



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo *in vitro* dos mecanismos da neuroinvasão e
neurodisseminação do HIV

Rita Margarida Gonçalves Ferreira

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS COM
ESPECIALIZAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL

Julho 2021



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudo *in vitro* dos mecanismos da neuroinvasão e
neurodisseminação do HIV

Autor: Rita Margarida Gonçalves Ferreira

Orientador: Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Coorientador: Mestre Ana Marta Carvalho Calado

Coorientador interno: Professor Doutor Celso Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, com especialização em Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Apoio financeiro de Programa Gilead Genese, Edição 2016

Agradecimentos

Dedico este espaço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha aprendizagem, enriquecimento e trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação. A todos o meu mais sincero e profundo agradecimento.

Primeiramente, agradeço ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, pela orientação, disponibilidade, partilha de conhecimento científico correto e rigoroso. Agradeço ainda ter-me permitido a participação nas 12^{as} Jornadas de Atualização em Doenças Infeciosas e no II Curso Pós-Graduado de Atualização em Virologia: Coinfeções e Comorbilidades Associadas à Infecção por HIV.

Em segundo lugar, à Mestre Marta Calado, pela paciência, por toda a ajuda e por todos ensinamentos que sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Foram muitas horas juntas na bancada e ao telemóvel, foram muitos os desafios e problemas que enfrentámos juntas! Uma aventura sem fim que nem um livro chegava para contar toda a história. Assim, levo mais uma Marta para as Martas especiais que tenho na minha vida.

Agradeço também a todas as pessoas com que me cruzei tanto no IHMT como na FFUL, colegas, amigos, docentes e não docentes, que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho e conhecimento, mas também para aquilo que sou. De entre os demais, um agradecimento especial a todos aqueles com quem partilhei o gabinete e/ou laboratório na FFUL. Houve muitos contornos e alterações no decorrer do trabalho, tendo sido muito importante o contributo de David Pires, Nuno Carmo, Rui Castro e Rute Marcelino, a quem agradeço a disponibilidade, preocupação e ajuda que me deram.

Aos meus amigos que tantas vezes me deram a energia certa e, do Alentejo, de Lisboa, do Porto e até de Inglaterra estiveram sempre por perto! A todos eles, aos meus lobitos e crianças que me cruzei nestes últimos tempos, eu devo o meu sorriso e gratidão.

À Minha Família, em especial aos Meus Pais e à minha Irmã, um enorme obrigada por acreditarem que seria capaz e por todos os ensinamentos de vida. Às minhas pequenas de quatro patas, que me alegram e fazem companhia. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação. A eles, dedico todo este trabalho.

Resumo

Atualmente, observa-se que indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), mesmo sob terapêutica antirretroviral, apresentam comorbidades como é o exemplo da demência. Através da compreensão dos mecanismos de infecção e disseminação do HIV no Sistema Nervoso Central (SNC) poder-se-á esclarecer o aparecimento destas comorbidades em que ocorre degeneração neuronal, designados no seu conjunto por distúrbios neurocognitivos associados ao HIV (HAND).

Atualmente ainda não estão claramente definidos os mecanismos de neuroinvasão, mas o mais consensualmente aceite é a Hipótese do Cavalo de Tróia. Este mecanismo defende que o HIV infeta monócitos e linfócitos T CD4⁺ ao nível do sangue periférico e atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), uma membrana permeável imprescindível na manutenção da homeostase do SNC, sem ser detetado, sob a forma de provirus integrado no genoma destas células. Uma vez no SNC, o HIV é capaz de infectar várias células, nomeadamente macrófagos perivascularres, micróglia e astrócitos. Alguns estudos indicam que estas células podem ser consideradas reservatórios virais por permitirem a integração do genoma viral no genoma celular e, em fases mais avançadas da infecção, permitirem a propagação da mesma no SNC. A disseminação do HIV no SNC ocorrerá através de proteínas virais e mediadores inflamatórios do hospedeiro (citocinas e quimiocinas), associados à toxicidade neuronal e consequente declínio cognitivo, libertados pelas células infectadas.

Com a finalidade de contribuir para o esclarecimento desta questão é fundamental compreender como influencia e decorre a comunicação e interação entre monócitos, linfócitos T CD4⁺, macrófagos perivascularres, micróglia, astrócitos e células neuronais. Pelo que, no presente trabalho, realizaram-se ensaios de infecciosidade usando células do SNC, mantendo-se as células dadoras e células alvo em cultura em contacto ou separadas por uma membrana (sistema *transwell*). Foram também realizados ensaios de infecciosidade por exposição de micróglia e astrócitos a secretomas produzidos por linfócitos T CD4⁺, macrófagos, micróglia e astrócitos infectados com diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2. De forma geral, os resultados demonstraram que as células infectadas não se comportam da mesma forma para todas as estipes primárias, independentemente do tipo de HIV. Além disso, demonstraram também que o HIV é capaz de infectar micróglia e astrócitos independentemente da ausência ou da baixa expressão do receptor CD4. No que diz respeito aos astrócitos, sugere-se o seu papel como reservatórios da infecção. Os ensaios de infecciosidade entre micróglia e astrócitos demonstram que a neurodisseminação é favorecida pelo contacto entre células, independentemente das estirpes. Contudo, observa-se que a separação de células por membrana não é impeditiva da infecção, havendo situações em que a infecção é favorecida. Os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos expostos aos diferentes secretomas, na presença e ausência de inibidores de entrada, sugerem que a infecção poderá estar a ser mediada não só por partículas virais mas também por componentes presentes nos secretomas produzidos pelas diferentes populações celulares. Considerando os resultados obtidos, o próximo passo passará então por analisar os componentes dos secretomas que evidenciaram atividade de RT na presença de inibidores de entrada.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência humana (HIV); Sistema nervoso central (SNC); distúrbios neurocognitivos associados ao HIV (HAND); micróglia; astrócitos.

Abstract

Currently it is observed that individuals infected by the human immunodeficiency virus (HIV), even under antiretroviral therapy, present comorbidities such as dementia. The understanding of the mechanisms of HIV infection and dissemination in the Central Nervous System (CNS), could clarify the development of these comorbidities in which neuronal degeneration occurs, designated as a HIV-associated neurocognitive disorders (HAND).

The neuroinvasion mechanism is not yet clearly defined, but among the proposed mechanisms the most accepted is the Trojan Horse Hypothesis. This mechanism propose that HIV infects monocytes and CD4⁺ T lymphocytes present in peripheral blood and crosses the blood brain barrier (BBB), a permeable membrane essential in maintaining CNS homeostasis, without being detected, in the form of provirus integrated into the genome of these cells. Once in the CNS, HIV can infect several cells, including perivascular macrophages, microglia and astrocytes. Some studies describe that these cells can be considered viral reservoirs because they allow the integration of the viral genome into the cell genome and, in more advanced stages of the infection, allow the spread of the virus in the CNS. The spread of HIV in the CNS will occur through viral proteins and host inflammatory mediators (cytokines and chemokines), associated with neuronal toxicity and consequent cognitive decline, released by infected cells.

To contribute to the clarification of this issue, it is essential to understand how to influence the communication and interaction between monocytes, CD4⁺ T lymphocytes, perivascular macrophages, microglia, astrocytes and neuronal cells. Therefore, in the present work, infectiousness tests were performed between CNS cells, keeping the culture of donor cells and target cells in contact, or separated by a membrane (*transwell* system). Infectiousness assays were also performed by exposure of microglia and astrocytes to secretomes produced by CD4⁺ T lymphocytes, macrophages, microglia and astrocytes infected with different primary isolates of HIV-1 and HIV-2. In general, the results showed that infected cells do not behave in the same way for all primary strains, regardless of the type of HIV. In addition, they also demonstrated that HIV could infect microglia and astrocytes regardless of the absence or low expression of the CD4 receptor. Regarding astrocytes, their role as reservoirs of infection is suggested. The infectiousness assays between microglia and astrocytes show that neurodissemination is favored by cell contact, regardless of the strain used. However it was observed that separation of cells by membrane is not preventing infection, and there are situations in which the infection is favored. The infectiousness assays of microglia and astrocytes exposed to different secretomes, in the presence and absence of entry inhibitors, suggest that the infection may be mediated by viral particles and/or by components present in the secretomes produced by the different cell populations. Considering the results obtained, the next step will be to analyze the components of the secretomes that showed RT activity in the presence of entry inhibitors.

Keywords: Human immunodeficiency virus (HIV); Central nervous system (CNS); HIV-associated Neurocognitive Disorder (HAND); microglia; astrocytes.

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
<i>Abstract</i>	iii
Índice geral.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	x
Lista de acrónimos e abreviaturas.....	xi
1. Introdução	1
1.1 Vírus da imunodeficiência Humana - Contextualização	1
1.2 HIV em Portugal	1
1.3 Taxonomia e características gerais do HIV	2
1.4 Epidemiologia	3
1.5 Estrutura do genoma e partícula viral do HIV	4
1.6 Ciclo replicativo	8
1.6.1 Fase precoce	8
1.6.1.1 Adsorção e entrada na célula hospedeira	9
1.6.1.2 Síntese do DNA viral, transporte e integração	9
1.6.2 Fase tardia	11
1.6.2.1 Expressão genética (Transcrição e tradução)	11
1.6.2.2 Montagem, saída e maturação da partícula viral	12
1.7 Tropismo	12
1.8 Patogénese da infeção, transmissão e sintomas	14
1.9 Resposta imunitária para o HIV	16
1.9.1 Respostas imune inata e humoral	17
1.9.2 Respostas de imunidade celular	18
1.10 Diagnóstico e terapêutica antiretroviral	19
1.10.1 Resistência associada à terapêutica anti-retroviral	20
1.11 Latência viral, reservatórios e santuários	21
1.12 Células envolvidas na patogénese do HIV	23
1.13 Células da corrente sanguínea	24
1.13.1 Linfócitos T CD4+	24

1.13.2	Monócitos/Macrófagos	25
1.13.3	Células dendríticas	26
1.14	Infeção Sistema nervoso central	27
1.14.1	Neuroinvasão	27
1.14.2	Sistema nervoso central - Contextualização	29
1.14.3	Complicações neurológicas associadas à SIDA	30
1.15	Células do Sistema nervoso central envolvidas na infeção por HIV	31
1.15.1	Células da glia	31
i.	Microglia	32
ii.	Astrócitos	33
iii.	Oligodendrócitos	34
1.15.2	Neurónios	34
1.16	Vesículas extracelulares: uma via alternativa da neurodegeneração	35
1.16.1	Papel das vesículas extracelulares no Sistema Nervoso Central	38
1.16.2	O papel das vesículas extracelulares na disseminação do HIV	39
1.17	Objetivos	40
2.	Materiais e métodos	41
2.1	Amostras	41
2.2	Populações celulares	41
2.2.1	Separação de células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)	41
2.2.2	Isolamento de células T CD4+	43
2.2.3	Isolamento de monócitos e diferenciação em macrófagos	44
2.2.4	Cultura das linhas celulares de micróglia e astrócitos	45
2.3	Ensaio de infecciosidade	47
2.3.1	Infeção de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetados com HIV	47
2.3.2	Ensaio de infecciosidade com secretomas produzidos em T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos	49
2.4	Quantificação da atividade da RT	52
3.	Resultados e discussão	53
3.1	Ensaio de infecciosidade	53
3.1.1	Infeção de micróglia e astrócitos por micróglia infetada com HIV	53

