positiva entre a frequência de células T CD4 específicas para a proteína viral Gag e os níveis de activação das células T CD4, sugerindo uma associação entre os níveis de activação imunitária e uma melhor qualidade das respostas T CD4 específicas permitindo possivelmente um melhor controlo da replicação viral na infecção HIV-2 (Foxall, Cortesao et al. 2008). Nos indivíduos infectados pelo HIV-2 foi também descrita uma melhor preservação das

respostas mediadas pelas células NK que apresentam maior capacidade para segregar citocinas quando comparada com a encontrada em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Nuvor, van der Sande et al. 2006).

As respostas humorais também parecem desempenhar um papel no controlo da replicação viral particularmente através da produção de anticorpos neutralizantes (Richman, Wrin et al. 2003; Montefiori and Mascola 2009). No caso da infecção pelo HIV-1 foram identificados anticorpos capazes de neutralizar um número substancial de isolados primários de HIV-1 do subtipo B (Trkola, Purtscher et al. 1996; Stiegler, Kunert et al. 2001; Zwick, Labrijn et al. 2001), no entanto este tipo de anticorpos parece estar presente apenas numa pequena proporção de indivíduos infectados pelo HIV-1 (Binley, Lybarger et al. 2008). Para além disso, na maioria dos casos, o vírus tem a capacidade de subverter este tipo de resposta, nomeadamente através da sucessiva emergência de variantes virais com epítomos para os quais ainda não foi desenvolvida uma resposta imunitária ou com modificações estruturais que limitam o acesso a potenciais anticorpos neutralizantes (Kwong, Doyle et al. 2002; Wei, Decker et al. 2003). Em indivíduos infectados pelo HIV-2 tem sido também descrita uma maior frequência de respostas por anticorpos neutralizantes contra vírus autólogos (Bjorling, Scarlatti et al. 1993) e heterólogos, tendo esses anticorpos uma acção mais alargada (Rodriguez, Sarr et al. 2007). Também foi mostrada a menor capacidade de escape viral à neutralização por anticorpos na infecção pelo HIV-2 em comparação com a infecção HIV-1 (Richman, Wrin et al. 2003; Shi, Brandin et al. 2005). A maior capacidade de neutralização dos anticorpos gerados contra o HIV-2 pode dever-se ao facto de existirem menos locais de glicosilação no domínio V3 da gp105 do que na região correspondente na gp120 conferindo uma maior acessibilidade a esse domínio por parte

dos anticorpos neutralizantes (Shi, Brandin et al. 2005) e/ou que esse domínio tenha uma capacidade de diversificação mais reduzida, limitando a capacidade de escape viral (Borrego, Marcelino et al. 2008). A acção de anticorpos não neutralizantes em conjunto com o complemento pode também desempenhar um papel no controlo da replicação viral, participando na eliminação de partículas virais por opsonização (Aasa-Chapman, Holuigue et al. 2005; Huber, Fischer et al. 2006; Forsman and Weiss 2008).

Apesar de os estudos sugerirem que uma resposta imunitária celular e humoral forte e polifuncional esteja relacionada com um ritmo mais lento de progressão na infecção pelo HIV-2, ainda não está completamente esclarecido se a resposta imunitária é o principal factor implicado no controlo da replicação do HIV-2 ou se este tipo de resposta aparece apenas porque a virémia é baixa ou indetectável levando a uma menor estimulação antigénica.

Têm sido identificados vários factores genéticos do hospedeiro que se encontram associados a uma melhor resposta imunitária contra a infecção. O controlo da replicação do HIV parece apresentar uma forte associação genética com os alelos HLA B\*5701 e B\*5703 do MHC classe I, em indivíduos caucasóides e africanos respectivamente (Pelak, Goldstein et al. 2010). Os loci do HLA classe I e do CCR5 foram as únicas regiões que mostraram associações significativas com a virémia mostrando o potencial papel importante das respostas CD8 restritas à classe I no controlo da replicação do HIV (Fellay, Ge et al. 2009). O facto dos alelos do HLA classe I contribuírem desproporcionalmente para a resposta CD8 inicial durante a infecção aguda reforça o papel das células T CD8 no controlo da replicação viral (Altfeld, Kalife et al. 2006). Os efeitos protectores dos alelos do MHC classe I parecem ser também mediados pela sua interacção com os receptores KIR na superfície das células NK. A combinação de certas



moléculas do HLA classe I do grupo serológico Bw4 (que incluem os alelos B\*57), com os receptores KIR3DL1 e KIR3DS1 parece ser mais protectora contra a progressão da doença do que a presença de apenas moléculas da classe I (Carrington, Martin et al. 2008).

## **8 Terapêutica**

### ***8.1 Terapêutica na infecção HIV-1***

Até 1996 os inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleósidos (NRTI) eram a única classe de medicamentos anti-retrovirais disponível para o tratamento de pessoas infectadas pelo HIV, sendo os doentes tratados em regime de monoterapia ou duoterapia (Stolk and Luers 2004). Este tipo de tratamento resultava frequentemente no desenvolvimento de resistências aos anti-retrovirais devido a inibição pouco eficiente da replicação viral. Surgiram nessa altura duas novas classes de medicamentos anti-retrovirais: os inibidores não nucleósidos da transcriptase reversa (NNRTI) e os inibidores da protease (PI). Vários estudos mostraram que, na maioria dos doentes infectados pelo HIV-1, a administração de combinações de três ou mais anti-retrovirais permitia reduzir a virémia para valores abaixo do limite de detecção dos testes em uso durante períodos de tempo prolongados (Gulick, Mellors et al. 1997; Hammer, Squires et al. 1997; Perelson, Essunger et al. 1997; Staszewski, Morales-Ramirez et al. 1999; Services 2009). Este tipo de abordagem terapêutica ficou conhecida como terapêutica anti-retroviral altamente eficaz (HAART) e a sua implementação foi decisiva para o tratamento dos indivíduos infectados com o HIV-1 mostrando ter um impacto significativo na redução das taxas de mortalidade, na redução do ritmo de progressão

para SIDA, e na melhoria da qualidade de vida dos indivíduos com acesso ao tratamento (Gulick, Mellors et al. 1997; Hammer, Squires et al. 1997; Palella, Delaney et al. 1998; Pomerantz and Horn 2003; Walensky, Paltiel et al. 2006). Outras classes de anti-retrovirais têm sido desenvolvidas e entrado na prática clínica. Entre estas encontram-se os inibidores nucleótidos da transcriptase reversa (NtRTI) de que é exemplo o Tenofovir (Cihlar and Ray 2010); inibidores de entrada, nomeadamente inibidores da fusão da membrana plasmática com o invólucro viral que tem como alvo a gp41 (ex: Enfuvirtide), e antagonistas da ligação da gp120 ao correceptor CCR5 (ex: Maraviroc), estando em desenvolvimento outras estratégias de inibição da entrada viral como a interacção entre a gp120 e o CD4 ou o correceptor CXCR4 (McKinnell and Saag 2009; Tilton and Doms 2010). Para além da entrada, a integração viral também tem sido alvo de desenvolvimento de novos medicamentos, nomeadamente inibidores da integrase (ex: Raltegravir), estando outras moléculas em diferentes fases de ensaios clínicos (Hicks and Gulick 2009; Prada and Markowitz 2010; Schafer and Squires 2010).

O sucesso terapêutico da HAART, sugeriu inicialmente que esta abordagem terapêutica poderia permitir a erradicação do vírus, no entanto vários estudos vieram demonstrar que tal não é possível dada a persistência de reservatórios virais que não são eliminados eficazmente pelas terapêuticas actuais (Chun, Stuyver et al. 1997; Finzi, Hermankova et al. 1997; Wong, Hezareh et al. 1997). Devido a este facto, a administração da terapêutica terá que ser mantida por toda a vida (Chun, Davey et al. 1999). Por outro lado a administração continuada destas terapias durante um período de tempo prolongado está associada a um risco aumentado de efeitos secundários dos medicamentos tendo sido evidenciados aumentos na prevalência de doenças cardiovasculares, diabetes e várias formas de cancro (Florescu and Kotler 2007; Mondy

and Tebas 2007; Bedimo 2008). Para além disso, estudos com metodologias mais sensíveis para a detecção de virémia têm demonstrado a existência de replicação viral persistente, com a detecção de virémias entre 1 e 50 cópias/ml na maioria dos doentes tratados (Dornadula, Zhang et al. 1999; Fischer, Gunthard et al. 2000; Maldarelli, Palmer et al. 2007; Palmer, Maldarelli et al. 2008), mesmo quando se procede à intensificação da terapêutica anti-retroviral (Dinosa, Kim et al. 2009).

A origem desta virémia residual ainda não está completamente esclarecida, podendo resultar da activação transitória de células nos reservatórios virais que já se encontravam infectadas antes do início da terapêutica, sem que ocorram novos ciclos de infecção (Dinosa, Kim et al. 2009), ou resultar de replicação viral persistente como resultado de uma terapia sub-ótima decorrente, por exemplo, de uma baixa aderência à terapêutica ou a problemas com a absorção ou metabolismo destes medicamentos (Little, Holte et al. 2002; Pomerantz and Horn 2003). A supressão incompleta da replicação associada à taxa de erro elevada do processo de transcrição reversa (Preston, Poiesz et al. 1988; Roberts, Bebenek et al. 1988) facilita o aparecimento de mutações pontuais em qualquer parte do genoma viral (Coffin 1995) podendo levar à emergência de vírus com mutações de resistência e com capacidade de evasão às respostas imunitárias específicas. O desenvolvimento de resistências tem sido o maior obstáculo ao tratamento da infecção pelo HIV limitando quer a magnitude quer a duração da resposta ao tratamento (Little, Holte et al. 2002).

Dada a persistência de reservatórios virais com capacidade replicativa que não são eficazmente eliminados pelas terapêuticas actuais, várias estratégias complementares da HAART têm sido propostas para a sua erradicação ou controlo (Richman, Margolis et al. 2009). Tem sido proposto que, sob a acção de HAART, a indução da expressão

genética viral e a produção de novos vírus deveria ter como consequência a morte das células infectadas e a eliminação do reservatório (Richman, Margolis et al. 2009). Entre as moléculas que têm sido propostas para a activação das células latentemente infectadas encontram-se inibidores das enzimas desacetilases das histonas (HDAC), envolvidas na remodelação da cromatina, tais como o ácido valproico, que potencialmente induzem a transcrição viral na ausência de activação celular (Lehrman, Hogue et al. 2005; Archin, Cheema et al. 2010); vários agonistas das cinases incluindo hexametilbisacetamida (HMBA) que activa a processos intracelulares de transdução de sinal que podem induzir a expressão do HIV (Choudhary, Archin et al. 2008); a Prostatina, que induz a activação de NF-kB e a expressão do HIV na ausência de proliferação celular (Kulkosky, Culnan et al. 2001); a proteína PTB que se encontra envolvida na exportação de mRNA do núcleo e que se encontra em baixas concentrações nas células quiescentes (Lassen, Ramyar et al. 2006); e a manipulação da expressão de miRNA envolvidos na regulação da expressão genética viral (Huang, Wang et al. 2007; Klase, Kale et al. 2007).

No que se refere a terapias complementares de base imunológica, têm-se realizado vários estudos sobre o potencial uso de IL-2 em combinação com a terapêutica anti-retroviral na recuperação do número de células T CD4 (Kovacs, Baseler et al. 1995; Davey, Murphy et al. 2000; Levy, Durier et al. 2003) e na eliminação dos reservatórios virais (Williams 1998; Chun, Engel et al. 1999; Cooper and Emery 1999). Apesar da utilização desta citocina se mostrar geralmente associada a um aumento substancial das contagens de linfócitos T CD4, estudos recentes mostraram que esse aumento não tem resultado em benefícios evidentes do ponto de vista clínico, nomeadamente na redução do risco de infecções oportunistas e da taxa de mortalidade (Abrams, Levy et al. 2009).

Do ponto de vista virológico, a utilização de IL-2 em associação com a terapêutica anti-retroviral também não parece ter um impacto significativo ao nível da replicação e latência virais (Stellbrink, van Lunzen et al. 2002). Tem sido também dada grande atenção ao potencial uso de IL-7 para a reconstituição imunitária (Nunnari and Pomerantz 2005; Rethi, Vivar et al. 2009) e tem sido estudada como um possível indutor da expressão genética viral no contexto da tentativa de eliminação dos reservatórios virais (Wang, Xu et al. 2005; Chahroudi and Silvestri 2010).

O desenvolvimento de vacinas terapêuticas é um outro tipo de abordagem no tratamento da infecção pelo HIV que tem recebido grande investimento. De um modo geral pretende-se com esta abordagem gerar ou aumentar a resposta imunitária específica contra o HIV, permitindo eventualmente a descontinuação da terapêutica anti-retroviral ou o controlo da replicação viral com um recurso mais limitado a medicamentos anti-retrovirais de forma a eliminar ou reduzir os efeitos secundários a eles associados. No entanto, ainda não está completamente esclarecida qual o tipo de resposta imunitária específica que melhor se associa a um controlo da replicação viral e que deve ser estimulada por este tipo de vacinas (Berzofsky, Ahlers et al. 2004; Pantaleo and Koup 2004). Tem sido testada a vacinação experimental com genes e proteínas estruturais e reguladoras (Kundu, Katzenstein et al. 1997; Lindenburg, Stolte et al. 2002; Harrer, Bauerle et al. 2005), com partículas semelhantes a vírus e com HIV-1 inativado (Eron, Ashby et al. 1996; Goebel, Mannhalter et al. 1999), em conjunto com adjuvantes e/ou moduladores, de forma a activar diferentes vias de resposta que envolvem, por exemplo, as respostas mediadas por células NK, por células T, e a produção de moléculas envolvidas na resposta imunitária (Kahn, Cherng et al. 2000). Apesar de alguns estudos revelarem um aumento da proliferação linfocitária com estas abordagens, a resposta

imunitária conseguida não tem sido associada a um melhor controlo da replicação viral após descontinuação da terapêutica (Kundu, Katzenstein et al. 1997; Egan 2004), apesar de se conseguir aparentemente induzir uma resposta CTL específica forte, que tem sido considerada fundamental para o controlo da replicação viral (Koup, Safrit et al. 1994; Rowland-Jones, Dong et al. 1998; Cosma, Nagaraj et al. 2003). Apesar dos resultados dos ensaios clínicos ainda não terem permitido a sua introdução na prática clínica, esta estratégia de tratamento mantém-se promissora dado o seu potencial na redução ou eliminação dos efeitos secundários associados à terapêutica anti-retroviral em uso actualmente e na limitação da emergência de variantes virais resistentes aquela terapêutica.

## ***8.2 Terapêutica na infecção HIV-2***

Os indivíduos infectados pelo HIV-2 que iniciam terapêutica têm sido tratados com os medicamentos e protocolos desenvolvidos para o tratamento da infecção HIV-1 (Adje-Toure, Cheingsong et al. 2003; Hightower and Kallas 2003; Damond, Lariven et al. 2008), dada a ausência de estudos clínicos randomizados sobre quando iniciar a terapêutica e quais os esquemas terapêuticos mais eficazes nesta infecção.

Devido à estrutura relativamente conservada das enzimas protease e transcriptase reversa entre HIV-1 e HIV-2, tem-se assumido que os medicamentos anti-retrovirais em uso para o tratamento da infecção por HIV-1 deveriam apresentar uma eficácia semelhante no tratamento da infecção por HIV-2 (Nkengasong, Adje-Toure et al. 2004). No entanto, vários estudos têm mostrado que a terapêutica anti-retroviral na infecção por HIV-2 tem geralmente uma eficácia mais limitada na redução da virémia e na

recuperação do número de células T CD4 em circulação (Adje-Toure, Cheingsong et al. 2003; Mullins, Eisen et al. 2004). Os poucos estudos efectuados sobre a actividade destes medicamentos na replicação do HIV-2 mostraram que em comparação com o HIV-1, o vírus apresenta níveis semelhantes de susceptibilidade aos NRTIs, no entanto apresenta resistência natural aos NNRTI (Larder, Chesebro et al. 1990; Cox, Aperia et al. 1994; Witvrouw, Pannecouque et al. 1999; Tuillon, Gueudin et al. 2004; Witvrouw, Pannecouque et al. 2004). Outros estudos mostraram que alguns NNRTI como a delavirdina inibem a replicação do HIV-2 mas a concentrações pelo menos 50 vezes mais elevadas do que as necessárias para inibir a replicação do HIV-1 (Witvrouw, Pannecouque et al. 1999; Buckheit, Watson et al. 2001). As elevadas concentrações destes fármacos que são necessárias para inibir o HIV-2 levam a que geralmente não se encontrem entre as escolhas terapêuticas a usar nos doentes infectados pelo HIV-2.

Estudos da cinética da actividade de ligação dos inibidores da protease à protease do HIV-2 mostraram que estes fármacos são eficazes contra a replicação do HIV-2, no entanto em muitos deles a ligação é feita com uma afinidade 10 a 100 vezes menor dependendo do inibidor (Tomasselli, Hui et al. 1990; Pichova, Weber et al. 1997). Existem contudo outros como o nelfinavir e o saquinavir que apresentam uma actividade inibitória semelhante na replicação do HIV-1 e HIV-2 (Martin, Mobberley et al. 1991; Vacca, Dorsey et al. 1994; Kempf, Marsh et al. 1995; Patick, Mo et al. 1996). Um estudo mais recente mostrou que o lopinavir, saquinavir, tipranavir e darunavir apresentavam capacidade de inibição da protease do HIV-2 mais elevada em comparação com o atazanavir, nelfinavir, e amprenavir, que apresentavam as menores actividades inibitórias (Brower, Bacha et al. 2008). Apesar de não haver orientações específicas sobre o melhor esquema terapêutico a ser usado em indivíduos infectados

pelo HIV-2, os dados disponíveis suportam a iniciação da terapêutica com um regime terapêutico triplo com NRTI e PI dada a resistência natural do HIV-2 aos NNRTI (Smith, Shaw et al. 2001; Jallow, Alabi et al. 2009).

Foram descritos vários polimorfismos que o HIV-2 pode apresentar, que resultam numa reduzida susceptibilidade a alguns inibidores da protease e que estão referenciados como mutações de resistência na infecção HIV-1 (Rodes, Holguin et al. 2000; Nkengasong, Adje-Toure et al. 2004; Johnson, Brun-Vezinet et al. 2008). Estes polimorfismos podem, por si só, limitar o tratamento dos indivíduos infectados pelo HIV-2 ao diminuir o número de medicamentos disponíveis para substituição da terapêutica em caso de resposta virológica ou imunológica insuficiente.

De um modo geral os estudos sugerem que uma boa resposta imunológica e virológica à terapêutica nos doentes infectados pelo HIV-2 requer uma escolha adequada do esquema terapêutico com inibidores da transcriptase reversa e da protease com actividade reconhecida contra o HIV-2, e da verificação da existência e da emergência de mutações e polimorfismos com efeitos sobre a resistência aos fármacos. Neste sentido é necessário o desenvolvimento de ensaios fenotípicos que permitam o estudo do impacto das mutações na eficácia dos vários esquemas terapêuticos.

## Referências

- Aasa-Chapman, M. M., S. Holuigue, et al. (2005). "Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* **79**(5): 2823-30.
- Abrams, D., Y. Levy, et al. (2009). "Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection." *N Engl J Med* **361**(16): 1548-59.
- Adje-Toure, C. A., R. Cheingsong, et al. (2003). "Antiretroviral therapy in HIV-2-infected patients: changes in plasma viral load, CD4+ cell counts, and drug resistance profiles of patients treated in Abidjan, Cote d'Ivoire." *AIDS* **17 Suppl 3**: S49-54.



- Agace, W. W., A. Amara, et al. (2000). "Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation." *Curr Biol* **10**(6): 325-8.
- Agosto, L. M., J. J. Yu, et al. (2007). "HIV-1 integrates into resting CD4+ T cells even at low inoculums as demonstrated with an improved assay for HIV-1 integration." *Virology* **368**(1): 60-72.
- Ahluwalia, J. K., S. Z. Khan, et al. (2008). "Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication." *Retrovirology* **5**: 117.
- Aiken, C. and D. Trono (1995). "Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis." *J Virol* **69**(8): 5048-56.
- Alce, T. M. and W. Popik (2004). "APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein." *J Biol Chem* **279**(33): 34083-6.
- Alexaki, A., Y. Liu, et al. (2008). "Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence." *Curr HIV Res* **6**(5): 388-400.
- Alexaki, A. and B. Wigdahl (2008). "HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination." *PLoS Pathog* **4**(12): e1000215.
- Almeida, C. A., P. Price, et al. (2002). "Immune activation in patients infected with HIV type 1 and maintaining suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy." *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(18): 1351-5.
- Altfeld, M., E. T. Kalife, et al. (2006). "HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1." *PLoS Med* **3**(10): e403.
- Amini, S., M. Saunders, et al. (2004). "Interplay between HIV-1 Vpr and Sp1 modulates p21(WAF1) gene expression in human astrocytes." *J Biol Chem* **279**(44): 46046-56.
- Amirayan-Chevillard, N., H. Tissot-Dupont, et al. (2000). "Highly active antiretroviral therapy (HAART) and circulating markers of immune activation: specific effect of HAART on neopterin." *Clin Diagn Lab Immunol* **7**(5): 832-4.
- An, P., R. Johnson, et al. (2009). "APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition." *J Infect Dis* **200**(7): 1054-8.
- Ancelle, R., O. Bletry, et al. (1987). "Long incubation period for HIV-2 infection." *Lancet* **1**(8534): 688-9.
- Andersson, S., H. Norrgren, et al. (2000). "Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection." *Arch Intern Med* **160**(21): 3286-93.
- Anzala, O. A., N. J. Nagelkerke, et al. (1995). "Rapid progression to disease in African sex workers with human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Infect Dis* **171**(3): 686-9.
- Appay, V. and D. Sauce (2008). "Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences." *J Pathol* **214**(2): 231-41.
- Aquaro, S., R. Calio, et al. (2002). "Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir." *Antiviral Res* **55**(2): 209-25.
- Archin, N. M., M. Cheema, et al. (2010). "Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection." *PLoS One* **5**(2): e9390.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., et al. (1992). "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines." *Science* **258**(5090): 1935-8.

- Ascher, M. S. and H. W. Sheppard (1988). "AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis." Clin Exp Immunol **73**(2): 165-7.
- Asjo, B., L. Morfeldt-Manson, et al. (1986). "Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection." Lancet **2**(8508): 660-2.
- Ayouba, A., P. Mauciere, et al. (2001). "HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998." Emerg Infect Dis **7**(3): 466-7.
- Ayouba, A., S. Souquieres, et al. (2000). "HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon." AIDS **14**(16): 2623-5.
- Ayyavoo, V., A. Mahboubi, et al. (1997). "HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B." Nat Med **3**(10): 1117-23.
- Badley, A. D., A. A. Pilon, et al. (2000). "Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis." Blood **96**(9): 2951-64.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Bafica, A., C. A. Scanga, et al. (2004). "Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors." J Immunol **172**(12): 7229-34.
- Bailey, J. R., A. R. Sedaghat, et al. (2006). "Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells." J Virol **80**(13): 6441-57.
- Balvay, L., M. Lopez Lastra, et al. (2007). "Translational control of retroviruses." Nat Rev Microbiol **5**(2): 128-40.
- Barker, E., C. E. Mackewicz, et al. (1998). "Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome." Blood **92**(9): 3105-14.
- Bartee, E., A. McCormack, et al. (2006). "Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators." PLoS Pathog **2**(10): e107.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.
- Barton, C. H., T. E. Biggs, et al. (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 regulatory protein Tat inhibits interferon-induced iNos activity in a murine macrophage cell line." J Gen Virol **77** (Pt 8): 1643-7.
- Bedimo, R. (2008). "Non-AIDS-defining malignancies among HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era." Curr HIV/AIDS Rep **5**(3): 140-9.
- Beignon, A. S., K. McKenna, et al. (2005). "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions." J Clin Invest **115**(11): 3265-75.
- Belshan, M. and L. Ratner (2003). "Identification of the nuclear localization signal of human immunodeficiency virus type 2 Vpx." Virology **311**(1): 7-15.
- Benkirane, M., R. F. Chun, et al. (1998). "Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat." J Biol Chem **273**(38): 24898-905.
- Benson, R. E., A. Sanfridson, et al. (1993). "Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection." J Exp Med **177**(6): 1561-6.

- Berkhout, B. (1992). "Structural features in TAR RNA of human and simian immunodeficiency viruses: a phylogenetic analysis." *Nucleic Acids Res* **20**(1): 27-31.
- Berkowitz, R., J. Fisher, et al. (1996). "RNA packaging." *Curr Top Microbiol Immunol* **214**: 177-218.
- Berkowitz, R. D., K. P. Beckerman, et al. (1998). "CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation." *J Immunol* **161**(7): 3702-10.
- Bernard, N. F., C. M. Yannakis, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons." *J Infect Dis* **179**(3): 538-47.
- Berry, N., K. Ariyoshi, et al. (1998). "Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection." *J Hum Virol* **1**(7): 457-68.
- Berthoux, L., S. Sebastian, et al. (2005). "Cyclophilin A is required for TRIM5 $\alpha$ -mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14849-53.
- Berzofsky, J. A., J. D. Ahlers, et al. (2004). "Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections." *J Clin Invest* **114**(4): 450-62.
- Betts, M. R., M. C. Nason, et al. (2006). "HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells." *Blood* **107**(12): 4781-9.
- Bibollet-Ruche, F., E. Bailes, et al. (2004). "New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a cercopithecus monkey virus clade." *J Virol* **78**(14): 7748-62.
- Binley, J. M., E. A. Lybarger, et al. (2008). "Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C." *J Virol* **82**(23): 11651-68.
- Bishop, K. N., R. K. Holmes, et al. (2006). "Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination." *J Virol* **80**(17): 8450-8.
- Bjorling, E., G. Scarlatti, et al. (1993). "Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection." *Virology* **193**(1): 528-30.
- Blagoveshchenskaya, A. D., L. Thomas, et al. (2002). "HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway." *Cell* **111**(6): 853-66.
- Blankson, J. N. (2010). "Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses?" *Antiviral Res* **85**(1): 295-302.
- Blankson, J. N., D. Persaud, et al. (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." *Annu Rev Med* **53**: 557-93.
- Blasius, A. L., E. Giurisato, et al. (2006). "Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation." *J Immunol* **177**(5): 3260-5.
- Blissenbach, M., B. Grewe, et al. (2010). "Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited." *J Virol* **84**(13): 6598-604.
- Boasso, A. and G. M. Shearer (2008). "Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis." *Clin Immunol* **126**(3): 235-42.
- Boasso, A., M. Vaccari, et al. (2006). "Do regulatory T-cells play a role in AIDS pathogenesis?" *AIDS Rev* **8**(3): 141-7.

- Borkow, G. and Z. Bentwich (2006). "HIV and helminth co-infection: is deworming necessary?" Parasite Immunol **28**(11): 605-12.
- Borrego, P., J. M. Marcelino, et al. (2008). "The role of the humoral immune response in the molecular evolution of the envelope C2, V3 and C3 regions in chronically HIV-2 infected patients." Retrovirology **5**: 78.
- Borrow, P. and N. Bhardwaj (2008). "Innate immune responses in primary HIV-1 infection." Curr Opin HIV AIDS **3**(1): 36-44.
- Bour, S., R. Geleziunas, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection." Microbiol Rev **59**(1): 63-93.
- Brandt, S., M. Blissenbach, et al. (2007). "Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation." PLoS Pathog **3**(4): e54.
- Brasey, A., M. Lopez-Lastra, et al. (2003). "The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle." J Virol **77**(7): 3939-49.
- Braun, D. P., H. Kessler, et al. (1988). "Monocyte functional studies in asymptomatic, human immunodeficiency disease virus (HIV)-infected individuals." J Clin Immunol **8**(6): 486-94.
- Brenchley, J. M., B. J. Hill, et al. (2004). "T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis." J Virol **78**(3): 1160-8.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?" Nat Immunol **7**(3): 235-9.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nat Med **12**(12): 1365-71.
- Brenchley, J. M., T. W. Schacker, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." J Exp Med **200**(6): 749-59.
- Brooks, D. G., S. G. Kitchen, et al. (2001). "Generation of HIV latency during thymopoiesis." Nat Med **7**(4): 459-64.
- Broussard, S. R., S. I. Staprans, et al. (2001). "Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease." J Virol **75**(5): 2262-75.
- Brower, E. T., U. M. Bacha, et al. (2008). "Inhibition of HIV-2 protease by HIV-1 protease inhibitors in clinical use." Chem Biol Drug Des **71**(4): 298-305.
- Browne, E. P., C. Allers, et al. (2009). "Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent." Virology **387**(2): 313-21.
- Brun-Vezinet, F., M. A. Rey, et al. (1987). "Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. Clinical and virological features in four patients." Lancet **1**(8525): 128-32.
- Buckheit, R. W., Jr., K. Watson, et al. (2001). "SJ-3366, a unique and highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that also inhibits HIV-2." Antimicrob Agents Chemother **45**(2): 393-400.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Burton, G. F., B. F. Keele, et al. (2002). "Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis."

- Seminars in Immunology **14**(4): 275-284.
- Bushman, F. D. (2002). "Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control." Curr Top Microbiol Immunol **261**: 165-77.
- Butler, I. F., I. Pandrea, et al. (2007). "HIV genetic diversity: biological and public health consequences." Curr HIV Res **5**(1): 23-45.
- Butler, S. L., E. P. Johnson, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles." J Virol **76**(8): 3739-47.
- Butsch, M. and K. Boris-Lawrie (2002). "Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion?" J Virol **76**(7): 3089-94.
- Cann, A. J., J. D. Rosenblatt, et al. (1985). "Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation." Nature **318**(6046): 571-4.
- Cao, W., L. Bover, et al. (2009). "Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction." J Exp Med **206**(7): 1603-14.
- Cao, Y., L. Qin, et al. (1995). "Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **332**(4): 201-8.
- Carrington, M., M. P. Martin, et al. (2008). "KIR-HLA intercourse in HIV disease." Trends Microbiol **16**(12): 620-7.
- Caselli, E., M. Galvan, et al. (2005). "Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells." Blood **106**(8): 2790-7.
- Cavaleiro, R., A. P. Baptista, et al. (2009). "Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease." PLoS Pathog **5**(11): e1000667.
- Cavaleiro, R., G. J. Brunn, et al. (2007). "Monocyte-mediated T cell suppression by HIV-2 envelope proteins." Eur J Immunol **37**(12): 3435-44.
- Cavert, W., D. W. Notermans, et al. (1997). "Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection." Science **276**(5314): 960-4.
- Chahroudi, A. and G. Silvestri (2010). "Interleukin-7 in HIV pathogenesis and therapy." Eur Cytokine Netw **21**(3): 202-7.
- Chakrabarti, L. A., S. R. Lewin, et al. (2000). "Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection." J Virol **74**(3): 1209-23.
- Chan, D. C. and P. S. Kim (1998). "HIV entry and its inhibition." Cell **93**(5): 681-4.
- Chanel, C., I. Staropoli, et al. (2002). "Low levels of co-receptor CCR5 are sufficient to permit HIV envelope-mediated fusion with resting CD4 T cells." AIDS **16**(17): 2337-40.
- Chang, H. C., F. Samaniego, et al. (1997). "HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region." AIDS **11**(12): 1421-31.
- Chatterjee, P., A. Garzino-Demo, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 2 multiply spliced transcripts." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(4): 331-5.
- Chen-Park, F. E., D. B. Huang, et al. (2002). "The kappa B DNA sequence from the HIV long terminal repeat functions as an allosteric regulator of HIV transcription." J Biol Chem **277**(27): 24701-8.

- Chen, H., S. Q. Wei, et al. (1999). "Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome." *J Biol Chem* **274**(24): 17358-64.
- Chen, Z., A. Luckay, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys." *J Virol* **71**(5): 3953-60.
- Cheng, X., M. Belshan, et al. (2008). "Hsp40 facilitates nuclear import of the human immunodeficiency virus type 2 Vpx-mediated preintegration complex." *J Virol* **82**(3): 1229-37.
- Cherepanov, P., G. Maertens, et al. (2003). "HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells." *J Biol Chem* **278**(1): 372-81.
- Chiu, Y. L., V. B. Soros, et al. (2005). "Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells." *Nature* **435**(7038): 108-14.
- Chomont, N., M. El-Far, et al. (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med* **15**(8): 893-900.
- Choudhary, S. K., N. M. Archin, et al. (2008). "Hexamethylbisacetamide and disruption of human immunodeficiency virus type 1 latency in CD4(+) T cells." *J Infect Dis* **197**(8): 1162-70.
- Chowers, M. Y., C. A. Spina, et al. (1994). "Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene." *J Virol* **68**(5): 2906-14.
- Chun, T. W., L. Carruth, et al. (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." *Nature* **387**(6629): 183-8.
- Chun, T. W., R. T. Davey, Jr., et al. (1999). "Re-emergence of HIV after stopping therapy." *Nature* **401**(6756): 874-5.
- Chun, T. W., R. T. Davey, Jr., et al. (2000). "Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy." *Nat Med* **6**(7): 757-61.
- Chun, T. W., D. Engel, et al. (1998). "Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8869-73.
- Chun, T. W., D. Engel, et al. (1999). "Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy." *Nat Med* **5**(6): 651-5.
- Chun, T. W., D. Finzi, et al. (1995). "In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency." *Nat Med* **1**(12): 1284-90.
- Chun, T. W., J. S. Justement, et al. (2001). "Suppression of HIV replication in the resting CD4+ T cell reservoir by autologous CD8+ T cells: implications for the development of therapeutic strategies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 253-8.
- Chun, T. W., L. Stuyver, et al. (1997). "Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13193-7.
- Cihlar, T. and A. S. Ray (2010). "Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine." *Antiviral Res* **85**(1): 39-58.
- Clapham, P. R. and A. McKnight (2002). "Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses." *J Gen Virol* **83**(Pt 8): 1809-29.
- Clavel, F., M. Guyader, et al. (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune

- deficiency virus type 2." *Nature* **324**(6098): 691-5.
- Clavel, F., K. Mansinho, et al. (1987). "Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa." *N Engl J Med* **316**(19): 1180-5.
- Clever, J., C. Sasseti, et al. (1995). "RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **69**(4): 2101-9.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." *Science* **270**(5243): 1811-5.
- Cochrane, A., S. Imlach, et al. (2004). "High levels of human immunodeficiency virus infection of CD8 lymphocytes expressing CD4 in vivo." *Journal of Virology* **78**(18): 9862-9871.
- Coffin, J. M. (1995). "HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy." *Science* **267**(5197): 483-9.
- Cohen, O. J., A. Kinter, et al. (1997). "Host factors in the pathogenesis of HIV disease." *Immunol Rev* **159**: 31-48.
- Col, E., C. Caron, et al. (2001). "The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat." *J Biol Chem* **276**(30): 28179-84.
- Coleman, C. M. and L. Wu (2009). "HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs." *Retrovirology* **6**: 51.
- Colin, L. and C. Van Lint (2009). "Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies." *Retrovirology* **6**: 111.
- Collman, R., N. F. Hassan, et al. (1989). "Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types." *J Exp Med* **170**(4): 1149-63.
- Connor, R. I., K. E. Sheridan, et al. (1997). "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals." *J Exp Med* **185**(4): 621-8.
- Cooper, D. A. and S. Emery (1999). "Latent reservoirs of HIV infection: flushing with IL-2?" *Nat Med* **5**(6): 611-2.
- Cornelissen, M., G. Mulder-Kampinga, et al. (1995). "Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population." *J Virol* **69**(3): 1810-8.
- Cosma, A., R. Nagaraj, et al. (2003). "Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals." *Vaccine* **22**(1): 21-9.
- Cowan, S., T. Hatzioannou, et al. (2002). "Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11914-9.
- Cox, S. W., K. Aperia, et al. (1994). "Comparison of the sensitivities of primary isolates of HIV type 2 and HIV type 1 to antiviral drugs and drug combinations." *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(12): 1725-9.
- Cron, R. Q., S. R. Bartz, et al. (2000). "NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells." *Clin Immunol* **94**(3): 179-91.
- Crowe, S., T. Zhu, et al. (2003). "The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection." *J Leukoc Biol* **74**(5): 635-41.

