



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO DAS DEFESAS DA CÉLULA HOSPEDEIRA CONTRA A INFECÇÃO PELO HIV

Trabalho submetido por
Laura Lourinho Silva Colaço Fialho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Dezembro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO DAS DEFESAS DA CÉLULA HOSPEDEIRA CONTRA A INFECÇÃO PELO HIV

Trabalho submetido por
Laura Lourinho Silva Colaço Fialho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

Dezembro de 2014

Dedicatória

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, ao Meu Irmão e às Minhas Avós, que são o meu pilar, um enorme obrigada, pelo amor incondicional, por acreditarem sempre em mim e por estarem sempre ao meu lado.

A eles, dedico este trabalho.

Agradecimentos

Muito Obrigada à Minha Família, especialmente aos meus Pais, ao meu Irmão, às minhas Avós todo o apoio, compreensão e ensinamentos de toda a vida.

Obrigada ao Meu Namorado, pela amizade, cumplicidade e apoio durante esta longa caminhada.

Obrigada aos Meus Amigos, que são como uma segunda família, agradeço a amizade, cumplicidade e ajuda nos momentos mais difíceis.

Obrigada aos Meus Professores, que contribuíram para a minha formação e por todos os ensinamentos prestados.

Obrigada à Prof. Doutora Isabel Barahona, pela orientação, dedicação e ajuda prestada.

A todos, Muito Obrigada!

Resumo

Na infecção pelo HIV-1, importantíssimas células do sistema imunitário são infectadas, originando uma deterioração progressiva do sistema imunitário, o que o torna susceptível a infecções oportunistas.

Este trabalho tem como objectivo perceber a forma como a célula hospedeira responde à infecção por HIV-1.

A exposição dos seres eucariotas a diversas infecções virais ao longo do tempo modulou o sistema imunitário inato e adquirido, que evoluiu de forma a fazer face a essas infecções. Por outro lado, também os agentes infecciosos desenvolveram estratégias para escapar a essas defesas. Diversas células do sistema imunitário como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK intervêm na resposta à patogénese viral. Para além destas células foram seleccionadas proteínas da própria célula que desempenham um papel fulcral na defesa da célula hospedeira contra a infecção pelo HIV-1, designadas por factores de restrição. Os factores abordados neste trabalho são: SAMHD1, TRIM5 α , tetrina e APOBEC3G. Sendo a APOBEC3G a que detém maior actividade anti-HIV-1.

A APOBEC3G tem como antagonista uma proteína viral acessória Vif. Na infecção pelo HIV-1 deficiente em Vif, o factor de restrição APOBEC3G é incorporado nos viriões formados catalisando a desaminação de citidina do RNA viral. Induz assim hipermutações no DNA proviral e consequentemente, inibe a replicação viral em linhagens de células T não-permissivas para vírus deficientes em Vif. Por outro lado, na presença de Vif a proteína APOBEC3G é degradada antes da sua incorporação no virião, evitando a hipermutação do genoma viral. Vif pode inibir a acção de APOBEC3G por mecanismos distintos da indução da sua degradação como por exemplo inibindo a sua tradução ou competindo pela ligação a componentes virais. A interacção APOBEC3G-Vif é um bom alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-retrovirais.

Abstract

In HIV-1, extremely important cells of the immune system become infected, leading to a progressive deterioration of the immune system, making it susceptible to opportunistic infections.

This study aims to understand how the host cell responds to infection by HIV-1.

The exposure of eukaryotes to various viral infections over time modulated the innate and acquired immune system, which has evolved to cope with these infections. Moreover, also developed strategies for infectious agents evade these defenses. Various immune cells such as macrophages, dendritic cells, neutrophils and NK cells involved in the response to viral pathogenesis. In addition to these proteins were selected cells of the cell that plays a pivotal role in the host cell defense against HIV-1, designated by restriction factors. The factors discussed in this paper are: SAMHD1, TRIM5 α , Tetherin and APOBEC3G. As APOBEC3G that has higher anti-HIV-1 activity.

The APOBEC3G has antagonist as an accessory viral protein Vif. In HIV-1 Vif deficient in the factor restriction APOBEC3G is incorporated into virions formed catalyzing the deamination of cytidine viral RNA. Hypermutations thus induces the proviral DNA and thus inhibits viral replication in non-permissive T cell lines deficient for Vif in virus. Moreover, the presence of Vif to APOBEC3G protein is degraded before its incorporation into the virion, avoiding hypermutation of the viral genome. Vif can inhibit the action of APOBEC3G by different mechanisms inducing degradation such as by inhibiting the translation or competing for binding to viral components. The APOBEC3G-Vif interaction is a good therapeutic target for the development of new antiretroviral drugs.

Índice Geral

Dedicatória.....	3
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract.....	9
Índice Geral	11
Índice de Figuras	13
Índice de Tabelas	15
Lista de Abreviaturas.....	17
1 – Introdução.....	19
1.1 – Origem do HIV-1 e HIV-2	19
2 - Caracterização do HIV-1.....	23
2.1 – Taxonomia.....	23
2.2 - Genoma e Estrutura.....	23
2.3 - Ciclo de Replicação.....	26
3 – Imunidade Inata	27
3.1 – Células <i>NK</i>	27
3.2 – Sistema do Complemento.....	28
3.3 – Anticorpos Neutralizantes	29
4 - Factores de Restrição Viral	31
4.1 - TRIM5 α	33
4.2 - Tetrina	34
4.3 - SAMHD1	35
4.4 – Família APOBEC	37
4.4.1 - Expressão da Subfamília APOBEC3	38
4.4.2 - Desaminase de citidina APOBEC3G	40
4.4.3 – Restrição de Vif induzida por APOBEC3G	40
4.4.4 - Inibição da acção de restrição de APOBEC3G por Vif.....	41
5 - Proteínas Virais Acessórias.....	47
6 - Anticorpos monoclonais com acção anti-viral	5151
Conclusão	53
Bibliografia.....	55

Índice de Figuras

Figura 1 – Mapa de África Ocidental e Central, mostrando as faixas onde se encontram as subespécies de chimpanzés.....	19
Figura 2 – Organização genómica do HIV-1.....	23
Figura 3 – Estrutura do HIV-1. Representação das proteínas acessórias e reguladoras.....	24
Figura 4 – Estrutura do HIV-1. Representação das proteínas estruturais.....	25
Figura 5 – Estrutura do HIV-1. Representação das enzimas virais.....	25
Figura 6 – Ciclo de replicação do HIV-1.....	26
Figura 7 – Ligação do factor de restrição TRIM5 α à cápside viral.....	34
Figura 8 – Restrição do HIV-1 por tetrina.....	35
Figura 9 – Restrição do HIV-1 por SAMHD1.....	36
Figura 10 – Família APOBEC3.....	38
Figura 11 – Restrição do HIV-1 induzida pela subfamília APOBEC3.....	39
Figura 12 – Neutralização de APOBEC3G induzida por Vif.....	43
Figura 13 – Estrutura dos domínios funcionais de Vif.....	44
Figura 14 – Degradação proteolítica promovida por Vpu.....	48

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Síntese dos factores de restrição anti-HIV e as suas características principais..... 32

Lista de Abreviaturas

- APOBEC3G** – Subunidade 3G da desaminase do mRNA da apolipoproteína B
- CBF β** – Factor de ligação central subunidade β (*Core-binding factor β*)
- CCR5**- Receptor de quimiocina tipo 5 (*C-C chemokine receptor type 5*)
- CXCR4** – Receptor de quimiocina tipo 4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*)
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP** – Trifosfato de desoxirribonucleótido
- dsDNA** – DNA de cadeia dupla
- Env** – Glicoproteína do envelope
- Gag** – *Group-specific antigen*
- HIV-1** - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
- HIV-2** - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
- IFN- α** – Interferão α
- LTR** - Extremidades Repetitivas Longas (*Long Terminal Repeat*)
- MCH** – Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade
- mRNA** – Ácido Ribonucleico Mensageiro
- Nef** – Factor Negativo (*Negative factor*)
- Rev** – Regulador de expressão de proteínas do virião (*Regulator of expression of virion proteins*)
- RNA** – Ácido Ribonucleico
- SAMHD1** - *Sterile alpha motif and histidine-aspartic domain containing protein 1*
- SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SIV** - Vírus de Imunodeficiência Símia
- SIVcpz** - Vírus de Imunodeficiência Símia de chimpanzé
- SIVsmm** - Vírus de Imunodeficiência Símia de *sootymangabeys*
- ssRNA** – Ácido Ribonucleico de cadeia simples
- Tat** – *Tans-activator of transcription*
- TRIM5 α** – *Tripartite motif 5- α*
- Vif** – Factor de infectividade viral (*Viral infectivity factor*)
- Vpr** – Proteína viral R (*Viral protein R*)
- Vpu** – Proteína viral U (*Viral protein U*)
- Vpx** – Proteína viral X (*Viral protein X*)

1 – Introdução

1.1 – Origem do HIV-1 e HIV-2

No início da década de 80, foi identificado o agente etiológico (revisto em Greene, 2007) daquela que viria a ser considerada uma das doenças mais devastadoras de sempre, a SIDA (Sharp & Hahn, 2011). Este síndrome é transmitido pelo HIV-1, o qual já registou cerca de 25 milhões de mortes e calcula-se que já infectou 33 milhões de pessoas, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública a nível global (Arroyave & Pujol, 2012).

Em 1986 é descoberto o HIV-2, apesar de morfológicamente semelhante ao HIV-1 é antigenicamente distinto, causando também SIDA nos indivíduos infectados, provenientes da África Ocidental (revisto em Sharp & Hahn, 2011).

Posteriormente, foram encontrados outros vírus semelhantes em vários primatas na África Subsariana como chimpanzés, *sootymangabeys*, mandris, entre outros, os quais foram denominados por SIV seguido por um sufixo de 3 letras que designaria a espécie de origem (Sharp & Hahn, 2011). De entre as espécies mencionadas aquela que teria transmitido o HIV-2 ao Homem, dada a sua maior taxa de infecção e onde as infecções naturais pareciam ser não patogénicas, foi a espécie de *sootymangabeys* (Sharp & Hahn, 2010).

Os vírus do género Lentivírus, no qual se insere o HIV, são maioritariamente transmitidos entre indivíduos de forma horizontal (Sharp & Hahn, 2011).

Vários estudos realizados em macacos infectados com SIV na ilha de Bioko, na Guiné equatorial, revelaram a existência de subespécies de macacos infectadas com o mesmo vírus em áreas geograficamente distintas ao longo do tempo. Até ao momento, macacos, símios africanos e chimpanzés parecem ter sido infectados com SIV sugerindo a hipótese de que estes lentivírus de primatas tenham surgido em África (Sharp & Hahn, 2010).

Dada a estreita relação genética entre HIV-1 e o SIVcpz, este tem sido o lentivírus de primatas que tem despertado maior interesse e que se pensa estar na origem do HIV-1. Os estudos epidemiológicos mostraram que na população de chimpanzés o número de indivíduos infectados era raro, ao contrário do que acontecia com as populações de *sootymangabeys*, em que um elevado número de indivíduos está infectado tanto em cativeiro como em estado selvagem o que põs em dúvida se de facto

os chimpanzés seriam um verdadeiro reservatório de SIVcpz que originou HIV-1 (Sharp & Hahn, 2011).