3.1.2 Infecção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados com HIV	58
3.1.3 Ensaios de infecciosidade com secretomas produzidos em T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos	64
4. Considerações finais	76
5. Referências Bibliográficas	82

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura de uma partícula viral madura de HIV	5
Figura 2: Representação esquemática do genoma viral de HIV-1 e HIV-2	6
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do HIV	8
Figura 4: Esquema representativo do processo de fusão com a célula-alvo	9
Figura 5: Modelo proposto para importação nuclear e descapsidação de HIV-1	10
Figura 6: Representação esquemática do percurso do HIV e resposta imunitária no hospedeiro humano	15
Figura 7: Ativação imunológica nas diferentes fases da história natural da infecção pelo HIV	17
Figura 8: Células infetadas pelo HIV	23
Figura 9: Mecanismos de entrada direta do HIV no SNC	30
Figura 10: Entrada de exossomas nas células	36
Figura 11: A inflamação causada pela infecção leva à neurodegeneração	38
Figura 12: Representação esquemática da separação do sangue periférico humano pelo método do gradiente de Ficoll	42
Figura 13: Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade das células do SNC por células idênticas infetadas com diferentes isolados primários de HIV	48
Figura 14: Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade com os secretomas	50
Figura 15: Representação esquemática do princípio do teste para quantificação da atividade da enzima transcriptase reversa (RT).	52
Figura 16: Representação das diferentes condições de cultura, quando as células dadoras são células da micróglia infetada por diferentes isolados primários de HIV e as células alvo são: a) micróglia e b) astrócitos.	53
Figura 17: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infetada por HIV-1 _{UCFL1032} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias.	54

Figura 18: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infectada por HIV-1 _{UCFL1034} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias.	55
Figura 19: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infectada por HIV-2 _{UCFL2074} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias.	57
Figura 20: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infectada por HIV-2 _{UCFL2072} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias.	58
Figura 21: Representação das diferentes condições de cultura, quando as células dadoras são células da micróglia infectada por diferentes isolados primários de HIV e as células alvo são: a) astrócitos e b) micróglia	59
Figura 22: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-1 _{UCFL1032} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias	60
Figura 23: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-1 _{UCFL1034} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias	61
Figura 24: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-2 _{UCFL2074} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias	62
Figura 25: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-2 _{UCFL2072} , nas condições de <i>mixed culture</i> e <i>transwell co-culture</i> , ao longo de sete dias	63
Figura 26: Representação esquemática do princípio do ensaio de infecciosidade de células neurogliais com diferentes secretomas, na presença ou ausência de inibidores de entrada (Maraviroc e AMD3100)	64
Figura 27: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infecção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-1 _{UCFL1032} , em células da micróglia (a) e astrócitos (b)	66
Figura 28: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-1 _{UCFL1032}	67
Figura 29: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infecção de células T CD4, MØ,	

micróglia e astrócitos com HIV-1_{UCFL1034}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b).
..... 68

Figura 30: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-1_{UCFL1034} ...
..... 69

Figura 31: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infecção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-2_{UCFL2074}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b)
..... 70

Figura 32: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infecção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-2_{UCFL2072}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b). A linha preta horizontal delimita o valor associado ao controlo negativo, permitindo eliminar o ruído de fundo 71

Figura 33: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-2_{UCFL2074}
..... 72

Figura 34: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-2_{UCFL2072}
..... 73

Índice de tabelas

Tabela 1: Comparação dos diferentes tipos de HIV	4
Tabela 2: Visão geral das proteínas de HIV e a sua função	7
Tabela 3: Tipos de infeção e efeitos no cérebro de células gliais humanas infetadas por HIV, associadas a distúrbios neurocognitivos	32
Tabela 4: Tipos de infeção e efeitos no cérebro de neurónios infetados por HIV, associadas a distúrbios neurocognitivos	34
Tabela 5: Identificação do estadio clínico e biótipo dos diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2	41
Tabela 6: Resultados da infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por micróglia infetada com diferentes estirpes de HIV.	54
Tabela 7: Resultados da infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por astrócitos infetados com diferentes estirpes de HIV.....	59
Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetados com diferentes estirpes de HIV, assinalando-se a condição da cultura que apresentou valores de RT (ng/mL) superiores	63
Tabela 5: Resultados do ensaio de infecciosidade de células neurogliais (micróglia e astrócitos) com diferentes secretomas produzidos em T CD4+, MO, Micróglia e astrócitos, infetados por diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2	65
Tabela 6: Resultados da infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por micróglia infetada com diferentes estirpes de HIV.....	54
Tabela 7: Resultados da infeção <i>trans</i> de micróglia e astrócitos por astrócitos infetados com diferentes estirpes de HIV	59
Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetados com diferentes estirpes de HIV, assinalando-se a cinzento a condição da cultura que apresentou valores de RT (ng/mL) superiores.	63
Tabela 9: Resultados do ensaio de infecciosidade de células neurogliais (micróglia e astrócitos) com diferentes secretomas produzidos em T CD4+, MO, Micróglia e astrócitos, infetados por diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2	65

Lista de acrónimos e abreviaturas

°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanómetro
ABTS	substrato de peroxidase
AcNT	anticorpos neutralizantes
ADCC	citotoxicidade celular dependente do anticorpo
ADCVI	inibição viral mediada por células e dependente dos anticorpos
ANI	deficiências neurocognitivas assintomáticas, do inglês <i>asymptomatic neurocognitive impairment</i>
anti-DIG-POD	anticorpo conjugado com peroxidase que reconhece digoxigenina
APC	célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cell</i>
APOBEC3	do inglês, <i>apolipoprotein B editing catalytic polypeptide</i>
BHE	barreira hematoencefálica, do inglês <i>blood–brain barrier</i>
BMVECs	células endoteliais microvasculares cerebrais, do inglês <i>brain-microvascular endothelial cells</i>
CA	proteína da cápside, do inglês <i>capsid protein</i>
cART	terapêutica antirretroviral combinada, do inglês <i>Combination Antiretroviral Therapy</i>
CCR5	recetor de β-quimiocinas da classe CC, do inglês <i>CC chemokine receptor 5</i>
CD4	do inglês, <i>cluster differentiation 4</i>
CDC	citotoxicidade dependente do complemento
cDNA	DNA complementar, do inglês <i>complementary DNA</i>
CDs	células dendríticas, do inglês <i>dendritic cells</i>

CHME-3	linha celular de micróglia
CMSP	células mononucleadas do sangue periférico
CO₂	dióxido de carbono
CPI	complexo de pré-integração
CRFs	formas recombinantes circulantes, do inglês <i>circulating recombinant forms</i>
CTL	linfócitos T citotóxicos
CXCR4	recetor de β -quimiocinas da classe CXC, do inglês <i>CXC chemokine receptor 4</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
env	gene codificante das glicoproteínas do invólucro do HIV, do inglês <i>envelope</i>
EUA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America</i>
Fc	região constante do anticorpo
FDA	do inglês Food and Drugs Administration
gag	gene codificante das proteínas da estrutura interna do HIV, do inglês <i>group specific antigen</i>
gp	glicoproteína
HAART	terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>
HAD	demência associada ao HIV, do inglês <i>HIV-associated dementia</i>
HAND	distúrbios neurocognitivos associados ao HIV, do inglês <i>HIV-associated neurocognitive disorders</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência humana do tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2

HIVDR	desenvolvimento de resistência aos antirretrovirais para HIV, do inglês <i>HIV drug resistance</i>
HLA	complexo major de histocompatibilidade
HTLV	Vírus humano da leucemia de células T
IL-2	interleucina 2, do inglês <i>interleukin 2</i>
IN	Integrase
InSTIs	inibidor da integrase, do inglês <i>integrase inhibitor</i>
IP	Inibidores da protease
IRES	<i>internal ribosome entry segment</i>
LAV	Vírus Associado a Linfadenopatias, do inglês <i>Lymphadenopathy-Associated Vírus</i>
LTR	repetições terminais longas, do inglês <i>Long Terminal Repeat</i>
MA	proteína da matriz, do inglês <i>matrix protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MDM	macrófagos derivados de monócitos
MHC	complexo major de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
[MIP1]-α	<i>Macrophage inflammatory protein type 1 alpha</i>
[MIP1]-β	<i>Macrophage inflammatory protein type 1 beta</i>
MND	distúrbios neurocognitivos leves, do inglês <i>mild neurocognitive disorder</i>
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NC	proteína da nucleocápside, do inglês <i>nucleocapsid protein</i>
nef	gene acessório do HIV, do inglês <i>negative factor</i>
NK	<i>natural killer</i>
NNRTI	inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa, do inglês <i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NRTI	inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeos, do inglês <i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>

PHA	fitohemaglutinina, do inglês <i>phytohaemagglutinin</i>
PI	inibidor da protease, do inglês <i>protease inhibitor</i>
pol	gene codificante das proteínas de natureza enzimática do HIV, do inglês <i>polymerase</i>
PR	protease viral
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
rev	gene regulador do HIV, do inglês <i>regulator of expression of viral proteins</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNaseH	ribonuclease H
rpm	rotações por minuto
RRE	elemento de resposta Rev, do inglês <i>rev-responsive elemento</i>
RT	transcriptase reversa, do inglês <i>reverse transcriptase</i>
SBF	soro bovino fetal
SGV-mm	linha celular de astrócitos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ou AIDS, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
SIV	vírus da imunodeficiência símia, do inglês <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIVcpz	Vírus da Imunodeficiência de Símios que infecta chimpanzés
SIVsmm	Vírus da Imunodeficiência de Símios que infecta o <i>sooty mangabey monkey</i>
SNC	sistema nervoso central
SU	glicoproteína de superfície, do inglês <i>surface protein</i>
SV40	mutante do vírus símio 40
TAN	teste de ácido nucleico HIV-1
TAR	do inglês, <i>transactivation response region</i>
TARV	terapia antirretroviral
tat	gene regulador do HIV, do inglês <i>transactivator of gene expression</i>
TCR	complexo recetor das células T, do inglês <i>T complex receptor</i>
TM	proteína transmembranar, do inglês <i>transmembrane protein</i>

TRIM5α	<i>Tripartite motif protein isoform 5 alpha</i>
UE	União Europeia
UK	Reino Unido, do inglês <i>United Kingdom</i>
UNAIDS	Programa das Nações Unidas em HIV/SIDA, do inglês <i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
URF	formas recombinantes únicas, do inglês <i>unique recombinant forms</i>
VEs	vesículas extracelulares
vif	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral infectivity factor</i>
VIS	Vírus de Imunodeficiência Símia
vpr	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral protein R</i>
vpu	gene acessório do HIV-1, do inglês <i>viral protein U</i>
vpX	gene acessório do HIV-2, do inglês <i>viral protein X</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

1. Introdução

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana - Contextualização

O Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus* - HIV), agente responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), é uma das maiores ameaças de saúde pública, sendo atualmente considerado uma pandemia que afeta 0,8% da população mundial (1,2).