- Crowe, S. M. and R. S. Kornbluth (1994). "Overview of HIV interactions with macrophages and dendritic cells: the other infection in AIDS." J Leukoc Biol **56**(3): 215-7.
- Cui, J., P. K. Tungaturthi, et al. (2006). "The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression." Cell Cycle **5**(22): 2626-38.
- Cullen, B. R. (2006). "Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors." J Virol **80**(3): 1067-76.
- Cullen, B. R. and W. C. Greene (1989). "Regulatory pathways governing HIV-1 replication." Cell **58**(3): 423-6.
- Curtis, B. M., S. Scharnowske, et al. (1992). "Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8356-60.
- Damond, F., S. Lariven, et al. (2008). "Virological and immunological response to HAART regimen containing integrase inhibitors in HIV-2-infected patients." AIDS **22**(5): 665-6.
- Damond, F., M. Worobey, et al. (2004). "Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(6): 666-72.
- Dandekar, S., M. D. George, et al. (2010). "Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 173-8.
- Davey, R. T., Jr., R. L. Murphy, et al. (2000). "Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial." JAMA **284**(2): 183-9.
- de Silva, T. I., M. Cotten, et al. (2008). "HIV-2: the forgotten AIDS virus." Trends Microbiol **16**(12): 588-95.
- de Witte, L., M. Bobardt, et al. (2007). "Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19464-9.
- Dean, M., M. Carrington, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." Science **273**(5283): 1856-62.
- Deeks, S. G., C. M. Kitchen, et al. (2004). "Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load." Blood **104**(4): 942-7.
- Deeks, S. G. and B. D. Walker (2007). "Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy." Immunity **27**(3): 406-16.
- Demarchi, F., P. D'Agaro, et al. (1993). "In vivo footprinting analysis of constitutive and inducible protein-DNA interactions at the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **67**(12): 7450-60.
- Demarchi, F., M. I. Gutierrez, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR." J Virol **73**(8): 7080-6.
- Demaria, A., S. Colombini, et al. (1994). "Cd8(+) Cytolytic T-Lymphocytes Become Infected in-Vitro in the Process of Killing Hiv-1-Infected Target-Cells." European Journal of Immunology **24**(3): 531-536.
- Demaria, A., G. Pantaleo, et al. (1991). "Infection of Cd8+ Lymphocytes-T with Hiv - Requirement for



- Interaction with Infected Cd4+ Cells and Induction of Infectious Virus from Chronically Infected Cd8+ Cells." *Journal of Immunology* **146**(7): 2220-2226.
- Deng, L., C. de la Fuente, et al. (2000). "Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones." *Virology* **277**(2): 278-95.
- Di Marzio, P., J. Tse, et al. (1998). "Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**(2): 129-38.
- Dillon, P. J., P. Nelbock, et al. (1990). "Function of the human immunodeficiency virus types 1 and 2 Rev proteins is dependent on their ability to interact with a structured region present in env gene mRNA." *J Virol* **64**(9): 4428-37.
- Dinosa, J. B., S. Y. Kim, et al. (2009). "Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(23): 9403-8.
- Donaghy, H., J. Wilkinson, et al. (2006). "HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow?" *J Leukoc Biol* **80**(5): 1001-12.
- Dornadula, G., H. Zhang, et al. (1999). "Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy." *JAMA* **282**(17): 1627-32.
- Douek, D. C., J. M. Brenchley, et al. (2002). "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells." *Nature* **417**(6884): 95-8.
- Douglas, J. L., J. K. Gustin, et al. (2010). "The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin." *PLoS Pathog* **6**(5): e1000913.
- Drosten, C., E. Muller-Kunert, et al. (2005). "Topographic and quantitative display of integrated human immunodeficiency virus-1 provirus DNA in human lymph nodes by real-time polymerase chain reaction." *J Mol Diagn* **7**(2): 219-25.
- Drylewicz, J., S. Matheron, et al. (2008). "Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France." *AIDS* **22**(4): 457-68.
- Duvall, M. G., A. Jaye, et al. (2006). "Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection." *J Immunol* **176**(11): 6973-81.
- Duverger, A., J. Jones, et al. (2009). "Determinants of the establishment of human immunodeficiency virus type 1 latency." *J Virol* **83**(7): 3078-93.
- Dyer, W. B., J. J. Zaunders, et al. (2008). "Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection." *Retrovirology* **5**: 112.
- Earl, P. L., R. W. Doms, et al. (1990). "Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2): 648-52.
- Easterbrook, P. J. (1999). "Long-term non-progression in HIV infection: definitions and epidemiological issues." *J Infect* **38**(2): 71-3.
- Egan, M. A. (2004). "Current prospects for the development of a therapeutic vaccine for the treatment of HIV type 1 infection." *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(8): 794-806.
- Engelman, A., G. Englund, et al. (1995). "Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication." *J Virol* **69**(5): 2729-36.
- Ensoli, B., L. Buonaguro, et al. (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." *J Virol*

67(1): 277-87.

- Eron, J. J., Jr., M. A. Ashby, et al. (1996). "Randomised trial of MNrgp120 HIV-1 vaccine in symptomless HIV-1 infection." Lancet **348**(9041): 1547-51.
- Estaquier, J., T. Idziorek, et al. (1994). "Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9431-5.
- Eszterhas, S. K., E. E. Bouhassira, et al. (2002). "Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position." Mol Cell Biol **22**(2): 469-79.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, et al. (2009). "HIV-1 Tat addresses dendritic cells to induce a predominant Th1-type adaptive immune response that appears prevalent in the asymptomatic stage of infection." J Immunol **182**(5): 2888-97.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, et al. (2002). "Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses." J Immunol **168**(1): 197-206.
- Fazekas de St Groth, B. and A. L. Landay (2008). "Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response?" AIDS **22**(6): 671-83.
- Feinberg, M. B., D. Baltimore, et al. (1991). "The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 4045-9.
- Fellay, J., D. Ge, et al. (2009). "Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans." PLoS Genet **5**(12): e1000791.
- Fellay, J., K. V. Shianna, et al. (2010). "Host genetics and HIV-1: the final phase?" PLoS Pathog **6**(10): e1001033.
- Fenyó, E. M. (2001). "The Role of Virus Biological Phenotype in Human Immunodeficiency virus pathogenesis." AIDS rev **3**: 157-168.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, et al. (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." Mol Ther **8**(2): 284-94.
- Ferre, A. L., P. W. Hunt, et al. (2009). "Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control." Blood **113**(17): 3978-89.
- Finzi, D., M. Hermankova, et al. (1997). "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." Science **278**(5341): 1295-300.
- Fischer, M., H. F. Gunthard, et al. (2000). "Residual HIV-RNA levels persist for up to 2.5 years in peripheral blood mononuclear cells of patients on potent antiretroviral therapy." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(12): 1135-40.
- Fletcher, T. M., 3rd, B. Brichacek, et al. (1996). "Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM)." EMBO J **15**(22): 6155-65.
- Florescu, D. and D. P. Kotler (2007). "Insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus in HIV-infected patients." Antivir Ther **12**(2): 149-62.
- Fonteneau, J. F., M. Larsson, et al. (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid

- dendritic cells." J Virol **78**(10): 5223-32.
- Forsman, A. and R. A. Weiss (2008). "Why is HIV a pathogen?" Trends Microbiol **16**(12): 555-60.
- Foxall, R. B., C. S. Cortesao, et al. (2008). "Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immune activation in infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but not HIV-1." J Virol **82**(19): 9795-9.
- Franco, J. M., A. Rubio, et al. (1999). "Reduction of immune system activation in HIV-1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**(10): 733-6.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, et al. (1994). "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 359-62.
- Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology **251**(1): 1-15.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." Somat Cell Mol Genet **26**(1-6): 13-33.
- Freed, E. O. and M. A. Martin (1995). "The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection." J Biol Chem **270**(41): 23883-6.
- Fuchs, D., H. Jager, et al. (1990). "Immune activation markers to predict AIDS and survival in HIV-1 seropositives." Immunol Lett **26**(1): 75-9.
- Fujita, M., M. Otsuka, et al. (2008). "Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages." J Virol **82**(15): 7752-6.
- Fujita, M., M. Otsuka, et al. (2010). "Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions." Rev Med Virol **20**(2): 68-76.
- Furtado, M. R., L. A. Kingsley, et al. (1995). "Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4+ T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." J Virol **69**(4): 2092-2100.
- Gabuzda, D. H., H. Li, et al. (1994). "Essential role of vif in establishing productive HIV-1 infection in peripheral blood T lymphocytes and monocyte/macrophages." J Acquir Immune Defic Syndr **7**(9): 908-15.
- Gaines, H., M. A. von Sydow, et al. (1990). "Immunological changes in primary HIV-1 infection." AIDS **4**(10): 995-9.
- Gallo, R. C. (1999). "Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8324-6.
- Gamble, T. R., F. F. Vajdos, et al. (1996). "Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid." Cell **87**(7): 1285-94.
- Gandhi, N., Z. Saiyed, et al. (2009). "Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes." AIDS Res Hum Retroviruses **25**(7): 691-9.
- Gao, F., E. Bailes, et al. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*." Nature **397**(6718): 436-41.
- Gao, F., L. Yue, et al. (1994). "Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology." J Virol **68**(11): 7433-47.
- Gao, F., L. Yue, et al. (1992). "Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa." Nature **358**(6386): 495-9.

- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5): 587-97.
- Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, et al. (1987). "Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins." *Virology* **156**(1): 171-6.
- Geleziunas, R., M. D. Miller, et al. (1996). "Unraveling the function of HIV type 1 Nef." *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(17): 1579-82.
- Giacca, M. (2005). "HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?" *Retrovirology* **2**: 7.
- Gillespie, G. M., S. Pinheiro, et al. (2005). "CD8+ T cell responses to human immunodeficiency viruses type 2 (HIV-2) and type 1 (HIV-1) gag proteins are distinguishable by magnitude and breadth but not cellular phenotype." *Eur J Immunol* **35**(5): 1445-53.
- Gillim-Ross, L., A. Cara, et al. (2005). "HIV-1 extrachromosomal 2-LTR circular DNA is long-lived in human macrophages." *Viral Immunol* **18**(1): 190-6.
- Giorgi, J. V., L. E. Hultin, et al. (1999). "Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage." *J Infect Dis* **179**(4): 859-70.
- Giorgi, J. V., R. H. Lyles, et al. (2002). "Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**(4): 346-55.
- Gloster, S. E., P. Newton, et al. (2004). "Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection." *AIDS* **18**(5): 749-55.
- Goebel, F. D., J. W. Mannhalter, et al. (1999). "Recombinant gp160 as a therapeutic vaccine for HIV-infection: results of a large randomized, controlled trial. European Multinational IMMUNO AIDS Vaccine Study Group." *AIDS* **13**(12): 1461-8.
- Goh, W. C., M. E. Rogel, et al. (1998). "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo." *Nat Med* **4**(1): 65-71.
- Goila-Gaur, R. and K. Strebel (2008). "HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity." *Retrovirology* **5**: 51.
- Goncalves, J., P. Jallepalli, et al. (1994). "Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **68**(2): 704-12.
- Goncalves, J., B. Shi, et al. (1995). "Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains." *J Virol* **69**(11): 7196-204.
- Gordon, S. N., B. Cervasi, et al. (2010). "Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals." *J Immunol* **185**(9): 5169-79.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, et al. (1991). "Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(8): 3195-9.
- Gougeon, M. L., H. Lecoecur, et al. (1996). "Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression." *J Immunol* **156**(9): 3509-20.
- Goujon, C., V. Arfi, et al. (2008). "Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells." *J Virol* **82**(24): 12335-45.
- Goujon, C., L. Riviere, et al. (2007). "SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a

- proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells." Retrovirology **4**: 2.
- Grabar, S., H. Selinger-Leneman, et al. (2009). "Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV." AIDS **23**(9): 1163-9.
- Grattinger, M., H. Hohenberg, et al. (1999). "In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A." Virology **257**(1): 247-60.
- Graziosi, C., G. Pantaleo, et al. (1993). "Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6405-9.
- Groom, H. C., E. C. Anderson, et al. (2009). "Rev: beyond nuclear export." J Gen Virol **90**(Pt 6): 1303-18.
- Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, et al. (2002). "CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?" Nat Med **8**(4): 319-23.
- Grossman, Z., B. Min, et al. (2004). "Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis." Nat Rev Immunol **4**(5): 387-95.
- Gulick, R. M., J. W. Mellors, et al. (1997). "Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy." N Engl J Med **337**(11): 734-9.
- Gulzar, N., B. Diker, et al. (2008). "Proportion of HIV-1 Infected CD8+CD4-T Lymphocytes In Vivo." Current Hiv Research **6**(6): 585-596.
- Gupta, S., R. Boppana, et al. (2008). "HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner." J Immunol **180**(1): 79-88.
- Guyader, M., M. Emerman, et al. (1987). "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2." Nature **326**(6114): 662-9.
- Haase, A. T. (2005). "Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts." Nat Rev Immunol **5**(10): 783-92.
- Hadida, F., V. Vieillard, et al. (1999). "Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells." J Immunol **163**(3): 1105-9.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-14.
- Hammer, S. M., K. E. Squires, et al. (1997). "A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." N Engl J Med **337**(11): 725-33.
- Han, Y., K. Lassen, et al. (2004). "Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes." J Virol **78**(12): 6122-33.
- Han, Y., Y. B. Lin, et al. (2008). "Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough." Cell Host Microbe **4**(2): 134-46.
- Hannibal, M. C., D. M. Markovitz, et al. (1993). "Differential activation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 transcription by specific T-cell activation signals." J Virol **67**(8): 5035-40.
- Harouse, J. M., C. Buckner, et al. (2003). "CD8+ T cell-mediated CXC chemokine receptor 4-

- simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10977-82.
- Harrer, E., M. Bauerle, et al. (2005). "Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption." Antivir Ther **10**(2): 285-300.
- Harrigan, P. R., M. Whaley, et al. (1999). "Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy." AIDS **13**(8): F59-62.
- Harris, R. S., K. N. Bishop, et al. (2003). "DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection." Cell **113**(6): 803-9.
- Harris, R. S. and M. T. Liddament (2004). "Retroviral restriction by APOBEC proteins." Nat Rev Immunol **4**(11): 868-77.
- Haynes, B. F., L. P. Hale, et al. (1999). "Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection." J Clin Invest **103**(4): 453-60.
- Hazenberg, M. D., D. Hamann, et al. (2000). "T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock." Nat Immunol **1**(4): 285-9.
- He, J., S. Choe, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity." J Virol **69**(11): 6705-11.
- Herbeuval, J. P., A. W. Hardy, et al. (2005). "Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13974-9.
- Herbeuval, J. P. and G. M. Shearer (2007). "HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad." Clin Immunol **123**(2): 121-8.
- Hicks, C. and R. M. Gulick (2009). "Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor." Clin Infect Dis **48**(7): 931-9.
- Hightower, M. and E. G. Kallas (2003). "Diagnosis, antiretroviral therapy, and emergence of resistance to antiretroviral agents in HIV-2 infection: a review." Braz J Infect Dis **7**(1): 7-15.
- Hill, C. M., H. Deng, et al. (1997). "Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor." J Virol **71**(9): 6296-304.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, et al. (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." Nature **339**(6223): 389-92.
- Ho, D. D., T. R. Rota, et al. (1986). "Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III." J Clin Invest **77**(5): 1712-5.
- Hoffman, N. G., F. Seillier-Moisewitsch, et al. (2002). "Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop." J Virol **76**(8): 3852-64.
- Hogan, C. M. and S. M. Hammer (2001). "Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics." Ann Intern Med **134**(10): 978-96.
- Holmes, D., Q. Jiang, et al. (2008). "Foxp3 and Treg cells in HIV-1 infection and immuno-pathogenesis." Immunol Res **41**(3): 248-66.

- Hosmalin, A. and P. Lebon (2006). "Type I interferon production in HIV-infected patients." J Leukoc Biol **80**(5): 984-93.
- Houzet, L., M. L. Yeung, et al. (2008). "MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals." Retrovirology **5**: 118.
- Huang, J., F. Wang, et al. (2007). "Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes." Nat Med **13**(10): 1241-7.
- Huang, M., J. M. Orenstein, et al. (1995). "p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease." J Virol **69**(11): 6810-8.
- Huang, Y., W. A. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-3.
- Huber, M., M. Fischer, et al. (2006). "Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection." PLoS Med **3**(11): e441.
- Huthoff, H. and B. Berkhout (2001). "Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA." RNA **7**(1): 143-57.
- Huvent, I., S. S. Hong, et al. (1998). "Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins." J Gen Virol **79** ( Pt 5): 1069-81.
- Iannello, A., M. R. Boulassel, et al. (2010). "Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study." J Immunol **184**(1): 114-26.
- Imlach, S., S. McBreen, et al. (2001). "Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 in vivo and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1." Journal of Virology **75**(23): 11555-11564.
- Ishikawa, K., W. Janssens, et al. (2001). "Genetic analysis of HIV type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa." AIDS Res Hum Retroviruses **17**(17): 1661-3.
- Jallow, S., A. Alabi, et al. (2009). "Virological response to Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in HIV-2 and HIV-1/HIV-2 Dually Infected Patients in The Gambia and the Emergence of Drug Resistant variants." J Clin Microbiol.
- Jaye, A., R. Sarge-Njie, et al. (2004). "No differences in cellular immune responses between asymptomatic HIV type 1- and type 2-infected Gambian patients." J Infect Dis **189**(3): 498-505.
- Jeang, K. T., R. Chun, et al. (1993). "In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor." J Virol **67**(10): 6224-33.
- Jiang, W., M. M. Lederman, et al. (2009). "Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection." J Infect Dis **199**(8): 1177-85.
- Johnson, V. A., F. Brun-Vezinet, et al. (2008). "Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Spring 2008." Top HIV Med **16**(1): 62-8.
- Jordan, A., D. Bisgrove, et al. (2003). "HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro." Embo J **22**(8): 1868-77.
- Jordan, A., P. Defechereux, et al. (2001). "The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation." Embo J **20**(7): 1726-38.
- Ju, S. M., H. Y. Song, et al. (2009). "Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix

- metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes." Exp Mol Med **41**(2): 86-93.
- Julg, B., K. L. Williams, et al. (2010). "Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses." J Virol **84**(11): 5540-9.
- Kahn, J. O., D. W. Cherng, et al. (2000). "Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial." JAMA **284**(17): 2193-202.
- Kahn, J. O. and B. D. Walker (1998). "Acute human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **339**(1): 33-9.
- Kalter, D. C., M. Nakamura, et al. (1991). "Enhanced HIV replication in macrophage colony-stimulating factor-treated monocytes." J Immunol **146**(1): 298-306.
- Kamine, J., B. Elangovan, et al. (1996). "Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator." Virology **216**(2): 357-66.
- Kao, S. Y., A. F. Calman, et al. (1987). "Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product." Nature **330**(6147): 489-93.
- Karczewski, M. K. and K. Strebel (1996). "Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein." J Virol **70**(1): 494-507.
- Kashanchi, F., R. Shibata, et al. (1994). "Second-site long terminal repeat (LTR) revertants of replication-defective human immunodeficiency virus: effects of revertant TATA box motifs on virus infectivity, LTR-directed expression, in vitro RNA synthesis, and binding of basal transcription factors TFIID and TFIIA." J Virol **68**(5): 3298-307.
- Katsikis, P. D., E. S. Wunderlich, et al. (1995). "Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals." J Exp Med **181**(6): 2029-36.
- Katz, R. A., K. Gravuer, et al. (1998). "A preferred target DNA structure for retroviral integrase in vitro." J Biol Chem **273**(37): 24190-5.
- Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, et al. (2007). "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction." Nat Immunol **8**(11): 1246-54.
- Kean, K. M. (2003). "The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis." Biol Cell **95**(3-4): 129-39.
- Keckesova, Z., L. M. Ylinen, et al. (2006). "Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity." J Virol **80**(10): 4683-90.
- Kedzierska, K. and S. M. Crowe (2002). "The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection." Curr Med Chem **9**(21): 1893-903.
- Keele, B. F., L. Tazi, et al. (2008). "Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **82**(11): 5548-61.
- Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, et al. (2006). "Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1." Science **313**(5786): 523-6.
- Kelly, J., M. H. Beddall, et al. (2008). "Human macrophages support persistent transcription from



- unintegrated HIV-1 DNA." *Virology* **372**(2): 300-12.
- Kempf, D. J., K. C. Marsh, et al. (1995). "ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2484-8.
- Kim, S. Y., R. Byrn, et al. (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression." *J Virol* **63**(9): 3708-13.
- King, J. E., E. A. Eugenin, et al. (2006). "HIV tat and neurotoxicity." *Microbes Infect* **8**(5): 1347-57.
- Kinoshita, S., L. Su, et al. (1997). "The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells." *Immunity* **6**(3): 235-44.
- Kirchhoff, F. (2009). "Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution?" *Nat Rev Microbiol* **7**(6): 467-76.
- Kirchhoff, F. (2010). "Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses." *Cell Host Microbe* **8**(1): 55-67.
- Kitchen, S. G. and J. A. Zack (1997). "CXCR4 expression during lymphopoiesis: implications for human immunodeficiency virus type 1 infection of the thymus." *J Virol* **71**(9): 6928-34.
- Klase, Z., P. Kale, et al. (2007). "HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR." *BMC Mol Biol* **8**: 63.
- Klimkait, T., K. Strebel, et al. (1990). "The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release." *J Virol* **64**(2): 621-9.
- Klotman, M. E., S. Kim, et al. (1991). "Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 5011-5.
- Koning, F. A., E. N. Newman, et al. (2009). "Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets." *J Virol* **83**(18): 9474-85.
- Koot, M., I. P. Keet, et al. (1993). "Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS." *Ann Intern Med* **118**(9): 681-8.
- Korber, B., M. Muldoon, et al. (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." *Science* **288**(5472): 1789-96.
- Korin, Y. D. and J. A. Zack (1999). "Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes." *J Virol* **73**(8): 6526-32.
- Kostrikis, L. G., Y. Huang, et al. (1998). "A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation." *Nat Med* **4**(3): 350-3.
- Kottlilil, S., J. Gamberg, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 replication, immune activation, and circulating cytotoxic T cells against uninfected CD4+ T cells." *J Clin Immunol* **20**(3): 175-86.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." *J Virol* **68**(7): 4650-5.
- Kovacs, J. A., M. Baseler, et al. (1995). "Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study." *N*

- Engl J Med **332**(9): 567-75.
- Kuiken, C. F., B.; Thomas Leitner, Christian Apetrei, Beatrice Hahn, Ilene Mizrachi, James Mullins, Andrew Rambaut, Steven Wolinsky, Bette Korber (2010). "HIV Sequence Compendium 2010."
- Kulkosky, J., D. M. Culnan, et al. (2001). "Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART." Blood **98**(10): 3006-15.
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, et al. (2008). "Pathogen recognition by innate receptors." J Infect Chemother **14**(2): 86-92.
- Kundu, S. K., D. Katzenstein, et al. (1997). "Effect of therapeutic immunization with recombinant gp160 HIV-1 vaccine on HIV-1 proviral DNA and plasma RNA: relationship to cellular immune responses." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **15**(4): 269-74.
- Kupfer, B., R. Kaiser, et al. (1998). "Role of HIV-1 phenotype in viral pathogenesis and its relation to viral load and CD4+ T-cell count." J Med Virol **56**(3): 259-63.
- Kupzig, S., V. Korolchuk, et al. (2003). "Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology." Traffic **4**(10): 694-709.
- Kwon, D. S., G. Gregorio, et al. (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." Immunity **16**(1): 135-44.
- Kwong, P. D., M. L. Doyle, et al. (2002). "HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites." Nature **420**(6916): 678-82.
- Lambert, A. A., C. Gilbert, et al. (2008). "The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways." Blood **112**(4): 1299-307.
- Lambotte, O., F. Boufassa, et al. (2005). "HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication." Clin Infect Dis **41**(7): 1053-6.
- Lambotte, O., Y. Taoufik, et al. (2000). "Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy." J Acquir Immune Defic Syndr **23**(2): 114-9.
- Lane, H. C., H. Masur, et al. (1983). "Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome." N Engl J Med **309**(8): 453-8.
- Lapham, C. K., J. Ouyang, et al. (1996). "Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines." Science **274**(5287): 602-5.
- Larder, B. A., B. Chesebro, et al. (1990). "Susceptibilities of zidovudine-susceptible and -resistant human immunodeficiency virus isolates to antiviral agents determined by using a quantitative plaque reduction assay." Antimicrob Agents Chemother **34**(3): 436-41.
- Larkin, M., R. A. Childs, et al. (1989). "Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition." AIDS **3**(12): 793-8.
- Lasky, L. A., G. Nakamura, et al. (1987). "Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor." Cell **50**(6): 975-85.
- Laspia, M. F., A. P. Rice, et al. (1989). "HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation." Cell **59**(2): 283-92.
- Lassen, K., Y. Han, et al. (2004). "The multifactorial nature of HIV-1 latency." Trends Mol Med **10**(11): 525-31.

- Lassen, K. G., K. X. Ramyar, et al. (2006). "Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells." PLoS Pathog **2**(7): e68.
- Lathey, J. L., R. D. Pratt, et al. (1997). "Appearance of autologous neutralizing antibody correlates with reduction in virus load and phenotype switch during primary infection with human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **175**(1): 231-2.
- Lawn, S. D., S. T. Butera, et al. (2001). "Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection." Clin Microbiol Rev **14**(4): 753-77, table of contents.
- Le Guenno, B. M., P. Barabe, et al. (1991). "HIV-2 and HIV-1 AIDS cases in Senegal: clinical patterns and immunological perturbations." J Acquir Immune Defic Syndr **4**(4): 421-7.
- Le Rouzic, E. and S. Benichou (2005). "The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle." Retrovirology **2**: 11.
- Lederman, M. M. and L. Margolis (2008). "The lymph node in HIV pathogenesis." Semin Immunol **20**(3): 187-95.
- Lefrere, J. J., L. Morand-Joubert, et al. (1997). "Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection." Blood **90**(3): 1133-40.
- Lehrman, G., I. B. Hogue, et al. (2005). "Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study." Lancet **366**(9485): 549-55.
- Leligdowicz, A., L. M. Yindom, et al. (2007). "Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection." J Clin Invest **117**(10): 3067-74.
- Lemey, P., O. G. Pybus, et al. (2004). "The molecular population genetics of HIV-1 group O." Genetics **167**(3): 1059-68.
- Lenasi, T., X. Contreras, et al. (2008). "Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency." Cell Host Microbe **4**(2): 123-33.
- Levin, A., Z. Hayouka, et al. (2009). "Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration." Protein Eng Des Sel **22**(12): 753-63.
- Levin, A., J. Rosenbluh, et al. (2010). "Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins." Mol Med **16**(1-2): 34-44.
- Levy, Y., C. Durier, et al. (2003). "Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial." AIDS **17**(3): 343-51.
- Lewinski, M. K., D. Bisgrove, et al. (2005). "Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription." J Virol **79**(11): 6610-9.
- Li, J. C., D. C. Lee, et al. (2005). "Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response." FEBS Lett **579**(14): 3055-62.
- Lichterfeld, M., D. E. Kaufmann, et al. (2004). "Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells." J Exp Med **200**(6): 701-12.
- Lindenburg, C. E., I. Stolte, et al. (2002). "Long-term follow-up: no effect of therapeutic vaccination with HIV-1 p17/p24:Ty virus-like particles on HIV-1 disease progression." Vaccine **20**(17-18): 2343-

7.

- Little, S. J., S. Holte, et al. (2002). "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV." N Engl J Med **347**(6): 385-94.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-77.
- Liu, Z., W. G. Cumberland, et al. (1997). "Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **16**(2): 83-92.
- Livingstone, W. J., M. Moore, et al. (1996). "Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group." Lancet **348**(9028): 649-54.
- Llano, M., D. T. Saenz, et al. (2006). "An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration." Science **314**(5798): 461-4.
- Lopes, A. R., A. Jaye, et al. (2003). "Greater CD8+ TCR heterogeneity and functional flexibility in HIV-2 compared to HIV-1 infection." J Immunol **171**(1): 307-16.
- Luban, J., K. L. Bossolt, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B." Cell **73**(6): 1067-78.
- Lusso, P. (2006). "HIV and the chemokine system: 10 years later." EMBO J **25**(3): 447-56.
- Lusso, P., P. L. Earl, et al. (2005). "Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains." J Virol **79**(11): 6957-68.
- MacNeil, A., J. L. Sankale, et al. (2006). "Genomic sites of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) integration: similarities to HIV-1 in vitro and possible differences in vivo." J Virol **80**(15): 7316-21.
- Maertens, G., P. Cherepanov, et al. (2003). "LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells." J Biol Chem **278**(35): 33528-39.
- Mahlknecht, U., I. Dichamp, et al. (2008). "NF-kappaB-dependent control of HIV-1 transcription by the second coding exon of Tat in T cells." J Leukoc Biol **83**(3): 718-27.
- Maldarelli, F., S. Palmer, et al. (2007). "ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia." PLoS Pathog **3**(4): e46.
- Malim, M. H., J. Hauber, et al. (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." Nature **338**(6212): 254-7.
- Mandl, J. N., A. P. Barry, et al. (2008). "Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections." Nat Med **14**(10): 1077-87.
- Mangeat, B., P. Turelli, et al. (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." Nature **424**(6944): 99-103.
- Marin, M., K. M. Rose, et al. (2003). "HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation." Nat Med **9**(11): 1398-403.

- Markovitz, D. M. (1993). "Infection with the human immunodeficiency virus type 2." Ann Intern Med **118**(3): 211-8.
- Markovitz, D. M., M. Hannibal, et al. (1990). "Differential regulation of human immunodeficiency viruses (HIVs): a specific regulatory element in HIV-2 responds to stimulation of the T-cell antigen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9098-102.
- Marlink, R., P. Kanki, et al. (1994). "Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1." Science **265**(5178): 1587-90.
- Marlink, R. G., D. Ricard, et al. (1988). "Clinical, hematologic, and immunologic cross-sectional evaluation of individuals exposed to human immunodeficiency virus type-2 (HIV-2)." AIDS Res Hum Retroviruses **4**(2): 137-48.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1995). "Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation." J Biol Chem **270**(21): 12335-8.
- Martin, J. A., M. A. Mobberley, et al. (1991). "The inhibitory activity of a peptide derivative against the growth of simian immunodeficiency virus in C8166 cells." Biochem Biophys Res Commun **176**(1): 180-8.
- Martinez-Maza, O., E. Crabb, et al. (1987). "Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity." J Immunol **138**(11): 3720-4.
- Martinez, V., D. Costagliola, et al. (2005). "Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression." J Infect Dis **191**(12): 2053-63.
- Marzio, G., M. Tyagi, et al. (1998). "HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13519-24.
- Masuyama, N., T. Kuronita, et al. (2009). "HM1.24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin." J Biol Chem **284**(23): 15927-41.
- Mavigner, M., P. Delobel, et al. (2009). "HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy." PLoS One **4**(10): e7658.
- Mayol, K., S. Munier, et al. (2007). "Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity." Vaccine **25**(32): 6047-60.
- McKinnell, J. A. and M. S. Saag (2009). "Novel drug classes: entry inhibitors [enfuvirtide, chemokine (C-C motif) receptor 5 antagonists]." Curr Opin HIV AIDS **4**(6): 513-7.
- McKnight, A., M. T. Dittmar, et al. (1998). "A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4." J Virol **72**(5): 4065-71.
- McMichael, A. J. and S. L. Rowland-Jones (2001). "Cellular immune responses to HIV." Nature **410**(6831): 980-7.
- Mehle, A., B. Strack, et al. (2004). "Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway." J Biol Chem **279**(9): 7792-8.
- Mela, C. M., A. Steel, et al. (2007). "Depletion of natural killer cells in the colonic lamina propria of viraemic HIV-1-infected individuals." AIDS **21**(16): 2177-82.
- Mellors, J. W., L. A. Kingsley, et al. (1995). "Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome

- after seroconversion." Ann Intern Med **122**(8): 573-9.
- Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., et al. (1996). "Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma." Science **272**(5265): 1167-70.
- Meylan, P. R., J. C. Guatelli, et al. (1993). "Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages." Virology **193**(1): 138-48.
- Michael, N. L., G. Chang, et al. (1997). "The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **3**(3): 338-40.
- Michael, N. L., T. Mo, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort." J Virol **69**(3): 1868-77.
- Michael, N. L., P. Morrow, et al. (1991). "Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in chronically infected cells is associated primarily with a shift in RNA splicing patterns." J Virol **65**(3): 1291-303.
- Michaels, F. H., N. Hattori, et al. (1993). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vif protein is located in the cytoplasm of infected cells and its effect on viral replication is equivalent in HIV-2." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(10): 1025-30.
- Migueles, S. A., A. C. Laborico, et al. (2002). "HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors." Nat Immunol **3**(11): 1061-8.
- Migueles, S. A., C. M. Osborne, et al. (2008). "Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control." Immunity **29**(6): 1009-21.
- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, et al. (1994). "The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages." J Exp Med **179**(1): 101-13.
- Miura, Y., Y. Koyanagi, et al. (2003). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy." J Med Dent Sci **50**(1): 17-25.
- Miyagi, E., S. Opi, et al. (2007). "Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **81**(24): 13346-53.
- Miyauchi, K., Y. Kim, et al. (2009). "HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes." Cell **137**(3): 433-44.
- Moir, S. and A. S. Fauci (2008). "Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease." J Allergy Clin Immunol **122**(1): 12-9; quiz 20-1.
- Mondy, K. and P. Tebas (2007). "Cardiovascular risks of antiretroviral therapies." Annu Rev Med **58**: 141-55.
- Montano, M. A., C. P. Nixon, et al. (1998). "Dysregulation through the NF-kappaB enhancer and TATA box of the human immunodeficiency virus type 1 subtype E promoter." J Virol **72**(10): 8446-52.
- Montano, M. A., C. P. Nixon, et al. (2000). "Elevated tumor necrosis factor-alpha activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF-kappaB enhancer gain-of-function." J Infect Dis **181**(1): 76-81.
- Montefiori, D. C., R. J. Cornell, et al. (1994). "Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection." Virology **205**(1): 82-92.