As estirpes do HIV-1 são muito diferentes e classificam-se em quatro grupos distintos (M, N, O e P) os quais têm diferentes prevalências (Sharp & Hahn, 2011). Os vírus do grupo N e o O são raros, e em grande parte, estão restritos aos Camarões e países envolventes. A grande maioria (98%) das infecções de HIV-1 em todo o mundo são causadas pelos vírus do grupo M. Dentro do grupo M, há uma grande diversidade e o epicentro da diversidade parece ser Kinshasa (então chamada Leopoldville), na República Democrática do Congo, em África (Figura 1) (Sharp & Hahn, 2010). O HIV-1 tem uma rápida taxa de evolução, e pensa-se que o vírus deverá ter circulado nas populações humanas durante muitos anos antes de ter sido reconhecido como agente patogénico, justificando assim a acumulação desta enorme diversidade (Sharp & Hahn, 2010).

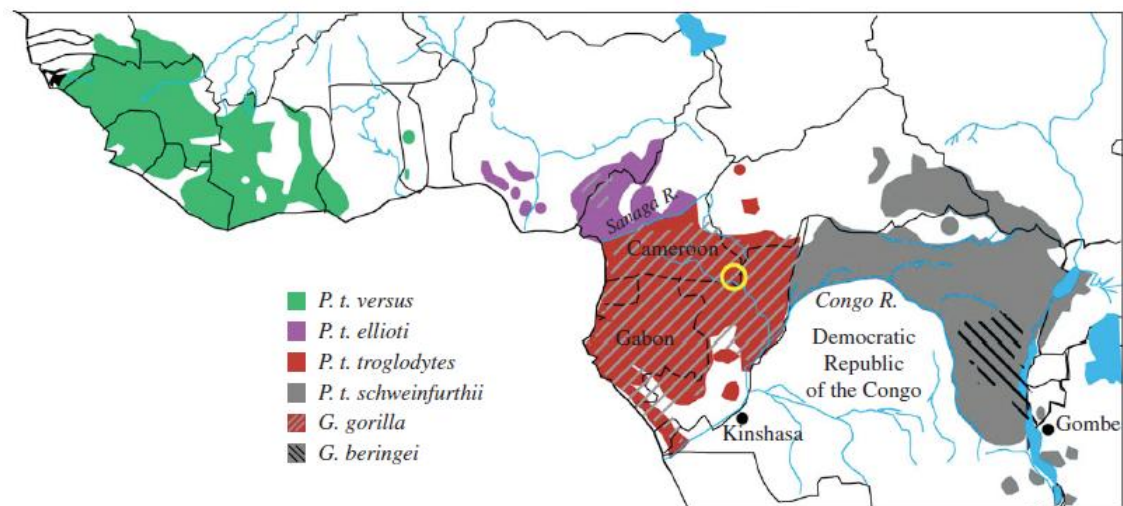


Figura 1 - Mapa de África ocidental e central, mostrando as faixas onde se encontram as subespécies de chimpanzés (código de cores). As faixas do oeste gorilas (*Gorilla*) e *G. gorilla* de Grauer oriental (*G. beringei*) são sobrepostos. O círculo amarelo indica a região sudeste de Camarões, onde estirpes SIVcpz estreitamente relacionadas ao HIV-1 grupo M foram encontrados (Retirado de: Sharp & Hahn, 2010).

A origem do HIV-2 foi determinada antes da origem do HIV-1, quando em 1989, um SIV intimamente relacionado com o HIV-2, foi encontrado num macaco, *sootymangabey* (*Cercocebus atys*), SIVsmm, cuja área de distribuição natural é na

África Ocidental. Posteriormente, outros vírus deste grupo foram encontrados em mangabeis cativos, e selvagens (Sharp & Hahn, 2010).

As análises filogenéticas mostraram que as estirpes do HIV-2 são muito semelhantes às estirpes de SIVsmm. Estas observações levaram a uma aceitação geral de que os vírus presentes em mangabeis foram a fonte de HIV-2, e a intercalação de diferentes grupos de HIV-2 entre estirpes SIVsmm implícitas indica que terá havido várias infecções cruzadas entre *sootymangabey* e o homem (Sharp & Hahn, 2010).

Como consequência de infecções cruzadas com Lentivírus, entre diferentes espécies de primatas, surge a SIDA em macacos e humanos. Assim, tanto o HIV-1 como o HIV-2 surgem como resultado da transferência zoonótica de vírus responsáveis por infectar primatas em África. (Sharp & Hahn, 2011)

Desde a sua descoberta, o HIV-1 tem sido alvo de estudo intenso devido à elevada patogenicidade e rápida propagação. (Sharp & Hahn, 2011)

2 - Caracterização do HIV-1

2.1 – Taxonomia

As características genéticas, biológicas e morfológicas de HIV-1 fazem com que estes vírus estejam inseridos na família *Retroviridae*. Tal como o nome indica (do latim *retro* = para trás), os vírus pertencentes a esta família realizam transcrição reversa de ssRNA genómico em dsDNA, a qual é realizada pela enzima transcriptase reversa (Costin, 2007).

O HIV-1 pertence ao género Lentivírus, os quais apresentam uma evolução lenta devido aos longos períodos de latência. (Costin, 2007)

2.2 - Genoma e Estrutura

A complexidade do genoma é característica de todos os Lentivírus. No caso específico do HIV-1 (9.8Kb), este apresenta duas cópias idênticas de ssRNA de sentido positivo, flanqueadas por LTR fulcrais para a transcrição reversa genómica e integração na célula hospedeira. (Costin, 2007)

O mRNA formado durante o ciclo replicativo é responsável por codificar as diferentes proteínas virais. Estas proteínas são classificadas em grupos funcionais distintos: proteínas precursoras (Gag, Pol e Env); proteínas reguladoras (Tat e Rev); e proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpu e Vpr) (Figuras 2 e 3) (Costin, 2007).

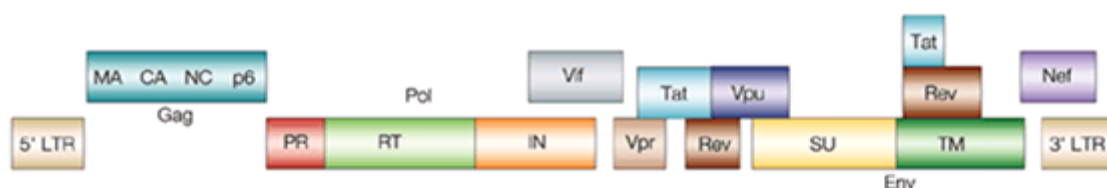


Figura 2 – Organização genómica do HIV-1 (Retirado de: Robinson, 2002).

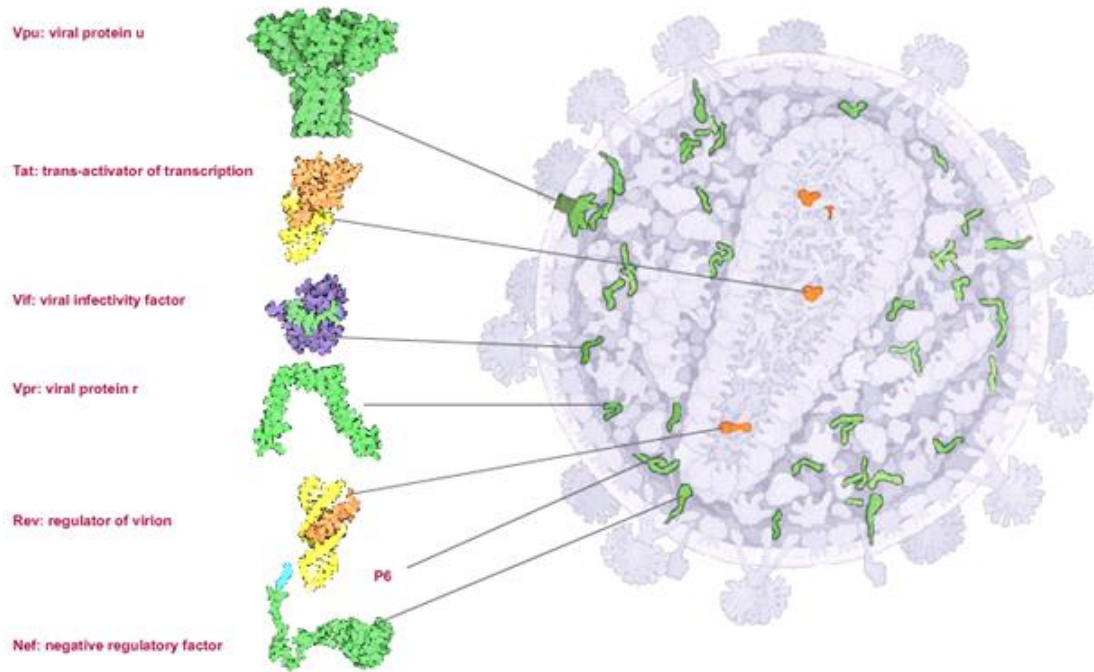


Figura 3 – Estrutura do HIV-1. Representação das proteínas acessórias (Vpu, Tat, Vif e Vpr) e reguladoras (Rev e Nef) (Adaptado de: Berman et al., 2000).

As Gag, Pol e Env, são sintetizadas como proteínas precursoras que sofrem proteólise e originam as várias proteínas funcionais. As proteínas Gag e Env constituem o núcleo e o invólucro do virião, respectivamente. Assim, Gag é precursora das seguintes proteínas estruturais: matriz ou p17; cápside ou p24 e nucleocápside ou p7 e p6 (Figura 4). Relativamente à Env origina as proteínas de superfície gp120 e a proteína transmembranar ou gp41 (Figura 4). A gp120 é utilizada pelo vírus para interação com o receptor CD4 presente em células T. Quanto à Pol, esta é precursora das enzimas protease, integrase e transcriptase reversa (Figura 5) (Cimarelli & Darlix, 2002).

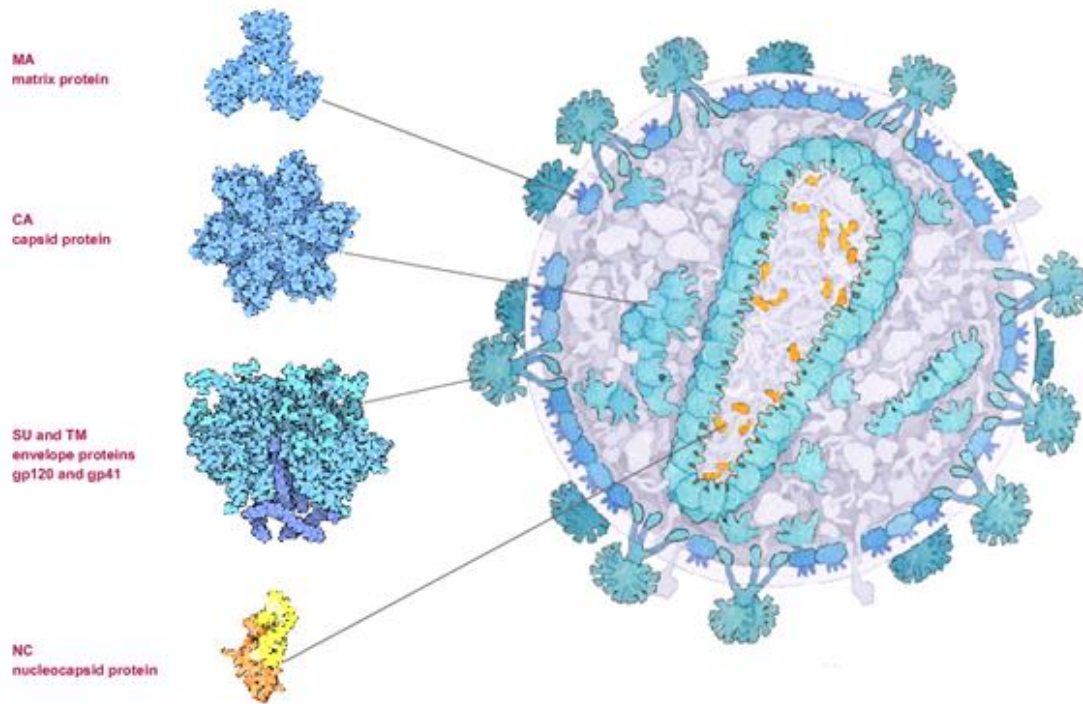


Figura 4 – Estrutura do HIV-1. Representação das proteínas estruturais (matriz, cápside, e nucleocápside), gp120 e gp41 (Adaptado de: Berman et al., 2000).