Segundo a UNAIDS (Programa das Nações Unidas em HIV/SIDA, do inglês *United Nations Programme on HIV/AIDS*), no final de 2018, cerca de 37,9 milhões de pessoas no mundo estavam infetadas por HIV. A população mais afetada inclui os países de baixo rendimento, sendo que cerca de 70% dos indivíduos infetados vivem em África (2).

Apesar da redução do número de mortes causadas por HIV ao longo dos anos, resultante de uma maior vigilância e da eficácia da terapia antirretroviral (TARV), o HIV continua a ser uma das principais causas de morte no mundo (3).

1.2 HIV em Portugal

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), embora Portugal continue a apresentar das mais elevadas taxas de prevalência da infeção por HIV e de incidência de SIDA registadas na União Europeia (UE), verifica-se uma tendência decrescente destas taxas nos últimos anos. Os resultados notórios dever-se-ão ao incremento significativo do acesso a TARV, com capacidade de transformar a infeção por HIV numa doença crónica (4,5).

Os estudos epidemiológicos realizados em Portugal em 2019, relatam 778 novos casos de infeção por VIH (o que corresponde a uma taxa de 7,6 casos por 10^5 habitantes), de acordo com as notificações efetuadas até 30 de junho de 2020. O grupo etário compreendido entre os 25 e os 29 anos apresentou a taxa de diagnóstico mais elevada (22,1 casos/ 10^5 habitantes), sendo que a maioria dos indivíduos diagnosticados tinham residência na Área Metropolitana de Lisboa (13,7 casos/ 10^5 habitantes) e na região do Algarve (13,5 casos/ 10^5 habitantes). Portugal continua a apresentar elevadas proporções

de diagnósticos tardios (55,8%), superiores às da UE (48,6%), principalmente ao nível da população heterossexual do sexo masculino (70,2%) e com idades superiores a 50 anos (70,7%), segundo os dados fornecidos pelo Relatório Infecção HIV e SIDA em Portugal – 2019 (4).

Com o desenvolvimento de medidas e programas através da disponibilização de diversas ferramentas de prevenção, seria expectável a redução do número de novos casos de infeção em Portugal. Ainda que o caminho seja longo é muito positivo o facto de Portugal ter atingido, com dados referentes ao ano de 2017, os objetivos 90-90-90 (90% dos infetados diagnosticados, 90% em tratamento e 90% com carga viral não detetável), traçados pela Organização das Nações Unidas (ONU) para se atingirem até 2020 (2,4,5).

1.3 Taxonomia e características gerais do HIV

Segundo a nomenclatura taxonómica, o HIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e, consecutivamente ao género *Lentivírus* e grupo dos Lentivírus dos primatas (6). É um retrovírus com genoma viral de RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) composto por nove genes e pertence ao grupo de retrovírus citopáticos e não-oncogénicos. Necessitam de uma enzima denominada transcriptase reversa para transcrever o genoma e, por consequência, permitir a sua integração no genoma da célula hospedeira. Todos os membros deste género de retrovírus possuem estrutura genómica semelhante, apresentando identidade próxima de 50% e todos têm a capacidade de infetar linfócitos através do receptor CD4 (do inglês, *cluster differentiation 4*) (1,7).

Os lentivírus possuem diversas propriedades morfológicas e biológicas comuns, sendo diferentes de outros retrovírus por causarem doenças de longa duração. Durante a infeção de um novo hospedeiro, o HIV dissemina-se quer por infeção *de novo* quer aquando da divisão celular sob a forma de provírus. Além disso, possuem tropismo para monócitos/macrófagos e linfócitos T, extensa variabilidade genética e, adicionalmente possuem genes regulatórios que não se encontram noutros grupos de retrovírus (7,8). No caso concreto do HIV, a variabilidade genética resulta da progressiva acumulação de mutações durante o processo de retrotranscrição, da elevada taxa de replicação, da recombinação entre estirpes virais e das pressões seletivas a que está sujeito no hospedeiro (7).

Quando o HIV foi descoberto foi inicialmente denominado de Vírus Associado às Linfadenopatias (LAV) e Vírus Humano da Leucemia de células T (HTLV) por dois grupos laboratoriais distintos. Porém, anos mais tarde, a nomenclatura única passou a ser HIV diferenciando-se em dois tipos, 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2). Embora os dois tipos sejam semelhantes na sua organização estrutural e genómica, apresentam características antigénicas distintas e diferenças nos antígenos virais (6,9).

1.4 Epidemiologia

A análise filogenética de sequências genómicas demonstrou que o HIV-1 e o HIV-2 partilham apenas 40-50% de homologia genética visto que resultaram de eventos de transmissão zoonótica distintos a partir de primatas não humanos infetados com o Vírus de Imunodeficiência Símia (SIV). HIV-1 é semelhante a SIV isolados de chimpanzés (SIV_{cpz}) e gorila (SIV_{gor}), enquanto HIV-2 pertence à linhagem de SIV_{mac/sm}, que infetam os macacos do género *Macaca spp* e da espécie *Cercocebus atys* (10,11).

As análises filogenéticas de sequências de HIV-1 isolados em todo o mundo, permitem a divisão em cinco grupos referentes a linhagens bastante distintas do vírus: M (*major*), O (*outlier*), N (*new ou non-M/non-O*) e o Grupo P. O grupo M é o mais prevalente e subdivide-se em nove subtipos designados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F são ainda segregados como subsubtipos A1 ou A2 e F1 ou F2, respetivamente. O grupo O consiste numa *pool* altamente divergente, com estirpes geneticamente relacionadas sem uma *clade* definida e restritas à África central e ocidental (principalmente Camarões e países vizinhos). Os grupos N e P só existem nos Camarões (11). Em relação a HIV-2, existem oito grupos designados pelas letras A a H, mas apenas as estirpes incluídas nos grupos A e B geram epidemias (10). A infeção da mesma célula por dois ou mais vírus diferentes leva à produção de vírus recombinantes, durante o processo de transcrição reversa. Recombinantes que gerem novos focos epidémicos designam-se de formas recombinantes circulantes (CRFs, do inglês *circulating recombinant forms*). Recombinantes que sejam únicos designam-se por formas recombinantes únicas (URF, do inglês *unique recombinant forms*) (7).

No que diz respeito à patogénese da infeção, o HIV-2 caracteriza-se por uma baixa carga viral ao longo das várias fases da infeção e por um período assintomático muito mais longo do que os indivíduos infetados por HIV-1. Além disso, o HIV-2 é menos virulento, e possui menor taxa de transmissão comparativamente a HIV-1. As diferenças fenotípicas entre as estirpes de HIV refletem-se na aptidão para realizarem uma infeção produtiva numa determinada célula (tropismo), taxa de replicação e capacidade de induzir a formação de sincícios. Ao nível da pandemia mundial, o HIV-1 é o maior responsável, uma vez que, a maioria dos indivíduos infetados pelo HIV-2 reside na África Ocidental (Senegal, Costa do Marfim e Guiné-Bissau) ou em países com os quais estabeleçam relações coloniais ou socioeconómicas, principalmente França, Espanha e Portugal (1,12). De forma resumida podemos comparar os diferentes tipos de HIV a partir da tabela 1.

Tabela 1: Comparação dos diferentes tipos de HIV

Tipo	Virulência	Infecciosidade	Prevalência	Origem filogenética
HIV-1	Elevada	Elevada	Global	SIVcpz
HIV-2	Muito baixa	Baixa	África Ocidental	SIVsmm

HIV-1: Vírus da Imunodeficiência humana do tipo 1; HIV-2: Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2; SIVcpz: Vírus da Imunodeficiência de Símios que infecta chipanzés; SIVsmm: Vírus da Imunodeficiência de Símios que infecta o *sooty mangabey monkey*.

1.5 Estrutura do genoma e partícula viral do HIV

O HIV na sua forma infecciosa possui uma morfologia esférica de diâmetro variável entre 100 a 120 nm, sendo a camada mais externa constituída pelo invólucro lipídico com origem na membrana celular do hospedeiro. As glicoproteínas de superfície (SU), gp120/gp105 (HIV-1/HIV-2) estão ancoradas ao invólucro pela glicoproteína transmembranar (TM), gp41/gp36 (HIV-1/HIV-2), tendo por função o reconhecimento dos receptores celulares capazes de promover o início da infeção. Por sua vez, a glicoproteína transmembranar permite a fusão entre o vírus e a membrana da célula hospedeira (13).

A cápside viral, na forma de cone truncado, é constituída pela proteína da cápside (p24/p26/CA), envolta pela proteína da matriz viral (p17/MA), que mantém a integridade estrutural do virião. Dentro da cápside encontra-se o material genético ligado à proteína da nucleocápside (NC), p7/p6, formando um complexo ribonucleoproteico que estabiliza o RNA viral; estão ainda presentes na cápside a protease viral (PR), a transcriptase reversa (RT), a integrase (IN) e as proteínas reguladoras Vpu/Vpx (HIV-1/HIV-2), Vif, Vpr, Tat, Rev e Nef (13,14). Os diferentes componentes virais e estrutura da partícula viral madura podem ser visualizados na Figura 1.