- Montefiori, D. C. and J. R. Mascola (2009). "Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need?" Curr Opin HIV AIDS **4**(5): 347-51.
- Morner, A., A. Bjorndal, et al. (1999). "Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage." J Virol **73**(3): 2343-9.
- Morner, A., A. Bjorndal, et al. (2002). "CCR5 or CXCR4 is required for efficient infection of peripheral blood mononuclear cells by promiscuous human immunodeficiency virus type 2 primary isolates." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(3): 193-200.
- Mukerjee, R., B. E. Sawaya, et al. (2007). "Association of p65 and C/EBPbeta with HIV-1 LTR modulates transcription of the viral promoter." J Cell Biochem **100**(5): 1210-6.
- Mullins, C., G. Eisen, et al. (2004). "Highly active antiretroviral therapy and viral response in HIV type 2 infection." Clin Infect Dis **38**(12): 1771-9.
- Muro-Cacho, C. A., G. Pantaleo, et al. (1995). "Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden." J Immunol **154**(10): 5555-66.
- Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells." Nature **326**(6114): 711-3.
- Naif, H. M., S. Li, et al. (1998). "CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection." J Virol **72**(1): 830-6.
- Nakayama, E. E., H. Maegawa, et al. (2006). "A dominant-negative effect of cynomolgus monkey tripartite motif protein TRIM5alpha on anti-simian immunodeficiency virus SIVmac activity of an African green monkey orthologue." Virology **350**(1): 158-63.
- Nakayama, E. E. and T. Shioda (2010). "Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha." Rev Med Virol **20**(2): 77-92.
- Nakayama, E. E., Y. Tanaka, et al. (2004). "A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform." AIDS **18**(5): 729-38.
- Neil, S. and P. Bieniasz (2009). "Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon." J Interferon Cytokine Res **29**(9): 569-80.
- Neil, S. J., T. Zang, et al. (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." Nature **451**(7177): 425-30.
- Nelson, D. E., A. E. Ihekwaba, et al. (2004). "Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression." Science **306**(5696): 704-8.
- Newman, E. N., R. K. Holmes, et al. (2005). "Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity." Curr Biol **15**(2): 166-70.
- Nicholson, J. K., G. D. Cross, et al. (1986). "In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV)." J Immunol **137**(1): 323-9.
- Nilsson, J., S. Kinloch-de-Loes, et al. (2007). "Early immune activation in gut-associated and peripheral lymphoid tissue during acute HIV infection." AIDS **21**(5): 565-74.
- Nkengasong, J. N., C. Adje-Toure, et al. (2004). "HIV antiretroviral drug resistance in Africa." AIDS Rev **6**(1): 4-12.

- Nomaguchi, M., M. Fujita, et al. (2008). "Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis." *Microbes Infect* **10**(9): 960-7.
- Norrgrén, H., Z. J. Da Silva, et al. (1998). "Clinical features, immunological changes and mortality in a cohort of HIV-2-infected individuals in Bissau, Guinea-Bissau." *Scand J Infect Dis* **30**(4): 323-9.
- Norris, P. J., H. F. Moffett, et al. (2004). "Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells." *J Virol* **78**(16): 8844-51.
- Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, I. N. d. S. D. R. J.* (2010). "INFECÇÃO VIH/SIDA - Situação em Portugal -31 de Dezembro de 2009." *Documento SIDA nº 141*.
- Nunnari, G. and R. J. Pomerantz (2005). "IL-7 as a potential therapy for HIV-1-infected individuals." *Expert Opin Biol Ther* **5**(11): 1421-6.
- Nunnari, G., J. A. Smith, et al. (2008). "HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier?" *J Exp Clin Cancer Res* **27**: 3.
- Nuvor, S. V., M. van der Sande, et al. (2006). "Natural killer cell function is well preserved in asymptomatic human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection but similar to that of HIV-1 infection when CD4 T-cell counts fall." *J Virol* **80**(5): 2529-38.
- Obbard, D. J., K. H. Gordon, et al. (2009). "The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1513): 99-115.
- Ogg, G. S., X. Jin, et al. (1998). "Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA." *Science* **279**(5359): 2103-6.
- Okoye, A., M. Meier-Schellersheim, et al. (2007). "Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection." *J Exp Med* **204**(9): 2171-85.
- Okulicz, J. F., V. C. Marconi, et al. (2009). "Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study." *J Infect Dis* **200**(11): 1714-23.
- Onyango, C. O., A. Leligidowicz, et al. (2010). "HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort." *Vaccine* **28 Suppl 2**: B60-7.
- Orenstein, J. M., C. Fox, et al. (1997). "Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections." *Science* **276**(5320): 1857-61.
- Osborn, L., S. Kunkel, et al. (1989). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7): 2336-40.
- Ostrowski, S. R., T. L. Katzenstein, et al. (2008). "Residual viraemia in HIV-1-infected patients with plasma viral load  $\leq 20$  copies/ml is associated with increased blood levels of soluble immune activation markers." *Scand J Immunol* **68**(6): 652-60.
- Pagans, S., A. Pedal, et al. (2005). "SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation." *PLoS Biol* **3**(2): e41.
- Paiardini, M., I. Frank, et al. (2008). "Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis." *AIDS Rev* **10**(1): 36-46.
- Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, et al. (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." *N Engl J Med* **338**(13): 853-60.



- Palmer, S., F. Maldarelli, et al. (2008). "Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3879-84.
- Pancio, H. A., N. Vander Heyden, et al. (2000). "The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells." J Virol **74**(13): 6162-7.
- Pang, S., Y. Koyanagi, et al. (1990). "High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients." Nature **343**(6253): 85-9.
- Pantaleo, G., O. J. Cohen, et al. (1998). "Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy." Nat Med **4**(3): 341-5.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1991). "Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9838-42.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1993). "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." Nature **362**(6418): 355-8.
- Pantaleo, G. and R. A. Koup (2004). "Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know." Nat Med **10**(8): 806-10.
- Pantaleo, G., S. Menzo, et al. (1995). "Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection." N Engl J Med **332**(4): 209-16.
- Panther, L. A., R. W. Coombs, et al. (1998). "Unintegrated circular HIV-1 DNA in the peripheral mononuclear cells of HIV-1-infected subjects: association with high levels of plasma HIV-1 RNA, rapid decline in CD4 count, and clinical progression to AIDS." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **17**(4): 303-13.
- Paranjpe, S., J. Craig, et al. (2002). "Subcompartmentalization of HIV-1 quasispecies between seminal cells and seminal plasma indicates their origin in distinct genital tissues." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(17): 1271-80.
- Patick, A. K., H. Mo, et al. (1996). "Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 292-7.
- Pauza, C. D. and T. M. Price (1988). "Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis." J Cell Biol **107**(3): 959-68.
- Pauza, C. D., P. Trivedi, et al. (1994). "2-LTR circular viral DNA as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo." Virology **205**(2): 470-8.
- Pearson, R., Y. K. Kim, et al. (2008). "Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency." J Virol **82**(24): 12291-303.
- Pedroza-Martins, L., K. B. Gurney, et al. (1998). "Differential tropism and replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 isolates in thymocytes: coreceptor expression allows viral entry, but productive infection of distinct subsets is determined at the postentry level." J Virol **72**(12): 9441-52.
- Peeters, M., C. Toure-Kane, et al. (2003). "Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials." AIDS **17**(18): 2547-60.
- Pelak, K., D. B. Goldstein, et al. (2010). "Host determinants of HIV-1 control in African Americans." J Infect Dis **201**(8): 1141-9.

- Pereira, L. A., K. Bentley, et al. (2000). "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." Nucleic Acids Res **28**(3): 663-8.
- Perelson, A. S., P. Essunger, et al. (1997). "Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy." Nature **387**(6629): 188-91.
- Permanyer, M., E. Ballana, et al. (2010). "Endocytosis of HIV: anything goes." Trends Microbiol **18**(12): 543-51.
- Perrin, L., L. Kaiser, et al. (2003). "Travel and the spread of HIV-1 genetic variants." Lancet Infect Dis **3**(1): 22-7.
- Persaud, D., Y. Zhou, et al. (2003). "Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers." J Virol **77**(3): 1659-65.
- Phair, J. P. (1994). "Keynote address: variations in the natural history of HIV infection." AIDS Res Hum Retroviruses **10**(8): 883-5.
- Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. (1993). "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." Science **259**(5102): 1749-54.
- Pichova, I., J. Weber, et al. (1997). "Peptide inhibitors of HIV-1 and HIV-2 proteases: a comparative study." Leukemia **11 Suppl 3**: 120-2.
- Pieniazek, D., D. Ellenberger, et al. (1999). "Predominance of human immunodeficiency virus type 2 subtype B in Abidjan, Ivory Coast." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(6): 603-8.
- Pierson, T., T. L. Hoffman, et al. (2000). "Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(17): 7824-33.
- Pierson, T. C., T. L. Kieffer, et al. (2002). "Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication." J Virol **76**(8): 4138-44.
- Piguet, V. and R. M. Steinman (2007). "The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways." Trends Immunol **28**(11): 503-10.
- Planelles, V., J. B. Jowett, et al. (1996). "Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses." J Virol **70**(4): 2516-24.
- Plantier, J. C., M. Leoz, et al. (2009). "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas." Nat Med **15**(8): 871-2.
- Poccia, F., S. Boullier, et al. (1996). "Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons." J Immunol **157**(1): 449-61.
- Poggi, A. and M. R. Zocchi (2006). "HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B." Clin Dev Immunol **13**(2-4): 369-72.
- Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 Rev protein." Annu Rev Microbiol **52**: 491-532.
- Pomerantz, R. J. and D. L. Horn (2003). "Twenty years of therapy for HIV-1 infection." Nat Med **9**(7): 867-73.
- Pomerantz, R. J., D. Trono, et al. (1990). "Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency." Cell **61**(7): 1271-6.
- Popov, S., M. Rexach, et al. (1998). "Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex." EMBO J **17**(4): 909-17.

- Popper, S. J., A. D. Sarr, et al. (1999). "Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2." *J Infect Dis* **180**(4): 1116-21.
- Potter, S. J., D. E. Dwyer, et al. (2003). "Differential cellular distribution of HIV-1 drug resistance in vivo: Evidence for infection of CD8+T cells during HAART." *Virology* **305**(2): 339-352.
- Poulsen, A. G., P. Aaby, et al. (1997). "9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa." *Lancet* **349**(9056): 911-4.
- Poulsen, A. G., B. Kvinesdal, et al. (1989). "Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa." *Lancet* **1**(8642): 827-31.
- Prada, N. and M. Markowitz (2010). "Novel integrase inhibitors for HIV." *Expert Opin Investig Drugs* **19**(9): 1087-98.
- Preston, B. D., B. J. Poiesz, et al. (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." *Science* **242**(4882): 1168-71.
- Pumfery, A., L. Deng, et al. (2003). "Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription." *Curr HIV Res* **1**(3): 343-62.
- Pyronnet, S. and N. Sonenberg (2001). "Cell-cycle-dependent translational control." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 13-8.
- Qi, X., Y. Koya, et al. (2007). "Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4+ T cells: involvement of NF-kappaB activation." *Virology* **361**(2): 325-34.
- Rabson, A. B. and M. A. Martin (1985). "Molecular organization of the AIDS retrovirus." *Cell* **40**(3): 477-80.
- Ramirez, B. C., E. Simon-Loriere, et al. (2008). "Implications of recombination for HIV diversity." *Virus Res* **134**(1-2): 64-73.
- Ranki, A., A. Lagerstedt, et al. (1994). "Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines." *Arch Virol* **139**(3-4): 365-78.
- Reeves, J. D., S. Hibbitts, et al. (1999). "Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo." *J Virol* **73**(9): 7795-804.
- Refsland, E. W., M. D. Stenglein, et al. (2010). "Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction." *Nucleic Acids Res* **38**(13): 4274-84.
- Rethi, B., N. Vivar, et al. (2009). "Limited efficiency of endogenous interleukin-7 levels in T cell reconstitution during HIV-1 infection: will exogenous interleukin-7 therapy work?" *AIDS* **23**(7): 745-55.
- Ribeiro, A. C., A. Maia e Silva, et al. (2005). "Functional analysis of Vif protein shows less restriction of human immunodeficiency virus type 2 by APOBEC3G." *J Virol* **79**(2): 823-33.
- Ribeiro, A. C., J. Moniz Pereira, et al. (1998). "HIV type 2 Vif proteins have specific conserved amino acid motifs." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**(5): 465-9.
- Rich, E. A., I. S. Chen, et al. (1992). "Increased susceptibility of differentiated mononuclear phagocytes to productive infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)." *J Clin Invest* **89**(1): 176-83.

- Richman, D. D., D. M. Margolis, et al. (2009). "The challenge of finding a cure for HIV infection." Science **323**(5919): 1304-7.
- Richman, D. D., T. Wrin, et al. (2003). "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4144-9.
- Richter, S., Y. H. Ping, et al. (2002). "TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7928-33.
- Rinaldo, C., X. L. Huang, et al. (1995). "High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors." J Virol **69**(9): 5838-42.
- Roberts, J. D., K. Bebenek, et al. (1988). "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1." Science **242**(4882): 1171-3.
- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." Science **288**(5463): 55-6.
- Rodes, B., A. Holguin, et al. (2000). "Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy." J Clin Microbiol **38**(4): 1370-4.
- Rodriguez, S. K., A. D. Sarr, et al. (2007). "Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections." J Virol **81**(10): 5331-8.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, et al. (1997). "Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia." Science **278**(5342): 1447-50.
- Ross, S. R. (2009). "Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species?" PLoS Pathog **5**(4): e1000347.
- Rossi, A., R. Mukerjee, et al. (2006). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat prevents dephosphorylation of Sp1 by TCF-4 in astrocytes." J Gen Virol **87**(Pt 6): 1613-23.
- Rowland-Jones, S. L., T. Dong, et al. (1998). "Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi." J Clin Invest **102**(9): 1758-65.
- Rowland-Jones, S. L. and H. C. Whittle (2007). "Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1?" Nat Immunol **8**(4): 329-31.
- Saez-Cirion, A., G. Pancino, et al. (2007). "HIV controllers: how do they tame the virus?" Trends Immunol **28**(12): 532-40.
- Saez-Cirion, A., M. Sinet, et al. (2009). "Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses." J Immunol **182**(12): 7828-37.
- Sailaja, G., I. Skountzou, et al. (2007). "Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells." Virology **362**(2): 331-41.
- Saksela, K., C. Stevens, et al. (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 mRNA expression in peripheral blood cells predicts disease progression independently of the numbers of CD4+ lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 1104-8.
- Saksela, K., C. E. Stevens, et al. (1995). "HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS." Ann Intern Med **123**(9): 641-8.
- Saltarelli, M. J., E. Hadziyannis, et al. (1996). "Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA

- splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals." *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(15): 1443-56.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." *Nature* **382**(6593): 722-5.
- Saphire, A. C., M. D. Bobardt, et al. (2001). "Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages." *J Virol* **75**(19): 9187-200.
- Sattentau, Q. J., P. R. Clapham, et al. (1988). "The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule." *AIDS* **2**(2): 101-5.
- Sayah, D. M., E. Sokolskaja, et al. (2004). "Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1." *Nature* **430**(6999): 569-73.
- Schafer, J. J. and K. E. Squires (2010). "Integrase inhibitors: a novel class of antiretroviral agents." *Ann Pharmacother* **44**(1): 145-56.
- Schim van der Loeff, M. F. and P. Aaby (1999). "Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2." *AIDS* **13 Suppl A**: S69-84.
- Schindler, M., J. Munch, et al. (2006). "Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1." *Cell* **125**(6): 1055-67.
- Schneider, E., S. Whitmore, et al. (2008). "Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years--United States, 2008." *MMWR Recomm Rep* **57**(RR-10): 1-12.
- Schrier, R. D., J. A. McCutchan, et al. (1993). "Mechanisms of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages." *J Virol* **67**(10): 5713-20.
- Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." *Cell* **110**(4): 521-9.
- Schuitemaker, H., M. Koot, et al. (1992). "Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population." *J Virol* **66**(3): 1354-60.
- Schulbin, H., H. Bode, et al. (2008). "Cytokine expression in the colonic mucosa of human immunodeficiency virus-infected individuals before and during 9 months of antiretroviral therapy." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(9): 3377-84.
- Sebastian, S. and J. Luban (2005). "TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid." *Retrovirology* **2**: 40.
- Sedaghat, A. R., J. German, et al. (2008). "Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics." *J Virol* **82**(4): 1870-83.
- Selig, L., J. C. Pages, et al. (1999). "Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses." *J Virol* **73**(1): 592-600.
- Services, (2009). "Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents": 1-161
- Seshamma, T., O. Bagasra, et al. (1992). "Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of

- certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10663-7.
- Sharkey, M. E., I. Teo, et al. (2000). "Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy." Nat Med **6**(1): 76-81.
- Sharova, N., C. Swingle, et al. (2005). "Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans." EMBO J **24**(13): 2481-9.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-50.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2003). "The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif." Nat Med **9**(11): 1404-7.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-45.
- Shi, Y., E. Brandin, et al. (2005). "Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation." J Gen Virol **86**(Pt 12): 3385-96.
- Silvestri, G., A. Fedanov, et al. (2005). "Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts." J Virol **79**(7): 4043-54.
- Silvestri, G. and M. B. Feinberg (2003). "Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection." J Clin Invest **112**(6): 821-4.
- Silvestri, G., D. L. Sodora, et al. (2003). "Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia." Immunity **18**(3): 441-52.
- Simmons, A., V. Aluvihare, et al. (2001). "Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators." Immunity **14**(6): 763-77.
- Simon, F., S. Matheron, et al. (1993). "Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2." AIDS **7**(11): 1411-7.
- Simon, J. H., R. A. Fouchier, et al. (1997). "The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells." J Virol **71**(7): 5259-67.
- Simon, J. H. and M. H. Malim (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes." J Virol **70**(8): 5297-305.
- Slobod, K. S., T. A. Bennett, et al. (1996). "Mobilization of CD34+ progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in human immunodeficiency virus type 1-infected adults." Blood **88**(9): 3329-35.
- Smed-Sorensen, A., K. Lore, et al. (2005). "Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Virol **79**(14): 8861-9.
- Smith, B. A., S. Gartner, et al. (2001). "Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells." Journal of Immunology **166**(1): 690-696.
- Smith, M. W., M. Dean, et al. (1997). "Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study." Science **277**(5328): 959-65.

- Smith, N. A., T. Shaw, et al. (2001). "Antiretroviral therapy for HIV-2 infected patients." *J Infect* **42**(2): 126-33.
- Smith, P. D., G. Meng, et al. (2003). "Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir." *J Leukoc Biol* **74**(5): 642-9.
- Sodora, D. L. and G. Silvestri (2008). "Immune activation and AIDS pathogenesis." *AIDS* **22**(4): 439-46.
- Song, B., B. Gold, et al. (2005). "The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates." *J Virol* **79**(10): 6111-21.
- Song, B., H. Javanbakht, et al. (2005). "Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates." *J Virol* **79**(7): 3930-7.
- Sonza, S., H. P. Mutimer, et al. (2002). "Selectively reduced tat mRNA heralds the decline in productive human immunodeficiency virus type 1 infection in monocyte-derived macrophages." *J Virol* **76**(24): 12611-21.
- Soriano, V., P. Gomes, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load." *J Med Virol* **61**(1): 111-6.
- Soros, V. B., W. Yonemoto, et al. (2007). "Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H." *PLoS Pathog* **3**(2): e15.
- Soumelis, V., I. Scott, et al. (2001). "Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients." *Blood* **98**(4): 906-12.
- Sousa, A. E., J. Carneiro, et al. (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." *J Immunol* **169**(6): 3400-6.
- Spina, C. A., T. J. Kwoh, et al. (1994). "The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes." *J Exp Med* **179**(1): 115-23.
- Srinivas, S. K., R. V. Srinivas, et al. (1992). "Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein." *J Biol Chem* **267**(10): 7121-7.
- Stacey, A. R., P. J. Norris, et al. (2009). "Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections." *J Virol* **83**(8): 3719-33.
- Stanley, S. K., S. W. Kessler, et al. (1992). "CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals." *J Immunol* **149**(2): 689-97.
- Staszewski, S., J. Morales-Ramirez, et al. (1999). "Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team." *N Engl J Med* **341**(25): 1865-73.
- Stellbrink, H. J., J. van Lunzen, et al. (2002). "Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial)." *AIDS* **16**(11): 1479-87.
- Stetson, D. B. and R. Medzhitov (2006). "Type I interferons in host defense." *Immunity* **25**(3): 373-81.
- Stettner, M. R., J. A. Nance, et al. (2009). "SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency

- virus type 1." J Gen Virol **90**(Pt 8): 2005-14.
- Stewart, S. A., B. Poon, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation." J Virol **74**(7): 3105-11.
- Stiegler, G., R. Kunert, et al. (2001). "A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1." AIDS Res Hum Retroviruses **17**(18): 1757-65.
- Stoddart, C. A., R. Geleziunas, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis." J Virol **77**(3): 2124-33.
- Stoddart, C. A., M. E. Keir, et al. (2010). "IFN-alpha-induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo." PLoS Pathog **6**(2): e1000766.
- Stolk, L. M. and J. F. Luers (2004). "Increasing number of anti-HIV drugs but no definite cure. Review of anti-HIV drugs." Pharm World Sci **26**(3): 133-6.
- Strain, M. C., H. F. Gunthard, et al. (2003). "Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4819-24.
- Strathdee, S. A., P. J. Veugelers, et al. (1996). "Lack of consistency between five definitions of nonprogression in cohorts of HIV-infected seroconverters." AIDS **10**(9): 959-65.
- Strebel, K., J. Luban, et al. (2009). "Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication." BMC Med **7**: 48.
- Streeck, H. and D. F. Nixon (2010). "T cell immunity in acute HIV-1 infection." J Infect Dis **202** Suppl 2: S302-8.
- Stremlau, M., M. Perron, et al. (2006). "Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5514-9.
- Sullivan, Y. B., A. L. Landay, et al. (2001). "Upregulation of CD4 on CD8(+) T cells: CD4(dim)CD8(bright) T cells constitute an activated phenotype of CD8(+) T cells." Immunology **103**(3): 270-280.
- Sumpter, B., R. Dunham, et al. (2007). "Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis." J Immunol **178**(3): 1680-91.
- Sune, C. and M. A. Garcia-Blanco (1995). "Sp1 transcription factor is required for in vitro basal and Tat-activated transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat." J Virol **69**(10): 6572-6.
- Svarovskaia, E. S., H. Xu, et al. (2004). "Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs." J Biol Chem **279**(34): 35822-8.
- Swiggard, W. J., C. Baytop, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli." J Virol **79**(22): 14179-88.
- Swingler, S., A. Mann, et al. (1999). "HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages." Nat Med **5**(9): 997-103.
- Taube, R., K. Fujinaga, et al. (1999). "Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation." Virology **264**(2): 245-53.



- Tersmette, M., R. E. de Goede, et al. (1988). "Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex." *J Virol* **62**(6): 2026-32.
- Tersmette, M., R. A. Gruters, et al. (1989). "Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates." *J Virol* **63**(5): 2118-25.
- Tesselaar, K., R. Arens, et al. (2003). "Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions." *Nat Immunol* **4**(1): 49-54.
- Thibault, S., R. Fromentin, et al. (2009). "TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells." *Retrovirology* **6**: 42.
- Tilton, J. C. and R. W. Doms (2010). "Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection." *Antiviral Res* **85**(1): 91-100.
- Tindall, B., S. Barker, et al. (1988). "Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection." *Arch Intern Med* **148**(4): 945-9.
- Tindall, B. and D. A. Cooper (1991). "Primary HIV infection: host responses and intervention strategies." *AIDS* **5**(1): 1-14.
- Tomasselli, A. G., J. O. Hui, et al. (1990). "Specificity and inhibition of proteases from human immunodeficiency viruses 1 and 2." *J Biol Chem* **265**(24): 14675-83.
- Triboulet, R., B. Mari, et al. (2007). "Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication." *Science* **315**(5818): 1579-82.
- Tristem, M., C. Marshall, et al. (1992). "Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr." *EMBO J* **11**(9): 3405-12.
- Trkola, A., T. Dragic, et al. (1996). "CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5." *Nature* **384**(6605): 184-7.
- Trkola, A., M. Purtscher, et al. (1996). "Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **70**(2): 1100-8.
- Troyer, R. M., J. McNevin, et al. (2009). "Variable fitness impact of HIV-1 escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000365.
- Tsubota, H., D. J. Ringler, et al. (1989). "Cd8+Cd4- Lymphocyte Lines Can Harbor the AIDS Virus In vitro." *Journal of Immunology* **143**(3): 858-863.
- Tuaille, E., M. Gueudin, et al. (2004). "Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups." *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**(5): 1543-9.
- Turner, B. G. and M. F. Summers (1999). "Structural biology of HIV." *J Mol Biol* **285**(1): 1-32.
- Tyagi, M., R. J. Pearson, et al. (2010). "Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction." *J Virol* **84**(13): 6425-37.
- Ueno, F., H. Shiota, et al. (2003). "Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells." *Microbes Infect* **5**(5): 387-95.

- Vacca, J. P., B. D. Dorsey, et al. (1994). "L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 4096-100.
- Van Damme, N., D. Goff, et al. (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." Cell Host Microbe **3**(4): 245-52.
- Van Maele, B. and Z. Debyser (2005). "HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins." AIDS Rev **7**(1): 26-43.
- Vandegraaff, N., E. Devroe, et al. (2006). "Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication." Virology **346**(2): 415-26.
- Vartanian, J. P., D. Guetard, et al. (2008). "Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions." Science **320**(5873): 230-3.
- Vartanian, J. P., M. Henry, et al. (2010). "Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis." PLoS Pathog **6**(5): e1000928.
- Veazey, R. S., M. DeMaria, et al. (1998). "Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection." Science **280**(5362): 427-31.
- Vesonen, M., C. E. Stevens, et al. (1996). "Stability in controlling viral replication identifies long-term nonprogressors as a distinct subgroup among human immunodeficiency virus type 1-infected persons." J Virol **70**(12): 9035-40.
- Vogt, V. M. (2000). "Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander?" Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 12945-7.
- Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." Nat Rev Genet **6**(3): 206-20.
- von Sydow, M., A. Sonnerborg, et al. (1991). "Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection." AIDS Res Hum Retroviruses **7**(4): 375-80.
- Wagner, L., O. O. Yang, et al. (1998). "Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans." Nature **391**(6670): 908-11.
- Walensky, R. P., A. D. Paltiel, et al. (2006). "The survival benefits of AIDS treatment in the United States." J Infect Dis **194**(1): 11-9.
- Walker, C. M., D. J. Moody, et al. (1986). "CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication." Science **234**(4783): 1563-6.
- Wang, F. X., Y. Xu, et al. (2005). "IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART." J Clin Invest **115**(1): 128-37.
- Wang, G. P., A. Ciuffi, et al. (2007). "HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications." Genome Res **17**(8): 1186-94.
- Wang, J. K., E. Kiyokawa, et al. (2000). "The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 394-9.
- Wang, X., L. Ye, et al. (2009). "Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection." Blood **113**(3): 671-4.

- Wei, S. Q., K. Mizuuchi, et al. (1997). "A large nucleoprotein assembly at the ends of the viral DNA mediates retroviral DNA integration." *EMBO J* **16**(24): 7511-20.
- Wei, X., J. M. Decker, et al. (2003). "Antibody neutralization and escape by HIV-1." *Nature* **422**(6929): 307-12.
- Weinberger, L. S., J. C. Burnett, et al. (2005). "Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity." *Cell* **122**(2): 169-82.
- Weiss, C. D., J. A. Levy, et al. (1990). "Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles." *J Virol* **64**(11): 5674-7.
- Whittle, H., A. Egboga, et al. (1992). "Clinical and laboratory predictors of survival in Gambian patients with symptomatic HIV-1 or HIV-2 infection." *AIDS* **6**(7): 685-9.
- Whittle, H., J. Morris, et al. (1994). "HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients." *AIDS* **8**(11): 1617-20.
- Wiegand, H. L., B. P. Doehle, et al. (2004). "A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins." *EMBO J* **23**(12): 2451-8.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." *J Virol* **66**(1): 226-34.
- Williams, K. C., S. Corey, et al. (2001). "Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS." *J Exp Med* **193**(8): 905-15.
- Williams, K. C. and W. F. Hickey (2002). "Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS." *Annu Rev Neurosci* **25**: 537-62.
- Williams, S. A., L. F. Chen, et al. (2006). "NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation." *EMBO J* **25**(1): 139-49.
- Wiskerchen, M. and M. A. Muesing (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells." *J Virol* **69**(1): 376-86.
- Witvrouw, M., C. Pannecouque, et al. (2004). "Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis." *Antivir Ther* **9**(1): 57-65.
- Witvrouw, M., C. Pannecouque, et al. (1999). "Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV." *AIDS* **13**(12): 1477-83.
- Williams, N. (1998). "Can IL-2 smoke out HIV reservoirs?" *Science* **282**(5393): 1394-5.
- Wong, J. K., M. Hezareh, et al. (1997). "Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia." *Science* **278**(5341): 1291-5.
- Wong, K., A. Sharma, et al. (2005). "HIV-1 Tat interactions with p300 and PCAF transcriptional coactivators inhibit histone acetylation and neurotrophin signaling through CREB." *J Biol Chem* **280**(10): 9390-9.
- Wu, L., N. P. Gerard, et al. (1996). "CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5." *Nature* **384**(6605): 179-83.
- Wu, L. and V. N. KewalRamani (2006). "Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 859-68.

- Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." *Retrovirology* **1**: 13.
- Yamaguchi, J., S. G. Devare, et al. (2000). "Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(9): 925-30.
- Yankulov, K., J. Blau, et al. (1994). "Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators." *Cell* **77**(5): 749-59.
- Yeung, M. L., M. Benkirane, et al. (2007). "Small non-coding RNAs, mammalian cells, and viruses: regulatory interactions?" *Retrovirology* **4**: 74.
- Yeung, M. L., Y. Bennasser, et al. (2005). "Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells." *Retrovirology* **2**: 81.
- Yi, J. S., M. A. Cox, et al. (2010). "T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion." *Immunology* **129**(4): 474-81.
- Yin, L., D. Braaten, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels." *J Virol* **72**(8): 6430-6.
- Ylinen, L. M., Z. Keckesova, et al. (2005). "Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles." *J Virol* **79**(18): 11580-7.
- Younes, S. A., B. Yassine-Diab, et al. (2003). "HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity." *J Exp Med* **198**(12): 1909-22.
- Zack, J. A., S. J. Arrigo, et al. (1990). "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." *Cell* **61**(2): 213-22.
- Zack, J. A., A. M. Haislip, et al. (1992). "Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle." *J Virol* **66**(3): 1717-25.
- Zagury, D., A. Lachgar, et al. (1998). "Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3851-6.
- Zauli, G., D. Milani, et al. (2001). "HIV-1 Tat protein down-regulates CREB transcription factor expression in PC12 neuronal cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/cyclic nucleoside phosphodiesterase pathway." *FASEB J* **15**(2): 483-91.
- Zazzi, M., L. Romano, et al. (1997). "Evaluation of the presence of 2-LTR HIV-1 unintegrated DNA as a simple molecular predictor of disease progression." *J Med Virol* **52**(1): 20-5.
- Zeh, C., D. Pieniazek, et al. (2005). "Nigerian HIV type 2 subtype A and B from heterotypic HIV type 1 and HIV type 2 or monotypic HIV type 2 infections." *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**(1): 17-27.
- Zhang, L., C. Chung, et al. (2000). "Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy." *J Clin Invest* **106**(7): 839-45.
- Zheng, L., Y. D. Yang, et al. (2005). "Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes." *J Zhejiang Univ Sci B* **6**(7): 668-72.
- Zheng, N. N., N. B. Kiviat, et al. (2004). "Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses in HIV-1- and HIV-2-infected individuals in Senegal." *J Virol* **78**(24): 13934-42.

- Zhou, M., L. Deng, et al. (2003). "The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12666-71.
- Zhou, M., M. A. Halanski, et al. (2000). "Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription." Mol Cell Biol **20**(14): 5077-86.
- Zhou, Q., D. Chen, et al. (1998). "Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages." EMBO J **17**(13): 3681-91.
- Zhou, Y., H. Zhang, et al. (2005). "Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells." J Virol **79**(4): 2199-210.
- Zhu, P., J. Liu, et al. (2006). "Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes." Nature **441**(7095): 847-52.
- Zhu, T., D. Muthui, et al. (2002). "Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy." J Virol **76**(2): 707-16.
- Zwick, M. B., A. F. Labrijn, et al. (2001). "Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41." J Virol **75**(22): 10892-905.



## Capítulo 2:

### Objectivos e plano de trabalhos

A infecção pelo HIV-2 é caracterizada por níveis de virémia muito mais baixos do que na infecção pelo HIV-1, no entanto vários estudos têm mostrado que os níveis de DNA proviral são semelhantes nas duas infecções, sugerindo um número semelhante de células infectadas.

**Este trabalho teve por objectivo investigar as razões deste aparente paradoxo e contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no controlo da latência e replicação viral na infecção HIV.**

Os receptores das quimiocinas servem de co-receptores para a entrada do vírus nas células que expressam a molécula CD4. Vários estudos sugerem que apesar do HIV-2 poder utilizar um número maior de co-receptores para infectar as células alvo, o CCR5 e o CXCR4 são os principais co-receptores utilizados *in vivo* por ambos os vírus. É plausível que diferentes níveis de expressão destes co-receptores *in vivo*, bem como que diferenças na capacidade do HIV-2 infectar diferentes sub-populações T possa contribuir para a patogénese distinta da infecção pelo HIV-2.

**O primeiro objectivo específico deste trabalho foi estudar a expressão de CCR5 e de CXCR4, assim como os níveis de DNA proviral em subpopulações de células T durante a infecção pelo HIV-2.**

Foram comparados doentes infectados pelo HIV-2 e pelo HIV-1, que não se encontravam sob terapêutica anti-retroviral e não apresentavam infecções oportunistas ou tumores. Para este objectivo as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas do sangue periférico e foram sorteadas células T CD4 naive e de memória, uma vez que todos os estudos anteriores de quantificação do DNA proviral foram efectuados em células mononucleares do sangue periférico não separadas. A expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 foi analisada quer nos PBMC quer nas subpopulações por citometria de fluxo e os níveis de DNA proviral foram quantificados por PCR em tempo real. Estes resultados são mostrados no capítulo 3.