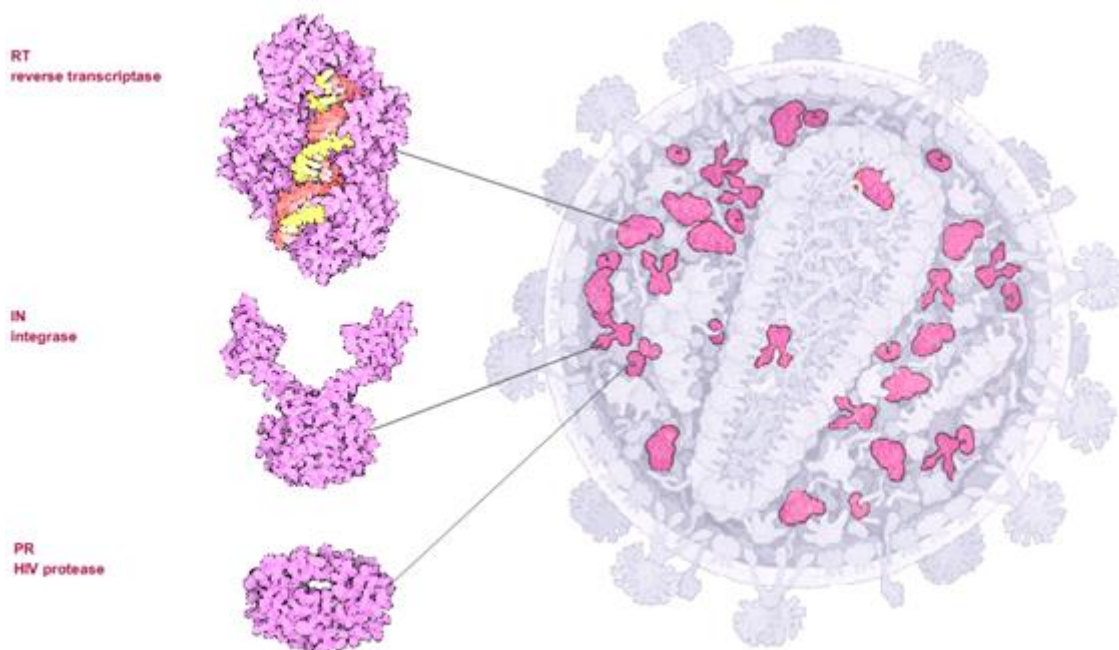


Figura 5 – Estrutura do HIV-1. Representação das enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease) (Adaptado de: Berman et al., 2000).

2.3 - Ciclo de Replicação

O ciclo de replicação viral do HIV inicia-se com a ligação do virião à membrana citoplasmática da célula T hospedeira através do receptor CD4 e co-receptores de quimiocinas, tais como CCR5 e CXCR4. Em seguida, ocorre fusão da membrana da partícula viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, seguida libertação da cápside viral, como material genético para o citoplasma. Por intermédio da enzima transcriptase reversa, o RNA viral de cadeia simples é convertido em DNA viral de cadeia dupla. Posteriormente, o DNA viral é incorporado no DNA da célula hospedeira por acção da enzima integrase. O vírus utiliza a enzima RNA polimerase II da célula para produção do mRNA que é utilizado na síntese das cadeias de poliproteínas virais. Estas são hidrolisadas pela protease viral em proteínas funcionais. Por fim, as partículas virais sintetizadas utilizam a membrana celular como cobertura libertando-se assim da célula hospedeira (Figura 6) (Costin, 2007).

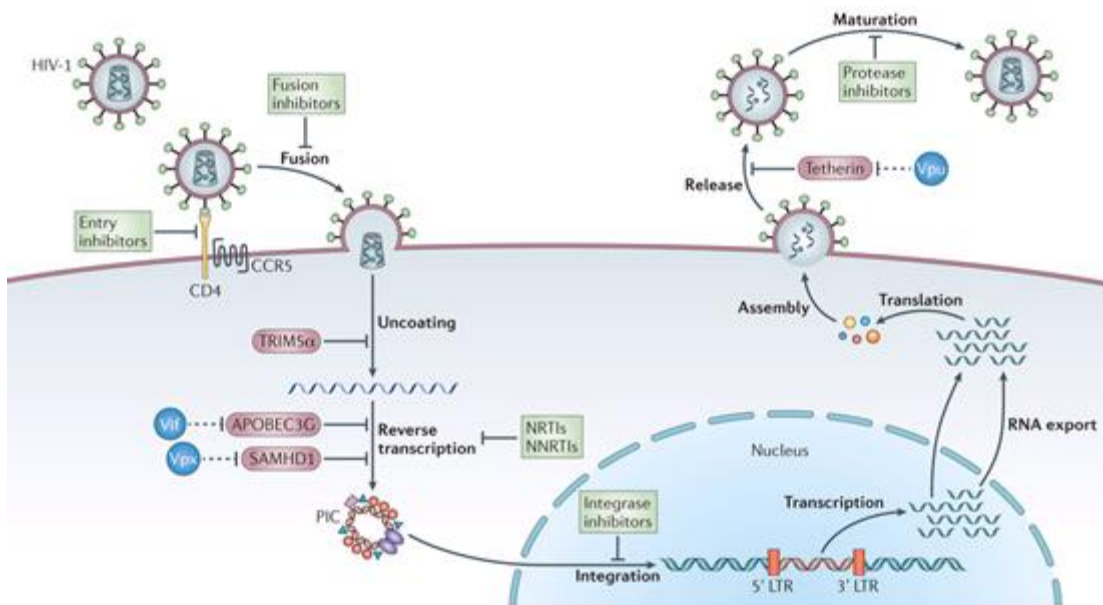


Figura 6 – Ciclo de replicação do HIV-1 (Retirado de: Barre-Sinoussi, Ross, & Delfraissy, 2013).

3 – Imunidade Inata

Após décadas de investigação, foi possível explicar a estrutura do HIV-1, patogénese e imunologia. O conhecimento adquirido permitiu avanços significativos no desenvolvimento de terapêutica medicamentosa, o que permitiu um decréscimo acentuado na mortalidade e transmissão relacionadas com o vírus (Lu & Fei, 2013).

Durante milhares de anos, os organismos eucariotas têm sido expostos a diversas infecções virais, o que permitiu o desenvolvimento do sistema imunitário inato e adquirido contra agentes infecciosos (Lu & Fei, 2013). Após a infecção a imunidade inata actua rapidamente de forma a proteger o hospedeiro contra o agente infeccioso e dando tempo ao sistema imunitário adquirido para responder mais especificamente (Chan, Towers, & Qasim, 2014). Simultaneamente, os vírus evoluíram de forma a escapar ao controlo do sistema imune (Lu & Fei, 2013).

Os tipos de células que detêm um papel importantíssimo na resposta à acção do agente infeccioso são macrófagos, células dendríticas, Células NK e neutrófilos (Guha & Ayyavoo, 2013).

A primeira linha de defesa contra a infecção por HIV é a imunidade inata sendo determinante para o controlo da patogénese viral (Borrow, Shattock, & Vyakarnam, 2010)

3.1 – Células NK

As células NK ou *Natural Killer* são componentes fulcrais da imunidade inata, proporcionando formas de defesa contra a infecção por HIV por meio de mecanismos citolíticos e não citolíticos (Lu & Fei, 2013). Através da segregação de diversas citocinas e quimiocinas, as células NK são capazes de antagonizar a infecção por HIV de forma não citolítica. As quimiocinas (classe de citocinas pró-inflamatórias) segregadas são CC-quimiocina ligando 3 (CCL3), CC-quimiocina ligando 4 (CCL4) e CC-quimiocina ligando 5 (CCL5) (Guha & Ayyavoo, 2013).

As células infectadas com o vírus apesar de não expressarem as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MCH), são reconhecidas pelas células NK activadas que as lisam com perforina e granzimas (Lu & Fei, 2013)

O aumento drástico da inibição de receptores e, por outro lado, o decréscimo da activação surge em resultado da infecção pelo HIV-1, por exemplo em receptores como NKp30, característico das células NK (Guha & Ayyavoo, 2013).

3.2 – Sistema do Complemento

O sistema do complemento promove a remoção de agentes patogénicos através de anticorpos e fagócitos, sendo por isso outro componente importante na imunidade inata. A sua activação pode ser dividida em quatro vias: a via clássica, a via da lectina de ligação a manose (MBL), a via alternativa e a via membranar lítica (Lu & Fei, 2013).

Após a passagem da barreira inicial, o sistema do complemento restringe a replicação viral, uma vez que, favorece o recrutamento de células inflamatórias (Guha & Ayyavoo, 2013).

A actividade do sistema do complemento é desencadeada pela ligação antigénio-anticorpo, via clássica, e também através da clivagem das proteínas de C3 e C5, via alternativa. O resultado da activação do complemento tanto por via clássica como por via alternativa é a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), através da formação de canais transmembranares do qual resulta a lise de virões (Lu & Fei, 2013).

Se por um lado no processo de defesa contra a infecção por HIV-1 o complemento promove a remoção do agente viral, por outro lado pode aumentar a infecciosidade do HIV-1, uma vez que medeia a ligação entre o vírus e as células hospedeiras específicas como é o caso de macrófagos e células dendríticas, que expressam o receptor do complemento CR3 e CR4, resultando na propagação da infecção viral. Assim, de forma a evitar a sua destruição, o vírus pode incorporar na sua membrana mais receptores do complemento CD55, CD59 e CD46 (Borrow et al., 2010).

Sistema do complemento contribui para a restrição da replicação viral, através da lise de partículas virais e células infectadas, neutralizando IgG e IgM associadas ao agente viral (Guha & Ayyavoo, 2013)

3.3 – Anticorpos Neutralizantes

Em resposta ao agente viral, o organismo humano desenvolve anticorpos, incluindo os anticorpos neutralizantes, contra os epítomos de diferentes antigénios (Flego, Ascione, Cianfriglia, & Vella, 2013) Uma série de anticorpos monoclonais neutralizantes foram identificados, como por exemplo, b12 e VRC01 que se ligam ao local de ligação entre CD4 e gp120, e 2G12 que se liga à configuração do glicano presente no domínio externo da gp120. Para além de que , na região na região V3 da gp120 se ligam os anticorpos PG9 e PGT128 (Lu & Fei, 2013).

O HIV consegue escapar à acção dos anticorpos neuralizantes através de mutações rápidas que alteram as proteínas virais, impedindo que estes anticorpos inibam eficientemente a infecção de novas células. Uma outra estratégia que o vírus utiliza para se defender dos anticorpos neutralizantes é mascarar os epítomos críticos das regiões do envelope viral que estão temporariamente expostas e que são alvo dos anticorpos neutralizantes (Lu & Fei, 2013).

4 - Factores de Restrição Viral

Os seres humanos desenvolveram, ao longo do tempo, para além do sistema imunitário inato e adquirido, proteínas que se expressam de forma autónoma que inibem a replicação viral, designadas por factores de restrição, os quais desempenham um papel importante na defesa da célula hospedeira contra a infecção pelo HIV-1 (Malim & Bieniasz, 2012). Estas proteínas têm a capacidade de diminuir significativamente a infecciosidade do HIV (Harris, Hultquist, & Evans, 2012).