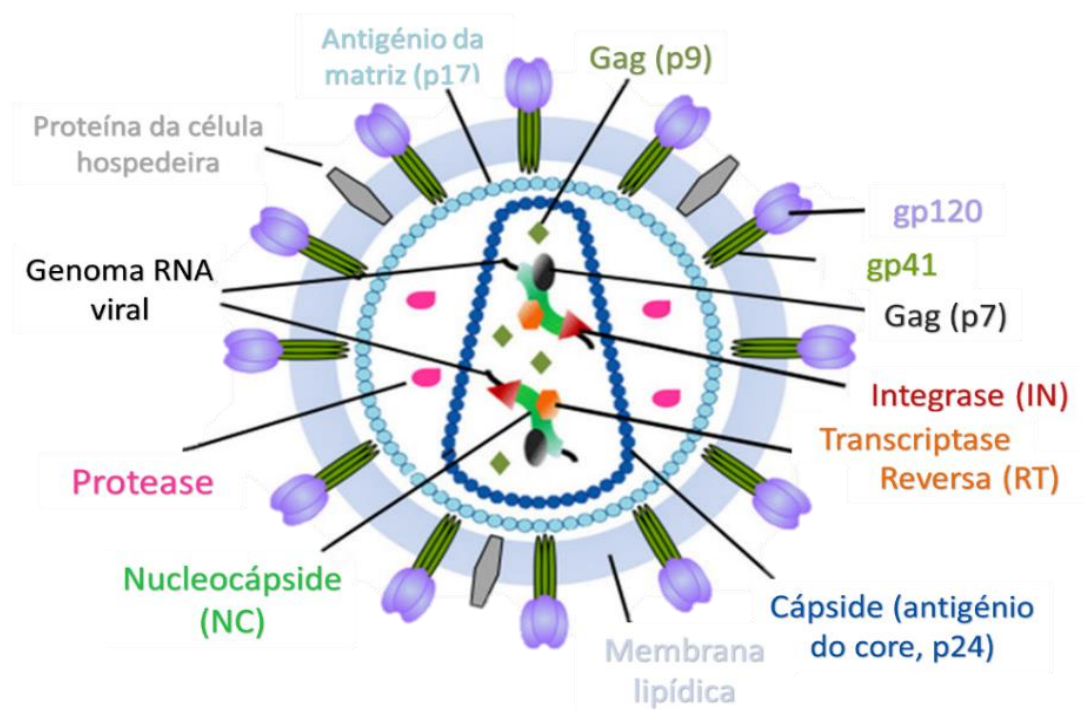


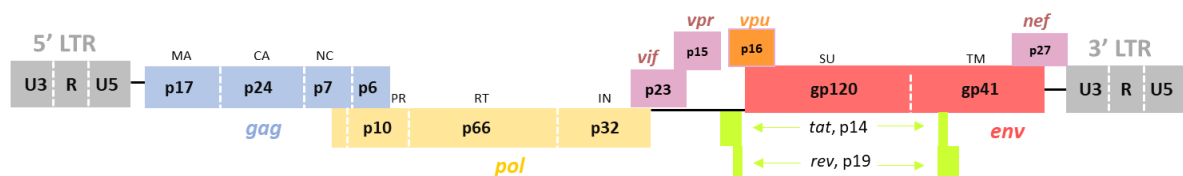
Figura 1: Estrutura de uma partícula viral madura de HIV (adaptado de Musumeci, Riccardi, Montesarchio, 2015)

O genoma do HIV é composto por duas moléculas de RNA lineares de cadeia simples idênticas, de aproximadamente 10 Kb, que codificam nove genes, dos quais três são genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e seis são genes regulatórios/acessórios (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef* e *vpu/vpx*). O genoma proviral (DNA proviral) é flanqueado por duas sequências análogas denominadas de sequências repetitivas terminais longas (LTR, do inglês *long terminal*

repeat), que controlam a transcrição do genoma viral, regulando a produção dos viriões (15,16).

Além das proteínas Gag, Pol e Env, o HIV codifica, também, duas proteínas reguladoras, a proteína Tat com atividade de transativação da transcrição, codificada pelo gene *tat*, e o regulador da transcrição do genoma viral (Rev) codificada pelo gene *rev*, ambas necessárias para o início da replicação (17). As proteínas reguladoras virais Tat, Rev e Nef resultam do *splicing* completo de um mesmo transcrito primário, promovendo o início da replicação. Os precursores das proteínas que não sofrem *splicing* total, como Gag (*group-specific antigen*), Env (*envelope*) e Pol (*polimerase*) são posteriormente processados por ação de uma protease, dando origem aos vários componentes da partícula viral. Assim, após o processamento proteolítico Gag origina as proteínas da MA, CA, NC e p6, Env gera gp120 e gp41 e Pol origina as enzimas virais PR, RT e IN (14,17). O vírus contém ainda, quatro genes que codificam as proteínas denominadas de acessórias sendo estas Nef (“*negative effector*”), Vif (“*viral infectivity factor*”) e as proteínas Vpr e Vpu/Vpx (proteínas virais r e u/x, respetivamente), que são importantes na replicação viral, saída da célula e patogénese (17). A organização do genoma viral de HIV-1 e HIV-2 encontra-se representada esquematicamente na Figura 2, enquanto na tabela 2 podemos encontrar um resumo das proteínas do HIV e sua função.

HIV-1



HIV-2

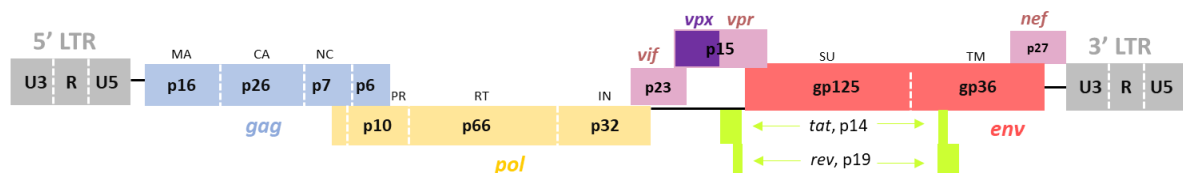


Figura 2: Representação esquemática do genoma viral de HIV-1 e HIV-2.

Tabela 2: Visão geral das proteínas de HIV e a sua função (adaptada de Advisory, G., Blood, C., Blut, A. & Assessment, S. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*, (2016))

Gene	Tamanho*	Proteína		Função
<i>Gag</i>	p17	Proteína da matriz (MA)	Estrutural	Formação da camada interna da partícula viral; Mantém a integridade do virião
	p24	Proteína da cápside (CA)		Formação da cápside viral cônica
	p7	Nucleocápside (NC)		Formação do complexo nucleoproteína/RNA
	p6			Libertação de partículas virais
<i>Pol</i>	p10	Protease (PR)		Clivagem proteolítica de Gag e do precursor proteico Gag-Pol; libertação de proteínas estruturais e enzimas virais
	p66	Transcriptase reversa (RT)		Transcrição de RNA em DNA proviral
	p32	Integrase (IN)		Integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro
<i>Env</i>	gp120	Glicoproteína de superfície (SU)		Ligação do vírus à célula hospedeira
	gp41	Proteína transmembranar (TM)		Ancoragem de gp120, fusão da membrana celular e viral
<i>Tat</i>	p14	Proteína transativador	Reguladora	Proteína precoce capaz de ativar a transcrição de genes virais
<i>Rev</i>	p19	Regulador de <i>splicing</i>		Regula a exportação de mRNA viral que não sofreu <i>splicing</i> ou apenas <i>splicing</i> parcial; delimita a passagem da fase precoce do ciclo replicativo para a fase tardia
<i>Nef</i>	p27	Fator de regulação negativa	Acessória	Influência a replicação do HIV devido à degradação de CD4 em células-alvo, apoptose e estimulação dos linfócitos T. Promove o aumento da infeciosidade das partículas virais
<i>Vif</i>	p23	Proteína de infeciosidade viral		Permite a produção de partículas virais infecciosas e inibe a proteína celular antiviral APOBEC3G
<i>Vpr</i>	p15	Proteína viral r		Importação do complexo de pré-integração (PIC) para o núcleo e bloqueio do ciclo celular na fase G2.
<i>Vpu</i>	p16	Proteína viral única (HIV-1)		Libertação de partículas virais eficientes; controla a degradação de CD4 e modula a circulação intracelular
<i>Vpx</i>	p15	Proteína viral x (HIV-2)		Interação com p6 em partículas virais, envolvida em passos precoces da replicação viral na replicação viral de HIV-2, componente de partículas virais

*números correspondentes ao tamanho das proteínas (p) ou glicoproteínas (gp) em 1,000 Da

1.6 Ciclo replicativo viral

O ciclo de replicação dos lentivírus, é semelhante ao de outros retrovírus, diferindo no que diz respeito aos receptores e coreceptores, número de proteínas reguladoras e acessórias que codificam. O ciclo replicativo pode dividir-se em duas fases: a primeira corresponde aos passos até à integração (fase precoce) e a segunda diz respeito à expressão génica e formação de novos viriões (fase tardia) (18). Na Figura 3 podemos observar uma representação esquemática do ciclo de replicação do HIV, desde o momento de ligação de uma partícula viral madura à célula hospedeira até ao momento em que se forma uma nova partícula viral infecciosa.

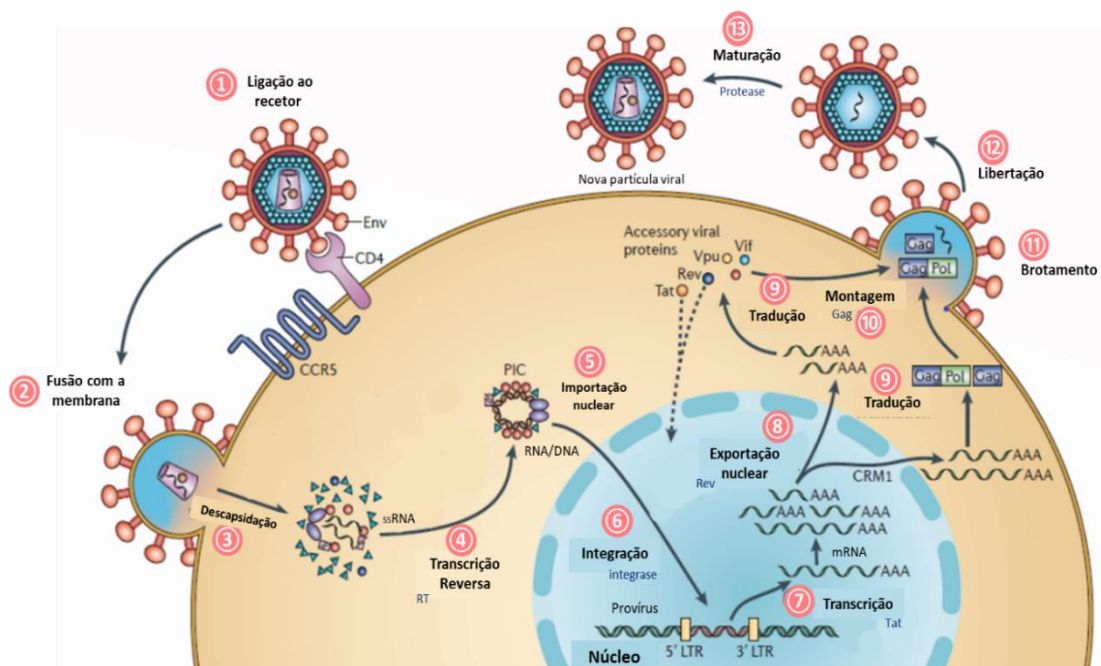


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do HIV. (Adaptado de Engelman & Cherepanov, 2012)

1.6.1 Fase precoce

De forma geral, a fase precoce inicia-se com o reconhecimento do receptor celular pelo virão maduro e envolve o processo de conduzir e integrar o DNA proviral no cromossoma da célula hospedeira (18).