O controlo da replicação do HIV é um processo complexo que envolve mecanismos virais e celulares (transcricionais e pós-transcricionais). Para expressão dos genes do HIV, alguns transcritos virais sofrem processamento por *splicing* a partir de um mRNA precursor. Na infecção pelo HIV-1, a fase de infecção primária é caracterizada por um aumento inicial dos transcritos que sofrem processamento (*multiply spliced*) e que codificam para as proteínas reguladoras, ao qual se segue um aumento dos transcritos não processados e de tamanho completo (*unspliced*). Os estudos existentes sugerem que na infecção pelo HIV-1, as células recentemente infectadas apresentam maiores níveis expressão de transcritos *multiply spliced*. É possível que os níveis significativos de DNA proviral encontrado nos doentes HIV-2 representem maioritariamente vírus latente sendo importante clarificar se a ausência de níveis significativos de virémia nestes doentes se deve a um bloqueio transcricional ou se deve a um controlo pós-transcricional.



**O segundo objectivo específico deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias que permitam a análise da actividade transcripcional do HIV-2 através da quantificação de transcritos *unspliced* (mRNA de *gag*) e transcritos *multiply spliced* (mRNA de *tat*).**

Para a análise de expressão dos transcritos *unspliced* e *multiply spliced* foram desenvolvidos testes para a quantificação de mRNA de *gag* e *tat*, de HIV-2 e de HIV-1. Foram optimizadas e comparadas estratégias de quantificação baseadas em *one-step* e *two-step* RT-qPCR em tempo real, e testadas varias variáveis metodológicas, nomeadamente o uso de diferentes condições de *priming* da reacção de transcrição reversa, o tipo e a concentração de *template* nas reacções de RT-qPCR e a utilização de curvas de calibração com cRNA (que permitiria a quantificação absoluta) ou com DNA (para quantificação relativa). Os protocolos para a extracção do mRNA e quantificação dos transcritos virais foram extensamente optimizados de forma a obter a máxima sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade, conforme se mostra no capítulo 4.

**O terceiro objectivo específico deste trabalho foi avaliar os níveis de DNA proviral e de mRNA do *gag* e do *tat* em doentes infectados pelo HIV-2 na ausência e na presença de terapia anti-retroviral e investigar a sua contribuição para a activação imunitária generalizada associada à progressão da infecção pelo HIV-2.**

Como referido anteriormente, existe a possibilidade que nos indivíduos infectados pelo HIV-2 os níveis de virémia baixos ou indetectáveis observados na presença de níveis significativos de DNA proviral se possam dever a uma regulação ao nível da actividade

transcricional, no entanto, não existem estudos que permitam tirar conclusões definitivas sobre essa hipótese. De forma a contribuir para o esclarecimento desta questão, esta última parte do trabalho teve como objectivo a avaliação da carga viral intracelular através da quantificação dos níveis de DNA proviral e de mRNA de *gag* e de *tat* em indivíduos infectados pelo do HIV-2 ou pelo HIV-1 e a análise do contributo desta carga viral intracelular para a activação imunológica e desta forma para a progressão da doença associada à infecção pelo HIV-2.

Em estudos anteriores o nosso laboratório mostrou que doentes infectados pelo HIV-1 e doentes infectados pelo HIV-2, com níveis semelhantes de depleção de células T CD4, apresentavam um aumento semelhante dos marcadores de activação das células T CD4 e CD8, apesar dos doentes infectados pelo HIV-2 apresentarem níveis de virémia significativamente mais baixos que os doentes infectados pelo HIV-1. De forma a testar a possibilidade da activação imunitária estar directamente relacionada com os níveis de DNA proviral e/ou com a expressão de mRNA virais, foi investigada a relação dos níveis de DNA proviral, virémia, e de mRNA virais *gag* e *tat* com vários marcadores de activação das células T. Os indivíduos infectados pelo HIV-2 tratados com terapia anti-retroviral apresentam geralmente uma reduzida resposta á terapêutica. Em estudos realizados em doentes HIV-1 tratados com terapêutica anti-retroviral mostraram que esta permitia, na maior parte dos casos, uma diminuição dos níveis de mRNA viral assim como a um decréscimo progressivo dos níveis de DNA proviral e dos níveis de activação imunitária, dados não existentes na infecção pelo HIV-2. Assim, este trabalho teve também por objectivo estudar os efeitos da terapêutica anti-retroviral na carga viral intracelular e investigar a sua relação com os níveis de activação imunitária em doentes infectados pelo HIV-2 tratados. Estes resultados são apresentados no capítulo 5.

De acordo com o previsto no decreto-Lei 388/70, artº. 8º, parágrafo 2, os resultados apresentados encontram-se publicados ou em processo de publicação nos seguintes artigos:

**Soares R**, Foxall R, Albuquerque A, Cortesao C, Garcia M, Victorino RM, Sousa AE. Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Journal of Virology*, 2006, 80 (24): 12425-9

**Rui S. Soares**, Paula Matoso, Marta Calado, Ana E. Sousa. Strategies to quantify unspliced and multiply spliced mRNA expression in HIV-2 infection. *Journal of Virological Methods*, 2011, *submetido*.

**Rui S. Soares**, Rita Tendeiro, Russell B. Foxall, António P. Baptista, Rita Cavaleiro, Perpétua Gomes, Ricardo Camacho, Emília Valadas, Manuela Doroana, Margarida Lucas, Francisco Antunes, Rui M. M. Victorino, Ana E. Sousa. Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients. *Journal of Virology*, 2011, 85 (5): 2429-2438



## Capítulo 3:

### Frequência aumentada de células T CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-2

*Publicação:*

Rui Soares<sup>1</sup>, Russell Foxall<sup>1</sup>, Adriana Albuquerque<sup>1</sup>, Catarina Cortesão<sup>1</sup>, Miguel Garcia<sup>1,2</sup>, Rui M. M. Victorino<sup>1,3</sup>, Ana E. Sousa<sup>1</sup>. **Increased frequency of circulating CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection.** *Journal of Virology*, 2006, 80 (24): 12425-9

<sup>1</sup> Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Quinta da Granja, 2829-511 Monte da Caparica, Portugal

<sup>3</sup> Medicina 2, Hospital de Santa Maria, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-035 Lisboa, Portugal



## **Abstract**

CCR5 expression determines susceptibility to infection, cell tropism and rate of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) disease progression. CCR5 is also considered the major HIV-2 coreceptor *in vivo*, in spite of broad coreceptor use *in vitro*. Here we report a significantly increased proportion of memory-effector CD4 T cells expressing CCR5 in HIV-2-infected patients correlating with CD4 depletion. Moreover, HIV-2 proviral DNA was essentially restricted to memory-effector CD4, suggesting that these are the main targets for HIV-2. Similar levels of proviral DNA were found in the two infection categories. Thus, the reduced viremia and slow rate of CD4 decline that characterize HIV-2 infection seem to be unrelated to coreceptor availability.

## Text

Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) immunodeficiency is characterized by a slow disease progression with limited impact on the survival of the majority of infected adults (20, 33, 45). The rate of CD4<sup>+</sup> T-cell decline is much slower in HIV-2 than in HIV-1 disease, and there is a low plasma viral load irrespective of disease stage (2, 4, 9, 17, 20, 32, 41, 43). The factors contributing to the suggested decreased rate of virus production in HIV-2 infection remain largely unknown.

In spite of the promiscuity of coreceptor usage exhibited by HIV-2 in *in vitro* experimental settings (8, 13, 16, 22, 29, 39, 40), several lines of evidence show that CCR5 and CXCR4 are the major coreceptors for HIV-2 infection *in vivo* (6, 24, 25).

In HIV-1 infected patients, CCR5 expression determines susceptibility to infection, cell tropism and the rate of disease progression and is currently an important target of new antiretroviral drugs (10, 11, 21, 27, 34, 35).

There are scanty data available on CCR5 and CXCR4 expression in HIV-2-infected patients. A previous study of a Senegalese cohort reported lower CCR5 expression in HIV-2 than in HIV-1 infection, but as these patients, unlike our cohorts, were not stratified according to CD4 depletion or viremia, direct comparison is problematic (38).

We analyzed here the CCR5 and CXCR4 expression in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from untreated HIV-2 and HIV-1-infected subjects who were currently living in Portugal and attending outpatient clinics in Lisbon and who exhibited no known ongoing opportunistic infections or tumours. The epidemiological and clinical features of these cohorts, as well as of healthy controls, are summarized in Table 1. Of note, HIV-2 and HIV-1 cohorts exhibited similar levels of CD4 depletion but striking differences in viremia.



TABLE 1. Cohort characterization

Characteristics	Healthy controls	HIV-2 <sup>+</sup> patients <sup>c</sup>	HIV-1 <sup>+</sup> patients <sup>c</sup>
No. of subjects (male/female)	21 (9/12)	22 (6/16)	23 (10/13)
Age (yr) <sup>a</sup>	42±4 (21-84)	46±3 (21-64)	37±3 (20-68)
Ethnicity			
White	17	8	13
Other	4	14	10
HIV transmission category			
Heterosexual	n.a. <sup>b</sup>	17	18
Homosexual or bisexual	n.a.	1	3
Intravenous drug user	n.a.	1	2
Blood transfusion	n.a.	3	0
CD3 count (cells/μL) <sup>a</sup>	1844±165 (767-3488)	1305±119 (427-2629) <sup>*</sup>	1454±158 (378-3554) <sup>*</sup>
% CD3 <sup>a</sup>	73±1.8 (58-84)	71±2.3 (48-87)	74±1.9 (55-90)
CD4 count (cells/μL) <sup>a</sup>	1174±108 (581-2387)	551±73 (38-1207) <sup>***</sup>	498±61 (86-1300) <sup>***</sup>
% CD4 <sup>a</sup>	46 ± 1.8 (33-64)	29±2.8 (4-49) <sup>***</sup>	28±2.4 (9-52) <sup>***</sup>
CD8 count (cells/μL) <sup>a</sup>	632±71 (234-1236)	729±76 (180-1456)	861±100 (269-2007)
% CD8 <sup>a</sup>	24±1.5 (13-38)	40±2.9 (24-70) <sup>***</sup>	44±2.4 (28-64) <sup>***</sup>
Viremia (RNA; no. of copies/ml) <sup>a</sup>	n.a.	409±190 (200-4006) <sup>d</sup>	75508 ± 30429 (118-548631) <sup>e</sup>
Proviral DNA (copies/10 <sup>6</sup> PBMC) <sup>a</sup>	n.a.	1760±823 (5-10725) <sup>f</sup>	2481±863 (61-12565) <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Data are mean±standard errors of the means with limits in brackets.

<sup>b</sup>n.a., not applicable.

<sup>c</sup>Significance in comparison with healthy control results is represented as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ . There were no significant differences between the HIV-2 and HIV-1 cohorts except for the viremia results ( $P < 0.0001$ ).

<sup>d</sup>HIV2 viremia was quantified by a reverse transcriptase PCR-based test (41); the results were below 200 RNA copies/ml (cutoff) in 19 out of the 21 patients studied. In these cases the cutoff value was used.

<sup>e</sup>HIV-1 viremia was quantified by reverse transcriptase PCR (Ultrasensitive Test; Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). The cutoff was of 50 RNA copies/ml.

<sup>f</sup>Proviral DNA was quantified by real-time PCR and was detected in all 17 HIV-2-infected patients and all 16 HIV-1-infected patients investigated.

CCR5 and CXCR4 expression were assessed by flow cytometry in freshly isolated PBMC as previously described (42).

HIV-2-positive patients exhibited a higher frequency of CCR5<sup>+</sup> cells within CD4<sup>+</sup> subset that reaches statistical than that seen with healthy subjects (Fig. 1A). In HIV-2

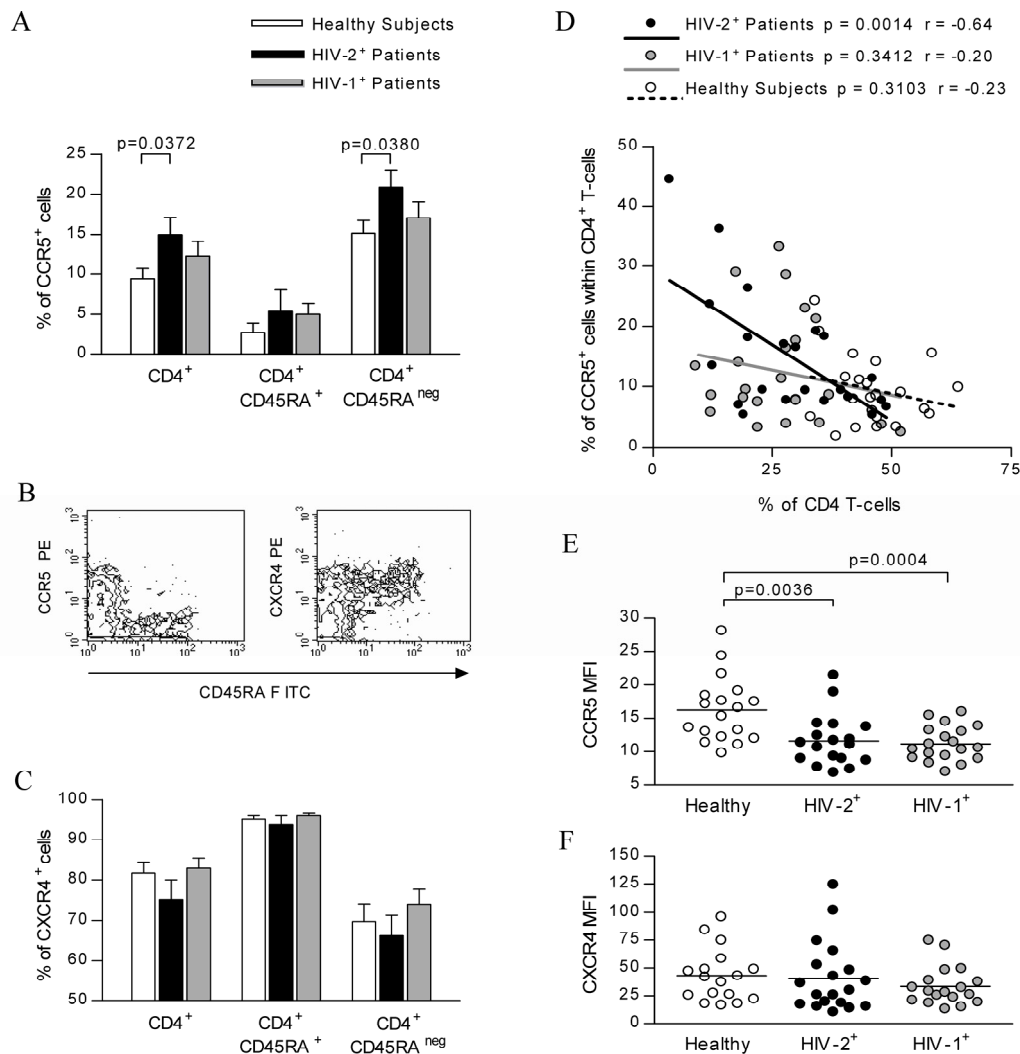
patients CCR5 expression was also largely confined to the memory CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> population, as illustrated in the representative contour plot of Fig. 1B.

The frequency of CXCR4<sup>+</sup> cells within CD4 T cells showed no significant differences between the three cohorts, although there was a trend to lower frequencies in the HIV-2 cohort in both the naïve and memory subsets (Fig. 1C).

A significant correlation between the frequency of CCR5<sup>+</sup> cells within the CD4 subset and the degree of CD4 depletion was observed with the HIV-2 cohort that was not observed with HIV-1-positive patients (Fig. 1D).

We have previously shown that CD4 depletion is directly linked to immune activation in both HIV-2 and HIV-1 infections in spite of the striking differences in viremia (15, 42). Since CCR5 is up-regulated upon T-cell activation, we looked for a possible correlation between the frequency of CCR5<sup>+</sup> cells and the expression of HLA-DR, a marker widely used to quantify immune activation in HIV disease (15). A significant correlation was observed with the HIV-2 cohort ( $r=0.68$ ;  $P=0.0009$ ), that was not found with HIV-1-positive patients ( $r=0.25$ ;  $P=0.2814$ ).

These data illustrated the link between the expansion of CCR5<sup>+</sup> cells and immune activation in HIV-2 infection. The lower frequency of circulating CCR5<sup>+</sup> cells in HIV-1 infection than in HIV-2 despite the similar heightened immune activation may be related to a continuous depletion of the CCR5 pool in association with the high viremia (19, 23).



**Fig. 1. CCR5 and CXCR4 expression in circulating CD4<sup>+</sup> T-cells from HIV-2 and HIV-1 infected patients as well as healthy controls.** Freshly isolated PBMC were surface stained with anti-CCR5 (clone 2D7) or anti-CXCR4 (clone 12G5) monoclonal antibodies (phycoerythrin conjugated; BD Biosciences, San Jose, CA), acquired, and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer using Cellquest software (BD Biosciences). Percentages of CCR5- and CXCR4- expressing cells within total CD4 T cells (CD4<sup>+</sup>), a naïve CD4 subset (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) and a memory CD4 subset (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>) are shown in panels A and C, respectively. Bars represent mean  $\pm$  standard errors of the means. Representative contour plots of the flow cytometric analysis of CD4<sup>+</sup> gated T cells of a HIV-2-infected patient with 291 CD4<sup>+</sup> T cells/ $\mu$ l are illustrated in panel B. (D) Correlation between the percentage of CCR5<sup>+</sup> cells within the CD4 subset and the frequency of circulating CD4<sup>+</sup> T-cells. Each dot represents one individual. The Pearson correlation coefficients for the different cohorts are shown. The median fluorescence intensity (MedianFI) of the whole population of CCR5- and CXCR4-expressing CD4<sup>+</sup> T cells are shown in panels E and F, respectively. Each dot represents one individual; bars represent means. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). The data were compared using an unpaired *t* test. Spearman's correlation coefficients were used to determine the correlation between two variables. *P* values  $<0.05$  were considered significant and are depicted in the figure.

The frequency of CCR5<sup>+</sup> cells may be underestimated due to binding-induced receptor internalization (26, 30). In fact, the assessment of the median fluorescence intensity (MedianFI) of CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells revealed a similar and significant down-regulation for both HIV-2 and HIV-1-infected cohorts in comparison with the results seen with healthy subjects (Fig. 1E). This contrasts with the absence of differences in MedianFI of CXCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells for the three cohorts (Fig. 1F). It is noteworthy that HIV-2 infection has been associated with high levels of production of RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  (1, 18, 28), possibly contributing to the CCR5 down-regulation.

In order to exclude the possibility that CCR5 $\Delta$ 32 mutations contribute to the low MedianFI of CCR5 (44), we screened the cohorts for the presence of this allele using the primers described in Table 2. None of the HIV-2 or HIV-1 infected patients exhibited the CCR5 $\Delta$ 32 allele. There were five healthy subjects heterozygous for CCR5 $\Delta$ 32. The exclusion of these individuals from the analysis resulted in an even more significant difference in the results of down-regulation of CCR5 MedianFI between both HIV cohorts and healthy subjects ( $P=0.0019$  for HIV-2 and  $P<0.0001$  for HIV-1).

On the other hand, despite differing levels of viremia, we did not find significant differences between HIV-2 and HIV-1 proviral DNA, suggesting the presence of similar numbers of infected cells in the two infection categories (Table 1), in agreement with previous reports (3-5, 14, 31). Proviral DNA was assessed by absolute quantitative real-time PCR in ABIPRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) with a detection range of 7 orders of magnitude and a sensitivity of five copies. Reactions containing 150 ng of genomic DNA extracted from 10<sup>6</sup> PBMC by use of an ABIPRISM 6100 nucleic acid extractor (Applied Biosystems), 25  $\mu$ l of Platinum quantitative PCR

SuperMix-UDG, 1 µl ROX reference dye (Invitrogen) (50X), 5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 300 nM primer (each), and 200 nM probe (Table 2) were run in duplicate. Albumin was used to standardize DNA input.

TABLE 2. Primer and probe sequences<sup>a</sup>

Primer or probe	Sequence <sup>b</sup>
<b>HIV-2</b>	
Forward primer..	5'- cgc gag aaa ctc cgt ctt g - 3'
Reverse primer...	5'- cac aca ata tgt ttt agc ctg tac ttt tt - '3'
Probe.....	5'- FAM - ccg ggc cgt aac ct - MGB - 3'
<b>HIV-1</b>	
Forward primer..	5'- ggg aga att aga tcg atg gga aa - 3'
Reverse primer...	5'- ctg ctt gcc cat act ata tgt ttt aat tta - 3'
Probe.....	5'- FAM- ccc tgg cct taa ccg aat t -MGB- 3'
<b>Albumin</b>	
Forward primer..	5'- tgc atg aga aaa cgc cag taa - 3'
Reverse primer...	5'- atg gtc gcc tgt tca cca a- 3'
Probe.....	5'- FAM- tca cca aat gct gca cag a - MGB - 3'
<b>CCR5<sup>c</sup></b>	
Forward primer..	5'-ttc att aca cct gca gct ct- 3'
Reverse primer...	5'-cac agc cct gtg cct ctt ctt ctc att tcg- 3'

<sup>a</sup> Primers and probes were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) and checked against the Los Alamos HIV database.

<sup>b</sup> FAM, 6-carboxyfluorescein; MGB, minor groove binding.

<sup>c</sup> Fifty nanograms of genomic DNA was amplified by PCR using 25 µl of Platinum PCR supermix (Invitrogen, Carlsbad, Ca), 300 nM primer (each), and 5 mM MgCl<sub>2</sub> and was run on 2% agarose gel with DNA bands stained with ethidium bromide.

It is worth noting that no correlation was found between the frequency of CCR5<sup>+</sup> cells within the CD4 subset and the levels of HIV-2 proviral DNA ( $r=0.08$ ,  $P=0.7483$ ).

In order to evaluate the possibility that the similar levels of proviral DNA in the presence of the dissimilar HIV-1 and HIV-2 viremia results might be due to differences in cell targets, we purified the naïve and the memory CD4 T cells from PBMC of two HIV-2 patients with different levels of CD4 depletion by high-speed cell sorting using FACSaria (BD Biosciences).

As depicted in Table 3, the levels of HIV-2 proviral DNA documented in the naïve subset were minimal. Therefore, these data suggest that memory CD4 T cells are the main targets for HIV-2 infection *in vivo*, reinforcing the idea of a major role of CCR5 coreceptor in HIV-2 infection. This was in agreement with data on HIV-1 infection in which integrated proviruses are preferentially detected within the memory subset (7, 12, 36).

TABLE 3. HIV-2 Proviral DNA in CD4 naïve and memory subsets

Case	No. of copies of proviral DNA/10 <sup>6</sup> PBMC	No. of CD4 cells/ $\mu$ l	Result for indicated subset <sup>a</sup>			
			CD4 <sup>+</sup> memory		CD4 <sup>+</sup> naïve	
			No. of copies of proviral DNA/10 <sup>6</sup> PBMC	% CCR5	No. of copies of proviral DNA/10 <sup>6</sup> PBMC	% CCR5
1	57	181	95	7.45	5	0.86
2	206	629	1541	11.21	5	2.08

<sup>a</sup> Freshly isolated PBMC were successively gated on CD4<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup> (naïve) or CD45RA<sup>-</sup> (memory); the subsets were purified using FACSAria (BD Biosciences), with purity higher than 98%.

In summary, HIV-2-infected patients showed an increase in the proportion of CCR5<sup>+</sup> cells within the memory-effector CD4<sup>+</sup> T cells in correlation with the degree of CD4 depletion and immune activation. In contrast, in HIV-1 infection there was dissociation between CCR5 and other markers of immune activation which could be interpreted as an indirect evidence of depletion of the CCR5<sup>+</sup> cells by HIV-1. However, the HIV-2 proviral load was also mainly restricted to memory-effector CD4 T cells, suggesting these are the major HIV-2 targets, which is consistent with CCR5 being the main HIV-2 coreceptor *in vivo*. Moreover, the levels of HIV-2 proviral load were similar to those observed in untreated HIV-1 infected individuals, suggesting equivalent numbers of

infected cells resulting from the two diseases in spite of viremia being undetectable in the majority of the HIV-2 patients.

The presence of reduced HIV-2 viremia seems to be unrelated to coreceptor availability. Since HIV-2 is no less cytopathic *per se* than HIV-1 (37), other host factors must be implicated in the control of viral replication in spite of significant proviral DNA levels in HIV-2-positive patients. The further investigation of the mechanisms contributing to this control of HIV-2 viremia in the absence of anti-retroviral therapy may prove to be useful in defining complementary therapeutic strategies to control viral reservoirs in HIV-1.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) and Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA to AES. RS, RF and CC received scholarships from FCT.

We gratefully acknowledge Perpétua Gomes for the quantification of HIV-2 viremia, Ana Caetano for cell sorting technical assistance, and the clinical collaboration of the following colleagues: E. Valadas, F. Antunes, L. Pinheiro, M. Doroana, M. Lucas, and R. Marçal.

### **References**

1. Ahmed, R. K., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Blaxhult, E. L. Fredriksson, G. Biberfeld, S. Andersson, and R. Thorstensson. 2005. Antigen-specific beta-chemokine production and CD8 T-cell noncytotoxic antiviral activity in HIV-2-infected individuals. *Scand J Immunol* **61**:63-71.
2. Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson,

- G. Biberfeld, and J. Albert.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**:3286-93.
3. **Ariyoshi, K., N. Berry, A. Wilkins, D. Ricard, P. Aaby, A. Naucle, P. T. Ngom, O. Jobe, S. Jaffar, F. Dias, R. S. Tedder, and H. Whittle.** 1996. A community-based study of human immunodeficiency virus type 2 provirus load in rural village in West Africa. *J Infect Dis* **173**:245-8.
  4. **Berry, N., K. Ariyoshi, S. Jaffar, S. Sabally, T. Corrah, R. Tedder, and H. Whittle.** 1998. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* **1**:457-68.
  5. **Berry, N., K. Ariyoshi, O. Jobe, P. T. Ngum, T. Corrah, A. Wilkins, H. Whittle, and R. Tedder.** 1994. HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4<sup>+</sup> lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1031-7.
  6. **Blaak, H., P. H. Boers, R. A. Gruters, H. Schuitemaker, M. E. van der Ende, and A. D. Osterhaus.** 2005. CCR5, GPR15, and CXCR6 are major coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia. *J Virol* **79**:1686-700.
  7. **Brenchley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup.** 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* **78**:1160-8.
  8. **Bron, R., P. J. Klasse, D. Wilkinson, P. R. Clapham, A. Pelchen-Matthews, C. Power, T. N. Wells, J. Kim, S. C. Peiper, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** 1997. Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J Virol* **71**:8405-15.
  9. **Damond, F., M. Gueudin, S. Pueyo, I. Farfara, D. L. Robertson, D. Descamps, G. Chene, S. Matheron, P. Campa, F. Brun-Vezinet, and F. Simon.** 2002. Plasma RNA viral load in human immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J Clin Microbiol* **40**:3654-9.
  10. **de Roda Husman, A. M., H. Blaak, M. Brouwer, and H. Schuitemaker.** 1999. CC chemokine receptor 5 cell-surface expression in relation to CC chemokine receptor 5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *J Immunol* **163**:4597-603.
  11. **Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien.** 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**:1856-62.
  12. **Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup.** 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* **417**:95-8.
  13. **Endres, M. J., P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, and J. A. Hoxie.** 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**:745-56.
  14. **Gomes, P., N. C. Taveira, J. M. Pereira, F. Antunes, M. O. Ferreira, and M. H. Lourenco.**



1999. Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* **37**:453-6.
15. **Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, A. E. Sousa, R. M. Victorino, and W. E. Paul.** 2002. CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* **8**:319-23.
  16. **Guillon, C., M. E. van der Ende, P. H. Boers, R. A. Gruters, M. Schutten, and A. D. Osterhaus.** 1998. Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J Virol* **72**:6260-3.
  17. **Jaffar, S., A. Wilkins, P. T. Ngom, S. Sabally, T. Corrah, J. E. Bangali, M. Rolfe, and H. C. Whittle.** 1997. Rate of decline of percentage CD4<sup>+</sup> cells is faster in HIV-1 than in HIV-2 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **16**:327-32.
  18. **Kokkotou, E. G., J. L. Sankale, I. Mani, A. Gueye-Ndiaye, D. Schwartz, M. E. Essex, S. Mboup, and P. J. Kanki.** 2000. In vitro correlates of HIV-2-mediated HIV-1 protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6797-802.
  19. **Krzysiek, R., A. Rudent, L. Bouchet-Delbos, A. Foussat, C. Boutillon, A. Portier, D. Ingrand, D. Sereni, P. Galanaud, L. Grangeot-Keros, and D. Emilie.** 2001. Preferential and persistent depletion of CCR5<sup>+</sup> T-helper lymphocytes with nonlymphoid homing potential despite early treatment of primary HIV infection. *Blood* **98**:3169-71.
  20. **Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, and et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**:1587-90.
  21. **Martin, M. P., M. Dean, M. W. Smith, C. Winkler, B. Gerrard, N. L. Michael, B. Lee, R. W. Doms, J. Margolick, S. Buchbinder, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, M. W. Hilgartner, D. Vlahov, S. J. O'Brien, and M. Carrington.** 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* **282**:1907-11.
  22. **McKnight, A., M. T. Dittmar, J. Moniz-Periera, K. Ariyoshi, J. D. Reeves, S. Hibbitts, D. Whitby, E. Aarons, A. E. Proudfoot, H. Whittle, and P. R. Clapham.** 1998. A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol* **72**:4065-71.
  23. **Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz.** 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**:761-70.
  24. **Morner, A., A. Bjorndal, J. Albert, V. N. Kewalramani, D. R. Littman, R. Inoue, R. Thorstensson, E. M. Fenyo, and E. Bjorling.** 1999. Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J Virol* **73**:2343-9.
  25. **Morner, A., A. Bjorndal, A. C. Leandersson, J. Albert, E. Bjorling, and M. Jansson.** 2002. CCR5 or CXCR4 is required for efficient infection of peripheral blood mononuclear cells by promiscuous human immunodeficiency virus type 2 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:193-200.
  26. **Mueller, A., E. Kelly, and P. G. Strange.** 2002. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* **99**:785-91.
  27. **Mummidi, S., S. S. Ahuja, E. Gonzalez, S. A. Anderson, E. N. Santiago, K. T. Stephan, F. E. Craig, P. O'Connell, V. Tryon, R. A. Clark, M. J. Dolan, and S. K. Ahuja.** 1998. Genealogy

- of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* **4**:786-93.
28. **Neoh, L. P., H. Akimoto, H. Kaneko, T. Hishikawa, H. Hashimoto, S. Hirose, Y. Kaneko, N. Yamamoto, and I. Sekigawa.** 1997. The production of beta-chemokines induced by HIV-2 envelope glycoprotein. *Aids* **11**:1062-3.
  29. **Owen, S. M., D. Ellenberger, M. Rayfield, S. Wiktor, P. Michel, M. H. Grieco, F. Gao, B. H. Hahn, and R. B. Lal.** 1998. Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *J Virol* **72**:5425-32.
  30. **Pastori, C., B. Weiser, C. Barassi, C. Uberti-Foppa, S. Ghezzi, R. Longhi, G. Calori, H. Burger, K. Kemal, G. Poli, A. Lazzarin, and L. Lopalco.** 2006. Long-lasting CCR5 internalization by antibodies in a subset of long-term nonprogressors: a possible protective effect against disease progression. *Blood* **107**:4825-33.
  31. **Popper, S. J., A. D. Sarr, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* **74**:1554-7.
  32. **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* **180**:1116-21.
  33. **Poulsen, A. G., P. Aaby, O. Larsen, H. Jensen, A. Naucner, I. M. Lisse, C. B. Christiansen, F. Dias, and M. Melbye.** 1997. 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet* **349**:911-4.
  34. **Reynes, J., P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, P. Andre, O. Avinens, M. C. Picot, J. Clot, J. F. Eliaou, and P. Corbeau.** 2001. CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression. *Aids* **15**:1627-34.
  35. **Ribeiro, R. M., M. D. Hazenberg, A. S. Perelson, and M. P. Davenport.** 2006. Naive and memory cell turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 tropism switch in human immunodeficiency virus type 1: implications for therapy. *J Virol* **80**:802-9.
  36. **Schnittman, S. M., H. C. Lane, J. Greenhouse, J. S. Justement, M. Baseler, and A. S. Fauci.** 1990. Preferential infection of CD4<sup>+</sup> memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6058-62.
  37. **Schramm, B., M. L. Penn, E. H. Palacios, R. M. Grant, F. Kirchhoff, and M. A. Goldsmith.** 2000. Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1. *J Virol* **74**:9594-600.
  38. **Shea, A., D. A. Sarr, N. Jones, L. Penning, G. Eisen, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, P. Kanki, and H. Cao.** 2004. CCR5 receptor expression is down-regulated in HIV type 2 infection: implication for viral control and protection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:630-5.
  39. **Shi, Y., E. Brandin, E. Vincic, M. Jansson, A. Blaxhult, K. Gyllensten, L. Moberg, C. Brostrom, E. M. Fenyo, and J. Albert.** 2005. Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *J Gen Virol* **86**:3385-96.
  40. **Sol, N., F. Ferchal, J. Braun, O. Pleskoff, C. Treboute, I. Ansart, and M. Alizon.** 1997. Usage of the coreceptors CCR-5, CCR-3, and CXCR-4 by primary and cell line-adapted human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **71**:8237-44.
  41. **Soriano, V., P. Gomes, W. Heneine, A. Holguin, M. Doruana, R. Antunes, K. Mansinho, W.**

- M. Switzer, C. Araujo, V. Shanmugam, H. Lourenco, J. Gonzalez-Lahoz, and F. Antunes.** 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* **61**:111-6.
42. **Sousa, A. E., J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim, Z. Grossman, and R. M. Victorino.** 2002. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* **169**:3400-6.
43. **Sousa, A. E., A. F. Chaves, A. Loureiro, and R. M. Victorino.** 2001. Comparison of the frequency of interleukin (IL)-2-, interferon-gamma-, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes. *J Infect Dis* **184**:552-9.
44. **Venkatesan, S., A. Petrovic, D. I. Van Ryk, M. Locati, D. Weissman, and P. M. Murphy.** 2002. Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Biol Chem* **277**:2287-301.
45. **Whittle, H., J. Morris, J. Todd, T. Corrah, S. Sabally, J. Bangali, P. T. Ngom, M. Rolfe, and A. Wilkins.** 1994. HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *Aids* **8**:1617-20.



## Capítulo 4:

# Estratégias para a quantificação da expressão de mRNA *unspliced* e *multiply spliced* na infecção pelo HIV-2

*Submetido para publicação:*

Rui S. Soares <sup>a</sup>, Paula Matoso <sup>a</sup>, Marta Calado <sup>a</sup>, Ana E. Sousa <sup>a</sup>. **Strategies to quantify unspliced and multiply spliced mRNA expression in HIV-2 infection.** 2011

<sup>a</sup> Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal.