Em células humanas, o HIV-1 geralmente consegue escapar à acção inibidora dos factores de restrição, permitindo assim que a sua replicação prossiga, através da produção de proteínas virais que inibem os factores de restrição da própria célula (Malim & Bieniasz, 2012). De uma forma geral, a capacidade de replicação do vírus depende do nível de expressão do factor de restrição do hospedeiro, dependente das células infectadas que detêm a capacidade de permitir ou não essa replicação, tomando as designações de células “permissivas e “não permissivas”, respectivamente (Harris et al., 2012).

Dada a interacção directa entre factores de restrição celulares e os seus antagonistas virais, é possível verificar nos primeiros, traços de evolução rápida devidos a uma vantagem selectiva de mutações. Estes traços são visíveis aquando da comparação entre genes dos factores de restrição entre as espécies evoluídas e o seu hospedeiro. Concluindo-se, que os factores de restrição actuais foram desenvolvidos e aperfeiçoados a partir de interacções entre hospedeiro e o agente patogénico (Harris et al., 2012). São, por este facto, considerados determinantes para a transmissão inter-espécies (Malim & Bieniasz, 2012).

Os factores de restrição abordados neste trabalho são: SAMHD1 que pertence à família das hidrolases; TRIM5 α não menos importante que as restantes, no entanto sem significado em seres humanos; e tetrina e APOBEC3G, que pertencem à família de desaminases, sendo APOBEC3G a que detém maior destaque neste trabalho. (Lu & Fei, 2013). Na Tabela 1 são apresentadas as características principais destes factores.

Tabela 1 – Síntese dos factores de restrição anti-HIV e as suas características principais. (Adaptado de: Chan, Towers, & Qasim, 2014)

Factor de restrição	Mecanismo de acção	Evasão viral	Desvantagens	Exploração
APOBEC3	Desaminação de citidina do genoma viral	Degradação proteossomal mediada por Vif	APOBEC3G induz mutações que podem promover a evolução do HIV	APOBEC3G modificado restringe o HIV nas células T e macrófagos
SAMHD1	Prevenção da transcrição reversa	Vpx causa degradação proteossomal no HIV-2	Função antiviral limitada a células quiescentes	Indefinido
TETRINA	Impede a libertação HIV, aprisionando as partículas virais	Degradação lisossomal promovida por Vpu	Reduz, mas não elimina a propagação do vírus ou a criação de reservatórios	Vpu resistente a tetrina em linhas celulares
TRIM5α	Vírus alvos para a degradação proteossomal e interrompe o revestimento	Proteínas acessórias são incapazes de contrariar restrição TRIM	Espécies de restrição específica; TRIM5 α humano não restringe HIV-1	Restrição de TRIM5 α demonstrada em ratos humanizados

4.1 - TRIM5 α

O factor de restrição TRIM5 α , foi inicialmente encontrado em células de macaco (Lu & Fei, 2013). O TRIM5 α é expresso em todos os tecidos humanos, incluindo as células T e pertence à família TRIM, que engloba cerca de 100 proteínas humanas com funções diversificadas (Chan et al., 2014).

A proteína TRIM5 α , apresenta na sua constituição um domínio C terminal designado B30.2 ou PRYSPRY, que é responsável pela ligação à cápside viral ou complexo de pré-integração (PIC) (Figura 7) (Harris et al., 2012) (Refsland, Hultquist, & Harris, 2012). Este factor de restrição encontra-se envolvido na inibição da replicação do HIV-1 numa fase precoce (Guha & Ayyavoo, 2013).

Ao entrar na célula, o TRIM5 α reconhece a cápside viral através do seu domínio B30.2. Apesar da interacção entre os monómeros destas proteínas ser fraca, a TRIM5 α no citosol forma dímeros, e em seguida, de forma espontânea hexâmeros, cujo número aumenta durante a entrada da cápside viral. Os hexâmeros são necessários para uma restrição eficiente e para mediar uma melhor ligação com a cápside viral permitindo que diversos domínios B30.2 envolvam o complexo de pré-integração e inibam a entrada do vírus para o núcleo. A replicação viral pode ser inibida através da ligação de TRIM5 α à cápside viral no citoplasma, interrompendo o seu processo de revestimento, o que é importante pois o tempo de desencapsidação é crítico para os retrovírus. Se o processo de desencapsidação for ser atrasado ou bloqueado, o complexo de pré-integração não entra no núcleo das células-alvo. Por outro lado, no caso de o processo ser acelerado, a proteína da cápside viral será degradada antes do final da transcrição inversa que cessa (Lu & Fei, 2013).

No entanto, por mutação da sequência da proteína da cápside viral o HIV pode escapar ao ataque por TRIM5 α (Lu & Fei, 2013).

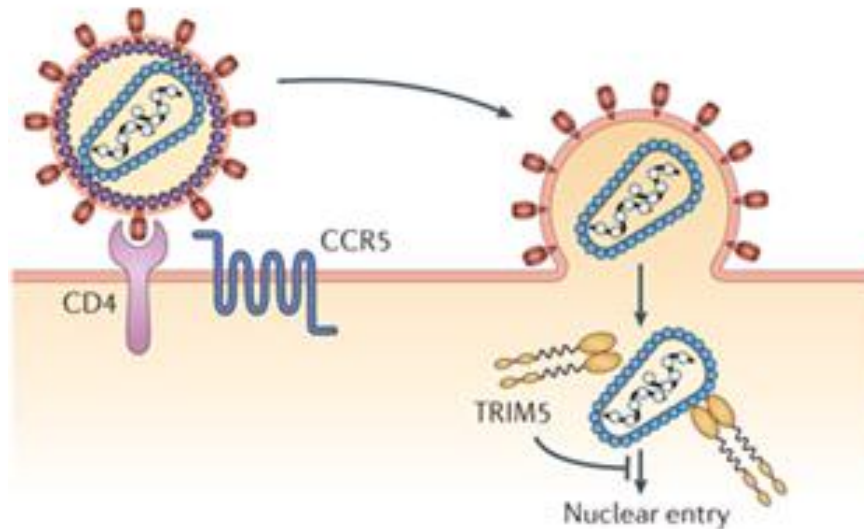


Figura 7 – Ligação do factor de restrição TRIM5 α à cápside viral (Retirado de: Hatzioannou & Evans, 2012).

4.2 - Tetrina

O factor de restrição tetrina também designada por BST-2, CD3 17 ou HM1.24, (Venkatesh & Bieniasz, 2013) foi recentemente identificado por Neil e Bieniasz (Lu & Fei, 2013).

A tetrina é uma proteína intrínseca glicosilada do tipo II com 30 a 36 kDa, que é expressa em várias células podendo ser regulada por interferões tipo I e estímulos pró-inflamatórios (Roy et al., 2014). A Tetrina tem uma extremidade N-terminal citosólica curta, uma hélice transmembranar, um domínio extracelular maioritariamente α -helicoidal e resíduos de cisteína extracelulares estabilizados homodimericamente por pontes de dissulfureto. Na extremidade C-terminal é modificada por um glicosilfosfatidilinositol (Venkatesh & Bieniasz, 2013).

É um factor de restrição de ampla especificidade, isto porque interage com a membrana da célula hospedeira ao invés de interagir com um factor viral. Tem a capacidade impedir a libertação de diversos vírus com envelope, como é o caso do HIV-1. Foi primeiramente identificada em células B, posteriormente foi demonstrada a sua elevada expressão, em algumas células como macrófagos, células dendríticas e células T CD4⁺ (Chan et al., 2014).

A proteína viral acessória Vpu pode inibir a tetrina através de tráfico endossomal e, posteriormente, degradação lisossomal que requer a proteína do hospedeiro β TrCP. Elevados níveis de tetrina podem saturar Vpu, resultando na restrição viral ou, por outro lado, variantes resistentes de Vpu são capazes de inibir a libertação do HIV-1 (Chan et al., 2014).

Foi já demonstrado que, para além dos retrovírus, este factor de restrição tem acção contra filovírus, adenovírus e herpesvírus (Lopez et al., 2010).

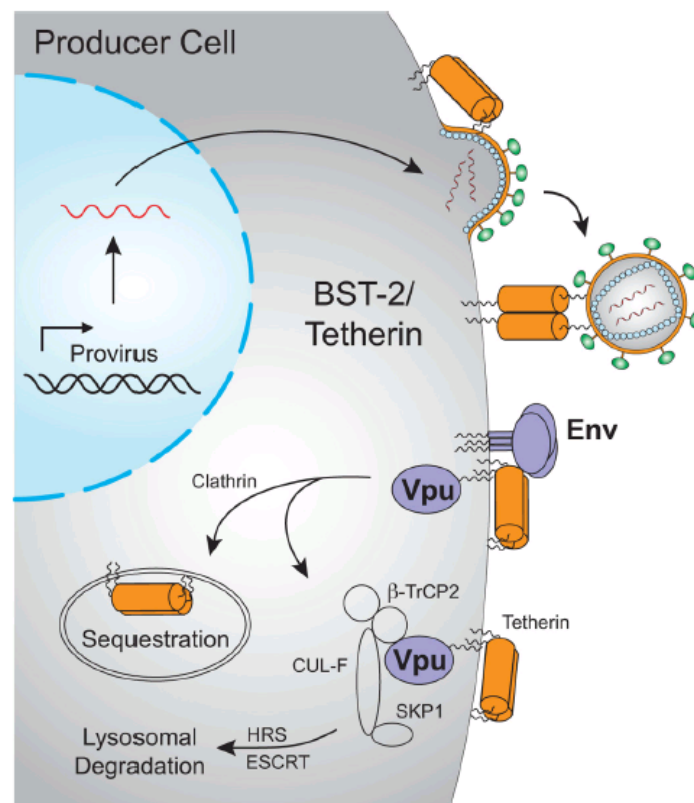


Figura 8 – Restrição do HIV-1 por Tetrina. A Tetrina actua ao nível da superfície das células T infectadas durante a libertação de viriões. Tanto Vpu como Env podem sequestrar a Tetrina para locais afastados do local de libertação do virião. Vpu recruta o complexo ubiquitina-ligase E para degradação lisossomal da Tetrina (Retirado de: Harris et al., 2012).

4.3 - SAMHD1

Este factor de restrição é uma fosfohidrolase que a nível intracelular degrada dNTP no início da transcrição reversa, sendo a sua actividade anti-retroviral regulada por modificações pós-traducionais (Wu, 2013).

A extensão da infecção pelo HIV-1 é específica do tipo de célula, por exemplo, as células T CD4+ humanas activadas são mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1 do que células humanas de linhagem mielóide, como macrófagos e células dendríticas. Estas últimas têm a capacidade de levar partículas virais intactas até às células T sensíveis, aumentando o número de células T infectadas. Vários estudos demonstraram que o factor de restrição específico de células mielóides, SAMHD1, tem a capacidade de limitar a extensão da sequência de transcrição reversa após a entrada viral (Harris et al., 2012), através da degradação de dNTP necessários para a síntese do DNA proviral. O facto de restringir a infecção viral apenas nas células mielóides, sugere a necessidade de um contexto celular específico ou componentes auxiliares (Berger et al., 2011).

O seu papel na regulação da resposta imunitária é destacado por mutações associadas ao Síndrome de Aicardi-Goutieres, em que existe uma produção elevada de Interferões tipo I (Wu, 2013).

Através da degradação proteolítica de SAMHD1, as proteínas Vpx de HIV-2 e SIV tornam as células humanas de linhagem mielóide admissíveis à infecção pelo HIV-1 (Harris et al., 2012).