1.6.1.1 Adsorção e entrada na célula hospedeira

O primeiro passo do ciclo de replicação vírica é a adsorção do invólucro viral à superfície da célula-alvo, através de uma primeira ligação da glicoproteína gp120/gp105 ao receptor de membrana CD4. A proteína CD4, glicoproteína da família das imunoglobulinas, está presente na membrana citoplasmática dos linfócitos T-auxiliadores e nos monócitos/macrófagos, contribuindo para a ativação das células T (19). As alterações conformacionais resultantes da ligação ao CD4 levam à exposição do local de ligação ao co-receptor de quimiocinas (CCR5 e/ou CXCR4, consoante o tropismo viral). O complexo formado (Figura 4) induz um rearranjo na conformação da glicoproteína transmembranar (gp41/gp36) tornando possível a fusão das duas membranas e a entrada da nucleocápside viral no citoplasma da célula (18,20).

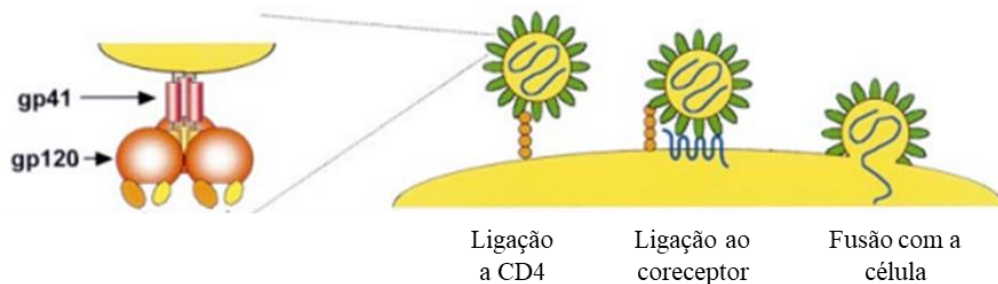


Figura 4: Esquema representativo do processo de fusão com a célula-alvo (Adaptado de Reeves and Robert, 2002).

1.6.1.2 Síntese do DNA viral, transporte e integração

Segundo a literatura, até há muito pouco tempo, após a entrada do vírus na célula ocorreria a descapsidação e, conseqüentemente a exposição do genoma do material genético e enzimas virais levando à retrotranscrição por ação da enzima RT. A RT e a ribonuclease H (RNaseH), presentes no complexo de pré-integração (CPI), realizam a síntese de uma molécula de DNA complementar (cDNA) tomando como molde o RNA genómico. No final do processo obtém-se uma molécula de DNA linear de cadeia dupla limitada pelas sequências LTR. Este passo de transcrição reversa é a razão para um elevado número de mutações uma vez que, a RT tende a cometer erros, aumentando a

probabilidade de produzir vírus mutantes. A molécula de cDNA formada seria então transportada para o núcleo como parte do CPI através dos poros do invólucro nuclear, havendo possíveis interações com filamentos de actina e recrutamento de alguns fatores proteicos celulares (14,21).

Estudos recentes, para a fase inicial da replicação do HIV-1, demonstram que a descapsidação ocorre mais tarde do que o inicialmente descrito, pelo que após a fusão da partícula viral com a célula hospedeira a cápside prossegue até ao núcleo através de poros nucleares (Figura 5). Em seguida e, de forma semelhante ao já descrito ocorre a retrotranscrição e só depois ocorre a descapsidação a fim de libertar a molécula de cDNA e promover a sua integração no genoma do hospedeiro. Esta alteração terá resultado da evolução de HIV-1 para manter a integridade da cápside e manter a separação entre as macromoléculas da cápside viral e do ambiente nuclear até ao momento da descapsidação, seguido da integração do genoma viral no hospedeiro. Contudo, serão necessários mais estudos para esclarecer esta alteração no ciclo replicativo do vírus, nomeadamente para determinar se a integridade da cápside permanece ou não totalmente intacta e compreender se são capazes de levar à infeção produtiva (22).

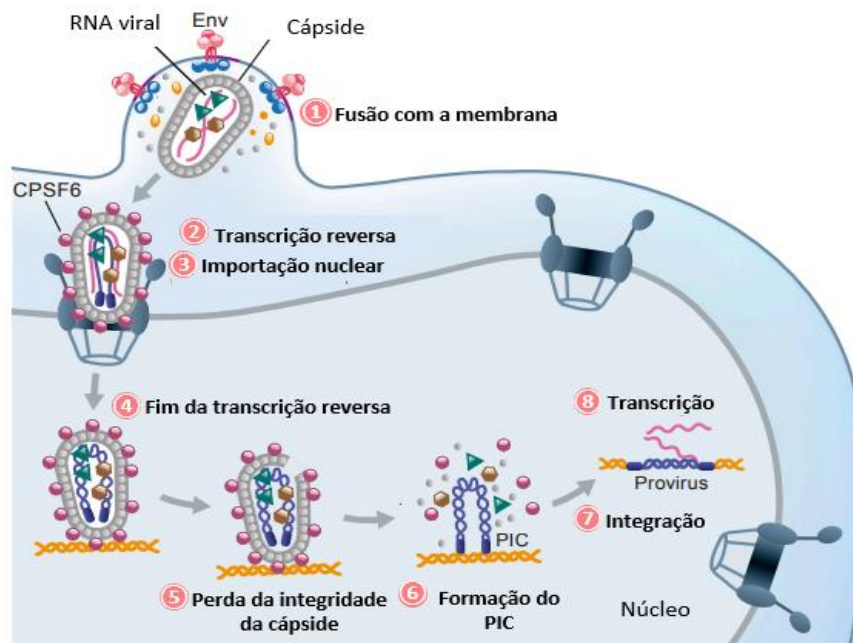


Figura 5: Modelo proposto para importação nuclear e descapsidação de HIV-1. (Adaptado de Chenglei Li et al., 2021)

De qualquer modo a partir do momento em que a molécula de cDNA é libertada no núcleo o ciclo replicativo parece prosseguir como já anteriormente descrito na literatura. Pelo que, por ação da integrase viral o genoma viral é incorporado no genoma do hospedeiro, o que resulta na formação de um provírus silenciado ou, em alternativa, transcrionalmente ativo, capaz de produzir novos viriões (23).

1.6.2 Fase tardia

A fase tardia começa com a regulação da expressão do genoma proviral integrado, e inclui todos os processos até à maturação das partículas virais. A sequência das etapas que se seguem só é possível caso a célula esteja ativada (18). Caso a célula não esteja ativada, o vírus permanece latente na célula hospedeira sem causar danos.

1.6.2.1 Expressão genética (Transcrição e tradução)

A produção de partículas virais inicia-se com a transcrição do provírus pela RNA Polimerase II celular através da ativação do promotor 5' - LTR por fatores celulares. Nos primeiros ciclos de transcrição são produzidas quantidades basais de RNA mensageiro que sofrem processamento múltiplo de *splicing*. Em alternativa ao *splicing* múltiplo são expressas as proteínas reguladoras Tat, Rev e Nef. A ligação da proteína Tat ao elemento TAR (do inglês, *transactivation response region*), presente na extremidade 5' de todos os RNAs virais, promove o aumento da velocidade de transcrição da RNA polimerase II celular, o que resulta na síntese de quantidades elevadas de mRNAs virais e também de moléculas completas de RNA genómico viral (24). O aumento significativo da transcrição do provírus resulta na acumulação da proteína reguladora pós-transcricional, proteína Rev. Esta proteína inibe a clivagem do RNA viral em pequenos RNAs, gerando mRNAs processados que codificam para as proteínas Vif, Vpr, Vpu e proteínas do invólucro; e não processados codificantes da informação para a síntese da protease, integrase, transcriptase reversa, proteínas da cápside, nucleocápside e da matriz do virão.

Quando produzida em quantidade suficiente, Rev liga-se a uma estrutura designada RRE (elemento de resposta Rev, do inglês *rev-responsive element*) presente nas

moléculas virais de RNA, promovendo a exportação dos transcritos que sofreram *splicing* simples (dos genes *env*, *vif*, *vpu* e *vpr*) e que não sofreram *splicing* (dos genes *gag* e *gag-pol*) para o citoplasma, onde são traduzidos nas proteínas Vif, Vpr e Nef e nas poliproteínas Gag (p55) e Gag-Pol (21,25). O processo de tradução do mRNA viral é determinado pelo *internal ribosome entry segment* (IRES), uma região líder não traduzida, que se liga a subunidades ribossômicas e a diversos fatores de iniciação da tradução (26).

1.6.2.2 Montagem, saída e maturação da partícula viral

A montagem das partículas virais ocorre ao nível da membrana celular, sendo coordenada por Gag e por vários fatores celulares. A libertação dos viriões ocorre por um processo de gemulação que resulta na saída de uma partícula viral imatura da célula hospedeira, por ação de p6Gag. Na ausência de p6Gag, gp120 e o receptor CD4 tendem a formar um complexo precoce no RE. Por último, a proteína Vpu/Vpx é responsável pela degradação de receptores CD4 importantes para o transporte das proteínas do invólucro para a membrana celular, e por uma diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, responsável pelo reconhecimento de células infectadas (17,27).

A capacidade de infecção é adquirida por maturação da partícula viral e ocorre já fora da célula, através do processamento das poliproteínas Gag e Gag-Pol em proteínas funcionais pela enzima PR viral (18). O processamento proteolítico dos precursores Pr55_{Gag} e Pr160_{Gag-Pol} dá origem a proteínas estruturais (MA, CA, NC e p6_{Gag}) e de natureza enzimática (PR, RT e IN), respetivamente, que se reorganizam para dar lugar a partículas virais maduras e infecciosas, os viriões. É formado assim o virão maduro, capaz de infectar novas células (21).

1.7 Tropismo

O tropismo celular é uma característica utilizada para descrever a “especificidade” dos vírus relativamente à sua capacidade para infectar diversos tipos celulares. Esta especificidade e, portanto, a capacidade viral para infectar um tipo celular e não outro,

reside na codificação do gene *env* do HIV para a glicoproteína de superfície do invólucro viral. As principais células alvo do HIV são os linfócitos T CD4+, leucócitos que organizam e desencadeiam a resposta imunitária. Estas células possuem à superfície a molécula CD4 que interage com os receptores de quimiocinas (coreceptores), permitindo a entrada do vírus na célula (28,29). Tais receptores encontram-se na membrana de células como linfócitos T CD4+, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células do sistema nervoso. Em consequência da infecção e destruição dos linfócitos T CD4+ por parte do HIV, os indivíduos ficam vulneráveis à infecção por outros microrganismos (29,30).