## **Abstract**

HIV-2 infection is associated with a slower rate of disease progression with limited impact on the survival of the majority of infected adults, and much lower plasma viral load than HIV-1. In spite of the major differences in viremia, the quantitative assessment of HIV-2 proviral load documented levels similar to those observed in HIV-1 infected individuals, suggesting an equivalent number of circulating infected cells in both infections. It remains unclear whether this apparent paradox results from a contribution of latent/quiescent viruses or from transcriptional and/or post-transcriptional control of HIV-2 replication. In order to investigate these possibilities, we developed one-step and two-step reverse transcription quantitative real-time PCR based methods (RT-qPCR) for *gag* and *tat* mRNA HIV-2 transcripts. These methodologies were validated and compared to assess the expression of HIV-2 *gag* and *tat* transcripts in parallel with proviral DNA and viral production.

## 1. Introduction

HIV-2 infection is characterized by levels of viremia much lower than those of HIV-1 (Simon, Matheron et al. 1993; Berry, Ariyoshi et al. 1998; Popper, Sarr et al. 1999; Andersson, Norrgren et al. 2000; Soriano, Gomes et al. 2000). However, the levels of cell-associated DNA-provirus have been shown to be similar in the two infections suggesting that the number of cells harboring viral DNA does not differ significantly (Berry, Ariyoshi et al. 1994; Gomes, Taveira et al. 1999; Popper, Sarr et al. 2000; Soares, Foxall et al. 2006). Thus, HIV-2 seems to be able to disseminate and establish a reservoir of infected cells similarly to HIV-1. It remains unclear whether this HIV-2 reservoir represents mainly latently infected cells or if a significant degree of HIV-2 replication is occurring and the production of new virions is controlled at the post-transcriptional level. Several mechanisms have been suggested to contribute to this putative control of viral replication including HIV-2 specific immune responses (Duvall, Jaye et al. 2006; Foxall, Cortesao et al. 2008), that were thought to contribute to the relatively benign course of HIV-2 infection (Marlink, Kanki et al. 1994; Drylewicz, Matheron et al. 2008).

HIV genes are expressed through complex splicing of a single mRNA precursor, generating more than 40 distinct mRNA species that can be grouped into three classes: unspliced (US) full length 9-kb mRNA, partially spliced 4 to 5 kb mRNA, and multiply spliced (MS) ~2-kb mRNA (Schwartz, Felber et al. 1990; Schwartz, Felber et al. 1992; Neumann, Harrison et al. 1994). US mRNA encodes the Gag and Gag-Pol polyproteins and also serves as the genomic viral RNA. MS mRNA encodes the regulatory HIV proteins Tat, Rev and Nef.

Kinetic analysis of HIV-1 mRNA expression *in vitro* in newly infected cells showed an



early expression of mostly MS mRNA followed by a subsequent increase in the levels of US mRNA (Kim, Byrn et al. 1989; Klotman, Kim et al. 1991; Ranki, Lagerstedt et al. 1994), suggesting that a large proportion of cells expressing HIV-1 MS mRNA are thought to have been recently infected (Bagnarelli, Valenza et al. 1996).

Data on HIV-2 transcription are scarce. To our knowledge there is only one report addressing the expression of unspliced mRNA in HIV-2 infected patients (MacNeil, Sarr et al. 2007), namely *gag* transcripts. Furthermore, there are no data on the quantification of HIV-2 multiply spliced viral mRNA, which highlights the need for further studies to clarify if the low viremia observed in the majority of HIV-2 infected patients is associated with an effective control of viral transcription. Since HIV-2 infected patients usually exhibit low to undetectable viremia, it is expected that the levels of viral transcripts might be low, highlighting the need to develop sensitive assays for the quantification of HIV-2 transcripts.

Two-step RT-qPCR has been the most frequently used method for the quantification of both unspliced and multiply spliced viral mRNA in HIV-1 infection (Furtado, Kingsley et al. 1995; Mackewicz, Patterson et al. 2000; Brachtel, Mascola et al. 2002; Hermankova, Siliciano et al. 2003; Pasternak, Adema et al. 2008; Pasternak, Jurriaans et al. 2009) and unspliced viral mRNA in HIV-2 infected patients (MacNeil, Sarr et al. 2007). Recently, approaches based on one-step RT-qPCR have been developed that may have some advantages over two-step RT-qPCR (Wacker and Godard 2005). In the latter approach the reverse transcription and the real-time PCR assay are performed in separate reactions. However, it is known that most of the variability in RT-qPCR is mainly attributable to the reverse transcription step, which has relatively high variability in its reaction efficiency (Stahlberg, Hakansson et al. 2004), errors associated with

successive pipetting steps during the preparation of the reactions. These factors may pose a problem for quantification, particularly when transcripts are present at low copy numbers, and/or if absolute quantification of mRNA is required. The one-step RT-qPCR approach is thought to minimize experimental variation since both enzymatic reactions occur in the same tube, and it involves less sample-handling, reducing the chance of contamination and/or pipetting-associated errors. Overall, these differences make this method more suitable for absolute quantification. Moreover, the protocol can be completed in a shorter time-period, thus minimizing sample-degradation. To our knowledge, there are so far no studies comparing these two methods in the quantification of HIV-1 and HIV-2 viral transcripts.

Quantification of HIV-2 transcripts requires the development of particularly sensitive assays given the low to undetectable viremia usually observed in HIV-2 infected patients. One-step RT-qPCR has been suggested to be less sensitive than two-step protocols (Battaglia, Benzoubir et al. 2009). However, a more detailed study comparing the efficiency and sensitivity of the two approaches for the quantification of high, intermediate and low transcript expression suggests that one-step RT-qPCR has a higher sensitivity for the detection of low transcript levels, and that the two methods have a similar reaction efficiency (Wacker and Godard 2005). Moreover, other factors are known to impact on the efficiency and sensitivity of RT-qPCR, namely the priming strategy and the concentration of RNA used in the reverse transcription step (Lekanne Deprez, Fijnvandraat et al. 2002; Stahlberg, Hakansson et al. 2004), as well as the quantity of cDNA used in the qPCR (Lekanne Deprez, Fijnvandraat et al. 2002). Thus, further development and comparison of both approaches are required in order to develop sensitive assays for the quantification of HIV-2 transcripts.

We report here the development and validation of one-step and two-step RT-qPCR methods for the analysis of HIV-2 unspliced and multiply spliced mRNA expression. The ability of these methods to analyze HIV-2 *gag* and *tat* mRNA expression upon *in vitro* infection was compared.

## **2. Materials and Methods**

### ***2.1 Samples used and in vitro infections***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from leucocyte-enriched buffy coats from healthy blood donors (Instituto Português de Sangue, Lisbon) by Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) gradient centrifugation were used for *in vitro* infections, under the approval of the Ethical Board of the Faculty of Medicine, University of Lisbon. Pooled PBMC from 3 different donors were stimulated with phytohemagglutinin for 48 hours (PHA; 3 µg/ml; Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) and subsequently infected with either HIV-2 ROD (MRC, UK) or HIV-2 primary isolates (Table 1, all viruses, except 20.04, were obtained from AIDS Reagent Program, National Institutes of Health, USA. HIV-2 20.04 was kindly provided by Nuno Taveira from Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa). Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine (all from Gibco-Invitrogen, Paisley, U.K.). PBMC were infected using medium supplemented with 10 UI/ml of human recombinant IL-2, and 5 µg/ml of polybrene (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 4 hours. Non-infected PBMC were used as negative controls for the one-step and two-step qPCR assays. Positive controls for these assays were generated from H9

cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) infected in the presence of polybrene (5 µg/ml) with cell-free culture supernatants containing the reference viral strains HIV-2 ROD or HIV-1 IIIB (AIDS Reagent Program, National Institutes of Health, USA) at more than 0.3 ng p24 equivalents/ml, and cultured for 48h upon infection. These H9 infected cells were also used to evaluate the specificity and sensitivity of the one-step and two-step qPCR assays.

Table 1: Characteristics of the HIV-2 strains

Viral Strain	LA/ PI <sup>a</sup>	Coreceptor Usage
ROD <sup>b</sup>	LA	CCR5/CXCR4
60415K <sup>c</sup>	PI	CCR5
20.04 <sup>d</sup>	PI	CXCR4
CDC310342 <sup>e</sup>	PI	MULTI <sup>e</sup>

<sup>a</sup> LA, lab adapted; PI, primary isolate  
<sup>b</sup>From MRC, UK; <sup>c</sup>From AIDS Reagent Program, NIH, USA; <sup>d</sup>Kindly provided by Nuno Taveira.  
<sup>e</sup>Multi, multiple coreceptor usage: CCR5, CXCR4, CCR1, STRL33

To evaluate the ability of each assay to quantify HIV-2 transcripts at different time points after infection, pooled PBMC were infected with 0.125 ng reverse transcriptase (RT) per  $3 \times 10^6$  PBMC of HIV-2 ROD, cultured in medium supplemented with IL-2 (10 UI/ml). Culture supernatants and cell pellets were collected at 24, 72, 94 and 120 hours after infection. *gag* and *tat* mRNA, and RT activity were quantified at all time-points, with total proviral DNA quantification performed on the final sample (120 hours after infection).

To evaluate the efficiency of these assays in detecting different viral strains, HIV-2 primary isolates utilizing either single CCR5 (60415K), CXCR4 (20.04) or multiple CCR5, CXCR4, CCR1 and STRL33 (CDC310342) co-receptors (Table 1) were used to infect PBMC at 0.5ng RT/3x10<sup>6</sup> cells. Cells and culture supernatants were collected 72h post-infection for quantification of *gag* and *tat* mRNA, and RT activity respectively; and at 120h for proviral DNA quantification.

### ***2.2 Isolation of total proviral DNA, Total RNA and mRNA.***

DNA and total RNA were extracted from pellets of 5x10<sup>6</sup> cells using QIAamp DNA Mini Kit and RNeasy mini kit respectively (Qiagen, Valencia, California), according to the manufacturer's instructions. For mRNA extraction, 5x10<sup>6</sup> cells were first lysed in 0.6 ml of Qiagen RLT buffer and were further homogenized using Qiashredder columns (Qiagen, Valencia, California). Polyadenylated mRNA was extracted using Oligotex mRNA direct mini kit (Qiagen, Valencia, California), treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX) and immediately converted to cDNA, or used directly in one-step RT-PCR assays. DNA, mRNA and cDNA concentrations were quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop technologies, Wilmington, DE).

### ***2.3 Target sequences, primers and probes***

Target nucleic acid sequences were selected in specific and conserved regions of the genome. HIV-2 *tat* primers and probe were designed to span an exon-exon splice junction in order to guarantee the amplification and detection of RNA sequences only. HIV-2 *gag* and *tat* oligonucleotide probes with a reporter 5'-6-carboxyfluorescein dye (FAM) and a 3'-Minor Groove Binder group (MGB) were used. MGB allows the

formation of highly stable duplexes with single-strained DNA targets allowing shorter probes to be used, resulting in increased specificity (Kutyavin, Afonina et al. 2000). For the selection of candidate primers and probes we used the Primer Express software package (Applied Biosystems). The primers were selected to generate short amplicons (less than 200 bp) that are more easily amplified, due to the more efficient PCR reaction and the minimization of potential secondary structure within the amplicon (Toouli, Turner et al. 2000).

The specificity of the primers, probes and expected amplicons was firstly verified by sequence similarity searches against the Los Alamos HIV database and using the BLAST algorithm (NCBI) (Altschul, Gish et al. 1990). Each alignment was scored and assigned a measure of statistical significance (E-value). Sequences with E-values equal or less than 0.01 were considered homologous (Altschul, Gish et al. 1990; Karlin and Altschul 1990). All combinations of HIV-2 *tat* forward and reverse oligonucleotides presented in Table 2 were then tested in terms of specificity. For this purpose, 1  $\mu$ M of each primer was used in PCR reactions prepared as described in sections 2.5. and 2.6. to test for amplification of HIV-1 and HIV-2 *tat* and *gag* cRNA and DNA standards ( $10^6$  copies/reaction), RNA positive controls (400 ng *total RNA* or 80 ng mRNA from H9 cells infected with HIV-1 IIIB or HIV-2 ROD), and negative controls (400 ng of total RNA or 80 ng mRNA from seronegative blood donors). The primer combinations that did not detect and amplify any sequences in both seronegative and HIV-1 positive controls were selected. The efficiency with which the selected primers amplified the standards were then compared in PCR reactions prepared as described in sections 2.5. and 2.6., containing 0.3, 0.6 or 1  $\mu$ M of each primer.

Table 2: Primers and probe tested for quantification of HIV-2 *tat* mRNA by one-step and two-step RT-qPCR assays.

Forward primers	F3.1: 5'-CTACCATTGCCAGCTGTGTT
	F3.2: 5'-TACCATTGCCAGCTGTGTTT
	F3.3: 5'-ACCATTGCCAGCTGTGTTT
	F3.4: 5'-CCATTGCCAGCTGTGTTTT
	<b>F3.5: 5'-AGGGGCTCGGGATATGTT</b>
Reverse primers	R2: 5'-CCCCGGTCCTTGTGGATAT
	<b>R3.1: 5'-TCTGTATCCACCGTCGTTTC</b>
	R3.2: 5'-CCAAGGCCAGATCTGTATCC
	R3.4: 5'-TCGTTTCCAACGTCTTCTTCT
	R3.5: 5'-GATCTGTATCCACCGTCGTTT
Probe	FAM-TGCATCAGACAAATC-MGB
<p>All combinations of forward (F) and reverse (R) primers were tested for specificity and reaction efficiency. Primers represented in bold were selected to be used in the quantification of HIV-2 infected samples.</p>	

In order to compare the efficiency of reactions between one-step RT-qPCR assay (which is an absolute quantitative approach with results expressed as copies/ng RNA), and two-step RT-qPCR assay (which is a relative quantitative approach with results expressed as arbitrary units), Ct (threshold cycle) values were used. Efficiency was evaluated by the slope of the regression curve obtained with at least 5 serial dilutions of each standard. The optimal primer and probe concentration was considered the one that allowed successful quantification at the lowest threshold cycle, the highest  $\Delta R_n$  and a difference in Ct values between two dilutions of approximately 3.3. A slope of -3.33 indicates an

efficiency of 100% (Bustin and Nolan 2004). We considered amplifications covering a range of slopes between -3.1 and -3.5 and efficiency between 90 and 110 %, as is general consensus (Raymaekers, Smets et al. 2009).

#### **2.4 Standards**

For one-step RT-qPCR, HIV-2 *gag* cRNA standard was produced from a pGEM T easy plasmid cloned with a conserved sequence of HIV-2 *gag* previously used as a standard for the quantification of HIV-2 total viral DNA (Soares, Foxall et al. 2006). The plasmid contains the T7 promoter sequence that allows *in vitro* transcription of the downstream sequence and synthesis of the corresponding cRNA standard. The cRNA standard was produced using the Riboprobe *in vitro* transcription system (Promega) according to the manufacturer's instructions and quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. cRNA was diluted to  $10^6$  copies/ $\mu$ l, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Subsequently, standard curves were generated from 10-fold dilutions in DEPC-treated water (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) to which carrier tRNA (from *Escherichia coli*; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 30  $\mu$ g/ml. HIV-2 *tat* cRNA standard was produced from a synthetic oligonucleotide (GenScript Corporation, Piscataway, New Jersey) corresponding to 200 bp fragment of HIV-2 *tat* transcript that includes the T7 promoter sequence. HIV-2 *tat* cRNA was produced by *in vitro* transcription, diluted and stored as described above for HIV-2 *gag* cRNA.

For the two-step q-PCR, the HIV-2 *gag* mRNA quantitative standard, previously used for the quantification of HIV-2 total viral DNA, was again used for HIV-2 *gag* mRNA quantification. HIV-2 *tat* standard was synthesised by amplifications of the same



synthetic oligonucleotide used to produce the HIV-2 *tat* cRNA standard used in the one-step RT-qPCR. These standards were aliquoted at  $10^6$  copies/ $\mu$ l, and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Standard curves were generated from 10-fold dilutions in DEPC-treated water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to which salmon sperm DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to give a final concentration of 30  $\mu\text{g/ml}$ .

### **2.5 One-step Real-time RT-qPCR.**

The quantification of the levels of HIV-2 *gag* and *tat* mRNA transcripts by one-step RT-qPCR was performed in a AbiPrism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Several quantities of mRNA (5 to 80ng) and total RNA (200 to 1000 ng) were tested in order to optimize for efficiency and sensitivity. Each sample was quantified in duplicate in a 50 $\mu$ l PCR mixture volume containing 25 $\mu$ l of SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Mix, 1 $\mu$ l ROX Reference Dye 50X, 5 mM of  $\text{MgCl}_2$  (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the above mentioned primers (Table 2).

For HIV-2 *tat* assay, the primer combinations that passed the specificity test were further evaluated at concentrations 0.1, 0.3, 0.6 and 1  $\mu\text{M}$  for best detection levels at different copy number and reaction efficiency.

For the quantification of HIV-2 *gag*, the primers F2 (5'- CGC GAG AAA CTC CGT CTT G-3'), R2- (5'- CACACAATATGTTTTAGCCTGTACTTTTT-3') and HIV-2 *gag* probe (5'-FAM-CCGGGCCGTAACCT -MGB-3') were used. These primers and probe have been tested and selected according to their specificity as we have previously reported (Soares, Foxall et al. 2006). The optimal concentration to be used in RT-qPCR

was chosen based on detection levels and reaction efficiency in amplifications of the different concentrations tested as described above for HIV-2 *tat* primers.

To prevent genomic DNA carryover, mRNA and total RNA samples were treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX).

## **2.6 Two-step Real-time RT-qPCR**

### *2.6.1 Reverse transcription*

A 13  $\mu$ l mix containing mRNA (5 to 80 ng) or total RNA (200 to 1000 ng), 250  $\mu$ M of deoxynucleotide triphosphates (dNTP), and 250 ng of random hexamers (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was prepared, and Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) protocol was followed. 500 ng of oligo(dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or 200 pmol of gene specific primer (R3.1.) were also tested in the HIV-2 *tat* assay in order to evaluate the impact of different priming strategies on RT reaction efficiency. The random hexamer primed samples were incubated for 10 minutes at 25°C. All samples were then heated to 42°C for 2 minutes and 1  $\mu$ l of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to give a final volume of 20  $\mu$ l per reaction. mRNA and total RNA samples were treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX) as described for one-step RT-qPCR. Contamination with genomic DNA was excluded by preparation of RT-qPCR reactions with and without reverse transcriptase.

### 2.6.2 qPCR

Quantification by qPCR was performed in AbiPrism 7000 SDS equipment in duplicate reactions of a PCR mixture (50  $\mu$ l) containing 25 $\mu$ l Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, 1 $\mu$ l ROX Reference Dye 50X, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and combinations of primers/probe (Table1) selected as described for one-step RT-qPCR assays. In order to optimize the two-step RT-qPCR for efficiency and sensitivity, several quantities of cDNA (200 to 1000 ng) were tested. To normalize for variability in the initial concentration and quality of the RNA, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (FAM/MGB probe, non primer limited – Applied Biosystems) was used as an endogenous control. The GAPDH standard curves were generated with serial dilutions of cDNA from pooled PBMC of 3 seronegative blood donors.

### 2.7 Total proviral DNA quantification

HIV-1 and HIV-2 total viral DNA were quantified using previously described real-time PCR assays (Soares, Foxall et al. 2006) that amplify highly conserved regions in HIV-1 and HIV-2 *gag* with a detection range of 7 orders of magnitude and a sensitivity of 5 copies.

### 2.8 Quantification of Reverse Transcriptase activity

Viral replication was monitored by quantification of reverse transcriptase (RT) activity in culture supernatants 72h after infection, using an enzyme-linked immunosorbent assay validated for the quantification of HIV-2 RT activity (Lenti-RT kit, Cavid Tech, Uppsala, Sweden).

### 3. Results

#### ***3.1 Development of one-step and two-step RT-qPCR assays for the quantification of HIV-2 unspliced and multiply spliced mRNA***

##### *3.1.1 Selection of target sequences, primers and probes.*

For HIV-2 all combinations of forward and reverse primers presented in Table 2 were tested and primer pair selection was based on the specificity and efficiency of the PCR reaction, as described in the section 2.3. The most sensitive detection levels and reaction efficiency that maintained specificity were achieved using HIV-2 *tat* primer pair F3.5 and R3.1 (Table 2). These primers failed to amplify mRNA samples from seronegative and HIV-1 infected controls. For HIV-2 *gag*, primers F2 and R2 had previously been selected with respect to their specificity (Soares, Foxall et al. 2006). The optimal primer pair concentration that yielded both high level detection sensitivity and reaction efficiency in RT-qPCR was found to be 1  $\mu$ M for both sets of primers.

##### *3.1.2 Selection of priming strategy for the reverse transcription of the two-step RT-qPCR.*

In order to determine the highest sensitivity in the two-step RT-qPCR, we compared random hexamer, oligo(dT) and gene-specific primers in terms of their relative abilities to reverse transcribe mRNA from cells infected with HIV-2 ROD into cDNA. All reverse transcription reactions were performed using the same mRNA sample and quantity of template in order to minimize deviations in efficiency attributable to changes in copy number, as has been reported in highly diluted samples (Peccoud and Jacob

1996). The mRNA reverse-transcribed using these priming strategies was subsequently tested in real-time PCR and the differences in HIV-2 tat Ct values evaluated. As the same starting material was used for all reverse transcription reactions, a lower Ct value indicated a more efficient reverse transcription reaction. Thus, we found that random hexamer primers showed increased efficiency in the two-step RT-qPCR for HIV-2 tat as exemplified by the lower Ct value obtained with this priming strategy (mean Ct: 35.67) as compared to oligo(dT) (mean Ct: 36.66) and gene-specific primer (mean Ct: 36.84). Thus we chose random hexamer primers were chosen to prime RT reactions in experiments for quantification of HIV-2 gag and tat transcripts by two-step RT-qPCR.

### 3.1.3 Quantity of template for one-step and two-step RT-qPCR assays

Both input RNA and cDNA template concentration used in reverse transcription and qPCR respectively, have been shown to impact upon the efficiency of the *RT-qPCR assays* (Lekanne Deprez, Fijnvandraat et al. 2002; Stahlberg, Hakansson et al. 2004; Wong and Medrano 2005). Likewise, the use of mRNA rather than total RNA has been suggested to improve both sensitivity and accuracy of transcript detection (Ramalho, Beck et al. 2004). Therefore, we tested several concentrations of total RNA (200 to 1000 ng) in one-step and two-step RT-qPCR assays; and mRNA (5 to 80 ng) and cDNA (200 to 1000 ng) in two-step RT-qPCR assay using HIV-2 infected samples (H9 cells infected with HIV-2 ROD). For one-step qPCR assays, the lowest mean Ct and highest fluorescence intensity (corresponding to the highest efficiency) were obtained with 400 ng of total RNA. For the two-step RT-qPCR assays, the highest reaction efficiency was obtained with 400 ng of total RNA or when 80 ng of mRNA were used in RT reaction, and 1000 ng of cDNA were used in the subsequent qPCR (data not shown).

### 3.1.4 Sensitivity of the PCR assays

Assay sensitivity was evaluated on the basis of repeated testing (5 replicates) at standard dilutions of  $10^5$  to 1 copy. The detection threshold was determined by the highest dilution of the standard in which amplification was detected in 100% of the replicates. For both HIV-2 *gag* and *tat*, detection failed in at least one of the replicates of the one copy standard, but the amplification was always detected in all replicates with 5 copies. Therefore, the sensitivity of both assays was established as 5 copies.

### 3.1.5 Reproducibility of PCR reactions

To assess and compare the *reproducibility* of one-step and two-step RT-qPCR assays we analyzed the *amplification* Ct values (as described in section 2.3) and calculated the coefficient of variation (CV) of Ct the at different copy number.

The intra-assay reproducibility was assessed from *the* coefficient of variation of Ct values of 5 replicates at each copy number per reaction encompassing a broad concentration range: from  $10^6$  to 5 copies. We observed that the intra-assay reproducibility was similar when comparing one-step and two-step RT-qPCR approaches (Tables 3 and 4).

Inter-assay reproducibility was determined by analyzing the coefficient of variation of Ct in 5 independent runs at each standard curve dilution point from  $10^6$  to 5 copies. Despite the low variability observed in both approaches, our results suggested that the inter-assay variability tended to be higher in the two-step as compared to one-step RT-qPCR (Tables 3 and 4).

Table 3: Intra and inter-assay reproducibility of HIV-2 *gag* transcript quantification using one-step and two-step RT-qPCR assays

Copy number	Intra-assay Reproducibility (CV of Ct values)		Inter-assay Reproducibility (CV of Ct values)	
	One-step	Two-Step	One-step	Two-Step
10 <sup>6</sup>	1.29	1.60	3.87	ND
10 <sup>5</sup>	1.51	1.08	0.98	4.51
10 <sup>4</sup>	0.39	0.59	0.27	3.39
10 <sup>3</sup>	0.65	1.54	1.4	3.73
10 <sup>2</sup>	0.64	2.08	3.02	3.13
10	3.05	3.41	3.0	2.86
5	4.07	2.88	0.13	1.83

Intra and inter-assay reproducibility was calculated as coefficient of variation (CV) of Ct values obtained in amplification of 5, 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> copies of standards. ND, not done.

Intra-assay CV was calculated from the Ct values of 5 replicates of each dilution of the standards.

Inter-assay CV was calculated from Ct values of each dilution of the standards collected in 5 separate runs.

Table 4: Intra and inter-assay reproducibility of HIV-2 *tat* transcript quantification using one-step and two-step RT-qPCR assays

Copy number	Intra-assay Reproducibility (CV of Ct values)		Inter-assay Reproducibility (CV of Ct values)	
	One-step	Two-Step	One-step	Two-Step
10 <sup>6</sup>	0.99	2.00	4.32	ND
10 <sup>5</sup>	1.28	2.48	4.35	6.52
10 <sup>4</sup>	0.40	2.99	3.47	5.69
10 <sup>3</sup>	0.61	1.40	5.40	5.57
10 <sup>2</sup>	1.11	1.76	3.02	5.40
10	3.63	3.11	1.79	3.40
5	2.09	1.75	2.07	3.37

Intra and inter-assay reproducibility was calculated as coefficient of variation (CV) of Ct values obtained in amplification of 5, 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> copies of standards. ND, not done.

Intra-assay CV was calculated from the Ct values of 5 replicates of each dilution of the standards.

Inter-assay CV was calculated from Ct values of each dilution of the standards collected in 5 separate runs.

### **3.2 HIV-2 *tat* and *gag* mRNA quantification by one-step and two-step RT-qPCR assays**

The performance of the one-step and two-step RT-qPCR assays were compared with regard to the quantification of HIV-2 *tat* and *gag* transcripts at different time points following *in vitro* infection with HIV-2 ROD. Both assays revealed a similar increase (approximately 2 log) in the expression of HIV-2 *gag* during the first 72h after infection, with a lower rate of increase thereafter (Fig. 1A and B, top graphs).

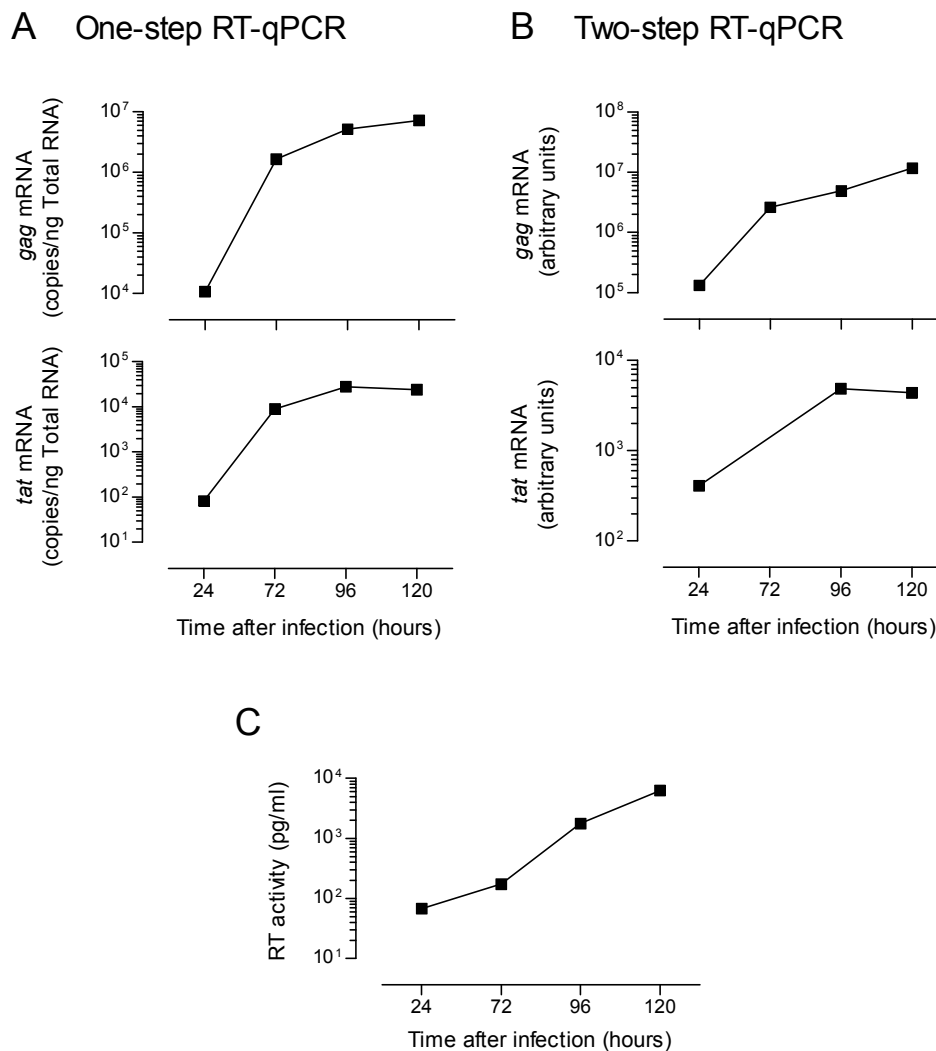
For HIV-2 *tat* mRNA expression, both one-step and two-step RT-qPCR assays also showed an increased rate of accumulation of transcripts in the first 72h after infection that stabilized at 96h post-infection (Fig. 1A and B, bottom graphs). This initial exponential increase in replication of *gag* and *tat* transcripts was paralleled by an increase in the detection of RT activity in the supernatants (Fig. 1C). At the final of the period of infection analyzed (120h), the levels of total proviral DNA confirmed the high number of infected cells ( $1,85 \times 10^7$  copies/ $10^6$  cells).

### **3.3 Quantification of *tat* and *gag* mRNA from samples infected with HIV-2 primary isolates using one-step and two-step RT-qPCR assays.**

After revealing that the one-step and two-step RT-qPCR assays were comparable in their ability to quantify HIV-2 ROD *gag* and *tat* transcripts, we next evaluated whether they also detected *gag* and *tat* transcripts from HIV-2 primary isolates (Table 1). We noted that, when total RNA was used as the template, the detection rate of *gag* mRNA was similar using either one-step or two-step RT-qPCR (Table 5). However, *tat* transcripts were not efficiently detected by either of these assays, when total RNA was used as template (Table 5). Of note, we observed lower amplification levels in the



quantification of *tat* and *gag* transcripts from HIV-2 primary isolates as compared to the HIV-2 ROD, despite the use of a higher amount of virus in the infections with the former (Table 5). In order to improve the detection efficiency of *tat* transcripts, we used both total RNA and mRNA templates. We noted that the detection rate of *tat* transcripts increased with the latter template in the two-step RT-qPCR assay (Table 5).



**Fig. 1. One-step vs two-step RT-qPCR quantification of HIV-2 *gag* and *tat* mRNA transcripts upon *in vitro* HIV-2 ROD infection.**

Cells and culture supernatants were collected at 24, 72, 96 and 120 hours after infection of PHA-stimulated pooled PBMC from 3 healthy donors ( $3 \times 10^6$ ) with 0.125 ng RT of HIV-2 ROD. Transcriptional activity was assessed by the quantification of HIV-2 *gag* (A and B, top graphs) and *tat* mRNA (A and B, bottom graphs) transcripts in total RNA using one-step (A) and two step (B) RT-qPCR assays. Viral production was assessed by the quantification of RT activity in the culture supernatants (C).

Table 5: Detection of *tat* and *gag* transcripts upon infection with HIV-2 primary isolates.

HIV-2 Strain	Proviral DNA <sup>b</sup> (copies/10 <sup>6</sup> cells)	RT <sup>c</sup> (pg/ml)	<i>gag</i> <sup>a</sup>			<i>tat</i> <sup>a</sup>		
			One-step	Two-step		One-step	Two-step	
			Total RNA	Total RNA	mRNA	Total RNA	Total RNA	mRNA
ROD	1.8E+07	196.4	20.7	21.6	20.4	28.2	28.4	28.0
60415K	7.2E+04	66.8	28.5	26.4	33.2	undet	undet	43.9
20.04	1.5E+02	83.3	36.1	undet	35.2	39.7	undet	35.1
CDC310342	5.0E+00	108.1	undet	35.9	33.7	undet	undet	43.7

3x10<sup>6</sup> PBMC were infected using 0.5 ng RT of the different viral strains. <sup>a</sup> *gag* and *tat* mRNA expression was evaluated at 72h after infection; and data represent mean Ct values from duplicate amplifications of each sample; Undet, undetectable RNA expression.  
<sup>b</sup>Proviral DNA was determined at 120h after infection. <sup>c</sup>RT activity was determined in the supernatants at 72h after infection.

However, the limited quantity of mRNA obtained from lymphocytes isolated from patients during clinical follow-up evaluation, constrained its routine use in one-step RT-qPCR assay given the high amount of mRNA required. Overall these results suggest that using mRNA as template in the two-step RT-qPCR assay may facilitate the detection of HIV-2 *tat* transcripts, particularly in clinical samples. In agreement, we have recently confirmed the feasibility of using this approach for the quantification of *tat* and *gag* expression in a large cohort of HIV-2 infected individuals (Soares, Tendeiro et al. 2010).

#### 4. Discussion

In this study, we developed and compared the performance of one-step and two-step RT-qPCR assays for the quantification of HIV-2 unspliced and multiply spliced transcripts. One-step RT-qPCR has been suggested to have potential advantages over the two-step

RT-qPCR, potentially providing absolute quantification of the transcripts, a reduction in the experimental variation and increased sensitivity (Wacker and Godard 2005). It is known that most of the variability in RT-qPCR can be attributed to the reverse transcription step due to the relatively high variability in reaction efficiency (Stahlberg, Hakansson et al. 2004). This could impact on the reproducibility and sensitivity of the assay, especially in two-step RT-qPCR, where the RT and PCR reactions are performed separately. These data indicate that the one-step RT-qPCR approach may be potentially more suitable for the quantification of HIV-2 mRNA transcripts. However, this first comparative study of one-step and two-step RT-qPCR assays developed to evaluate HIV-2 transcriptional activity revealed that at high/medium copy number the performance of both assays was similar. On the other hand, at low copy number the two-step approach using mRNA as template showed better detection sensitivity.