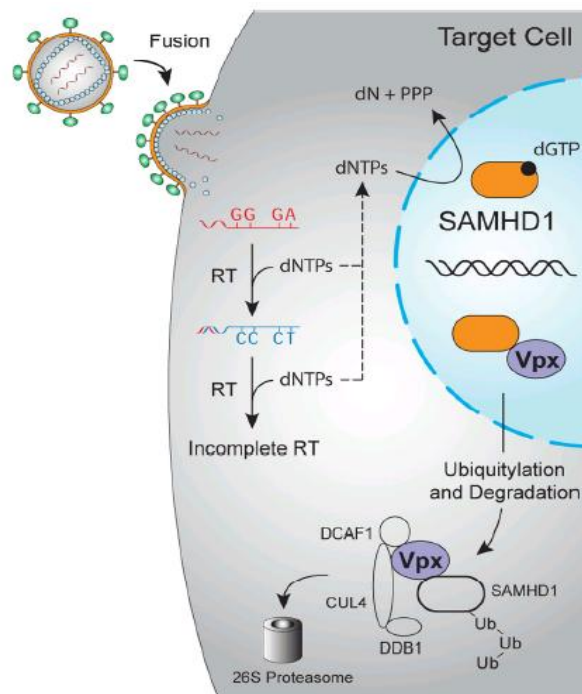


Figura 9 – Restrição do HIV-1 por SAMHD1. SAMHD1 bloqueia a transcrição reversa do HIV-1 através da degradação de dNTP. O seu antagonista Vpx pode contrariar a restrição de SAMHD1 funcionando como adaptador ao complexo ubiquitina-ligase E

promovendo a degradação de SAMHD1 proteossoma 26 S (Retirado de:Harris et al., 2012).

4.4 – Família APOBEC

A família APOBEC engloba as desaminases de citidina que, em seres humanos inclui: APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 e APOBEC4 (Goila-Gaur & Strebel, 2008).

A APOBEC1 foi a primeira proteína da família a ser identificada (Moris, Murray, & Cardinaud, 2014). Encontra-se localizada no cromossoma 12 (Goila-Gaur & Strebel, 2008) e é expressa apenas ao nível do tracto gastrointestinal humano, no entanto, pode expressar-se no fígado em ratinhos, ratos, cães e cavalos. Tem acção ao nível do metabolismo lipídico, uma vez que, tem influência na edição de apolipoproteína B pré-mRNA. Deste modo, a sua acção é relevante no que respeita às concentrações plasmáticas de lipoproteínas que estão implicadas em patologias como hiperlipidemia ou aterosclerose. Em ratinhos a sua elevada expressão reduz os níveis de LDL, por outro lado, pode induzir carcinoma hepático em animais transgénicos (Moris et al., 2014).

A APOBEC2 localiza-se no cromossoma 6 (Goila-Gaur & Strebel, 2008). Em humanos é expressa apenas no coração e nos músculos esqueléticos. Estudos realizados *in vitro*, mostraram que esta proteína também apresenta actividade de desaminase de citidina (Moris et al., 2014).

Quanto aos sete genes APOBEC3, estes estão localizados no cromossoma 22 (Goila-Gaur & Strebel, 2008). Estes genes são bastante polimórficos e são na maioria expressos em células T e fagocitárias (Moris et al., 2014).

Por fim a mais recente, APOBEC4 localiza-se no cromossoma 1 e ao que parece não tem capacidade para restringir o vírus selvagem ou o HIV-1 deficiente em Vif em células humanas (Goila-Gaur & Strebel, 2008).

A acção anti-viral das APOBEC3 desta família estende-se a outros vírus para além de retrovírus como HIV-1 e SIV. Apresenta uma acção inibidora em vírus como hepadnavírus, vírus da leucemia murina, vírus do tumor mamário de ratinho, vírus da anemia infecciosa equina e, também, em retrotransposições (da Costa et al., 2014).

As APOBEC podem ter dois domínios desaminase, mas normalmente apenas um deles é cataliticamente activo, enquanto que o outro está envolvido na encapsidação viral (Figura 11) (Goila-Gaur & Strebel, 2008).

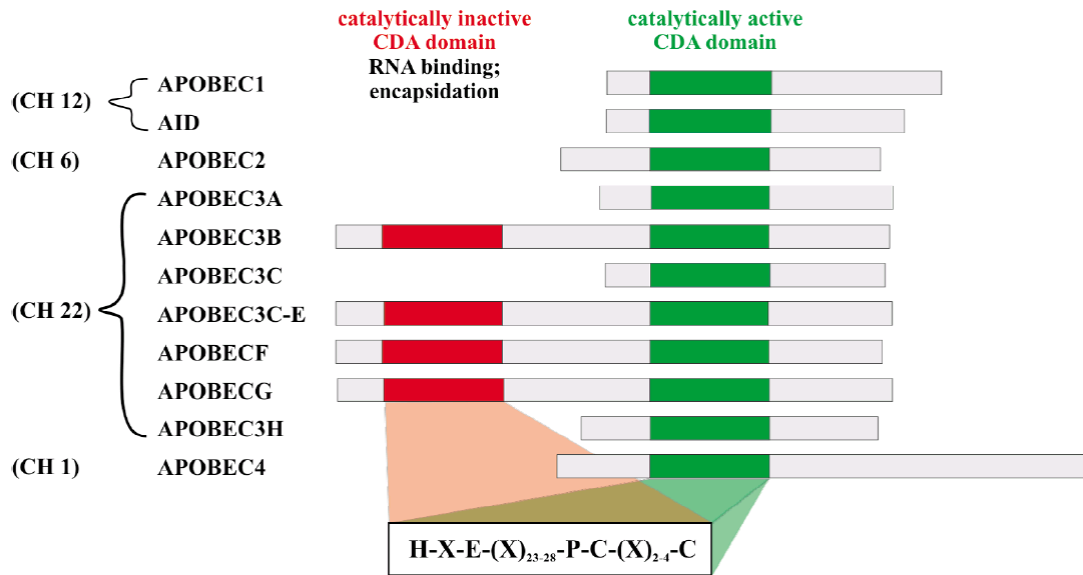


Figura 10 – Família APOBEC3. Representação das proteínas humanas APOBEC3 consoante o cromossoma em que se inserem e de acordo com os domínios cataliticamente inactivo (vermelho) e activo (verde). (Retirado de: Goila-Gaur & Strebel, 2008).

4.4.1 - Expressão da Subfamília APOBEC3

A subfamília APOBEC3 engloba os seguintes genes: APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G e APOBEC3H (Refsland et al., 2012).

Apenas algumas das proteínas desta subfamília APOBEC3, têm relevância demonstrada na infecção por HIV, as quais são APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G e APOBEC3H (Figura 12) (Kim et al., 2014). Estas têm expressão em células T CD4+ não permissivas e são capazes de inibir eficazmente a infecção viral por acumulação de mutações de guanina a adenina. São susceptíveis à acção de Vif, uma proteína acessória que é seu antagonista (Harris et al., 2012).

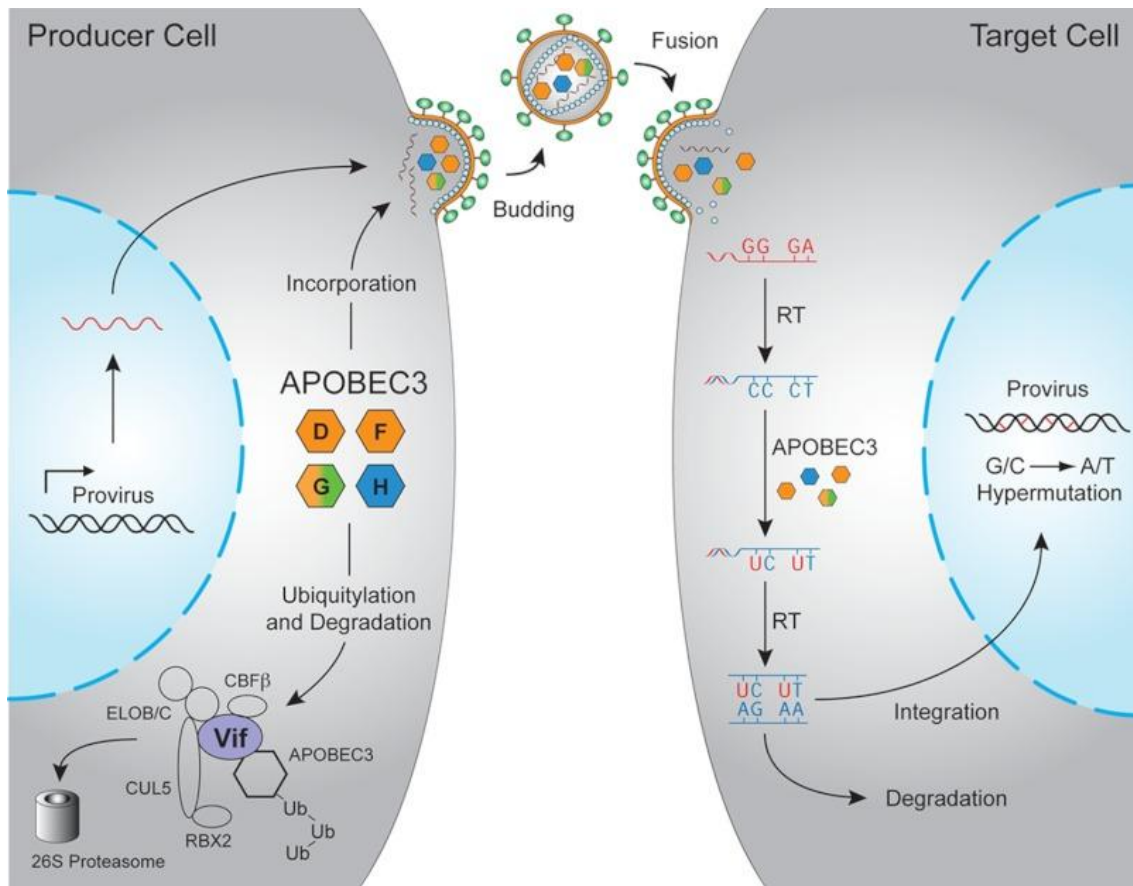


Figura 11 – Restrição do HIV-1 induzida pela subfamília APOBEC3. (APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, e APOBEC3H podem incorporar-se em viriões de HIV-1 e resultar na desaminação de citosinas em uracilos, durante a iniciação da transcrição reversa a partir de RNA viral em células infectadas. Vif também contraria a restrição das APOBEC3 na célula produtora de vírus através do recrutamento do complexo ubiquitina-ligase E e CBF β provocando a degradação das proteínas APOBEC3 no proteossoma 26S (Retirado de: Harris et al., 2012).

As APOBEC3A e APOBEC3B são expressas principalmente em monócitos e linfócitos B, respectivamente. As APOBEC3F e APOBEC3G expressam-se em células T, monócitos e células dendríticas. Esta família de proteínas funciona com uma linha de defesa primária do hospedeiro à infecção viral, uma vez que a sua indução é também efectuada por mediadores de inflamação. O IFN- α aumenta a expressão de APOBEC3A e APOBEC3G em monócitos e macrófagos. Para além das células imunitárias, as APOBEC3 também são expressas ao nível dos testículos e ovários humanos, assim como em diversas células cancerígenas de origem não imunitária, como é o caso das linhas celulares de adenocarcinoma colon rectal, melanomas e carcinoma do pulmão. O

papel na imunidade antiviral, demonstrado pela acção contra a infecciosidade do HIV-1, foi primeiramente atribuído a APOBEC3G (Moris et al., 2014). Apesar das propriedades antivirais demonstrados por todos os membros da subfamília APOBEC3, sabe-se que o poder anti-viral varia entre os membros (Berger et al., 2011).