Com o avançar dos estudos sobre o tropismo, *in vitro*, para o HIV, tem-se verificado a existência de vários coreceptores com um papel relevante na entrada do vírus na célula, como por exemplo: CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, XCR1, FPRL1, GPR1, GPR15, APJ, ChemR23, CXCR7/ RDC1, D6, BLTR e US28. Apesar da diversidade de potenciais coreceptores, os principais coreceptores são CCR5 e CXCR4, descritos como os mais importantes para a patogénese da infecção pelo HIV (31).

De acordo com o tropismo para o co-receptor celular, as variantes do HIV são denominadas R5 se usarem CCR5 como co-receptor, enquanto vírus com preferência por CXCR4 são denominados X4. Existem ainda estirpes que usam ambos os coreceptores, denominadas de duplas ou mistas (D/M). As estirpes R5 são predominantes durante os estágios iniciais da infecção pelo HIV-1, estando descrita a sua capacidade de infetar predominantemente macrófagos derivados de monócitos e células CD4+. Apesar de células linfóides serem predominantemente infetadas por estirpes R5, as estirpes X4 também podem infetar estas células. O aparecimento de tais estirpes é geralmente associado à perda acelerada de células T CD4+ e à progressão da doença (31–33).

Alguns estudos descrevem uma hipótese alternativa para a entrada de vírus nas células independente da presença de CD4, ocorrendo por interações entre a glicoproteína de superfície, numa conformação nativa, ao co-receptor (34,35). Ou seja, as células podem ser infetadas pelo HIV sem que este utilize o receptor CD4, como é o caso dos fibroblastos, das células epiteliais, renais, hepáticas e nervosas, e de células T CD8+. No entanto, esta via é relativamente menos eficaz do que a via normalmente utilizada (36,37).

Este mecanismo de infecção alternativo permite explicar a presença de partículas virais em células que, à partida, não seriam infetadas pelo HIV, como é o caso dos astrócitos, oligodendrócitos e neurónios que não expressam o receptor CD4, e dos macrófagos e células da micróglia que tem baixos níveis deste mesmo receptor. As alterações causadas nestas células pela presença do vírus podem ser responsáveis pelo aparecimento de patologias associadas ao HIV no hospedeiro, como são exemplo as doenças neurodegenerativas, o cancro e as nefropatias associadas ao HIV (38,39).

Várias evidências descritas por Kosuke *et. al* sugerem que o HIV poderá entrar na célula por mecanismos de endocitose, independente do pH. Os estudos realizados por estes autores demonstraram que a fusão completa de HIV-1 ocorreu apenas em compartimentos endossomais, mas não na membrana plasmática de células epiteliais e linfóides. Além disso, destacam que a reduzida quantidade de Env detetada em HIV-1 poderá não ser suficiente por si só para sustentar um poro de fusão, sugerindo a possibilidade de que fatores celulares envolvidos no tráfego de membrana sejam responsáveis pela forte preferência do vírus para a entrada via endocítica (40).

1.8 Patogénese da infecção, transmissão e sintomas

Tendo em conta que atualmente a infecção por HIV permanece sem cura, a melhor abordagem para tentar minimizar o seu impacto passa por intervenções direcionadas para reduzir a transmissão do vírus (41). A transmissão do HIV pode ocorrer através de relações sexuais desprotegidas, partilha de seringas ou instrumentos corto-perfurantes, transfusão de sangue, transmissão vertical durante a gravidez, parto ou amamentação. Cerca de 50% dos indivíduos com infecção primária permanecem assintomáticos, enquanto os restantes desenvolvem sintomas idênticos à gripe nas primeiras quatro semanas após a infecção (42).

A patogénese da infecção pelo HIV-1 e a progressão para a SIDA são consequência das propriedades deste retrovírus e da resposta imunitária mediada pelo hospedeiro, onde o equilíbrio entre a eficácia destes dois fatores determina o resultado da infecção, desde o surgimento da doença até à sobrevivência a longo prazo (43). O decurso da infecção por HIV altera-se ao longo do tempo, sendo que a infecção por HIV pode ser dividida em três

fases: a fase aguda (ou infecção primária), com a duração de quatro a oito semanas; uma fase crónica (ou clinicamente latente), com duração entre cinco a quinze anos; por fim, dá-se a fase de SIDA em consequência do colapso do sistema imunitário. Pode observar-se na Figura 6 a relação entre a carga viral do HIV e a presença de células T CD4⁺ desde o momento da infecção à fase característica da SIDA, no hospedeiro Humano (44,45).

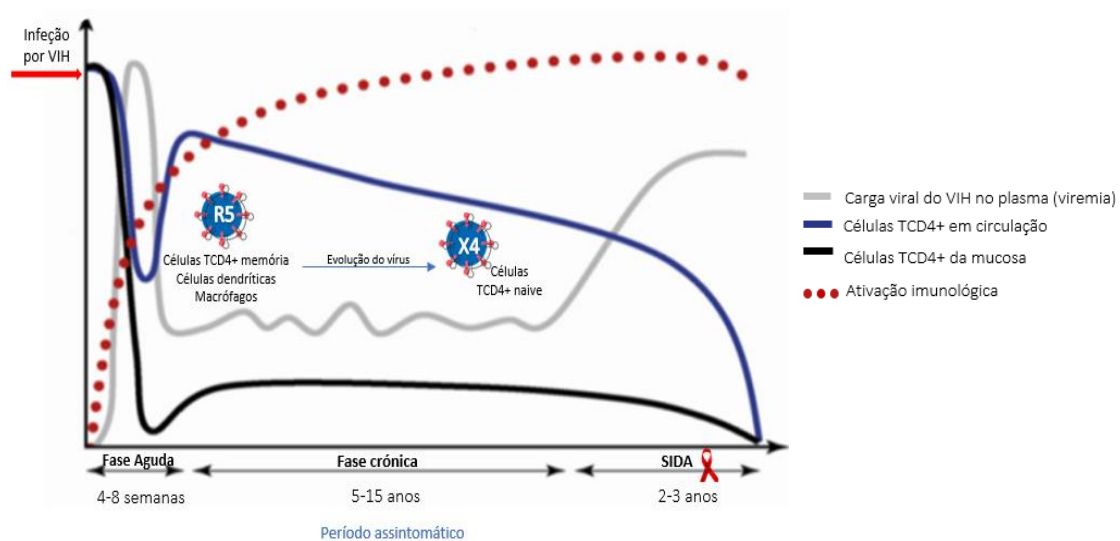


Figura 6: Representação esquemática do percurso do HIV e resposta imunitária no hospedeiro humano (patogénese), desde o momento da infecção por HIV à fase característica da SIDA. (Adaptado de Forsman, 2008)

Durante a fase inicial o vírus replica rapidamente pelo que ocorre a disseminação do vírus e o estabelecimento da infecção em vários tipos de células incluindo células dendríticas, células T CD4⁺ e macrófagos e vários tecidos linfóides (46). Nesta fase, os títulos virais são extremamente elevados no sangue periférico levando à diminuição abrupta do número de linfócitos T CD4⁺, T CD8 e células B (47). É nesta fase que os indivíduos infetados começam a sentir sintomas, normalmente muito semelhantes a sintomas gripais como febre, dores de cabeça, artralgia, por vezes acompanhados de erupção cutânea, entre outros (44,45). Posteriormente, a carga viral tende a diminuir face à resposta imunitária desenvolvida por parte do hospedeiro para controlar a multiplicação do vírus, levando a uma queda acentuada da virémia plasmática e início da produção de

anticorpos. O período desde o momento da infecção até ao aparecimento de anticorpos em circulação é denominado de período de janela imunológica (44,45).

Após a fase aguda, a infecção entra num período de infecção crónica geralmente assintomática que tende a variar entre um a quinze anos e, no caso de apresentar sintomas mais acentuados estes podem resultar da infecção direta e danificação de órgãos como o cérebro (desde perda de memória a demência), rins (insuficiência renal), coração (insuficiência cardíaca), órgãos genitais (45). Durante este período, a replicação viral diminui mas persiste nos nódulos linfáticos, sendo que a dado momento ocorre um rápido *turnover* de viriões plasmáticos e linfócitos T CD4+. Ou seja, a transição da fase crónica para a fase de SIDA é marcada pelo incremento da virémia e redução do número de células T CD4+ em circulação por consequência da ativação persistente que eventualmente reduz sua capacidade regenerativa, tal como se observa na Figura 6 (21).

Na fase de SIDA, com o declínio gradual dos níveis de linfócitos T CD4+ (inferior a 200 células/mm³), dá-se o descontrolo da resposta imunitária levando a uma série de mudanças imunossupressivas em que o ambiente torna-se propenso ao aparecimento de várias infeções oportunistas como pneumonia, meningite e candidíase (44,45).

1.9 Resposta imunitária para o HIV

Durante a fase inicial e aguda da infecção o hospedeiro desenvolve respostas celulares e humorais específicas, ainda que a maioria dessas respostas não evite a replicação do vírus na maioria dos indivíduos infetados. Contudo, as respostas específicas desenvolvidas contra o HIV parecem ser determinantes, para o controlo da replicação vírica e para evolução da doença (48). A ativação imunológica nas diferentes fases da história natural da infecção pelo HIV encontra-se esquematicamente representada na Figura 7.

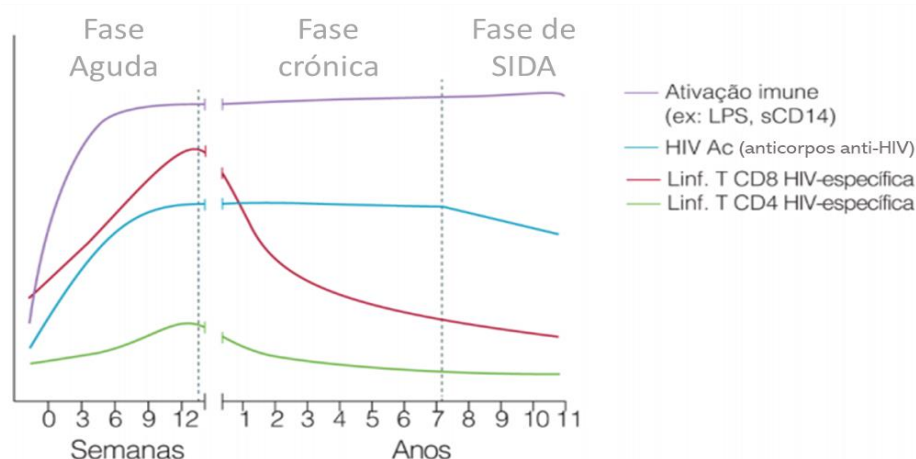


Figura 7: Ativação imunológica nas diferentes fases da história natural da infecção pelo HIV. Cada linha representa diferentes marcadores associados a ativação imune desencadeada pela infecção, como também dos níveis de anticorpos anti-HIV, sendo coloridas de acordo com a legenda a direita. (Adaptado de Maartens et al, 2014).