Several factors have been described to impact upon the efficiency of reaction and detection capacity of RT-qPCR based assays, such as the priming strategy used during the reverse transcription step and the quantity of template. We showed here that both the priming strategy and the quantity of template impact upon the reaction efficiency and detection of HIV-2 *gag* and *tat* transcripts, in both assays. However, even after optimization of these factors, no major differences were found between one-step and two-step RT-qPCR assays in terms of reproducibility, specificity and sensitivity. The analysis of viral replication and expression of HIV-2 ROD *gag* and *tat* transcripts with both one-step and two-step RT-qPCR methods showed an accumulation of these transcripts after infection that is similar to that previously reported for the accumulation of HIV-1 unspliced and multiply spliced transcripts (Kim, Byrn et al. 1989; Klotman, Kim et al. 1991; Ranki, Lagerstedt et al. 1994). Both assays showed an equivalent

ability to detect HIV-2 *gag* and *tat* transcripts in total RNA extracted from cells productively infected and actively replicating HIV-2 ROD. These results are in agreement with studies that compared one-step and two-step RT-qPCR methodologies for the detection of transcripts at medium and high copy number (Wacker and Godard 2005), such as the levels of *gag* and *tat* transcripts found after infection with HIV-2 ROD. In these cases, one-step RT-qPCR may represent an advantage over a two-step approach since it offers the possibility of reliable absolute quantification of viral transcripts, and the assay time is shorter.

Nevertheless, these assays showed a lower detection rate when quantifying HIV-2 *tat* and *gag* transcripts from PBMC infected with HIV-2 primary isolates as compared to that observed in PBMC infected with the HIV-2 ROD. Several factors may contribute to this result, including a lower transcriptional activity of these HIV-2 isolates and/or genetic variability that can impact on the efficiency of the reactions. The lower RT activity observed after infection with primary isolates as compared to HIV-2 ROD support a lower viral transcriptional activity in cells infected with the former. Additionally, we observed an increased detection when mRNA was used as template in the two-step RT-qPCR approach, probably due to the enrichment of the sample in target mRNA molecules. These results are in agreement with studies that show an impact of type (total RNA or mRNA) and concentration of the template on the efficiency of the RT-qPCR assays (Lekanne Deprez, Fijnvandraat et al. 2002; Stahlberg, Hakansson et al. 2004; Wong and Medrano 2005).

It is likely that viral transcripts may also be present at low copy number in most of the patients with HIV-2 infection, given the low to undetectable viremia usually observed (Simon, Matheron et al. 1993; Berry, Ariyoshi et al. 1998; Popper, Sarr et al. 1999;

Andersson, Norrgren et al. 2000; Soriano, Gomes et al. 2000). Our findings suggest that the two-step RT-qPCR method using mRNA as template may allow an increased sensitivity and detection of HIV-2 *gag* and *tat* mRNA transcripts in clinical samples. This method was recently used to evaluate HIV-2 and HIV-1 unspliced and multiply spliced mRNA expression in a large cohort of infected patients (Soares, Tendeiro et al. 2011).

In conclusion, we described here, for the first time, one-step and two-step RT-qPCR assays for the quantification of both unspliced and multiply spliced HIV-2 transcripts. These approaches will be instrumental in future studies addressing the apparent paradox of a low to undetectable viremia despite significant levels of proviral DNA in HIV-2 infected individuals.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Russell Foxall, Helena Nunes-Cabaço, Andreia Fonseca and Rui Victorino for the critical reading of the manuscript and helpful discussion of the results.

*Financial Support.* Grants from “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT) and “Programa Operacional Ciência e Inovação 2010” (POCI2010) as well as from Fundação Calouste Gulbenkian to AES. RSS, PM, and MC received scholarships from FCT.

*Potential conflict of interest.* All authors: no conflicts.

## **References**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Andersson, S., Norrgren, H., da Silva, Z., Biague, A., Bamba, S., Kwok, S., Christopherson, C., Biberfeld,

- G. and Albert, J., 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 160, 3286-93.
- Bagnarelli, P., Valenza, A., Menzo, S., Sampaolesi, R., Varaldo, P.E., Butini, L., Montroni, M., Perno, C.F., Aquaro, S., Mathez, D., Leibowitch, J., Balotta, C. and Clementi, M., 1996. Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo. *J Virol* 70, 7603-13.
- Battaglia, S., Benzoubir, N., Nobilet, S., Charneau, P., Samuel, D., Zignego, A.L., Atfi, A., Brechot, C. and Bourgeade, M.F., 2009. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 4, e4355.
- Berry, N., Ariyoshi, K., Jaffar, S., Sabally, S., Corrah, T., Tedder, R. and Whittle, H., 1998. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1, 457-68.
- Berry, N., Ariyoshi, K., Jobe, O., Ngum, P.T., Corrah, T., Wilkins, A., Whittle, H. and Tedder, R., 1994. HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1031-7.
- Brachtel, E.F., Mascola, J.R., Wear, D.J., Ehrenberg, P.K., Dayhoff, D.E., Sanders-Buell, E., Michael, N.L. and Frankel, S.S., 2002. Demonstration of de novo HIV type 1 production by detection of multiply spliced and unspliced HIV type 1 RNA in paraffin-embedded tonsils. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, 785-90.
- Bustin, S.A. and Nolan, T., 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15, 155-66.
- Drylewicz, J., Matheron, S., Lazaro, E., Damond, F., Bonnet, F., Simon, F., Dabis, F., Brun-Vezinet, F., Chene, G. and Thiebaut, R., 2008. Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *Aids* 22, 457-68.
- Duvall, M.G., Jaye, A., Dong, T., Brenchley, J.M., Alabi, A.S., Jeffries, D.J., van der Sande, M., Togun, T.O., McConkey, S.J., Douek, D.C., McMichael, A.J., Whittle, H.C., Koup, R.A. and Rowland-Jones, S.L., 2006. Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. *J Immunol* 176, 6973-81.
- Foxall, R.B., Cortesao, C.S., Albuquerque, A.S., Soares, R.S., Victorino, R.M. and Sousa, A.E., 2008. Gag-specific CD4+ T-cell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immune activation in infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but not HIV-1. *J Virol* 82, 9795-9.
- Furtado, M.R., Kingsley, L.A. and Wolinsky, S.M., 1995. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4+ T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 69, 2092-2100.
- Gomes, P., Taveira, N.C., Pereira, J.M., Antunes, F., Ferreira, M.O. and Lourenco, M.H., 1999. Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* 37, 453-6.
- Hermankova, M., Siliciano, J.D., Zhou, Y., Monie, D., Chadwick, K., Margolick, J.B., Quinn, T.C. and Siliciano, R.F., 2003. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol* 77, 7383-92.
- Karlin, S. and Altschul, S.F., 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2264-8.
- Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D., 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis

- during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* 63, 3708-13.
- Klotman, M.E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. and Wong-Staal, F., 1991. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5011-5.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B. and Hedgpeth, J., 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28, 655-61.
- Lekanne Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M. and Moorman, A.F., 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 307, 63-9.
- Mackewicz, C.E., Patterson, B.K., Lee, S.A. and Levy, J.A., 2000. CD8(+) cell noncytotoxic anti-human immunodeficiency virus response inhibits expression of viral RNA but not reverse transcription or provirus integration. *J Gen Virol* 81, 1261-4.
- MacNeil, A., Sarr, A.D., Sankale, J.L., Meloni, S.T., Mboup, S. and Kanki, P., 2007. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* 81, 5325-30.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., Gueye, E.H. and *et al.*, 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587-90.
- Neumann, M., Harrison, J., Saltarelli, M., Hadziyannis, E., Erfle, V., Felber, B.K. and Pavlakis, G.N., 1994. Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1531-42.
- Pasternak, A.O., Adema, K.W., Bakker, M., Jurriaans, S., Berkhout, B., Cornelissen, M. and Lukashov, V.V., 2008. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J Clin Microbiol* 46, 2206-11.
- Pasternak, A.O., Jurriaans, S., Bakker, M., Prins, J.M., Berkhout, B. and Lukashov, V.V., 2009. Cellular levels of HIV unspliced RNA from patients on combination antiretroviral therapy with undetectable plasma viremia predict the therapy outcome. *PLoS One* 4, e8490.
- Peccoud, J. and Jacob, C., 1996. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J* 71, 101-8.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E. and Kanki, P.J., 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* 74, 1554-7.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Travers, K.U., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E. and Kanki, P.J., 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 180, 1116-21.
- Ramalho, A.S., Beck, S., Farinha, C.M., Clarke, L.A., Heda, G.D., Steiner, B., Sanz, J., Gallati, S., Amaral, M.D., Harris, A. and Tzetis, M., 2004. Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2, 11-5.
- Ranki, A., Lagerstedt, A., Ovod, V., Aavik, E. and Krohn, K.J., 1994. Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines. *Arch Virol* 139, 365-78.

- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. and Cartuyvels, R., 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 23, 145-51.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M. and Pavlakis, G.N., 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 64, 2519-29.
- Schwartz, S., Felber, B.K. and Pavlakis, G.N., 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* 12, 207-19.
- Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Loussert-Ajaka, I., Bartczak, S., Pepin, J.M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., Gastaut, J.A. and *et al.*, 1993. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* 7, 1411-7.
- Soares, R., Foxall, R., Albuquerque, A., Cortesao, C., Garcia, M., Victorino, R.M. and Sousa, A.E., 2006. Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* 80, 12425-9.
- Soares, R.S., Tendeiro, R., Foxall, R.B., Baptista, A.P., Cavaleiro, R., Gomes, P., Camacho, R., Valadas, E., Doroana, M., Lucas, M., Antunes, F., Victorino, R.M. and Sousa, A.E., 2011. Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients. *J Virol* 85, 2429-38
- Soriano, V., Gomes, P., Heneine, W., Holguin, A., Doruana, M., Antunes, R., Mansinho, K., Switzer, W.M., Araujo, C., Shanmugam, V., Lourenco, H., Gonzalez-Lahoz, J. and Antunes, F., 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 61, 111-6.
- Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H. and Kubista, M., 2004. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 50, 509-15.
- Toouli, C.D., Turner, D.R., Grist, S.A. and Morley, A.A., 2000. The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences. *Anal Biochem* 280, 324-6.
- Wacker, M.J. and Godard, M.P., 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech* 16, 266-71.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85.



## Capítulo 5:

### **Carga viral celular evidencia a existência de replicação viral persistente em doentes infectados pelo HIV-2 avirémicos**

*Publicação:*

Rui S. Soares<sup>1</sup>, Rita Tendeiro<sup>1</sup>, Russell B. Foxall<sup>1</sup>, António P. Baptista<sup>1</sup>, Rita Cavaleiro<sup>1</sup>, Perpétua Gomes<sup>2,3,4</sup>, Ricardo Camacho<sup>2,4</sup>, Emília Valadas<sup>5</sup>, Manuela Doroana<sup>5</sup>, Margarida Lucas<sup>6</sup>, Francisco Antunes<sup>5</sup>, Rui M. M. Victorino<sup>1,6</sup>, Ana E. Sousa<sup>1</sup>. **Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2 infected patients.** *Journal of Virology*, 2011, 85 (5): 2429-2438

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Medicina Transfusional, Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira, 126, 1349-019 Lisboa, Portugal; <sup>3</sup> Instituto Superior de Saúde Egas Moniz, Quinta da Granja, Monte de Caparica, 2829 - 511 Caparica, Portugal; <sup>4</sup> CMDT, Instituto Superior de Higiene e Medicina Tropical, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal; <sup>5</sup> Clínica Universitária de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal; <sup>6</sup> Clínica Universitária de Medicina 2, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal



## Abstract

Viremia is significantly lower in HIV-2 than HIV-1 infection, irrespective of disease stage. Nevertheless, the comparable proviral DNA burden observed in these two infections indicates similar numbers of infected cells. Here we investigated this apparent paradox by assessing cell-associated viral replication.

We found that untreated HIV-1-positive (HIV-1<sup>+</sup>) and HIV-2<sup>+</sup> individuals, matched for CD4 T cell depletion, exhibited similar *gag* mRNA levels, indicating that significant viral transcription is occurring in untreated HIV-2<sup>+</sup> patients, despite the reduced viremia (undetectable to  $2.6 \times 10^4$  RNA copies/ml). However, *tat* mRNA transcripts were observed at significantly lower levels in HIV-2<sup>+</sup> patients, suggesting that the rate of *de novo* infection is decreased in these patients. Our data also reveal a direct relationship of *gag* and *tat* transcripts with CD4 and CD8 T cell activation, respectively. Antiretroviral therapy (ART)-treated HIV-2<sup>+</sup> patients showed persistent viral replication, irrespective of plasma viremia, possibly contributing to the emergence of drug resistance mutations, persistent hyperimmune activation, and poor CD4 T cell recovery that we observed in these individuals.

In conclusion, we provide here evidence of significant ongoing viral replication in HIV-2<sup>+</sup> patients, further emphasizing the dichotomy between amount of plasma virus and cell-associated viral burden, and stressing the need for antiretroviral trials and the definition of therapeutic guidelines in HIV-2 infection.

## Introduction

HIV-2 infection is characterized by low to undetectable plasma viral load (3, 5, 46, 50, 54), in agreement with its reduced transmission rate (2, 26, 30), providing a natural model to investigate the relative contribution of HIV replication to AIDS progression.

Notwithstanding the two-log difference in viremia levels that characterize HIV-2 and HIV-1 infection, similar levels of cell-associated viral DNA have been reported, suggesting a comparable number of infected cells (6, 24, 45, 52). This apparent paradox highlights the potential contribution of quiescent latent virus to proviral load and the relevance of quantifying the ongoing viral replication. The only study, to our knowledge, addressing transcriptional activity in HIV-2-positive (HIV-2<sup>+</sup>) patients demonstrated lower *gag* mRNA expression levels in HIV-2<sup>+</sup> than HIV-1<sup>+</sup> individuals (34). However, the fact that these cohorts were not paired for disease stage is a possible confounding factor, as it is known that *gag* mRNA levels are increased in HIV-1<sup>+</sup> individuals with low CD4 T cell counts (22, 39).

In spite of the rate of CD4 T cell decline being much slower in HIV-2 than in HIV-1 infection (19, 35), a progressive CD4 T cell depletion ultimately leading to AIDS is observed in HIV-2<sup>+</sup> individuals (12, 36). Importantly, despite the lack of clinical trials of antiretroviral therapy (ART) in HIV-2 infection, the majority of reports showed poor immunological recovery in ART-treated HIV-2<sup>+</sup> patients, even in the context of suppression of viremia (1, 19, 29, 40, 51, 56). A rapid emergence of drug-associated mutations in HIV-2<sup>+</sup> patients under ART has also been reported (7, 13-15, 25, 29, 41, 47, 48), suggesting, that there is some ongoing viral replication. There are no data regarding the impact of ART on HIV-2 proviral DNA levels and/or HIV-2

transcriptional activity.

We have previously shown that CD4 T cell depletion is directly related to immune activation but only indirectly to plasma viral load in both HIV-2 and HIV-1 infections (28, 55). Here we investigate the relationship of CD4 T cell levels and T cell activation with cell-associated viral burden, measured in terms of *gag* and *tat* mRNA and proviral DNA levels, in parallel with plasma viremia in cohorts of untreated HIV-2<sup>+</sup> and HIV-1<sup>+</sup> individuals together with a cohort of ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals.

## **Materials and Methods**

### *Studied cohorts*

We assessed 45 HIV-2<sup>+</sup> (16 of which were receiving ART) and 27 untreated HIV-1<sup>+</sup> patients followed at Hospital de Santa Maria in Lisbon, Portugal, as well as 16 HIV-seronegative age-matched controls. None of the patients had ongoing opportunistic infections or tumours. Table 1 and 2 describe untreated and treated cohorts, respectively. Although HIV-2 infected cohorts included an increased number of women, non-Caucasian and elderly individuals, in the current study these factors were not found to significantly impact in the parameters under analysis (data not shown). All subjects gave informed consent for blood sampling and processing. The study was approved by the Ethical Board of the Faculty of Medicine, University of Lisbon.

### *Cell isolation and flow cytometry*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated immediately after blood collection and characterized by flow cytometry as previously described (9).

*DNA and mRNA extraction*

DNA was extracted from 5x10<sup>6</sup> PBMC using QIAamp DNA Mini Kit. For mRNA extraction, 5x10<sup>6</sup> PBMC were lysed (RLT), homogenized (QiaShredder columns), extracted (Oligotex mRNA direct mini-kit) (all from Qiagen, Valencia, CA), treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX) and immediately converted to cDNA. Samples were quantified using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop technologies, Wilmington, DE).

**TABLE 1.** Characterization of untreated HIV-2<sup>+</sup>, untreated HIV-1<sup>+</sup> and seronegative cohorts<sup>c</sup>

	Seronegative	Untreated HIV-2	Untreated HIV-1
No. (male/female)	16 (6/10)	29 (9/20)	27 (18/9)
Median age (range) (yr)	45 (27-57)	52 (9-78)#	39 (23-61)
Ethnicity (caucasian/other) (no.)	15/1	15/14	20/7
CD4 T cells/μl (range)	818 (518-1312)	568 (52-1586)*	372 (18-1848)**
% CD4 T cells (range)	43 (34-61)	28 (7-54)***	20 (1-47)***
CD8 T cells/μl (range)	494 (213-1109)	788 (271-1701)**	1065 (177-2996)***
% CD8 T cells (range)	27 (12-42)	37 (23-74)***	50 (16-69)***
Viremia (range) (RNA copies/ml) <sup>a</sup>	NA	200 (200-2.6 x10 <sup>4</sup> )###	1.4 x10 <sup>4</sup> (40-4.5x10 <sup>6</sup> )
Proviral DNA (range)(copies/10 <sup>6</sup> PBMC) <sup>b</sup>	NA	5 (5-1033)	54 (5-975)

<sup>a</sup> HIV-2 viremia was below 200 RNA copies/ml (cutoff) in 22 out of 29 patients studied; HIV-1 viremia was below 40 RNA copies/ml (cutoff) in 3 out of 24 patients.

<sup>b</sup> Proviral DNA was below 5 copies/10<sup>6</sup> PBMC (cutoff) in 15 out of the 29 HIV-2-infected patients and in 9 out of 24 HIV-1-infected patients investigated.

<sup>c</sup> NA, not applicable. Values are medians, with limits in brackets. Test cutoff value was used to calculate the median if levels were below cutoff. Significance in comparison to seronegative: \*, *P*<0.05; \*\*, *P*<0.01; \*\*\*, *P*<0.0001. Significance in comparison to HIV-1: #, *P*<0.05; ###, *P*<0.0001.

**TABLE 2.** Characterization of ART-treated HIV-2<sup>+</sup> cohorts<sup>a</sup>

Parameter	ART HIV-2	ART HIV-2 viremic	ART HIV-2 (all)
No (male/female)	11 (5/6)	5 (3/2)	16 (8/8)
Median age (range) (yr)	54 (34 – 62)	53 (31 – 62)	54 (31-62)
Current ART regimen (no. patients)			
2 NRTI	3	-	3
2 NRTI +1 PI	6	4	10
3 NRTI	2	1	3
Length of follow-up (range) (mo)			
under ART	28 (1 – 109)	66 (6 – 120)	58 (1 – 120)
after HIV diagnosis	65 (8 – 242)	177 (29– 220)	97 (8 – 242)
CD4 T cells/μl (range)	340 (70 – 554)	163 (84 – 719)	302 (70-719)
% CD4 T cells (range)	22 (5 – 36)	10 (4 – 23)	20 (4-36)
CD8 T cells/μl (range)	825 (244 – 1419)	912 (447 – 1532)	887 (244-1532)
% CD8 T cells (range)	50 (26 – 64)	53 (49– 65)	51 (26-65)
Viremia (RNA copies/ml) (range)	200	4172 (499 – 34314)	200 (200-34314)
Proviral DNA (copies/10 <sup>6</sup> PBMC) (range) <sup>b</sup>	108 (5 – 346)	5 (5 – 726)	57 (5-726)

<sup>a</sup> Values are medians, with limits in brackets. Test cutoff value was used to calculate the median if levels were below cutoff. NRTI, nucleoside RT inhibitor; PI, protease inhibitor.

<sup>b</sup> Proviral DNA was below 5 copies/10<sup>6</sup> PBMC (cutoff) in 5 out of 11 aviremic and in 3 out of 5 viremic HIV-2 patients.

### *Viremia and Proviral DNA*

HIV-1 viremia was quantified by a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay with detection threshold of 40 RNA copies/ml (Roche, Basel, Switzerland). HIV-2 viremia was quantified using a previously described in-house developed assay with a detection threshold of 200 RNA copies/ml (54). Quantification of viremia in ART-treated individuals with levels below 200 RNA copies/ml was repeated using a more sensitive

real-time RT-PCR assay with a detection threshold of 40 RNA copies/ml as described (20). HIV-1 and HIV-2 total viral DNA (integrated and non-integrated viral DNA species) was quantified using real-time PCR assays that amplify highly conserved regions in HIV-1 and HIV-2 *gag* with a detection range of 7 orders of magnitude and a sensitivity of 5 copies as we have previously described (52). Test cutoff values were used to calculate the median and the correlations with other parameters when levels were below cutoff.

*gag and tat mRNA*

Eighty ng of mRNA was reverse transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 250 nM of random hexamers and was quantified in duplicate using cDNA (1µg) in a PCR mixture (50µl) containing 25µl Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, 1µl ROX Reference Dye 50X, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (all from Invitrogen) and variable concentrations of the following primers and probes: HIV-1 *gag* F2 (10 pmol/ul): 5'-gggagaattagatcgatgggaaa-3'; HIV-1 *gag* R1 (10 pmol/ul): 5'- gctccctgcttgcccata- 3'; HIV-1 *gag* Probe: 5' FAM- ccctggcettaaccgaatt-MGB-3'; HIV-2 *gag* F2 (10 pmol/ul): 5'-cgcgagaaactccgtcttg-3'; HIV-2 *gag* R2 (10 pmol/ul): 5'-cacacaatatgttttagcctgtactttt; Probe HIV-2-*gag*: 5' FAM- ccgggcccgtaacct-MGB-3'. *tat* multiply spliced mRNA expression was quantified using the following primers and probes: HIV-1 *tat* F2.3 (6 pmol/ul): 5'-gacgaagagctcctcaagaca-3'; HIV-1 *tat* R2.4 (6 pmol/uL): 5'-gagacagagacagatccggtc-3'; HIV-1 *tat* probe: 5'-FAM-tctctatcaaagcaaccgc-MGB-3'; HIV-2 *tat* F3.5 (10 pmol/ul): 5'- aggggctcgggatatgtt-3'; HIV-2 *tat* R3.1 (10 pmol/ul): 5'- tctgtatccaccgtcgtttc - 3'; HIV-2 *tat* Probe: 5'-FAM-tgcatcagacaaatc-MGB-3', in a AbiPrism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City,



CA, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control (FAM/MGB probe, non primer limited – Applied Biosystems; standard curve with cDNA generated from pooled PBMC from 3 seronegatives). Standard curves for *tat* were generated using amplifications of synthetic oligonucleotides (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, USA) corresponding to 200 bp fragments of HIV-1 and HIV-2 *tat* transcripts, and for *gag* as described previously (52). The median values and the correlations with other parameters were calculated using the *tat* and *gag* relative quantification values of patients presenting detectable levels of the transcripts.

#### *HIV-2 Sequencing*

The in-house methodology was used to sequence a 1280-bp HIV-2 *pol* gene fragment, including the entire protease and part of reverse transcriptase from plasma samples. Viral RNA was retrotranscribed and amplified using Access RT-PCR Core Reagents kit (Promega, Madison, WI, USA), and outer primers JA218 ([+1859] 5'-GAA AGA AGC CCC GCA ACT TCC-3') and JA221 ([-3258] 5'-GCT CTG CTT CTG CTA ATT CTG TCC A-3') as described (54). A nested PCR was performed; a second amplification was carried out using *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* and the inner primers JA219 ([+1898] 5'-AGG GGC T(A/G)A CAC CAA CAG CAC-3') and JA220<sub>MOD</sub> ([-3178] 5'-GTC TTT AT( T/C) CCT GGG TAG AT(T/G) TGT G-3'). Cycle sequencing was accomplished with *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* according to manufacturer's recommendations and using four sequencing primers: JA219, JA220 ([-3178] 5'-GTC TTT AT(T/C) CCT GGG TAG ATT TGT G-3'), JA222 ([+2525] 5'-ACC TCC AAC TAA TCC TTA TAA TAC C-3') and JA223 ([-2625] 5'-ACT GAA TTT CTG TGA AAT CTT GAG T-3'). Purified products were run on an ABI PRISM 3100

genetic analyzer according to the same protocol but adjusted to HIV-2-specific settings; and nucleotide sequences were analyzed with *SeqScape Software Version 2.5* (all from Applied Biosystems) by alignment with the ROD HIV-2 reference strain (GenBank accession number M15390).

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software Inc., SD) using Mann-Whitney test, Spearman's coefficient, and Fisher's exact test. *P* values <0.05 were considered significant. Test cutoff value was used to calculate the median if levels were below cutoff.

## **Results**

### ***Ongoing viral replication in untreated HIV-2 infection***

In order to investigate the degree of ongoing viral replication during the natural history of HIV-2 and HIV-1 infections, we compared untreated HIV-2 and HIV-1 cohorts matched for the degree of CD4 T cell depletion (Table 1), although length of infection was likely greater in HIV-2<sup>+</sup> than HIV-1<sup>+</sup> individuals. As expected, viremia was significantly lower in HIV-2 than HIV-1 infection (3, 5, 46, 50, 54). Twenty-two out of 29 HIV-2<sup>+</sup> patients had levels below the test cutoff (aviremic) and the highest viremia was  $2.6 \times 10^4$  RNA copies/ml (Table 1). Conversely, the proviral DNA load, as previously reported, were similar (6, 24, 45, 52), suggesting comparable numbers of infected cells in these two groups despite their distinct viremia (Table 1). Of note, although no significant correlation was found between proviral DNA and viremia in HIV-2 infection, significantly higher proviral levels were found in viremic than

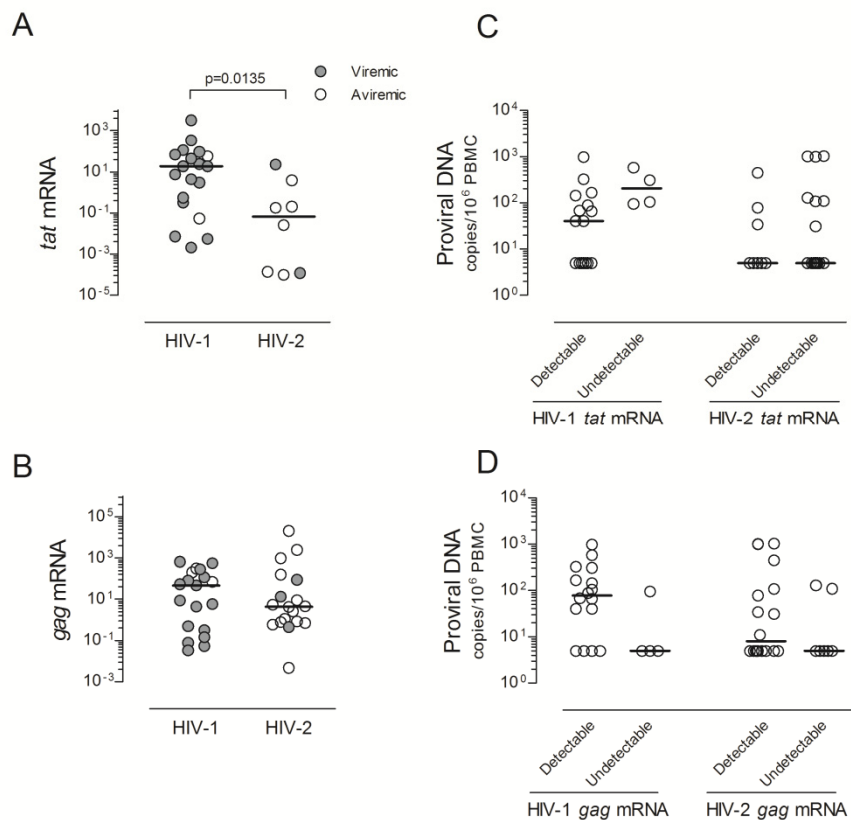
“aviremic” individuals ( $P= 0.0396$ ).

*tat* mRNA, a multiply spliced (MS) HIV transcript, is thought to be mainly expressed in recently infected cells and/or cells actively producing virus (31, 32, 38, 53). We found a significantly higher number of individuals with undetectable *tat* mRNA in the HIV-2 than in the HIV-1 cohort ( $P=0.0014$ ; Fisher’s exact test). Moreover, HIV-2<sup>+</sup> patients with detectable *tat* mRNA featured significantly lower levels than their HIV-1<sup>+</sup> counterparts (Fig.1A), and a significant correlation with viremia was observed only with the HIV-1 cohort ( $r=0.4791$ ,  $P=0.0443$ ,  $n=19$  for HIV-1 cohort;  $r=0.0312$ ,  $P=0.9349$ ,  $n=8$  for HIV-2 cohort).

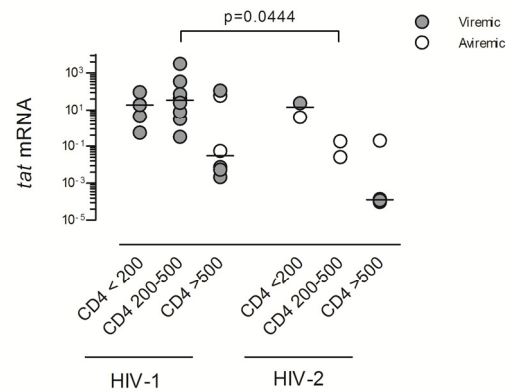
Although no correlation with CD4 T cell levels were observed (Table 3), individuals with low CD4 T cell counts tended to have higher levels of *tat* mRNA (Supplemental Fig.1).

Conversely, *gag* mRNA, an unspliced (US) HIV transcript, was similarly expressed in the HIV-1 and HIV-2 cohorts (Fig.1B), which included an equal number of individuals with undetectable expression levels. Of note, no correlation was found with viremia in either infection. Furthermore, on comparing viremic and aviremic HIV-2<sup>+</sup> individuals, we observed no significant differences between the number of patients with detectable *tat* and *gag* mRNA transcripts, as well as similar levels of expression of *tat* and *gag* mRNA (Fig.1A and Fig.1B), although these results should be interpreted cautiously, given the small number of individuals assessed. A low ratio of *gag* to *tat* mRNA levels has been suggested both as a marker of active viral transcription and of HIV-1 disease progression (22, 37, 49). We found a significantly higher *gag-to-tat* ratio in HIV-2<sup>+</sup> as compared to HIV-1<sup>+</sup> patients ( $P=0.0118$ ), although no association with viremia was found in either cohort.

Of note, neither *tat* nor *gag* mRNA expression levels, nor *gag*-to-*tat* ratio significantly correlated with proviral DNA load in either HIV cohort. Moreover, when we subdivided the HIV-1 and HIV-2 cohorts on the basis of detectable and undetectable viral mRNA, no differences in proviral DNA levels were observed (Fig.1C and Fig.1D). Thus, no direct relationship appears to exist between the number of infected cells, as estimated by proviral DNA, and the levels of *tat* and *gag* transcription in PBMC during untreated HIV-2 and HIV-1 infections, suggesting a significant contribution of archived viral DNA.



**Fig. 1 *tat* and *gag* mRNA expression and proviral DNA levels in untreated HIV-2 and HIV-1 infections.** Graphs show the expression of *tat* (A) and *gag* (B) (as arbitrary units) relative to GAPDH in those individuals with detectable levels of these transcripts, from a total of 25 HIV-2<sup>+</sup> and 23 HIV-1<sup>+</sup> individuals evaluated. Open symbols refer to patients with viremia below the cutoff of the test, and closed symbols to patients with detectable viremia. Proviral DNA levels were compared for untreated HIV-2<sup>+</sup> (25 of 25) and HIV-1<sup>+</sup> (20 of 23) individuals with detectable and undetectable *tat* (C) and *gag* (D) mRNA transcripts. Bars represent medians.



**Supplemental Figure 1. *tat* mRNA expression in untreated HIV-2 and HIV-1 infections stratified accordingly to circulating CD4 T cell counts.** Graphs show the expression of *tat* relative to GAPDH in those individuals with detectable levels of this transcript, from a total of 25 HIV-2<sup>+</sup> and 23 HIV-1<sup>+</sup> individuals evaluated. HIV-1 and HIV-2 infected patients were grouped according to CD4 T cell numbers, namely more than 500 cells/ $\mu$ l, 200 to 500 cells/ $\mu$ l, and less than 200 cells/ $\mu$ l. Open symbols refer to patients with viremia below the cutoff of the test, and closed symbols to patients with detectable viremia. Bars represent medians.

Overall, HIV-2<sup>+</sup> individuals exhibited reduced levels of *tat*, and similar levels of *gag* transcripts compared to their HIV-1<sup>+</sup> counterparts, translating into a higher *gag*-to-*tat* mRNA ratio in the former.

***Relationship of plasma and cell-associated viral load with CD4 T cell depletion and T cell activation in HIV-2 infection***

We have previously shown that T cell activation markers were similarly upregulated in HIV-1 and HIV-2 infections when patients were matched for CD4 T cell levels, suggesting that CD4 T cell depletion is more directly linked to immune activation than to viral load (28, 55). Here, we assessed the relationship between cell-associated viral mRNA and DNA and the hyperimmune activation observed in HIV-2 and HIV-1 infections.

With respect to *gag* mRNA expression, we found a direct correlation with the levels of

HLA-DR expression (Table 3) and HLA-DR and CD38 coexpression ( $r=0.5150$ ;  $P=0.0287$ ) within CD4 T cells in HIV-2<sup>+</sup>; this correlation which did not reach statistical significance in HIV-1<sup>+</sup> individuals. No correlations were found with CD8 T cell activation levels (Table 3).

**TABLE 3.** Correlations between virological parameters and levels of CD4 T cells and immune activation in untreated HIV-2 and HIV-1 infections.

Viremia, DNA, or transcript	Virus type	$r; P^a$			
		% CD4 T cells	CD4 T cells/ $\mu$ l	% HLA-DR+ in CD4 T cells	% HLA-DR+38+ in CD8 T cells
Viremia	HIV-2	-0.3097; 0.1021	<b>-0.3943; 0.0343</b>	<b>0.5186; 0.0039</b>	<b>0.5288; 0.0032</b>
	HIV-1	<b>-0.6120; 0.0009</b>	<b>-0.5810; 0.0019</b>	<b>0.4731; 0.0146</b>	<b>0.7140; &lt; 0.0001</b>
Proviral DNA	HIV-2	0.0313; 0.8719	0.1555; 0.4207	0.2281; 0.2339	0.1029; 0.5952
	HIV-1	0.0652; 0.7621	-0.1019; 0.6358	0.0005; 0.9983	0.1590; 0.4580
<i>tat</i> mRNA	HIV-2	-0.5952; 0.1323	-0.5238; 0.1966	0.6190; 0.1017	0.6667; 0.0831
	HIV-1	-0.3737; 0.1150	-0.3193; 0.1827	0.2825; 0.2413	<b>0.5404; 0.0169</b>
<i>gag</i> mRNA	HIV-2	<b>-0.5728; 0.0130</b>	-0.3870; 0.1126	<b>0.4985; 0.0353</b>	0.3189; 0.1971
	HIV-1	0.2281; 0.3477	0.1869; 0.4435	-0.4018; 0.0882	-0.4193; 0.0739

<sup>a</sup> Test cutoff values were used to calculate the correlations with viremia or proviral DNA, if levels were below the cutoff. Correlations with viral mRNA were calculated using the *tat* and *gag* relative quantification values of patients presenting detectable levels of the transcripts (8 and 18 in HIV-2, respectively, and 19 for both *tat* and *gag* in HIV-1). Statistically significant correlations are represented in bold.