4.4.2 - Desaminase de citidina APOBEC3G

A proteína APOBEC3G foi o primeiro factor de restrição a ser identificado como potencial inibidor da infecção por HIV-1, posteriormente, outros factores de restrição foram descobertos (revisto por Lu & Fei, 2013).

Como mencionado anteriormente, este factor de restrição pertence à família das desaminases de citidinas, apresentando especificidade para o DNA de cadeia simples, interferindo na replicação do genoma viral (Kim et al., 2014).

Tal como acontece com os restantes membros da subfamília APOBEC3, esta tem um domínio curto de hélice α , um domínio catalítico e um pseudocatalítico e um péptido ligante. O domínio catalítico apresenta HXE-(X)₂₇₋₂₈-PCX₂₋₄-C. No entanto, apenas nas APOBEC3B, APOBEC3G e APOBEC3F esta estrutura está duplicada. A ligação da APOBEC3G ao ácido nucleico está relacionada com os seus domínios desaminase. Apesar de ser cataliticamente inactivo, o domínio N-terminal é relevante na encapsidação viral e na ligação ao RNA viral. Enquanto que o domínio C-terminal é cataliticamente activo favorecendo a ligação ao DNA de cadeia simples (Goila-Gaur & Strebel, 2008).

4.4.3 – Restrição de Vif induzida por APOBEC3G

A inibição da replicação do HIV-1 resulta da indução de uma hipermutação no genoma viral, que ocorre em uma fase inicial da transcrição reversa. Para que a APOBEC3G iniba a infecção viral é necessária a sua integração nos viriões podendo induzir hipermutação no genoma viral quando o vírus infectar uma nova célula (Strebel, 2005).

Através da interacção com RNA viral, as proteínas APOBEC3G são incorporadas nos viriões formados através da interacção com Gag (Guha & Ayyavoo, 2013). Na ausência de Vif, uma proteína com cerca de 23kD (característica necessária

para a produção de vírus infecciosos) (Goila-Gaur & Strebel, 2008) a APOBEC3G catalisa a desaminação de citidina em uracilo de (-)DNA durante a transcrição reversa, verificando-se hipermutação de guanina para adenina (Pillai, Wong, & Barbour, 2008). Esta hipermutação resulta na inactivação do genoma viral, conduz à produção de viriões defeituosos no próximo ciclo replicativo, ou por outro lado, pode tornar o genoma viral não viável em apenas um ciclo replicativo, o que resulta da degradação do genoma na célula-alvo (Strebel, 2005).

Inicialmente a função da APOBEC3G foi descrita como uma extensa mutação no genoma viral devido à já referida hipermutação. Descobertas recentes revelaram que APOBEC3G desaminase-deficiente exerciam uma acção inibidora viral considerável, concluindo-se que esta acção inibidora poderia ser através de uma actividade desaminase-independente. Um estudo realizado por comparação com APOBEC3G selvagem e APOBEC3G desaminase-deficiente concluiu que a acção antiviral de APOBEC3G desaminase-deficiente foi significativamente menor do que APOBEC3G selvagem, o que significa que para a inibição viral do HIV-1 Vif-deficiente eficaz é necessária APOBEC3G cataliticamente activa (Miyagi et al., 2007)

4.4.4 – Inibição da acção de restrição de APOBEC3G por Vif

A proteína Vif tem a capacidade de neutralizar a acção de restrição da APOBEC3G através do recrutamento de um complexo de ubiquitina-ligase E3-Culina 5-Elongina B/C-RBX2, o que leva à degradação proteolítica de APOBEC3G em células infectadas, reduzindo a incorporação de viriões (Harris et al., 2012).

Alguns estudos revelaram que a proteína Vif apesar de dispensável para algumas linhagens de células T é indispensável para outras (Harris et al., 2012) normalmente para a replicação do HIV-1 em células T primárias, macrófagos, células dendríticas, monócitos e em células de linhagem linfóide tais como CEM e Hut78, designadas de não permissivas. Por outro lado, a sua acção é dispensável em linhagens de células T como CEM-SS, Jurkat e SupT1 designadas de permissivas (Moris et al., 2014). As células do tipo permissivas, apresentam o fenótipo que permite a replicação de HIV-1 Vif-deficiente. Já as células ditas não permissivas produzem um factor hospedeiro capaz de inibir a replicação de HIV-1 Vif-deficiente, inicialmente designado por CEM-15, conhecido actualmente como APOBEC3G (revisto por Goila-Gaur & Strebel, 2008).

Quando o gene funcional *vif* está ausente, os vírus apresentam uma reduzida capacidade de replicação em células não permissivas, ao contrário do que se verifica em vírus selvagens (Goila-Gaur & Strebel, 2008).

As células resultantes da fusão de células permissivas e não permissivas apresentam o fenótipo das não permissivas, o que sugere a existência de um factor de restrição dominante. Facto que levou à identificação do factor de restrição APOBEC3G em determinadas células não permissivas. A expressão deste factor de restrição em células T permissivas permitiu que passassem a não permissivas para a replicação do HIV *Vif*-deficiente (Harris et al., 2012).

A forma como *Vif* neutraliza a APOBEC3G pode ser efectuada através de mecanismos distintos (Figura 13). Assim, através da inibição da tradução por ligação ao mRNA da APOBEC3G, e consequentemente, diminuir a síntese desta proteína. Também, através da sua ligação a APOBEC3G pode induzir degradação proteolítica (Henriet et al., 2009), ou seja *Vif* ao ligar-se à APOBEC3G recruta o complexo de ubiquitina-ligase E3 que contém Culina 5- e Elongina B/C-RBX2, e que induz a poliubiquitinação de APOBEC3G e, em seguida, a degradação da mesma (Guha & Ayyavoo, 2013). Por último, através da competição com APOBEC3G pela ligação a componentes virais, *Vif* pode inibir a integração de APOBEC3G nos viriões (Henriet et al., 2009), reduzindo a capacidade desta proteína restringir a replicação viral (Kim et al., 2014).

Vif de HIV apresenta uma acção inibidora ineficaz contra as proteínas APOBEC3 de macaco, rato e gato. Apesar deste facto, as APOBEC3 humanas e de macaco podem ser inibidas por *Vif* de SIV_{smm} e SIV_{mac}, dada a sua elevada actividade (Hatzioannou & Evans, 2012).

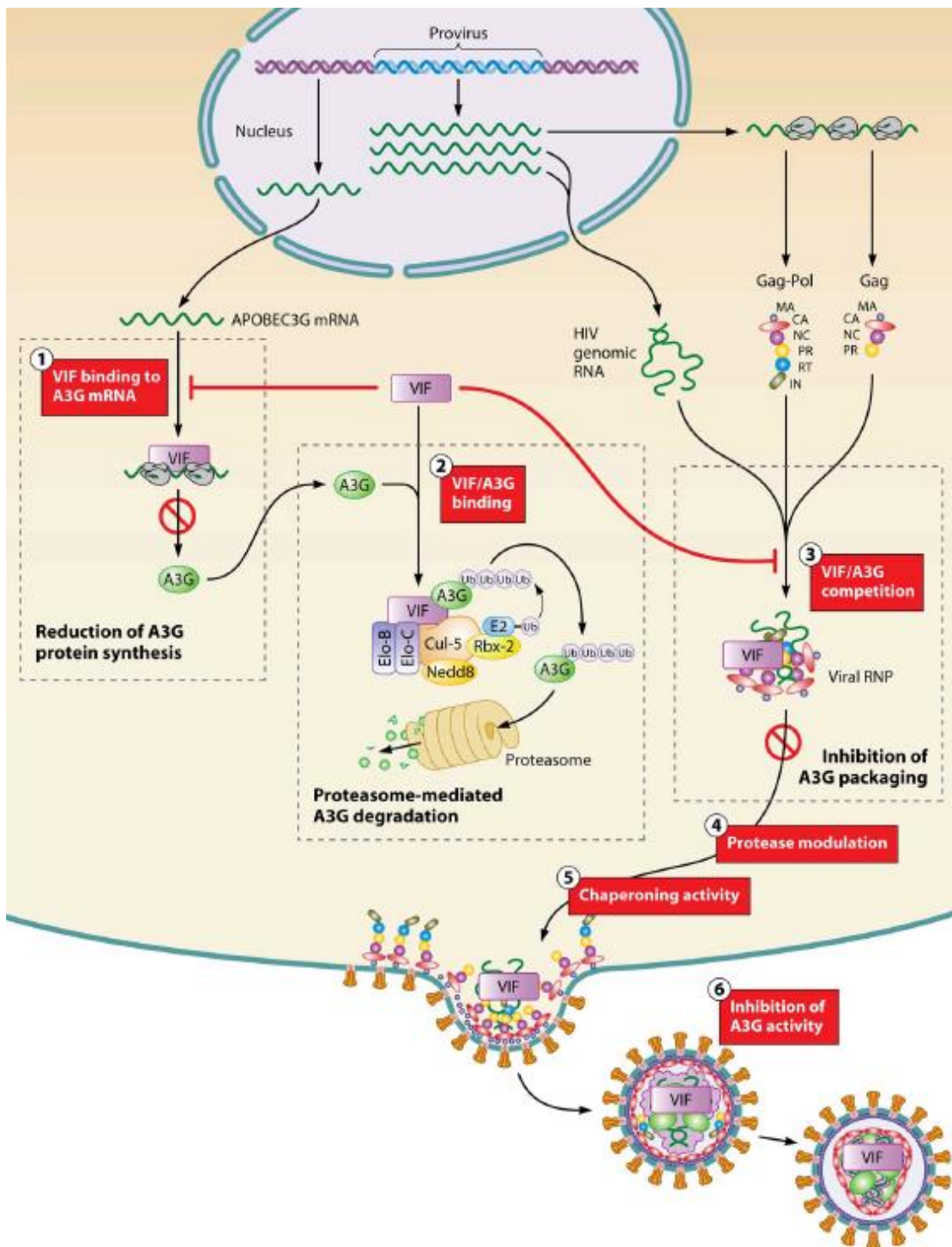


Figura 12 – Neutralização de APOBEC3G induzida por Vif. (Retirado de: Henriët et al., 2009)

Vários domínios funcionais da proteína Vif estão associados à ligação entre o complexo ubiquitina-ligase E3 e o factor de restrição APOBEC3G. O domínio SOCS-box tem afinidade para o complexo elonginaB/C e inclui os motivos Cullin-Box e BC-box. A elongina C liga-se, através de ligações hidrófobas, à sequência¹⁴⁴ SLQ (Y/F)

LA¹⁴⁹ localizada na região C-terminal do motivo BC-box. Na região C-terminal da elongina B interagem a Culina5 e o motivo¹⁶¹ PPLP¹⁶⁴ e de Vif contido na Cullin-box. Quanto ao domínio HCCH localiza-se no seguimento do motivo BC-box e medeia a interacção de Culina 5. O domínio de ligação da APOBEC3G localiza-se na região não linear da extremidade N-terminal. Este contém o motivo¹⁴ DRMR¹⁷ que interage com a sequência (128-130) de APOBEC3F e o motivo⁴⁰YRHHY⁴⁴ que tem um papel funcional importante na interacção com APOBEC3G (Figura 14) (da Costa et al., 2014).