1.9.1 Respostas imune inata e humoral

A imunidade inata é a primeira resposta a acontecer quando ocorre uma infecção pelo HIV, antes do desenvolvimento de uma resposta adaptativa específica. Algumas células, tais como as células dendríticas, os monócitos, os macrófagos e as *natural killer* (NK), são responsáveis por atuarem nesta fase para controlo da replicação viral (49). Existem diferenças na resposta imune inata para os diferentes tipos de HIV, sendo que para HIV-1 a replicação é bloqueada pela proteína SAMHD1 expressa pelas células dendríticas (CD), enquanto para HIV-2 ocorre a ligação da sua proteína acessória Vpx a SAMDH1, diminuindo assim a sua capacidade inibitória. Outra proteína, a *Tripartite motif protein isoform 5 alpha* (TRIM5α), atua como fator antiretroviral, bloqueando a infecção, antes do estabelecimento do provírus, tendo este mecanismo um efeito mais acentuado durante a infecção por HIV-2 (50).

A resposta humoral é caracterizada pelo aparecimento de antígeno aproximadamente 15 dias após o início da infecção, sendo que podem ser detetados anticorpos específicos para o HIV em vários compartimentos como no sangue, nas mucosas e fluídos genitais (51). O papel dos anticorpos é fundamental no controlo e eliminação das partículas virais e células infetadas. Além disso o diagnóstico da infecção

por HIV é feito através da detecção de anticorpos, que parecem contribuir para o declínio da virémia, após a infecção aguda, estando a perda destes anticorpos associada à progressão da infecção.

Os anticorpos neutralizantes (AcNT), anticorpos que ao ligarem-se às proteínas do invólucro impedem a entrada do vírus nas células-alvo, têm um papel importante no controle da virémia, na transição da fase aguda para a fase crônica de latência clínica e estão associados a um prognóstico favorável (52).

Alguns anticorpos contra as proteínas do invólucro gp120 e gp41, têm a capacidade de se ligar ao receptor Fc de células capazes de mediar reações citotóxicas, dependentes de anticorpos (ADCC), contra células infectadas por HIV ou que apresentam à sua superfície a gp120. Estes anticorpos são detetados logo após a infecção aguda e parecem diminuir nas fases avançadas da doença. Os anticorpos não formalmente neutralizantes podem também ter atividade antiviral que é mediada pela região constante (Fc) do anticorpo, e resulta da interação entre a região Fc do anticorpo e os receptores da região Fc expressos na membrana celular de vários tipos de células (ex. NK, macrófagos, dendríticas e neutrófilos). Estes anticorpos atuam através de um ou mais dos seguintes mecanismos antivirais: citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC), inibição viral mediada por células e dependente dos anticorpos (ADCVI), e fagocitose (53,54).

1.9.2 Respostas de imunidade celular

A resposta de imunidade celular pode ser caracterizada pelos linfócitos T citotóxicos, pelos fatores supressores solúveis e pela resposta das células T CD4+.

As respostas celulares contra o vírus são, maioritariamente, mediadas por células T CD8+ citotóxicas clássicas (linfócitos T citotóxicos [CTL]), isto é, que reconhecem os determinantes virais, nas células infectadas, através da apresentação antigénica, no contexto do complexo major de histocompatibilidade (HLA) classe I e tem a capacidade de induzir a lise direta destas células. A resposta imunitária celular realizada pelas células T CD8+ traduz-se na produção de moléculas efetoras, tais como citocinas (em especial IFN-gama e TNF-alfa) e perforinas (55). No decorrer da infecção existem vários

mecanismos que podem contribuir para a perda da atividade citotóxica, como é o caso das proteínas acessórias Tat, Nef e Vpu de HIV-1. Estas proteínas têm a capacidade de promover a diminuição da expressão de moléculas HLA classe I, da superfície da célula impedindo, assim, o reconhecimento antigénico pelos linfócitos T CD8+. A proteína Nef é, ainda, capaz de induzir a expressão de ligandos da molécula Fas nas células infetadas, o que promove a apoptose dos CTL, envolvidos na lise daquelas células (56).

Células T CD8+ também têm capacidade para inibir a replicação vírica por uma via não-citolítica, mediada por fatores solúveis, como *CD8 Antiviral Factor* (CAF). Além disso, sabe-se que após a estimulação específica das células T CD8+ pelos antígenos de HIV são libertadas elevadas quantidades de fatores solúveis, as quimiocinas. As β quimiocinas (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted* [RANTES], *Macrophage inflammatory protein type 1 alpha* [MIP1]- α e *Macrophage inflammatory protein type 1 beta* [MIP1]- β) competem com o vírus para o uso do receptor CCR5 e bloqueiam, desta forma, a entrada do vírus na célula (56).

No que diz respeito às células T CD4+ ou auxiliares (*helper*), estas reconhecem os epítomos, no contexto da apresentação dependente do HLA classe II, e respondem através da sua proliferação e produção de citocinas como a IL-2 (57).

1.10 Diagnóstico e terapêutica antiretroviral

O diagnóstico da infeção por HIV deve ser feito através de um imunoensaio de antígeno/anticorpo a partir de uma amostra de plasma ou soro. Atualmente, utilizam-se testes de triagem de 4ª geração, com a finalidade de testar a presença de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, e o antígeno viral p24. Um teste de 4ª geração permite detetar a infeção numa fase muito inicial, entre 11 dias e um mês após a infeção, através da presença do antígeno p24. Desta forma, é possível um diagnóstico e a introdução precoce da terapia antirretroviral. Apenas se existir a possibilidade de infeção muito precoce não detetada pelo teste inicial, sabendo-se que houve exposição ao agente viral, se deve realizar um teste de ácido nucleico HIV-1 (TAN) (58,59).

A fase mais avançada da infeção pelo HIV, fase de SIDA, pode levar muitos anos para se desenvolver se não for tratada, dependendo do indivíduo. A SIDA é definida por

uma contagem inferior a 200 células CD4 por microlitro de sangue e, em consequência da imunodeficiência, pelo desenvolvimento de infecções oportunistas ou fúngicas, alguns tipos de cancro, disfunção do sistema nervoso ou outras manifestações clínicas graves de longo prazo (59,60). Com a evolução da terapêutica utilizada, nomeadamente a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*) os indivíduos infetados progridem para a fase de SIDA mais tardiamente. Esta terapêutica tem como objetivo reduzir a carga viral, permitindo restaurar a função imune, ou seja, suprime a replicação viral a um nível quase indetectável. Esta terapia consiste na combinação de, pelo menos, três antirretrovirais e usualmente inclui, pelo menos, um antirretroviral da classe dos inibidores das proteases (61). Os antirretrovirais foram desenvolvidos tendo por alvo vários passos do ciclo replicativo, principalmente sobre enzimas virais que atuam na replicação dos vírus nas células. Os antirretrovirais podem ser classificados em várias classes amplas: 1. Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeo (NRTI), 2. Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTI) – os inibidores da transcriptase reversa impedem a conversão de RNA em DNA- 3. Inibidores da protease (IP) - impedem a clivagem proteolítica dos polipéptidos precursores levando à formação de um virião imaturo incapaz de infetar novas células-, 4. Antagonistas dos coreceptores, 5. Inibidores da fusão - Os inibidores de entrada, ou de fusão, impedem a entrada do vírus nas células, por inibição do co-receptor -, 6. Inibidores da integrase (InSTIs) - impedem a integração do DNA viral no DNA da célula hospedeira (45).

O tratamento antirretroviral não consegue eliminar o vírus do organismo, embora a carga viral diminua para níveis muito baixos ou indetectáveis, ficando o vírus presente na sua forma inativa (latente). Um aumento na carga viral durante o tratamento pode indicar que o vírus desenvolveu resistências ao tratamento e/ou que o indivíduo afetado não efetuou a terapia antirretroviral de forma adequada (62,63).

1.10.1 Resistência associada à terapêutica anti-retroviral

Atualmente não existe cura para a infeção pelo HIV, no entanto, nos dias de hoje um indivíduo com diagnóstico positivo para HIV e que tome a terapia antiretroviral como prescrito, pode viver uma vida longa, sem risco efetivo de transmitir a um indivíduo HIV

negativo. Com a terapia antirretroviral, a replicação viral e a expectativa de vida pode ser quase a mesma de alguém que não contraiu HIV. Contudo, os custos associados à HAART, bem como os possíveis efeitos secundários conduzem a falhas na adesão da terapêutica por parte do paciente, condicionando o sucesso desta (63). Exemplo disso, é a presença de vírus em “reservatórios” no hospedeiro por longos períodos de tempo capaz de levar à origem de populações virais multirresistentes, alguns dos quais podem demonstrar grande infecciosidade e elevada capacidade replicativa. O desenvolvimento de resistência aos antirretrovirais para HIV (HIVDR, do inglês *HIV drug resistance*) resulta de vários fatores, como por exemplo a heterogeneidade das espécies de HIV, da taxa de replicação viral, da probabilidade de ocorrência de uma determinada mutação (ou conjunto de mutações) e ainda do efeito das mutações de resistência na suscetibilidade à terapêutica e no fitness replicativo do vírus (64,65). A crescente preocupação face às consequências do HIVDR levou ao processo consultivo de partes interessadas para o desenvolvimento de um plano estratégico, por parte da WHO, para combater esta problemática (65).

1.11 Latência viral, reservatórios e santuários

A latência viral é caracterizada pela inexistência de expressão genética a partir do DNA proviral, ocorrendo desde o momento em que o vírus infeta células que não estejam ativadas. Essa latência pode gerar-se antes ou depois da integração (latência pré-integracional e latência pós-integracional, respetivamente) (66). A latência pré-integracional é caracterizada por uma ineficaz integração do provírus ou incompleta transcrição reversa. Entre os mecanismos propostos associados a esta forma de latência encontram-se a baixa atividade da RT, baixos níveis de dNTPs nas células alvo, a hipermutação do DNA induzida pelo fator de restrição APOBEC3 (do inglês, *apoliprotein B editing catalytic polypeptide*), e a impossibilidade de importação nuclear do complexo de pré-integração (67,68). Esta forma de latência é frequentemente observada em células T CD4⁺ e em monócitos/macrófagos. A latência pós-integracional tem sido demonstrada em linfócitos T ativados. Outros fatores envolvidos na regulação do estado de latência viral são a diminuição da concentração de Tat, a regulação negativa

da expressão genética da célula por microRNAs (miRNA) e a oclusão do promotor viral (69,70).

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. Um dos maiores desafios na erradicação do HIV é a formação de reservatórios de longa duração que são resistentes à terapia antirretroviral ou resultantes da suspensão da terapêutica em doentes com virémias indetetáveis durante vários anos (68). 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 estável (71).