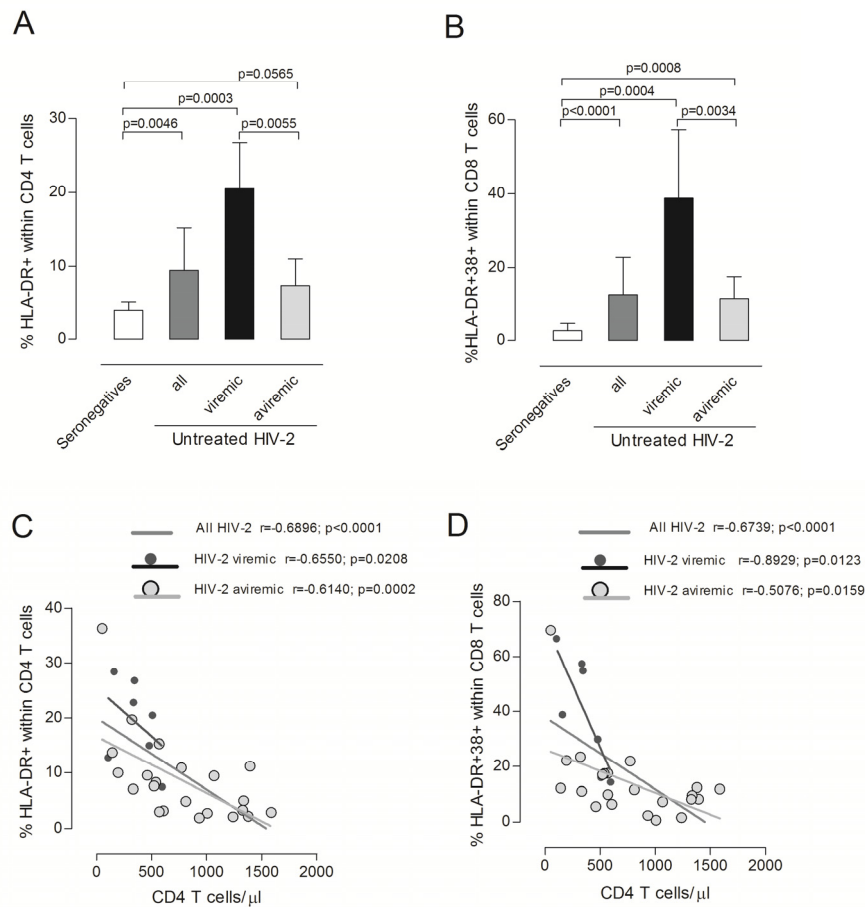
Conversely, we observed that the levels of *tat* mRNA in HIV-1<sup>+</sup> individuals directly correlated with CD8 T cell activation levels, measured either as proportion of HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Table 3) or CD38<sup>+</sup> cells ( $r=0.6196$ ;  $P=0.0047$ ), as well as CD38 mean fluorescence intensity (MFI;  $r=0.7386$ ;  $P= 0.0003$ ). Clear trends for an association

between *tat* mRNA levels and CD8 T cell activation were also observed with the HIV-2 cohort, but no significant correlations were found with CD4 T cell activation in either infection (Table 3).

Of note, proviral DNA levels did not directly correlate with either CD4 or CD8 T cell activation in HIV-1<sup>+</sup> and HIV-2<sup>+</sup> individuals (Table 3), further suggesting that a significant component comprises archived quiescent virus.

In spite of the narrow range of HIV-2 viremia (undetectable to 26263 copies/ml), significant positive correlations were found between viremia and several T cell activation markers (Table 3) (percentage of HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> within CD4 T cells:  $r=0.5685$ ,  $P=0.0013$ ; percentage and MFI of CD38 within CD8 T cells:  $r=0.6196$ ,  $P=0.0047$  and  $r=0.5330$ ,  $P=0.0029$ , respectively). In order to further assess the relative contribution of viremia, we compared viremic and aviremic HIV-2<sup>+</sup> individuals (Table 1). Although the former showed significantly higher CD4 and CD8 T cell activation than the latter (Fig.2A and B), both viremic and aviremic HIV-2<sup>+</sup> individuals had significantly higher levels of T cell activation as compared to seronegatives (Fig.2A and B) and exhibited strong negative correlations between CD4 T cell numbers and CD4 and CD8 T cell activation levels (Fig.2C and D).

Overall, our data not only demonstrated that T cell activation was strongly associated with CD4 T cell depletion, both in viremic and aviremic HIV-2<sup>+</sup> individuals, but also supported a contribution, even at low levels, of circulating virus to both CD4 and CD8 T cell activation. Moreover, we showed that *gag* mRNA was directly related to CD4 T cell activation, and *tat* mRNA to CD8 T cell activation, suggesting an overall impact of viral transcripts upon T cell activation.



**Fig.2. Relationship between viremia, absolute CD4 T cell numbers, and T cell activation in untreated HIV-2 infection.** Proportion of CD4 T cells expressing HLA-DR (**A**) and CD8 T cells coexpressing HLA-DR and CD38 (**B**) in seronegative individuals (white bars) and untreated HIV-2 patients (dark gray bars). HIV-2 patients were further stratified into viremic (black bars) and aviremic groups (light gray bars). Bars represent median±interquartile range. Correlations between CD4 T cell depletion and proportion of cells expressing HLA-DR within the CD4 T cell subset (**C**) and the proportion of CD8 T cells coexpressing HLA-DR and CD38 (**D**).

***Cell-associated viral mRNA and DNA in HIV-2<sup>+</sup> patients under ART.***

In order to further dissect the impact of cell-associated viral DNA and RNA upon HIV-2 immunopathogenesis, we assessed these parameters in patients receiving ART (Table 2). This cohort exhibited significantly lower CD4 T cell counts than untreated HIV-2<sup>+</sup> individuals did ( $P=0.0046$ ), in agreement with previous reports showing a limited CD4 T cell recovery in ART-treated HIV-2 infection (1, 19, 29, 40, 51, 56). Viremia levels were similar in the treated and untreated HIV-2 cohorts, due to the low level viremia

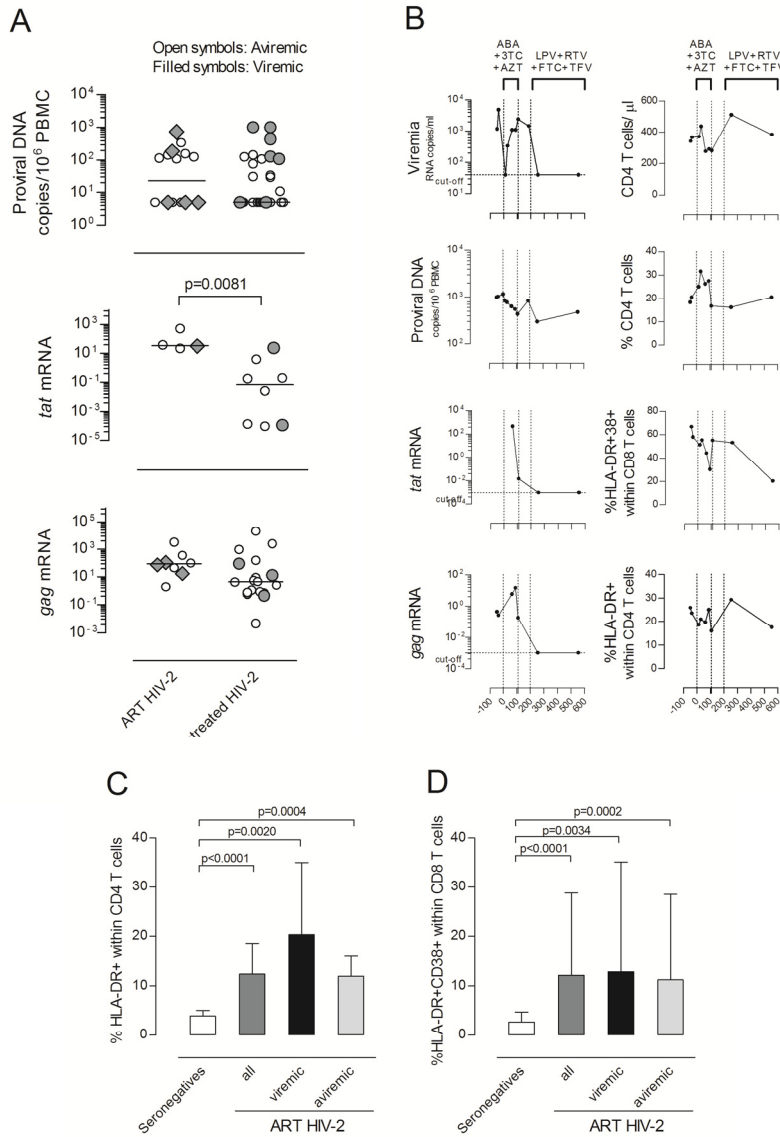


detected in some of the ART-treated HIV-2<sup>+</sup> patients (Table 2).

Of note, in contrast with the progressive decline in proviral DNA levels usually observed in ART-treated HIV-1<sup>+</sup> patients (23, 58), proviral DNA did not significantly differ between untreated and treated HIV-2<sup>+</sup> patients (Fig.3A), despite the prolonged treatment. Moreover, treated and untreated HIV-2 patients featured similar levels of *gag* mRNA expression, whereas *tat* expression was significantly higher in the treated cohort, although the reduced number of individuals with detectable *tat* transcripts preclude a definitive interpretation (Fig.3A). No significant differences were found between the number of patients with detectable *tat* and *gag* mRNA transcripts within treated and untreated groups. These results showed significant amounts of ongoing viral replication in ART-treated HIV-2 infection, suggesting a limited effectiveness of the ART regimens in HIV-2 infection, which justifies further exploration in large cohorts treated with optimized ART regimens.

Additionally, neither the amount of *gag* and *tat* transcripts, nor proviral DNA significantly differed between treated HIV-2 patients with detectable and undetectable viremia (Fig.3A), emphasizing that the absence of detectable viremia is not a good surrogate marker for cell-associated viral mRNA and/or DNA during HIV-2 infection.

A rapid emergence of mutations potentially associated with drug resistance has been reported for HIV-2<sup>+</sup> patients under ART (25, 29, 41). We confirmed the presence of mutations in the reverse transcriptase and protease in our ART-treated HIV-2 cohort (Table 4). These data further support the presence of significant amounts of ongoing replication in these ART-treated HIV-2<sup>+</sup> patients, leading us to speculate about the potential contribution of ART-induced selective pressure upon the virus to the increased *tat* transcript levels (Fig.3).



**Fig. 3 Impact of ART on HIV-2 plasma and cell-associated viral load, CD4 T cell frequency and T cell activation.** (A) Levels of Proviral DNA, and *tat* and *gag* mRNA (expressed as arbitrary units) were compared in untreated and ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals. Open symbols represent patients with viremia below the cutoff of the test, and closed symbols patients with detectable viremia. Bars represent median. (B) Longitudinal study of a representative ART-treated HIV-2<sup>+</sup> patient. Day 0 was defined as the therapy initiation date. The vertical dashed lines indicate the periods under specific ART regimens (ABC, abacavir; 3TC, lamivudine; AZT, zidovudine; LPV, lopinavir; RTV, ritonavir; FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir). Mutations in protease (PR) and reverse transcriptase (RT) were analysed before therapy (day -37), and after the first ART regimen (day 108). Mutations [aminoacid changes] found before therapy (day -37) were, in **PR**, Y14H; N40S; N41D; N68G; K69[K,R]; K70R; and in **RT**: D17[E,D]; W24[G,W]; K28R; C38[W,C]; K43[K,R]; K64R; L74V; K82R; D123G; P126Q; H162Y; V167I; K176S; H228D; W235[G,C,W]; Q245E. Mutations found after first therapy (day 108) were, in **PR**, Y14H; N40S; N41D; N68G; K69R; K70R and, in **RT**, K28R; K43[K,R]; K64R; W71R; L74I; K82R; T88[T,P]; H96[H,P]; G99[A,G]; D123G; P126[Q,P]; I159[I,L]; H162Y; V167I; K176S; M184V; I187[I,L]; and L209[P,L]. Proportion of CD4 T cells expressing HLA-DR (C) and CD8 T cells coexpressing HLA-DR and CD38 (D) in seronegative individuals (white bars) and ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals (dark gray bars). HIV-2<sup>+</sup> patients were further stratified into viremic (black bars) and aviremic groups (light gray bars). Bars represent median $\pm$ interquartile range.

**TABLE 4.** Virological parameters and CD4 T cell levels of HIV-2<sup>+</sup> patients under ART<sup>d</sup>

Case no.	Current ART regimen	Follow-up after HIV diagnosis/under ART (mo) <sup>a</sup>	CD4 T Pré-ART; post-ART (cells/ $\mu$ l) <sup>a</sup>	Mutations	Viremia (RNA copies/ml)	Proviral DNA (copies/10 <sup>6</sup> PBMC)	<i>tat</i> mRNA (Arbitrary units)	<i>gag</i> mRNA (Arbitrary units)
1	d4T+3TC+ SQV/r <sup>b</sup>	177/108	300; 719	NA	4172	5	Undet	1.07x10 <sup>2</sup>
2	AZT/3TC/ABC	63/63	138; 554	NA	<40	5	Undet	9.82x10 <sup>1</sup>
3	AZT/3TC	26/26	457; 535	PR+RT <sup>c</sup>	<40	5	2.13x10 <sup>1</sup>	Undet
4	AZT/3TC <sup>b</sup>	206/64	500; 520	NA	44	158	Undet	Undet
5	AZT/3TC+LPV/r	126/26	125; 457	NA	<40	114	Undet	3.56x10 <sup>2</sup>
6	AZT/3TC+LPV/r	38/28	164; 406	NA	<40	108	Undet	4.46x10 <sup>1</sup>
7	AZT/3TC/ABC	242/61	287; 340	PR+RT <sup>c</sup>	191	5	ND	ND
8	AZT/3TC+SQV/r	8/5	222; 326	NA	<40	145	Undet	Undet
9	AZT/3TC+NFXV <sup>b</sup>	29/4	143; 277	PR+RT <sup>c</sup>	499	5	3.14x10 <sup>1</sup>	1.72x10 <sup>1</sup>
10	AZT/3TC	15/1	297; 273	NA	<40	126	Undet	Undet
11	AZT/3TC+IDV/r	65/51	112; 251	NA	<40	346	5.19x10 <sup>2</sup>	1.91
12	AZT/3TC/ABC	220/56	176; 163	PR+RT <sup>c</sup>	742	187	Undet	7.25x10 <sup>1</sup>
13	AZT/3TC+IDV <sup>b</sup>	218/6	121; 102	PR+RT <sup>c</sup>	<40	5	3.73x10 <sup>1</sup>	3.30x10 <sup>3</sup>
14	d4T+3TC+SQV/r <sup>b</sup>	177/120	82; 87	NA	34314	726	ND	ND
15	AZT/3TC+LPV/r <sup>b</sup>	67/12	120; 84	PR+RT <sup>c</sup>	10474	5	Undet	Undet
16	ABC/FTC+LPV/r <sup>b</sup>	216/7	128; 70	NA	<40	5	Undet	Undet

<sup>a</sup> ART refers to the current therapy.

<sup>b</sup> Previous ART regimens included the following: Case 1, AZT, ddI, ddC; case 4, ddC, d4T; case 9, ddI, EFV; case 13, d4T; case 14, AZT, ddI; case 15, ddI, d4T, NFV; case 16, AZT.

<sup>c</sup> The following mutations (amino acid change) were found ( those mutations previously associated with drug resistance are in bold). Case 3: for PR, P19S, N61D, E65K, **L99F**; for RT, V5L, K9R, I10V, M11T, E44[K,R,E,G], K68G, R72[K,R], K82R, D86E, Q91[Q,P], P126Q, H162Y, V167I, K173R, K176Q, I179T, E197G, R200K, Y227F, H228Q. Case 7: for PR, Y14[H,Y], N40S, N61D, E65[K,R], K70R; for RT, M11T, E44[E,D], K82R, P126Q, H162Y, V167I, K176Q, **M184V**, **D218[E,D]**, E219D, D224[N,D], P226[P,S], H228Q, W239[G,W], Q245H, L246W, Q248L, E250D, I251T, K259N, N265I, W266G. Case 9: for PR, E21D, N40S, **T56[T,A]**, **V62[A,V]**, K70R, **V71I**, **L99F**; for RT, V5I, M11T, D17[E,D], P51S, D76V, F77L, R78G, E79K, P126Q, S134A, V167I, K176P, I180L, **M184V**, H228Q, E250G, I251V, K259N, N265I. Case 12: for PR, Y14H, N40S, N41[N,D], I46[L,V], N61[N,D], E65R, D79E; for RT, K9R, I10V, M11T, R22K, K35R, K40R, P51S, K70Q, D86E, R104[K,R], V111I, P126Q, S134A, V167I, K176P, I180[L,L], **M184V**, **S215Y**, F221L, D224N, H228Q. Case 13: for PR, Y14H, N40S, E65R, K70R, **F85L**, I89V, **L90M**; for RT, A3V, V5M, I10V, M11R, K43R, T53S, T58S, T60[T,P], T88[T,P], P126Q, A138T, V167I, A174T, K176P, I180L, **M184V**, H228Q, K243[K,R]. Case 15: for PR, K7R, **V10I**, V22I, V33I, E37D, N40S, **I54M**, T56V, N68G, K70R, **V71I**, M76L, **I82F**, I89[I,V], T91A, G94[S,G]; for RT, P1[P,L], V5[V], I10[I,V], D17[N,D], E48[E,G], A62[A,V], K64[K,R], **K65[K,R]**, A101P, P126Q, P126Q, V135A, **Q151M**, H162Y, V167I, K176P, I180L, **M184V**, I189L, V201A, F214L, **D218[K,N,E,D]**, E219[E,D], H228K, V254F.

<sup>d</sup> ND, not done; Undet, undetectable mRNA expression; NA, no amplification; ART, antiretroviral therapy; reverse transcriptase (RT) inhibitors: AZT, zidovudine; 3TC, lamivudine; ABC, abacavir; d4T, stavudine; ddC, zalcitabine; ddI, didanosine; EFV, efavirenz; FTC, emtricitabine; r, ritonavir. Protease (PR) inhibitors: LPV, lopinavir, IDV, indinavir, NFV, nelfinavir; SQV, saquinavir.

The selection of adequate ART regimens to treat HIV-2 infection is difficult given the lack of clinical trials. There are currently some phenotypic studies that allow the

selection of better first-line therapies than a few years ago (16, 61), but the knowledge of HIV-2 resistance pathways is still incomplete. Longitudinal data of an individual HIV-2<sup>+</sup> patient, in whom the initial ART regimen was associated with the rapid emergence of mutations and virological failure, illustrated that switching to another ART combination was associated with viremia suppression and a decline of cell-associated viral burden (Fig.3B). This was supported by both a loss of measurable *tat* and *gag* transcripts, and a decrease in the levels of proviral DNA, both of which are indicative of a successful virological response. Nevertheless, this patient's immunological response was limited, with only marginal CD4 T cell recovery and a partial decrease in both CD4 and CD8 T cell immune activation (Fig.3B), suggesting that factors other than viral replication are contributing to the poor immunological reconstitution. Our findings support a role for persistent immune activation, given that, as shown in figures 3C and D, ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals exhibited significantly higher levels of T cell activation than seronegatives did, similar levels of CD4 and CD8 T cell activation in comparison with untreated HIV-2 cohort, and significant negative correlations between absolute CD4 T cell numbers and the percentages of HLA-DR<sup>+</sup> within CD4 T cells ( $r=-0.5147$ ;  $P=0.0413$ ), and HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> within CD8 T cells ( $r=-0.5294$ ;  $P=0.0350$ ).

Overall, significant amounts of ongoing viral replication were observed in HIV-2-infected patients under ART, highlighting the importance of additional studies of antiretroviral drug efficacy in HIV-2 infection. Furthermore, ART apparently failed to significantly impact on T cell activation, even in patients with undetectable viremia, possibly contributing to their low CD4 T cell recovery.

## Discussion

Here we demonstrated that untreated HIV-1<sup>+</sup> and HIV-2<sup>+</sup> individuals with similar degrees of CD4 T cell depletion featured similar levels of *gag* mRNA transcripts, suggesting that significant viral transcription occurs in HIV-2 patients, despite the lower viremia. Conversely, we found decreased levels of *tat* mRNA in untreated HIV-2<sup>+</sup> individuals. Given the previous reports demonstrating that HIV-1 *tat* mRNA transcripts accumulate and outnumber *gag* mRNA transcripts in recently infected cells (31, 32, 38, 53), our results provide evidence for a decreased rate of *de novo* cell infection in HIV-2 disease.

Proviral DNA levels have been used to estimate the extent of viral reservoirs (8, 10, 11, 18). We and others have shown that the levels of total proviral DNA are similar in the two HIV infections despite the reduced viremia observed in HIV-2<sup>+</sup> individuals (6, 45, 52). This may result from a preferential contribution of latently infected, quiescent T cells, to total HIV-2 proviral DNA. Alternatively, a significant amount of ongoing viral replication occurs, but it does not translate into plasma viral load. In this study, we showed that the levels of proviral DNA were not associated with viral transcription levels in both HIV-1<sup>+</sup> and HIV-2<sup>+</sup> individuals, bringing into question the reliability of proviral DNA levels as a marker of replicative activity in both infections.

Additionally, the impact of plasma and cell-associated viral load upon HIV-2-associated hyperimmune activation was investigated. Of note, significantly higher levels of CD4 and CD8 T cell activation were found in viremic as compared to aviremic individuals, despite the small amount of circulating virus observed in viremic HIV-2<sup>+</sup> patients. In agreement with a recent report on an African cohort (33), our data support a contribution of plasma viral load, even at low levels, to immune activation, which may

be related both to transmission of cell free viruses and/or immunological effects of viral proteins.

The direct association between *gag* mRNA and CD4 T cell activation that we observed with HIV-infected patients raises the possibility that ongoing viral replication significantly contributes to the maintenance of heightened T cell activation in HIV-2<sup>+</sup> individuals in spite of the reduced viremia. In addition, the direct association found between *tat* mRNA levels and CD8 T cell activation, particularly in HIV-1<sup>+</sup> individuals, suggests a specific role of this transactivator molecule and/or newly infected cells in driving CD8 T cell activation.

With respect to HIV-1 infection, those rare (<0.1%) individuals who are able to control viral replication in the absence of ART (27, 42, 44, 60) provide another valuable resource for the investigation of factors associated with viremia control. Various criteria have been used to define this population, including viremia ranging from undetectable (elite controllers) up to 2000 RNA copies/ml (viremic controllers) (42, 60). Notably, the small cohort of HIV-1 controllers within our untreated HIV-1 cohort resemble the untreated HIV-2 cohort in terms of viremia, *gag* and *tat* mRNA expression, *gag-to-tat* ratio and proviral DNA levels. The seven individuals with viremia <2000 RNA copies/ml tended to have lower levels of *tat* mRNA (14.59±14.47) than the other HIV-1<sup>+</sup> patients did (262.0±210.4), though the levels did not reach statistical significance. The number of patients with detectable *tat* mRNA, *gag* mRNA and proviral DNA was similar within these subgroups of the HIV-1 cohort, and no differences in *gag* mRNA levels or proviral DNA were observed, but the *gag-to-tat* ratio was higher in controllers ( $P=0.0434$ ). These data further support that viremia control is associated with reduced levels of *tat* transcripts.

Finally, we provide evidence of persistent HIV-2 replication during ART, based on proviral DNA, and *gag* and *tat* mRNA levels, irrespective of detectable plasma viremia. We also demonstrated drug-related genetic evolution of HIV-2 reverse transcriptase and protease gene sequences. The high levels of *tat* mRNA observed with the ART-treated HIV-2 cohort suggested that the therapeutic regimens used were unable to reduce the rate of *de novo* cell infection. These data contrast with those for ART-treated HIV-1<sup>+</sup> patients in which virological response is usually associated with a sharp decline in MS mRNA (4, 21, 62), and in the proportion of MS mRNA relative to US mRNA in PBMC (57), as well as with a progressive decrease in proviral DNA (23, 58, 59) despite the low-level viremia that can frequently be detected using ultrasensitive assays (17, 43).

In agreement with previous reports (1, 19, 29, 40, 51), we documented poor CD4 T cell recovery in ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals, even in those with evidence of viral suppression. Our findings suggest that persistent hyperimmune activation may be a main determinant of this impaired immune reconstitution. The study of lymphoid tissue from HIV-2 infected patients will be instrumental in evaluating the degree of irreversible damage associated with long-term infection that may limit the potential for immune recovery and providing support for an early start of ART in this otherwise relatively benign disease.

In conclusion, we provide here evidence of ongoing viral replication in HIV-2 infection despite the low or undetectable viremia and of its association with CD4 and CD8 T cell activation, with the latter being more closely related to the levels of *tat* mRNA. Of particular note was the persistent viral replication in ART-treated HIV-2<sup>+</sup> individuals. In light of these findings, and in particularly the apparent ease with which the virus mutated in treated HIV-2<sup>+</sup> individuals to escape drug activity, there is an obvious need

for large-scale drug trials in HIV-2 infection to determine the most appropriate drug regimen and also the benefit of an early initiation of therapy in this infection.

## Acknowledgements

We thank Sara Sousa and Luis França from the Clínica Universitária de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, as well as Luis Pinheiro from the Clínica Universitária de Medicina 2 from the Hospital Universitário de Santa Maria, for the collaboration in the collection of clinical data or patient follow-up and Nuno Taveira for helpful discussion.

This study was funded by grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) and Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 (POCI2010) as well as from Fundação Calouste Gulbenkian to AES. APB received scholarship from GlaxoSmithKline and RSS, RT, RBF, and RC a scholarship from FCT.

All authors report no potential conflict of interest.

## References

1. **Adje-Toure, C. A., R. Cheingsong, J. G. Garcia-Lerma, S. Eholie, M. Y. Borget, J. M. Bouchez, R. A. Otten, C. Maurice, M. Sassan-Morokro, R. E. Ekpini, M. Nolan, T. Chorba, W. Heneine, and J. N. Nkengasong.** 2003. Antiretroviral therapy in HIV-2-infected patients: changes in plasma viral load, CD4<sup>+</sup> cell counts, and drug resistance profiles of patients treated in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS* **17 Suppl 3**:S49-54.
2. **Adjorlolo-Johnson, G., K. M. De Cock, E. Ekpini, K. M. Vetter, T. Sibailly, K. Brattegaard, D. Yavo, R. Doorly, J. P. Whitaker, L. Kestens, and et al.** 1994. Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA* **272**:462-6.
3. **Andersson, S., H. Norrgren, Z. da Silva, A. Biague, S. Bamba, S. Kwok, C. Christopherson, G. Biberfeld, and J. Albert.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* **160**:3286-93.
4. **Bagnarelli, P., A. Valenza, S. Menzo, R. Sampaolesi, P. E. Varaldo, L. Butini, M. Montroni, C. F. Perno, S. Aquaro, D. Mathez, J. Leibowitch, C. Balotta, and M. Clementi.** 1996. Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in



- vivo. *J Virol* **70**:7603-13.
5. **Berry, N., K. Ariyoshi, S. Jaffar, S. Sabally, T. Corrah, R. Tedder, and H. Whittle.** 1998. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* **1**:457-68.
  6. **Berry, N., K. Ariyoshi, O. Jobe, P. T. Ngum, T. Corrah, A. Wilkins, H. Whittle, and R. Tedder.** 1994. HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4<sup>+</sup> lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1031-7.
  7. **Brandin, E., L. Lindborg, K. Gyllensten, C. Brostrom, L. Hagberg, M. Gisslen, B. Tuveesson, A. Blaxhult, and J. Albert.** 2003. pol gene sequence variation in Swedish HIV-2 patients failing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:543-50.
  8. **Brenchley, J. M., B. J. Hill, D. R. Ambrozak, D. A. Price, F. J. Guenaga, J. P. Casazza, J. Kuruppu, J. Yazdani, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup.** 2004. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* **78**:1160-8.
  9. **Cavaleiro, R., A. P. Baptista, R. S. Soares, R. Tendeiro, R. B. Foxall, P. Gomes, R. M. Victorino, and A. E. Sousa.** 2009. Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease. *PLoS Pathog* **5**:e1000667.
  10. **Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano.** 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**:183-8.
  11. **Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci.** 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13193-7.
  12. **Clavel, F., K. Mansinho, S. Chamaret, D. Guetard, V. Favier, J. Nina, M. O. Santos-Ferreira, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* **316**:1180-5.
  13. **Colson, P., M. Henry, N. Tivoli, H. Gallais, J. A. Gastaut, J. Moreau, and C. Tamalet.** 2005. Polymorphism and drug-selected mutations in the reverse transcriptase gene of HIV-2 from patients living in southeastern France. *J Med Virol* **75**:381-90.
  14. **Colson, P., M. Henry, C. Tourres, D. Lozachmeur, H. Gallais, J. A. Gastaut, J. Moreau, and C. Tamalet.** 2004. Polymorphism and drug-selected mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 2 from patients living in Southern France. *J Clin Microbiol* **42**:570-7.
  15. **Damond, F., F. Brun-Vezinet, S. Matheron, G. Peytavin, P. Campa, S. Pueyo, F. Mammano, S. Lasteré, I. Farfara, F. Simon, G. Chene, and D. Descamps.** 2005. Polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) protease gene and selection of drug resistance mutations in HIV-2-infected patients treated with protease inhibitors. *J Clin Microbiol* **43**:484-7.
  16. **Desbois, D., B. Roquebert, G. Peytavin, F. Damond, G. Collin, A. Benard, P. Campa, S. Matheron, G. Chene, F. Brun-Vezinet, and D. Descamps.** 2008. In vitro phenotypic susceptibility of human immunodeficiency virus type 2 clinical isolates to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1545-8.
  17. **Dinosa, J. B., S. Y. Kim, A. M. Wiegand, S. E. Palmer, S. J. Gange, L. Cranmer, A. O'Shea, M. Callender, A. Spivak, T. Brennan, M. F. Kearney, M. A. Proschan, J. M. Mican, C. A. Rehm, J. M. Coffin, J. W. Mellors, R. F. Siliciano, and F. Maldarelli.** 2009. Treatment

- intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9403-8.
18. **Douek, D. C., J. M. Brechley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup.** 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* **417**:95-8.
  19. **Drylewicz, J., S. Matheron, E. Lazaro, F. Damond, F. Bonnet, F. Simon, F. Dabis, F. Brun-Vezinet, G. Chene, and R. Thiebaut.** 2008. Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. *AIDS* **22**:457-68.
  20. **Ferns, R. B., and J. A. Garson.** 2006. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus internal control. *J Virol Methods* **135**:102-8.
  21. **Fischer, M., B. Joos, B. Niederost, P. Kaiser, R. Hafner, V. von Wyl, M. Ackermann, R. Weber, and H. F. Gunthard.** 2008. Biphasic decay kinetics suggest progressive slowing in turnover of latently HIV-1 infected cells during antiretroviral therapy. *Retrovirology* **5**:107.
  22. **Furtado, M. R., L. A. Kingsley, and S. M. Wolinsky.** 1995. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4<sup>+</sup> T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **69**:2092-2100.
  23. **Garrigue, I., I. Pellegrin, B. Hoen, B. Dumon, M. Harzic, M. H. Schrive, D. Sereni, and H. Fleury.** 2000. Cell-associated HIV-1-DNA quantitation after highly active antiretroviral therapy-treated primary infection in patients with persistently undetectable plasma HIV-1 RNA. *AIDS* **14**:2851-5.
  24. **Gomes, P., N. C. Taveira, J. M. Pereira, F. Antunes, M. O. Ferreira, and M. H. Lourenco.** 1999. Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol* **37**:453-6.
  25. **Gottlieb, G. S., N. M. Badiane, S. E. Hawes, L. Fortes, M. Toure, C. T. Ndour, A. K. Starling, F. Traore, F. Sall, K. G. Wong, S. L. Cherne, D. J. Anderson, S. A. Dye, R. A. Smith, J. I. Mullins, N. B. Kiviat, and P. S. Sow.** 2009. Emergence of multiclass drug-resistance in HIV-2 in antiretroviral-treated individuals in Senegal: implications for HIV-2 treatment in resource-limited West Africa. *Clin Infect Dis* **48**:476-83.
  26. **Gottlieb, G. S., S. E. Hawes, H. D. Agne, J. E. Stern, C. W. Critchlow, N. B. Kiviat, and P. S. Sow.** 2006. Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. *AIDS* **20**:895-900.
  27. **Grabar, S., H. Selinger-Leneman, S. Abgrall, G. Pialoux, L. Weiss, and D. Costagliola.** 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* **23**:1163-9.
  28. **Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, A. E. Sousa, R. M. Victorino, and W. E. Paul.** 2002. CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* **8**:319-23.
  29. **Jallow, S., A. Alabi, R. Sarge-Njie, K. Peterson, H. Whittle, T. Corrah, A. Jaye, M. Cotton, G. Vanham, S. J. McConkey, S. Rowland-Jones, and W. Janssens.** 2009. Virological response to Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in HIV-2 and HIV-1/HIV-2 Dually Infected Patients in The Gambia and the Emergence of Drug Resistant variants. *J Clin Microbiol*.
  30. **Kanki, P. J., K. U. Travers, M. B. S, C. C. Hsieh, R. G. Marlink, N. A. Gueye, T. Siby, I. Thior, M. Hernandez-Avila, J. L. Sankale, and et al.** 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* **343**:943-6.