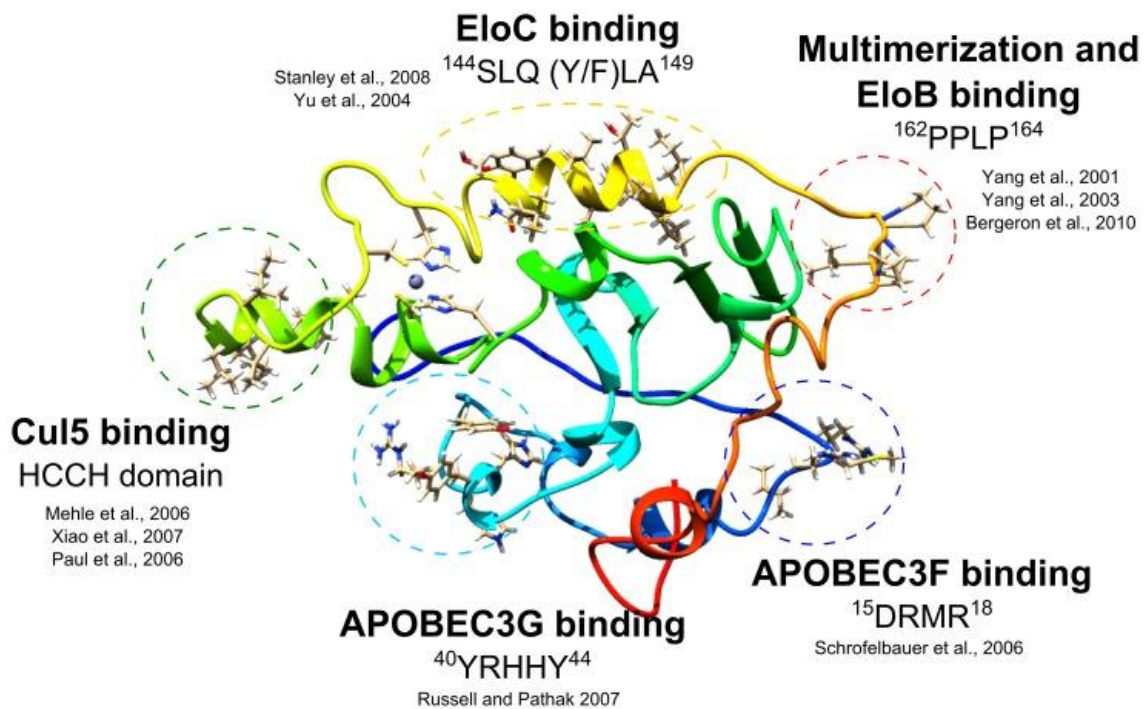


Figura 13 – Estrutura dos domínios funcionais de Vif de HIV-1. Representação da ligação ao complexo ubiquitina-ligase E3 e factores de restrição APOBEC3G e APOBEC3F (Retirado de: da Costa et al., 2014)

O factor de transcrição proteossómico CBF β foi identificado em estudos como uma proteína associada a Vif, que somente na presença de Vif se associa ao complexo de ligase E3. Foi demonstrado em estudos *knockdown* que CBF β é crucial para a estabilidade de Vif e degradação de APOBEC3 nas células do hospedeiro. (Harris et al., 2012)

A purificação bioquímica do complexo tetramérico CBF β -Vif-ElonginaB/C deveu-se ao factor CBF β . Este complexo tetramérico pode originar um complexo hexamérico ao combinar-se com um dímero Culina5/RBX2 com acção de poliubiquitinação de APOBEC3G, o que poderá conduzir à degradação de Vif ou até

mesmo do complexo Vif-Ligase E3-APOBEC3. A evolução no desenvolvimento de fármacos destinados a promover a interrupção da interação Vif-APOBEC3 poderá extinguir a replicação viral. Assim, uma nova classe de fármacos pode ser desenvolvida com o intuito de suprimir a carga viral. (Harris et al., 2012)

O facto do HIV-1 apresentar uma enorme capacidade de evolução é sem dúvida um dos factores que permitem a sua resistência à imunidade do hospedeiro. De uma forma geral, os vírus com genoma RNA têm elevadas taxas de mutação devido à reduzida fidelidade da transcriptase reversa. (Pillai et al., 2008)

Com uma supressão incompleta de Vif as concentrações intracelulares de APOBEC3 irão aumentar apenas para exercer uma acção intermédia na mutação do genoma viral, que resulta em uma aceleração da evolução viral sem promover o seu colapso. Esta supressão, quer seja completa ou incompleta, é considerada uma estratégia terapêutica como alternativa às terapêuticas já implementadas. Por outro lado, há evidências de que as estratégias terapêuticas envolvendo interação Vif-APOBEC3 podem, ao contrário do que seria desejado, beneficiar a evolução viral. Inibição incompleta de Vif pode resultar numa incapacidade da defesa imunológica derivada da rápida evolução de mutações, assim como na resistência a fármacos por parte de outros membros de regime anti-retroviral. (Pillai et al., 2008)

Estudos bioquímicos e de mutagenese revelaram que níveis perto do fisiológico de APOBEC3G têm a capacidade de induzir a hipermutação no sentido 5' para 3' (Goila-Gaur & Strebel, 2008), por substituição de TGG por TAA (codão de terminação), restringindo a transcrição viral Vif-deficiente em linhagens de células T permissivas (Lu & Fei, 2013). A frequência desta hipermutação induzida por APOBEC3G pode levar à produção de partículas virais não infecciosas (Hosseini & Mac Gabhann, 2013).

Um trabalho experimental evidenciou características da interação APOBEC3G e o HIV-1 demonstrando, com base em ensaios *in vivo* que, uma maior extensão da hipermutação viral promovida por APOBEC3G é directamente proporcional à concentração celular de APOBEC3G (Pillai et al., 2008).

5 - Proteínas Virais Acessórias

Para contrariar a acção bloqueadora, por parte dos factores de restrição, o HIV-1 desenvolveu algumas estratégias de defesa baseadas em proteínas acessórias (Harris et al., 2012). Os agentes virais utilizam comumente como estratégia de evasão a destruição das proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro, os já referidos factores de restrição (Stanley et al., 2008).

Algumas evidências destacam a importâncias das proteínas acessórias na patogénese da infecção viral, uma vez que, estas contribuem para modificações no meio celular facilitando a replicação viral. O genoma dos lentivírus codifica para diversas proteínas acessórias como Nef, Vif, Vpr, Vpu e Vpx. No entanto, estas não são comuns a todos os lentivírus. Nef e Vpr são específicas de lentivírus primatas (HIV-1, HIV2 e SIV). Vpx é expressa apenas por HIV-2, SIVsmm e SIVmac. Vpu é expressa apenas por HIV-1 e algumas estirpes de SIV (Roy et al., 2014).

A proteína acessória Vpr com cerca de 14 kDa tem diversas acções como, por exemplo, induzir paragem do ciclo celular assim como da apoptose e intervém na modulação da eficácia da transcrição reversa (Guenzel, Hérate, & Benichou, 2014).

A proteína Vpu de 16 KDa é produzida em conjunto com Env e desempenha um papel importante como antagonista da tetrina. A Vpu apresenta como funções o recrutamento do complexo ubiquitina ligase para mediar a degradação proteossomal e poliubiquitinação e ajudar a libertação de partículas virais maduras. A Vpu ajuda a manter a tetrina afastada dos locais de exocitose do virião, no entanto o mecanismo exacto para este facto ainda não é totalmente conhecido. Alguns estudos revelaram que a replicação do HIV é bastante sensível ao IFN- α na ausência da proteína Vpu, e a replicação eficaz depende de Vpu em tecidos linfóides humanos infectados tanto *in vivo* como *ex vivo* (Lu & Fei, 2013).

A proteína acessória Vpu é constituída por 81 aminoácidos e é uma fosfoproteína intrínseca do tipo I. É constituída por um domínio N-terminal curto, um domínio transmembranar de 23 aminoácidos e um grande domínio C-terminal citoplasmático. As suas funções principais são evidenciadas durante a replicação viral do HIV-1 ligando-se ao receptor CD4 para a degradação proteossomal e, finalmente, favorecendo a libertação viral das células hospedeiras através da inibição do factor de restrição tetrina. É por isso considerado como um factor-chave para a invasão viral do sistema imune (Roy et al., 2014).

Os lentivírus utilizam um complexo receptor para infectar as células hospedeiras. O componente principal do complexo receptor é CD4. É uma glicoproteína intrínseca do Tipo I com 54Kda, expressa na superfície celular de linfócitos T help, células da linhagem de monócitos/macrófagos e células progenitoras hematopoiéticas. A infecção de células CD4⁺ por lentivírus resulta numa reduzida modulação, rápida e constante, nos níveis de expressão na superfície de CD4. A depleção de CD4 em células infectadas é conseguida pela acção das proteínas acessórias Nef, Vpu e Env, tendo a última uma menor acção. A proteína Nef é produzida imediatamente após a infecção e tem como alvo o receptor para a degradação lisossomal. Quanto à proteína Env precursora gp160, liga-se a CD4 no retículo endoplasmático e bloqueando transporte de ambas até à membrana celular. A proteína acessória Vpu, como já referido anteriormente, atinge o receptor CD4 para a degradação proteossomal (Roy et al., 2014).

A degradação de CD4 recém-sintetizado, induzida por Vpu, envolve múltiplas etapas, a ligação de Vpu a CD4 através dos domínios transmembranares, a retenção de CD4 no retículo endoplasmático, poliubiquitinação e, por fim, a sua degradação. Este processo de degradação requer a integridade de duas fosfoserinas S₅₂/S₅₆ presentes no motivo canónico DSCXXS presente na interior da extremidade citoplasmática de Vpu, envolvida numa interação com β -TrCP1 ou β -TrCP2, dois adaptadores para o complexo ubiquitina-ligase SCF. O recrutamento do complexo SCF ^{β -TrCP} resulta na poliubiquitinação de CD4 em resíduos de serina, lisina e treonina. A poliubiquitinação de CD4 contribui para a retenção do receptor no retículo endoplasmático, permitindo o recrutamento do complexo ERAD VCP-UFDL1-NPL4 que leva à saída do retículo e consequente degradação (Figura 15) (Roy et al., 2014).

A proteína acessória Vpx, encontrada exclusivamente em alguns vírus como é o caso de SIV e HIV-2, aumenta a infecção por HIV-1 em células dendríticas e macrófagos, sendo também capaz de promover a acumulação de DNA. (Lu & Fei, 2013).

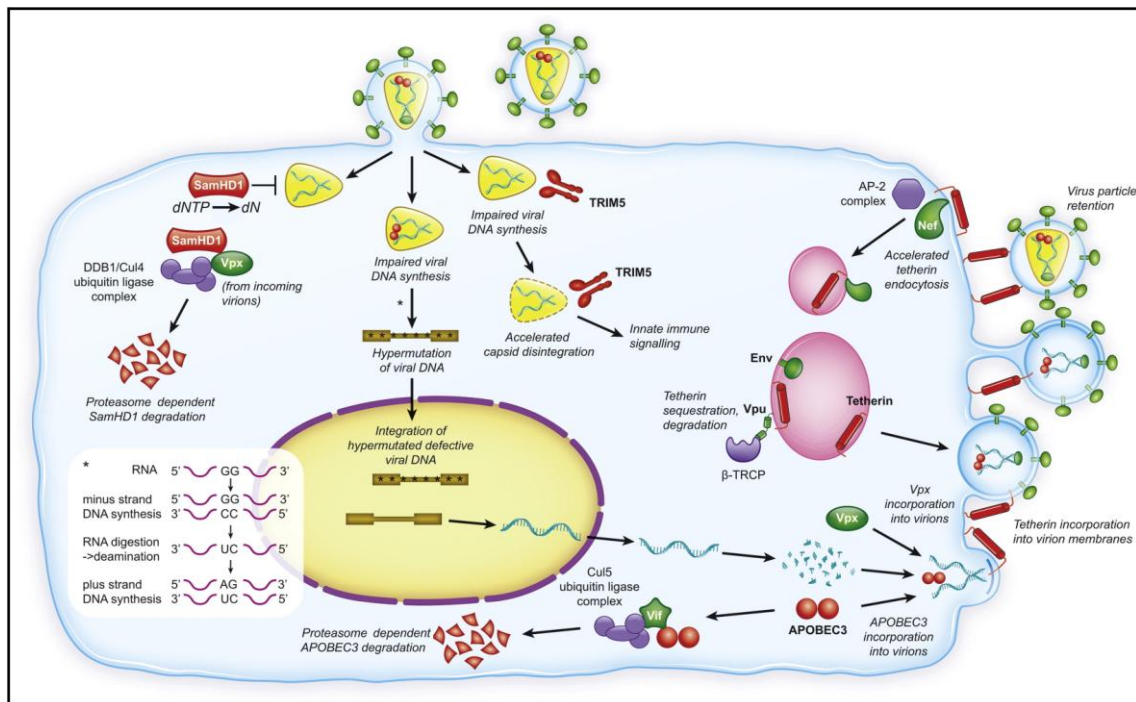


Figura 14 – Factores de restrição na infecção por HIV-1 e seus antagonistas. (Retirado de: Blanco-Melo, Venkatesh, & Bieniasz, 2012)

A patogênese da infecção pelo HIV-1 está relacionada com o nível de replicação viral e refere-se a diversos factores específicos do vírus e da célula hospedeira. A actividade dos produtos codificados e pelos seus genes afectam a entrada do vírus e os eventos posteriores à essa entrada (Kim et al., 2014).

Os processos de mutação e recombinação viral do HIV-1 têm como efeito promover a diversidade genética entre as várias variantes do vírus e assim permitir uma adaptação mais rápida (Kim et al., 2014).

6 - Anticorpos monoclonais com acção antiviral

Actualmente, são produzidos anticorpos monoclonais que reconhecem os epítomos de diversos vírus, graças aos avanços na biotecnologia e biologia celular, permitindo o desenvolvimento de terapêuticas menos imunogénicas, mais seguras e ao mesmo tempo mais eficazes. Deste modo, os anticorpos monoclonais surgem como uma nova classe de medicamentos biológicos em áreas como oncologia e nas doenças auto-imunes e inflamatórias, sendo que no campo das doenças infecciosas a sua utilização ainda não está desenvolvida (Flego et al., 2013)

Diversos mecanismo de acção podem ser atribuídos aos anticorpos monoclonais com actividade antiviral. Estes podem bloquear a interacção do receptor de ligação a proteínas da superfície viral. Podem também, através da interferência com as alterações conformacionais necessárias à fusão da membrana, neutralizar a infecção viral na superfície celular ou no interior de endossomas, como no caso do HCV (Flego et al., 2013). As alterações conformacionais resultantes da interacção entre a proteína gp120 da superfície do envelope viral com o receptor CD4, leva à exposição de locais de ligação aos co-receptores CCR5 ou CXCR4. Consequentemente, também são sentidas alterações adicionais na proteína gp41 (Flego et al., 2013). Actualmente, decorrem investigações utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra o co-receptor CCR5, como é o caso de CCR5mAb004 e PRO 140 (Murga, Franti, Pevear, Maddon, & Olson, 2006)

Um exemplo desses anticorpos é o Ibalizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que tem a capacidade de se ligar ao receptor CD4. Apesar de não inibir a ligação da proteína gp120 ao receptor CD4 pode, por alterações conformacionais após esta ligação, impedir a interacção do complexo gp120-CD4 com os co-receptores CCR5 ou CXCR4 (Song et al., 2010)

Os vírus desenvolveram mecanismos como defesa à acção dos anticorpos monoclonais, como por exemplo a glicosilação do receptor viral. Pelo facto dos hidratos de carbono serem pouco imunogénicos, a resposta por parte de linfócitos do tipo B é evitada (Flego et al., 2013)

Conclusão

Este trabalho teve como objectivo perceber de que forma a célula hospedeira responde à infecção por HIV-1.

Concluiu-se que, de entre os factores de restrição abordados neste trabalho, a proteína APOBEC3G é a que parece ser mais eficaz contra a infecção pelo HIV-1. Esta desaminase de citidina também inibe SIV, hepadnavírus, vírus da leucemia murina, vírus do tumor mamário de ratinho, vírus da anemia infecciosa equina e, também, em retrotransposões.

A APOBEC3G tem como antagonista uma proteína viral acessória Vif. Na infecção pelo HIV-1, e na ausência de Vif, o factor de restrição APOBEC3G é incorporado nos viriões formados catalisando a desaminação de citidina de DNA. Induz assim uma hipermutação no sentido 5' para 3' que restringe a replicação viral do HIV-1 Vif-deficiente em linhagens de células T permissivas. Em contra-partida, Vif pode inibir a APOBEC3G por mecanismos distintos como: a inibição da sua tradução, indução da sua degradação proteolítica ou por competição pela ligação a componentes virais.

A interacção APOBEC3G-Vif é alvo de investigação terapêutica anti-retroviral, no entanto é necessária prudência neste campo, visto que a interacção APOBEC3G-Vif ao contrário do que seria desejado pode favorecer a evolução viral, uma vez que a inibição incompleta de Vif pode resultar numa incapacidade da defesa imunológica derivada da rápida evolução de mutações, assim como na resistência a fármacos por parte de outros membros de regime anti-retroviral.

Bibliografía

- Arroyave, J. C., & Pujol, F. H. (n.d.). Interacción entre el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus GB tipo-C durante el estado de co-infección, 31–41.
- Barre-Sinoussi, F., Ross, A. L., & Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Micro*, *11*(12), 877–883. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3132>
- Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X.-N., Cordeil, S., Bouaziz, S., ... Cimarelli, A. (2011). APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathogens*, *7*(9), 1–15. doi:10.1371/journal.ppat.1002221
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank, *28*(1), 235–242.
- Blanco-Melo, D., Venkatesh, S., & Bieniasz, P. D. (2012). Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity*, *37*(3), 399–411. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.013
- Borrow, P., Shattock, R. J., & Vyakarnam, A. (2010). Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology*, *7*(1), 84. doi:10.1186/1742-4690-7-84
- Chan, E., Towers, G. J., & Qasim, W. (2014). Gene therapy strategies to exploit TRIM derived restriction factors against HIV-1. *Viruses*, *6*(1), 243–63. doi:10.3390/v6010243
- Cimarelli, A., & Darlix, J. (2002). Cellular and Molecular Life Sciences Biomedicine and Diseases : Review Assembling the human immunodeficiency virus type 1, *59*, 1166–1184.
- Costin, J. M. (2007). Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*, *4*, 100. doi:10.1186/1743-422X-4-100
- Da Costa, K. S., Leal, E., dos Santos, A. M., Lima e Lima, A. H., Alves, C. N., & Lameira, J. (2014). Structural analysis of viral infectivity factor of HIV type 1 and its interaction with A3G, EloC and EloB. *PloS One*, *9*(2), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0089116
- Flego, M., Ascione, A., Cianfriglia, M., & Vella, S. (2013). Clinical development of monoclonal antibody-based drugs in HIV and HCV diseases. *BMC Medicine*, *11*(1), 1–17. doi:10.1186/1741-7015-11-4
- Goila-Gaur, R., & Strebel, K. (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*, *5*, 51. doi:10.1186/1742-4690-5-51

- Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *European Journal of Immunology*, 37 Suppl 1, S94–102. doi:10.1002/eji.200737441
- Guenzel, C. a, Hérate, C., & Benichou, S. (2014). HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker”. *Frontiers in Microbiology*, 5(March), 127. doi:10.3389/fmicb.2014.00127
- Guha, D., & Ayyavoo, V. (2013). Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1. *Isrn Aids*, 2013, 954806. doi:10.1155/2013/954806
- Harris, R. S., Hultquist, J. F., & Evans, D. T. (2012). The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 40875–40883. doi:10.1074/jbc.R112.416925
- Hatzioannou, T., & Evans, D. T. (2012). Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Micro*, 10(12), 852–867. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2911>
- Helen M Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, TN Bhat, Helge Weissig, Ilya N Shindyalov, P. E. B. (2002, April). *Nucleic Acids Research*.
- Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J.-C., & Marquet, R. (2009). Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 73(2), 211–32. doi:10.1128/MMBR.00040-08
- Hosseini, I., & Mac Gabhann, F. (2013). APOBEC3G-Augmented Stem Cell Therapy to Modulate HIV Replication: A Computational Study. *PloS One*, 8(5), e63984. doi:10.1371/journal.pone.0063984
- Kim, E.-Y., Lorenzo-Redondo, R., Little, S. J., Chung, Y.-S., Phalora, P. K., Maljkovic Berry, I., ... Wolinsky, S. M. (2014). Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004281. doi:10.1371/journal.ppat.1004281
- Lopez, L. a, Yang, S. J., Hauser, H., Exline, C. M., Haworth, K. G., Oldenburg, J., & Cannon, P. M. (2010). Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal. *Journal of Virology*, 84(14), 7243–7255. doi:10.1128/JVI.02636-09
- Lu, L., & Fei, Y. (2013). Tactics used by HIV-1 to evade host innate, adaptive, and intrinsic immunities, 126(12), 2374–2379. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20122551
- Malim, M. H., & Bieniasz, P. D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), a006940. doi:10.1101/cshperspect.a006940

- Miyagi, E., Opi, S., Takeuchi, H., Khan, M., Goila-Gaur, R., Kao, S., & Strebel, K. (2007). Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, *81*(24), 13346–53. doi:10.1128/JVI.01361-07
- Moris, A., Murray, S., & Cardinaud, S. (2014). AID and APOBECs span the gap between innate and adaptive immunity. *Frontiers in Microbiology*, *5*(October), 1–13. doi:10.3389/fmicb.2014.00534
- Murga, J. D., Franti, M., Pevear, D. C., Maddon, P. J., & Olson, W. C. (2006). Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(10), 3289–3296. doi:10.1128/AAC.00699-06
- Pillai, S. K., Wong, J. K., & Barbour, J. D. (2008). Turning up the volume on mutational pressure: is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3). *Retrovirology*, *5*, 26. doi:10.1186/1742-4690-5-26
- Refsland, E. W., Hultquist, J. F., & Harris, R. S. (2012). Endogenous origins of HIV-1 G-to-A hypermutation and restriction in the nonpermissive T cell line CEM2n. *PLoS Pathogens*, *8*(7), e1002800. doi:10.1371/journal.ppat.1002800
- Roy, N., Pacini, G., Berlioz-Torrent, C., & Janvier, K. (2014). Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. *Frontiers in Microbiology*, *5*(May), 177. doi:10.3389/fmicb.2014.00177
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *365*(1552), 2487–94. doi:10.1098/rstb.2010.0031
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Song, R., Franco, D., Kao, C.-Y., Yu, F., Huang, Y., & Ho, D. D. (2010). Epitope mapping of ibalizumab, a humanized anti-CD4 monoclonal antibody with anti-HIV-1 activity in infected patients. *Journal of Virology*, *84*(14), 6935–6942. doi:10.1128/JVI.00453-10
- Stanley, B. J., Ehrlich, E. S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.-F., & Xiong, Y. (2008). Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *Journal of Virology*, *82*(17), 8656–8663. doi:10.1128/JVI.00767-08
- Strebel, K. (2005). APOBEC3G & HTLV-1: inhibition without deamination. *Retrovirology*, *2*, 1–3. doi:10.1186/1742-4690-2-37
- Venkatesh, S., & Bieniasz, P. D. (2013). Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS Pathogens*, *9*(7), e1003483. doi:10.1371/journal.ppat.1003483

Wu, L. (2013). SAMHD1 knockout mice: modeling retrovirus restriction in vivo. *Retrovirology*, *10*, 1–5. doi:10.1186/1742-4690-10-142