31. **Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore.** 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* **63**:3708-13.
32. **Klotman, M. E., S. Kim, A. Buchbinder, A. DeRossi, D. Baltimore, and F. Wong-Staal.** 1991. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5011-5.
33. **Leligdowicz, A., J. Feldmann, A. Jaye, M. Cotten, T. Dong, A. McMichael, H. Whittle, and S. Rowland-Jones.** 2010. Direct relationship between virus load and systemic immune activation in HIV-2 infection. *J Infect Dis* **201**:114-22.
34. **MacNeil, A., A. D. Sarr, J. L. Sankale, S. T. Meloni, S. Mboup, and P. Kanki.** 2007. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol* **81**:5325-30.
35. **Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, E. H. Gueye, and et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* **265**:1587-90.
36. **Matheron, S., S. Pueyo, F. Damond, F. Simon, A. Lepretre, P. Campa, R. Salamon, G. Chene, and F. Brun-Vezinet.** 2003. Factors associated with clinical progression in HIV-2 infected-patients: the French ANRS cohort. *AIDS* **17**:2593-601.
37. **Michael, N. L., T. Mo, A. Merzouki, M. O'Shaughnessy, C. Oster, D. S. Burke, R. R. Redfield, D. L. Birx, and S. A. Cassol.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort. *J Virol* **69**:1868-77.
38. **Michael, N. L., P. Morrow, J. Mosca, M. Vahey, D. S. Burke, and R. R. Redfield.** 1991. Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in chronically infected cells is associated primarily with a shift in RNA splicing patterns. *J Virol* **65**:1291-303.
39. **Michael, N. L., M. Vahey, D. S. Burke, and R. R. Redfield.** 1992. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol* **66**:310-6.
40. **Mullins, C., G. Eisen, S. Popper, A. Dieng Sarr, J. L. Sankale, J. J. Berger, S. B. Wright, H. R. Chang, G. Coste, T. P. Cooley, P. Rice, P. R. Skolnik, M. Sullivan, and P. J. Kanki.** 2004. Highly active antiretroviral therapy and viral response in HIV type 2 infection. *Clin Infect Dis* **38**:1771-9.
41. **Ntemgwa, M. L., T. d'Aquin Toni, B. G. Brenner, R. J. Camacho, and M. A. Wainberg.** 2009. Antiretroviral drug resistance in human immunodeficiency virus type 2. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3611-9.
42. **Okulicz, J. F., V. C. Marconi, M. L. Landrum, S. Wegner, A. Weintrob, A. Ganesan, B. Hale, N. Crum-Cianflone, J. Delmar, V. Barthel, G. Quinnan, B. K. Agan, and M. J. Dolan.** 2009. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* **200**:1714-23.
43. **Palmer, S., F. Maldarelli, A. Wiegand, B. Bernstein, G. J. Hanna, S. C. Brun, D. J. Kempf, J. W. Mellors, J. M. Coffin, and M. S. King.** 2008. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3879-84.
44. **Pereyra, F., S. Palmer, T. Miura, B. L. Block, A. Wiegand, A. C. Rothchild, B. Baker, R. Rosenberg, E. Cutrell, M. S. Seaman, J. M. Coffin, and B. D. Walker.** 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* **200**:984-90.

45. **Popper, S. J., A. D. Sarr, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J Virol* **74**:1554-7.
46. **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* **180**:1116-21.
47. **Rodes, B., A. Holguin, V. Soriano, M. Dourana, K. Mansinho, F. Antunes, and J. Gonzalez-Lahoz.** 2000. Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* **38**:1370-4.
48. **Ruelle, J., F. Roman, A. T. Vandenbroucke, C. Lambert, K. Fransen, F. Echahidi, D. Pierard, C. Verhofstede, K. Van Laethem, M. L. Delforge, D. Vaira, J. C. Schmit, and P. Goubau.** 2008. Transmitted drug resistance, selection of resistance mutations and moderate antiretroviral efficacy in HIV-2: analysis of the HIV-2 Belgium and Luxembourg database. *BMC Infect Dis* **8**:21.
49. **Seshamma, T., O. Bagasra, D. Trono, D. Baltimore, and R. J. Pomerantz.** 1992. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10663-7.
50. **Simon, F., S. Matheron, C. Tamalet, I. Loussert-Ajaka, S. Bartczak, J. M. Pepin, C. Dhiver, E. Gamba, C. Elbim, J. A. Gastaut, and et al.** 1993. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS* **7**:1411-7.
51. **Smith, N. A., T. Shaw, N. Berry, C. Vella, L. Okorafor, D. Taylor, J. Ainsworth, A. Choudhury, R. S. Daniels, S. El-Gadi, A. Fakoya, G. Moyle, J. Oxford, R. Tedder, S. O'Shea, A. de Ruiter, and J. Breuer.** 2001. Antiretroviral therapy for HIV-2 infected patients. *J Infect* **42**:126-33.
52. **Soares, R., R. Foxall, A. Albuquerque, C. Cortesao, M. Garcia, R. M. Victorino, and A. E. Sousa.** 2006. Increased frequency of circulating CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol* **80**:12425-9.
53. **Sonza, S., H. P. Mutimer, K. O'Brien, P. Ellery, J. L. Howard, J. H. Axelrod, N. J. Deacon, S. M. Crowe, and D. F. Purcell.** 2002. Selectively reduced tat mRNA heralds the decline in productive human immunodeficiency virus type 1 infection in monocyte-derived macrophages. *J Virol* **76**:12611-21.
54. **Soriano, V., P. Gomes, W. Heneine, A. Holguin, M. Doruana, R. Antunes, K. Mansinho, W. M. Switzer, C. Araujo, V. Shanmugam, H. Lourenco, J. Gonzalez-Lahoz, and F. Antunes.** 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* **61**:111-6.
55. **Sousa, A. E., J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim, Z. Grossman, and R. M. Victorino.** 2002. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* **169**:3400-6.
56. **van der Ende, M. E., J. M. Prins, K. Brinkman, M. Keuter, J. Veenstra, S. A. Danner, H. G. Niesters, A. D. Osterhaus, and M. Schutten.** 2003. Clinical, immunological and virological response to different antiretroviral regimens in a cohort of HIV-2-infected patients. *AIDS* **17 Suppl 3**:S55-61.
57. **Vesonen, M., M. Markowitz, Y. Cao, D. D. Ho, and K. Saksela.** 1997. Human immunodeficiency virus type-1 mRNA splicing pattern in infected persons is determined by the proportion of newly infected cells. *Virology* **236**:104-9.
58. **Viard, J. P., M. Burgard, J. B. Hubert, L. Aaron, C. Rabian, N. Pertuiset, M. Lourenco, C.**

- Rothschild, and C. Rouzioux.** 2004. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS* **18**:45-9.
59. **Vitone, F., D. Gibellini, P. Schiavone, and M. C. Re.** 2005. Quantitative DNA proviral detection in HIV-1 patients treated with antiretroviral therapy. *J Clin Virol* **33**:194-200.
60. **Walker, B. D.** 2007. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* **15**:134-6.
61. **Witvrouw, M., C. Pannecouque, W. M. Switzer, T. M. Folks, E. De Clercq, and W. Heneine.** 2004. Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir Ther* **9**:57-65.
62. **Zanchetta, M., S. Walker, N. Burighel, D. Bellanova, O. Rampon, C. Giaquinto, and A. De Rossi.** 2006. Long-term decay of the HIV-1 reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **193**:1718-27.



## Capítulo 6:

### Conclusões e perspectivas futuras

A infecção pelo HIV-2 está associada a um ritmo mais lento de progressão para SIDA e a menores níveis de virémia em todas as fases da infecção. No entanto, vários estudos têm mostrado que os níveis de DNA proviral em células mononucleares do sangue periférico são idênticos nas duas infecções (Berry, Ariyoshi et al. 1994; Gomes, Taveira et al. 1999; Popper, Sarr et al. 2000; Soares, Foxall et al. 2006), sugerindo um número semelhante de células infectadas. Ambos os vírus utilizam receptores das quimiocinas que funcionam como co-receptores para a entrada em células alvo, juntamente com o receptor CD4. O HIV-2 parece utilizar uma gama mais alargada de co-receptores (Endres, Clapham et al. 1996; Bron, Klasse et al. 1997; Sol, Ferchal et al. 1997; Guillon, van der Ende et al. 1998; McKnight, Dittmar et al. 1998; Owen, Ellenberger et al. 1998; Shi, Brandin et al. 2005). No entanto, vários estudos sugerem que, tal como para o HIV-1, o CCR5 e o CXCR4 são os principais co-receptores utilizados *in vivo* (Morner, Bjorndal et al. 1999; Morner, Bjorndal et al. 2002; Blaak, Boers et al. 2005).

Os nossos dados sugerem que a diferença nos níveis de virémia e progressão para a doença que se observam entre os doentes infectados pelo HIV-2 e os doentes infectados pelo HIV-1 aparentemente não se relacionam com a disponibilidade de co-receptores, tal como apresentado no capítulo 3. Estudámos os níveis de expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 em doentes infectados pelo HIV-2 e em doentes infectados pelo HIV-1 que apresentavam níveis semelhantes de depleção de linfócitos T CD4 e demonstrámos

que os indivíduos infectados pelo HIV-2 apresentam uma frequência mais elevada de células que expressam CCR5 na população de células T CD4 em comparação com os indivíduos saudáveis. Também documentámos uma correlação entre a frequência de células que expressam CCR5 na população T CD4 e o grau de depleção de células T CD4 nos doentes infectados pelo HIV-2 mas não nos doentes infectados pelo HIV-1. Dado que mostrámos em estudos anteriores que a depleção de células T CD4 se encontra directamente associada aos níveis de activação imunitária e a expressão de CCR5 é aumentada durante a activação das células T, investigámos a associação entre a frequência de células CCR5+ e os níveis de activação imunitária. Verificámos a existência de uma correlação positiva entre a frequência de células CCR5+ e a expressão de HLA-DR nos indivíduos infectados pelo HIV-2 mas não nos indivíduos infectados pelo HIV-1 evidenciando a associação entre a expansão de células CCR5+ e os níveis de activação imunitária na infecção HIV-2.

As diferenças na frequência de células CCR5+ em circulação observadas nos indivíduos infectados pelo HIV-1 ou pelo HIV-2 poderão resultar, entre outros factores, do equilíbrio entre a activação imunitária (que tende a aumentar a expressão de CCR5 e o número de células T CD4 que expressam CCR5), e a infecção directa destas células (que tende a diminuir o seu número). A frequência mais baixa de células CCR5+ em circulação na infecção HIV-1, em comparação com a infecção pelo HIV-2, sugere que estas células podem estar a ser preferencialmente eliminadas na presença de virémia mais elevada.

Todos os estudos anteriores a este trabalho que quantificaram DNA proviral em doentes infectados pelo HIV-2, foram efectuados em PBMC (Berry, Ariyoshi et al. 1994;



Ariyoshi, Berry et al. 1996; Berry, Ariyoshi et al. 1998; Gomes, Taveira et al. 1999; Popper, Sarr et al. 2000), não havendo dados sobre o número de células infectadas em diferentes subpopulações de células T CD4. É possível que diferentes níveis de expressão destes co-receptores possam determinar diferentes populações de células alvo e contribuir para as diferenças de virémia e progressão para a doença observada nas infecções pelo HIV-1 e pelo HIV-2.

Neste trabalho investigámos pela primeira vez a expressão destes co-receptores e os níveis de DNA proviral em populações purificadas de células T CD4 naïve e memória de doentes infectados pelo HIV-2. A quantificação do DNA proviral nestas células mostrou que os níveis de DNA proviral nas células T naïve dos doentes infectados pelo HIV-2 são muito baixos, sugerindo que as células T de memória são preferencialmente infectadas pelo HIV-2, tal como se observa nos indivíduos infectados pelo HIV-1. Como anteriormente demonstrado, observámos também que a expressão de CCR5 é igualmente mais baixa nas células T naïve, o que é concordante com os dados que apontam o CCR5 como o principal co-receptor usado pelo HIV-2. Em conjunto, estes dados sugerem que a população de células T CD4 de memória é o principal alvo do HIV-2.

A população de células T CD4+ de memória é constituída por diferentes sub-populações celulares tais como células T CD4 de memória centrais e células T CD4 de memória efectoras. As células T CD4 de memória centrais têm a capacidade de recircular pelos órgãos linfóides secundários e são consideradas fundamentais para montar respostas específicas secundárias e diferenciar-se em células de memória efectoras (Sallusto,

Lenig et al. 1999; Geginat, Sallusto et al. 2001). A preservação das células T CD4 de memória centrais tem sido associada a um melhor prognóstico da infecção HIV/SIDA (Okoye, Meier-Schellersheim et al. 2007; Potter, Lacabaratz et al. 2007), apesar de, dada a sua capacidade de se manterem quiescentes, terem sido identificadas como um reservatório importante na infecção pelo HIV-1 (Chomont, El-Far et al. 2009). As células T CD4 de memória efectoras têm uma capacidade de “homing” para os tecidos e de produção rápida de citocinas efectoras e de actividade citotóxica estando envolvidas directamente na resposta imunitária contra o HIV (Potter, Lacabaratz et al. 2007). No futuro, será importante realizar estudos que permitam quantificar os níveis de DNA proviral e replicação viral nestas populações, dado que é possível que diferentes padrões de infecção e replicação nestas populações celulares possam ter impacto para a latência e produção viral na infecção pelo HIV-2, bem como para uma possível diferente preservação destas sub-populações nos doentes infectados pelo HIV-2.

Dado que o HIV-2 não parece ser menos citopático *per se* que o HIV-1 (Schramm, Penn et al. 2000), os resultados apresentados neste trabalho sugerem que outros factores, que não a disponibilidade de co-receptores, deverão estar envolvidos no controlo da replicação viral na infecção pelo HIV-2.

A transcrição viral no HIV-1 é caracterizada pela maior expressão inicial de transcritos que foram sujeitos a *splicing* (mRNA *multiply spliced*) tal como o mRNA de *tat*, permitindo a síntese de proteínas reguladoras, em comparação com os transcritos não processados e de tamanho completo (mRNA *unspliced*) tal como o mRNA de *gag*. Nas fases mais tardias da infecção os níveis dos transcritos *unspliced* passam a ser os mais

frequentes permitindo a síntese de proteínas estruturais e do RNA genómico viral (Kim, Byrn et al. 1989; Pomerantz, Trono et al. 1990; Klotman, Kim et al. 1991; Michael, Morrow et al. 1991; Ranki, Lagerstedt et al. 1994; Sonza, Mutimer et al. 2002). Tem sido sugerido que os níveis mais baixos de virémia característicos da infecção pelo HIV-2 podem ser devidos a uma menor transcrição viral, nomeadamente de transcritos *unspliced* (MacNeil, Sarr et al. 2007). No entanto, não existem estudos sobre os níveis de expressão de mRNA *multiply spliced* na infecção pelo HIV-2, nem sobre as metodologias mais adequadas para a sua quantificação. Assim foi nosso objectivo o desenvolvimento de metodologias que permitissem investigar o grau de replicação viral *ex vivo* em doentes infectados pelo HIV-2.

No capítulo 4 documentámos o desenvolvimento, optimização e comparação de metodologias baseadas em *one-step* e *two-step* RT-qPCR para a quantificação dos transcritos *unspliced* e *multiply spliced* de HIV-2. Mostrámos que vários factores podem influenciar a eficiência da reacção e a detecção dos transcritos, nomeadamente o tipo (RNA total ou mRNA) e a concentração de *template*, e a estratégia de *priming* escolhida. Os resultados obtidos sugerem que estas duas metodologias são equivalentes na quantificação de mRNA de HIV-2 com níveis de transcrição elevados e moderados. No entanto, na quantificação de mRNA com níveis de transcrição baixos, a metodologia baseada em *two-step* RT-qPCR apresentou uma maior capacidade de detecção, nomeadamente quando é usado mRNA em vez de RNA total. Dada a presença de virémias baixas ou indetectáveis na maioria dos doentes infectados pelo HIV-2 é plausível que os mRNA virais *unspliced* e *multiply spliced* possam ser transcritos a níveis baixos. Os nossos dados sugerem que a metodologia baseada em *two-step* RT-

qPCR utilizando mRNA como *template* é adequada para a quantificação dos níveis de transcrição dos mRNA virais *unspliced* e *multiply spliced* em indivíduos infectados pelo HIV-2.

Utilizando a metodologia desenvolvida e descrita no capítulo 4, documentámos níveis significativos de transcrição viral nos indivíduos infectados pelo HIV-2, apesar dos níveis mais baixos de virémia, tal como descrito no capítulo 5. A análise da actividade transcricional, através da quantificação dos níveis de mRNA de *gag* e de *tat* em coortes de doentes não tratados infectados pelo HIV-2 ou pelo HIV-1 com níveis semelhantes de depleção de células T CD4, revelou que estes doentes apresentavam níveis semelhantes de mRNA de *gag*. Outros estudos mostraram que na infecção pelo HIV-1, os níveis dos transcritos para *tat* acumulavam-se e suplantavam os níveis de transcritos para *gag* em células recentemente infectadas (Kim, Byrn et al. 1989; Klotman, Kim et al. 1991; Michael, Morrow et al. 1991; Sonza, Mutimer et al. 2002). Neste estudo verificámos que os indivíduos infectados pelo HIV-2 apresentavam níveis mais baixos de mRNA de *tat* relativamente aos indivíduos infectados pelo HIV-1, sugerindo que a taxa de novas infecções ao nível celular é menor nos indivíduos infectados pelo HIV-2. Estes resultados estão em concordância com os nossos resultados que mostram a maior frequência de células T CD4 que expressam CCR5 na infecção pelo HIV-2 sugerindo que a infecção directa de novas células alvo (que expressam CCR5) deverá ocorrer a um ritmo mais baixo que na infecção pelo HIV-1.

Nos indivíduos infectados pelo HIV-1 tem sido demonstrado que o tecido linfóide associado à mucosa intestinal é particularmente abundante em células T CD4 que expressam elevados níveis de CCR5, constituindo um alvo preferencial para infecção e

replicação viral (Veazey, DeMaria et al. 1998; Brenchley, Schacker et al. 2004; Brenchley, Price et al. 2006). Pensa-se que a replicação viral e a consequente depleção destas células facilite o processo de translocação microbiana promovendo a hiperactivação do sistema imunitário, e seja desta forma determinante para o ritmo de progressão para SIDA (Brenchley, Price et al. 2006). Os nossos dados levantam a possibilidade de uma melhor preservação desta população na mucosa gastrointestinal dos doentes infectados pelo HIV-2. Será importante no futuro estudar o grau de infecção e replicação ao nível do tecido linfóide associado à mucosa intestinal nos indivíduos infectados pelo HIV-2, de forma a verificar se a menor taxa de novas infecções ao nível das células T CD4 no sangue periférico (sugerida pelos resultados apresentados neste trabalho), também se verifica ao nível daquele tecido e qual a sua relação com a imunopatogénese associada a esta infecção.

No capítulo 5 mostrámos também que os níveis de DNA proviral são semelhantes nas duas infecções não se correlacionando com os níveis de transcritos virais. Estes resultados sugerem que uma parte significativa do DNA proviral integrado estará latente ou que uma elevada proporção destas sequências são defectivas quer na infecção pelo HIV-2 quer na infecção pelo HIV-1.

Mostrámos também a existência de níveis significativamente mais elevados de activação das células T CD4 e CD8 nos indivíduos infectados pelo HIV-2 virémicos em comparação com os indivíduos avirémicos sugerindo que a virémia, mesmo a níveis baixos, contribui para o estado de activação imunitária que é característico da infecção HIV/SIDA.

Nos indivíduos infectados pelo HIV-2 é possível que o baixo nível de vírus em

circulação se deva a que a replicação viral se encontre maioritariamente confinada aos tecidos linfóides e/ou que exista uma captura mais eficiente dos viriões, por exemplo por parte das células foliculares dendríticas ao nível dos tecidos linfóides. É igualmente possível que nos órgãos linfóides a infecção de novas células ocorra preferencialmente através do contacto célula a célula, não havendo a produção de grandes quantidades de viriões livres. Esta transmissão viral por contacto celular directo parece, no entanto, ser suficiente para induzir a disrupção destes tecidos e contribuir para os níveis de activação imunitária observados nestes indivíduos.

Assim, consideramos muito importante o estudo da ultra-estrutura e dos níveis de infecção e replicação viral do HIV-2 nos tecidos linfóides, de forma a avaliar o impacto daqueles parâmetros na virémia e níveis de activação imunitária observados nestes indivíduos. Esta contribuição poderá ser devida a efeitos directos do vírus e/ou efeitos indirectos mediados por exemplo pelas proteínas virais.

Os órgãos linfóides têm sido identificados como os principais locais onde ocorre a replicação viral e a infecção de novas células, no entanto os dados sobre a replicação viral no tecido linfóide de doentes infectados pelo HIV-2 é bastante limitada (Jobe, Ariyoshi et al. 1999). É possível que uma maior preservação do tecido linfóide nos indivíduos infectados pelo HIV-2 permita a manutenção de uma proliferação linfocitária homeostática que contribua para um menor ritmo de perda de linfócitos T CD4. É possível também, como mencionado acima, que essa possível preservação do tecido linfóide tenha um papel determinante no confinamento da replicação viral resultando nas virémias baixas a indetectáveis que são frequentemente observadas nos indivíduos infectados pelo HIV-2.

Por estes motivos será importante investigar a capacidade do HIV-2 infectar e replicar

nos tecidos linfóides de forma a avaliar a citopaticidade e a sua relação com o grau de dano irreversível associado à infecção prolongada e o seu papel na reconstituição imunitária.

Os resultados apresentados no capítulo 5 suportam um papel dada replicação viral persistente para a elevada activação imunitária observada nos indivíduos infectados pelo HIV-2 apesar dos níveis reduzidos de virémia. Nestes doentes documentámos a existência de uma associação directa entre os níveis de mRNA para *gag* e a activação das células T CD4. Além disso, o estudo sugere um papel importante da molécula transativadora viral *tat*, ou da taxa de células recentemente infectadas para os níveis de activação das células T CD8, particularmente na infecção pelo HIV-1. Nestes indivíduos observámos uma correlação directa entre os níveis de mRNA do *tat* e a activação das células T CD8.

A proteína Tat é uma proteína multifuncional, que para além do seu papel na replicação viral, pode ser libertada para o meio extracelular e exercer os seus efeitos, quer em células infectadas quer nas não infectadas, contribuindo para a patogénese associada à infecção pelo HIV (Ferrari, Pellegrini et al. 2003; Zheng, Yang et al. 2005; Zheng, Yang et al. 2007; Ju, Song et al. 2009). Encontram-se descritos efeitos da proteína Tat ao nível da expressão de vários genes virais e celulares (Li, Lee et al. 2005; Mahlknecht, Dichamp et al. 2008; Ju, Song et al. 2009). Entre outros, têm sido referidos efeitos ao nível do aumento da expressão genética de várias citocinas como a IL-6 (Scala, Ruocco et al. 1994) e a IL-2 (Westendorp, Li-Weber et al. 1994), bem como da cadeia  $\alpha$  (CD25) do seu receptor (Mayol, Munier et al. 2007), do CCR5 (Zheng, Yang et al. 2005), na

diminuição da expressão de MHC classe I (Matsui, Warburton et al. 1996) e na indução de morte celular por apoptose (Park, Ullrich et al. 2001; Kim, Avraham et al. 2003; Giacca 2005). É possível que a menor expressão de *tat* que documentámos nos indivíduos infectados pelo HIV-2 traduza uma menor produção da proteína e consequentemente efeitos mais limitados do Tat nos indivíduos infectados pelo HIV-2. Seria interessante quantificar os níveis de produção da proteína Tat nestes indivíduos e verificar os efeitos específicos da proteína Tat do HIV-2 ao nível da expressão genética. Seria igualmente interessante estudar os níveis de expressão de outros transcritos virais, nomeadamente Rev e Nef dado o seu papel na replicação viral. É possível que diferentes níveis de expressão destes transcritos tenham impacto na produção de proteínas virais e novos viriões e consequentemente nos níveis de virémia bem como possivelmente nos níveis de activação imunitária observados nos indivíduos infectados pelo HIV-2. Durante este estudo tentámos desenvolver ensaios para a quantificação destes transcritos, no entanto foram encontradas dificuldades na selecção de primers/sondas e condições de reacção que permitissem a quantificação eficiente destes transcritos mantendo a especificidade dos ensaios.

Os resultados obtidos no estudo de indivíduos infectados pelo HIV-2 sob terapêutica anti-retroviral evidenciam a existência de replicação viral persistente nestes doentes, apesar da terapêutica anti-retroviral. Documentámos pela primeira vez a presença de níveis significativos de DNA proviral, e de mRNA para *gag* que não são significativamente diferentes dos níveis encontrados nos doentes não tratados. Para além disso, verificámos que os doentes infectados pelo HIV-2 tratados expressavam níveis elevados de mRNA para *tat* que são significativamente mais elevados do que os



níveis encontrados nos doentes não tratados, o que sugere que o ritmo de infecção de novas células não parece ser controlado com a terapêutica. Estes resultados podem estar relacionados com a presença de mutações que identificámos na transcriptase reversa e na protease, o que indirectamente suporta a existência de replicação persistente nos doentes infectados pelo HIV-2 tratados.

É de notar que estes níveis elevados de transcrição nos doentes infectados pelo HIV-2 tratados são independentes do nível de virémia, o que sugere que a virémia não será um bom marcador da actividade transcricional nestes doentes tratados.

Também mostrámos que a terapêutica anti-retroviral não se associou a uma redução dos níveis de activação das células T, estando estes níveis correlacionados negativamente com o número de linfócitos T CD4 em circulação. Esta observação sugere que o elevado nível de activação imunitária nestes doentes tratados poderá contribuir para a menor taxa de recuperação do número de células T em circulação e consequentemente para as baixas contagens de células T CD4 habitualmente observadas em doentes infectados pelo HIV-2 sob terapêutica anti-retroviral.

Em conjunto, estes dados contrastam com o descrito em estudos efectuados em doentes infectados pelo HIV-1 tratados, nos quais a terapêutica anti-retroviral conduz à redução progressiva dos níveis de DNA proviral (Garrigue, Pellegrin et al. 2000; Viard, Burgard et al. 2004; Vitone, Gibellini et al. 2005), para além de se associar a uma rápida redução os níveis de mRNA *multiply spliced* (Bagnarelli, Valenza et al. 1996; Zanchetta, Walker et al. 2006; Fischer, Joos et al. 2008) e a uma diminuição progressiva da proporção de mRNA *multiply spliced* em relação aos níveis de mRNA *unspliced* (Vesanen,

Markowitz et al. 1997).

Os nossos dados reforçam a importância de se investir na selecção de regimes terapêuticos mais adequados para o tratamento dos doentes infectados pelo HIV-2. Apesar de existirem alguns estudos fenotípicos que permitem a selecção de terapêuticas de primeira linha mais adequadas (Smith, Shaw et al. 2001; Jallow, Alabi et al. 2009), não existem ensaios clínicos sobre terapêutica anti-retroviral em doentes HIV-2 e o estudo dos mecanismos de resistência aos fármacos por parte do HIV-2 é ainda bastante limitado (Ntemgwa, d'Aquin Toni et al. 2009).

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho mostram que os baixos níveis de virémia, apesar de níveis significativos de DNA proviral, geralmente encontrados nos indivíduos infectados pelo HIV-2 em comparação com os infectados pelo HIV-1, não parecem estar relacionados nem com a disponibilidade dos principais co-receptores utilizados para a entrada do vírus nas células, nem com diferentes major nas células T alvo para a infecção.

Apesar da carga viral circulante ser reduzida ou indetectável, documentámos a existência de replicação viral persistente nos indivíduos infectados pelo HIV-2, incluindo nos indivíduos tratados com terapêutica anti-retroviral, e demonstrámos a sua relação directa com os níveis de activação imunitária salientando a relevância da replicação viral para activação imunitária persistente observada nestes doentes.

Estes dados representam uma contribuição importante para a definição de estratégias de seguimento clínico dos doentes infectados pelo HIV-2 e para a compreensão da patogénese da infecção HIV/SIDA.

## Referências

- Ariyoshi, K., N. Berry, et al. (1996). "A community-based study of human immunodeficiency virus type 2 provirus load in rural village in West Africa." *J Infect Dis* **173**(1): 245-8.
- Bagnarelli, P., A. Valenza, et al. (1996). "Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo." *J Virol* **70**(11): 7603-13.
- Berry, N., K. Ariyoshi, et al. (1998). "Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection." *J Hum Virol* **1**(7): 457-68.
- Berry, N., K. Ariyoshi, et al. (1994). "HIV type 2 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+ lymphopenia in HIV type 2-infected individuals." *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(8): 1031-7.
- Blaak, H., P. H. Boers, et al. (2005). "CCR5, GPR15, and CXCR6 are major coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia." *J Virol* **79**(3): 1686-700.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?" *Nat Immunol* **7**(3): 235-9.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* **12**(12): 1365-71.
- Brenchley, J. M., T. W. Schacker, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." *J Exp Med* **200**(6): 749-59.
- Bron, R., P. J. Klasse, et al. (1997). "Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein." *J Virol* **71**(11): 8405-15.
- Chomont, N., M. El-Far, et al. (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med* **15**(8): 893-900.
- Endres, M. J., P. R. Clapham, et al. (1996). "CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4." *Cell* **87**(4): 745-56.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, et al. (2003). "Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time." *Mol Ther* **8**(2): 284-94.
- Fischer, M., B. Joos, et al. (2008). "Biphasic decay kinetics suggest progressive slowing in turnover of latently HIV-1 infected cells during antiretroviral therapy." *Retrovirology* **5**: 107.
- Garrigue, I., I. Pellegrin, et al. (2000). "Cell-associated HIV-1-DNA quantitation after highly active antiretroviral therapy-treated primary infection in patients with persistently undetectable plasma HIV-1 RNA." *AIDS* **14**(18): 2851-5.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." *J Exp Med* **194**(12): 1711-9.
- Giacca, M. (2005). "HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?" *Retrovirology* **2**: 7.
- Gomes, P., N. C. Taveira, et al. (1999). "Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay." *J Clin Microbiol* **37**(2): 453-6.
- Guillon, C., M. E. van der Ende, et al. (1998). "Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type

- 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities." J Virol **72**(7): 6260-3.
- Jallow, S., A. Alabi, et al. (2009). "Virological response to Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in HIV-2 and HIV-1/HIV-2 Dually Infected Patients in The Gambia and the Emergence of Drug Resistant variants." J Clin Microbiol.
- Jobe, O., K. Ariyoshi, et al. (1999). "Proviral load and immune function in blood and lymph node during HIV-1 and HIV-2 infection." Clin Exp Immunol **116**(3): 474-8.
- Ju, S. M., H. Y. Song, et al. (2009). "Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes." Exp Mol Med **41**(2): 86-93.
- Kim, S. Y., R. Byrn, et al. (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression." J Virol **63**(9): 3708-13.
- Kim, T. A., H. K. Avraham, et al. (2003). "HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells." J Immunol **170**(5): 2629-37.
- Klotman, M. E., S. Kim, et al. (1991). "Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 5011-5.
- Li, J. C., D. C. Lee, et al. (2005). "Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response." FEBS Lett **579**(14): 3055-62.
- MacNeil, A., A. D. Sarr, et al. (2007). "Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection." J Virol **81**(10): 5325-30.
- Mahlknecht, U., I. Dichamp, et al. (2008). "NF-kappaB-dependent control of HIV-1 transcription by the second coding exon of Tat in T cells." J Leukoc Biol **83**(3): 718-27.
- Matsui, M., R. J. Warburton, et al. (1996). "Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **11**(3): 233-40.
- Mayol, K., S. Munier, et al. (2007). "Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity." Vaccine **25**(32): 6047-60.
- McKnight, A., M. T. Dittmar, et al. (1998). "A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4." J Virol **72**(5): 4065-71.
- Michael, N. L., P. Morrow, et al. (1991). "Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in chronically infected cells is associated primarily with a shift in RNA splicing patterns." J Virol **65**(3): 1291-303.
- Morner, A., A. Bjorndal, et al. (1999). "Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage." J Virol **73**(3): 2343-9.
- Morner, A., A. Bjorndal, et al. (2002). "CCR5 or CXCR4 is required for efficient infection of peripheral blood mononuclear cells by promiscuous human immunodeficiency virus type 2 primary isolates." AIDS Res Hum Retroviruses **18**(3): 193-200.
- Ntemgwa, M. L., T. d'Aquin Toni, et al. (2009). "Antiretroviral drug resistance in human immunodeficiency virus type 2." Antimicrob Agents Chemother **53**(9): 3611-9.

- Okoye, A., M. Meier-Schellersheim, et al. (2007). "Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection." *J Exp Med* **204**(9): 2171-85.
- Owen, S. M., D. Ellenberger, et al. (1998). "Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry." *J Virol* **72**(7): 5425-32.
- Park, I. W., C. K. Ullrich, et al. (2001). "HIV-1 Tat induces microvascular endothelial apoptosis through caspase activation." *J Immunol* **167**(5): 2766-71.
- Pomerantz, R. J., D. Trono, et al. (1990). "Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency." *Cell* **61**(7): 1271-6.
- Popper, S. J., A. D. Sarr, et al. (2000). "Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo." *J Virol* **74**(3): 1554-7.
- Potter, S. J., C. Lacabartz, et al. (2007). "Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study." *J Virol* **81**(24): 13904-15.
- Ranki, A., A. Lagerstedt, et al. (1994). "Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines." *Arch Virol* **139**(3-4): 365-78.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-12.
- Scala, G., M. R. Ruocco, et al. (1994). "The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein." *J Exp Med* **179**(3): 961-71.
- Schramm, B., M. L. Penn, et al. (2000). "Cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1." *J Virol* **74**(20): 9594-600.
- Shi, Y., E. Brandin, et al. (2005). "Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation." *J Gen Virol* **86**(Pt 12): 3385-96.
- Smith, N. A., T. Shaw, et al. (2001). "Antiretroviral therapy for HIV-2 infected patients." *J Infect* **42**(2): 126-33.
- Soares, R., R. Foxall, et al. (2006). "Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection." *J Virol* **80**(24): 12425-9.
- Sol, N., F. Ferchal, et al. (1997). "Usage of the coreceptors CCR-5, CCR-3, and CXCR-4 by primary and cell line-adapted human immunodeficiency virus type 2." *J Virol* **71**(11): 8237-44.
- Sonza, S., H. P. Mutimer, et al. (2002). "Selectively reduced tat mRNA heralds the decline in productive human immunodeficiency virus type 1 infection in monocyte-derived macrophages." *J Virol* **76**(24): 12611-21.
- Veazey, R. S., M. DeMaria, et al. (1998). "Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection." *Science* **280**(5362): 427-31.
- Vesonen, M., M. Markowitz, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type-1 mRNA splicing pattern in infected persons is determined by the proportion of newly infected cells." *Virology* **236**(1): 104-9.
- Viard, J. P., M. Burgard, et al. (2004). "Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level." *AIDS* **18**(1): 45-9.

- Vitone, F., D. Gibellini, et al. (2005). "Quantitative DNA proviral detection in HIV-1 patients treated with antiretroviral therapy." *J Clin Virol* **33**(3): 194-200.
- Westendorp, M. O., M. Li-Weber, et al. (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells." *J Virol* **68**(7): 4177-85.
- Zanchetta, M., S. Walker, et al. (2006). "Long-term decay of the HIV-1 reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **193**(12): 1718-27.
- Zheng, L., Y. Yang, et al. (2007). "HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand." *Intervirology* **50**(3): 224-8.
- Zheng, L., Y. D. Yang, et al. (2005). "Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes." *J Zhejiang Univ Sci B* **6**(7): 668-72.