As células que se encontram melhor caracterizadas como reservatórios de HIV são as células T CD4+, capazes de sobreviver por longos períodos de tempo, potenciando a propagação do provírus através da sua capacidade de divisão e diferenciação, facilitando a longo prazo a persistência viral. A formação de um reservatório viral na população de células T CD4+ quiescentes ocorre logo na infecção primária. Em comparação, tem sido demonstrada a presença de um reservatório viral latente em células T CD4+ de memória, as quais integram DNA proviral (69). Num reservatório latente a expressão viral fica suspensa, sendo que o genoma viral se integra e permanece no DNA como provírus, mas não é transcrito, não sendo, por este motivo, alvo do sistema imunitário ou da terapêutica antirretroviral. 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, as células dendríticas e macrófagos nos órgãos linfóides, as células estaminais hematopoiéticas na medula óssea, a micróglia no sistema nervoso central, e vários tipos de células nos órgãos genitais, incluindo células T CD4+ e macrófagos (72).

1.12 Células envolvidas na patogénese do HIV

Como referido anteriormente, o HIV entra nas células por ligação ao receptor CD4 e ao co-receptor CCR5 e CXCR4. Tais receptores encontram-se na membrana de várias células tais como linfócitos T CD4+, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células do sistema nervoso (Figura 8) (73). Entre os receptores de quimiocinas expressos em células humanas, o CXCR4 e CCR5 parecem ser os mais importantes para a entrada de HIV em linfócitos e o CCR5 para monócitos, macrófagos e micróglia e linfócitos, que apresenta uma expressão menor deste co-receptor. Tendo em conta que estas células apresentam um papel fundamental na imunidade adquirida (no caso dos linfócitos T CD4+) e na imunidade inata (no caso dos monócitos/macrófagos e das CD) é cada vez mais importante compreender a suscetibilidade destas células à infeção pelo HIV, a possibilidade de se tornarem reservatórios virais e as alterações funcionais que possam ocorrer, revelando assim a importância do papel que estas desempenham na imunopatogénese da infeção pelo HIV (73,74).

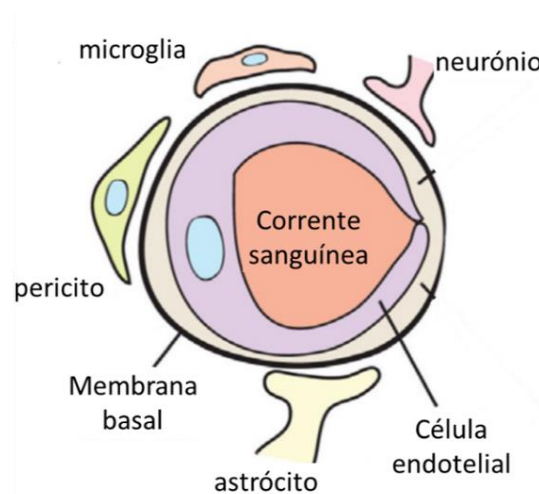


Figura 8: Células infetadas pelo HIV. A barreira hematoencefálica que separa a corrente sanguínea do sistema nervoso central é composta por células endoteliais microvasculares cerebrais com junções apertadas especializadas, envolvida por uma membrana basal, pericitos, astrócitos e neurónios suscetíveis à infeção por HIV. (adaptado de Koyuncu et al., 2013)

Alguns estudos têm vindo a demonstrar que existem células que podem ser infetadas pelo HIV sem que este utilize o receptor CD4, como é o caso dos fibroblastos,

das células epiteliais, renais, hepáticas e nervosas, e de células T CD8+. Nestes casos, pensa-se que exista uma exposição dos locais de ligação da glicoproteína de superfície ao co-receptor sem que exista uma ligação prévia ao receptor CD4, permitindo a entrada do vírus na célula. Desta forma é possível explicar a presença de partículas virais em células que, à partida, não seriam infetadas pelo HIV, como é o caso dos astrócitos, oligodendrócitos e neurónios que não expressam o receptor CD4, e dos macrófagos e células da micróglia que tem baixos níveis deste mesmo receptor (36,75).

1.13 Células da corrente sanguínea

1.13.1 Linfócitos T CD4+

As células T desenvolvem-se no timo e desempenham um papel central na resposta imune. Estas células expressam um receptor de células T (TCR) e também podem expressar a glicoproteína CD4 ou CD8 na sua superfície (células CD4+/células T auxiliares e células T CD8+ /citotóxicas, respetivamente) (76). Os linfócitos T CD4+ atuam na resposta imune adquirida, ativando e estimulando outras células do sistema imunitário. Participam no reconhecimento de antígenos proteicos apresentados por moléculas de MHC de classe II, presentes à superfície de células apresentadoras de antígenos (APC) (77).

Os linfócitos T CD4+ ativados secretam citocinas que permitem ativação de outras células, em particular, macrófagos, linfócitos T CD8+ e linfócitos B (8). Estas células servem ainda como importantes reservatórios virais: uma parte destas células transporta provírus HIV integrados no DNA hospedeiro sem multiplicação viral ativa e a outra parte, providenciam uma vida curta às células efetoras que servem como alvos de replicação (78,79).

Tendo os linfócitos T CD4+ um papel tão importante na ativação da resposta imune e, dado que uma das características da imunodeficiência provocada pelo HIV, é a diminuição do número destes linfócitos, o indivíduo infetado e não tratado torna-se mais suscetível a doenças oportunistas que podem levar à morte (21,80).

1.13.2 Monócitos/Macrófagos

Monócitos e macrófagos pertencem ao sistema de fagócitos mononucleares, um componente da imunidade inata. São co-ativadores de linfócitos B e T por apresentarem antígenos, secretam citocinas pró-inflamatórias e cumprem funções de fagocitose de microrganismos como bactérias, fungos e parasitas (81). Monócitos são leucócitos derivados da medula óssea que circulam no sangue e gânglios linfáticos antes de migrar para tecidos e diferenciarem-se em macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos são geralmente considerados células terminais diferenciadas que fagocitam patógenos ou toxinas, secretam citocinas que recrutam outras células do sistema e migram para gânglios linfáticos (82,83).

À semelhança dos linfócitos T CD4+, os monócitos/macrófagos expressam à sua superfície os receptores para a entrada do HIV, sendo por isso potenciais alvos de infecção viral. A infecção por monócitos pode ocorrer no sangue ou na medula óssea. Essas células podem ser i) diretamente infetadas ou ii) infetadas após a absorção fagocítica de linfócitos infetados e/ou viriões livres. Apesar disso, estudos *in vitro* demonstraram que os monócitos apenas raramente são produtivamente infetados, havendo no entanto um aumento de suscetibilidade à infecção quando ocorre a diferenciação em macrófagos (84,85).

Embora os macrófagos tenham pouca expressão de CD4 à sua superfície e o número de monócitos/macrófagos infetados por HIV seja muito inferior relativamente ao de linfócitos T CD4+, estes conseguem produzir grandes quantidades de vírus. Além disso, os macrófagos são mais resistentes aos efeitos citopáticos do vírus e mais eficientes a escapar à ação do sistema imunitário do indivíduo infetado (86). No que diz respeito à capacidade destas células infetadas passarem barreiras sem serem detetadas, os monócitos são capazes de passar a barreira hematoencefálica (BHE) e diferenciar-se em macrófagos dando início à neuroinvasão, contribuindo para o aparecimento de doenças neurodegenerativas associadas ao HIV através da produção de citocinas pró inflamatórias e outras neurotoxinas (81). Não havendo morte celular, os macrófagos infetados são preservados e mantêm a produção de viriões durante um longo período de tempo, constituindo reservatórios virais (87).

1.13.3 Células dendríticas

As células dendríticas (CDs) são células que apresentam antígenos e constituem uma importante ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida pela sua capacidade de induzir uma resposta imunitária apropriada após reconhecimento do patógeno. Assim, tornam-se capazes de fagocitar e processar microrganismos, ativando outras células do sistema imunitário como os linfócitos T. Estas células estão presentes em tecidos como a pele (onde se encontra uma célula dendrítica específica, denominada célula de Langerhans, também presente nas mucosas), mucosas do nariz, pulmões, estômago e intestinos; são também encontradas no sangue, na sua forma imatura (88)(89).

Tal como os linfócitos T CD4⁺ e os monócitos/macrófagos, as CD expressam à sua superfície o receptor CD4⁺ e os coreceptores CCR5 e/ou CXCR4 necessários para a entrada do vírus na célula, embora em baixas quantidades. No entanto, quando comparado com a infeção em linfócitos T CD4⁺, estas células apresentam uma menor produtividade de viriões infecciosos, possivelmente relacionada com a baixa quantidade de receptor e coreceptores à superfície, a capacidade de degradação do vírus após a sua internalização e/ou a expressão de fatores que bloqueiam a replicação viral, como é o caso da proteína antirretroviral APOB3G (90,91).

De modo geral, o vírus aproveita-se da elevada capacidade de migração das CDs e do potencial de recrutamento de linfócitos T, essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune apropriada, para promover a infeção. A infeção pode ocorrer por uma de duas formas, infeção *trans* ou *cis*, mediante a existência ou não de contacto entre as células, respetivamente. Uma infeção do tipo *cis* implica a entrada do vírus na célula, a integração do genoma viral e a produção *de novo* de partículas virais. Por oposição a este mecanismo de infeção direta existe um outro tipo de infeção denominado infeção do tipo *trans* que consiste num mecanismo de endocitose do vírus por parte das células apresentadoras de antígeno (APC), que, após contacto célula-célula com linfócitos T CD4⁺ ou outras células suscetíveis à infeção pelo HIV, permitem a transferência das partículas virais originando infeção nas células com as quais contactaram, sendo esta uma infeção produtiva ou não (92). Um dos mecanismos descritos para mediar a infeção do tipo *trans* é a libertação de vesículas extracelulares, por células infetadas, que podem, ao ser secretadas, contribuir para a disseminação e patogénese da infeção pelo HIV (93,94).

No que diz respeito a uma infecção produtiva de CD do tipo *cis*, esta resulta na produção de novas partículas virais capazes de infectar linfócitos T CD4⁺ (95,96).

Adicionalmente, as células dendríticas podem constituir reservatórios virais, contribuindo continuamente para a infecção de novos linfócitos T CD4⁺. As células infectadas pelo HIV capazes de escapar à resposta imunológica não reconhecem um antígeno que leve à ativação destas células pelo que têm a capacidade de impedir a maturação das CD (46).

1.14 Infecção do Sistema Nervoso Central

1.14.1 Neuroinvasão

O sistema nervoso central (SNC) é separado da periferia pela barreira hematoencefálica (BHE), que é uma camada contínua de células endoteliais microvasculares cerebrais firmemente ligadas – denominadas células endoteliais microvasculares cerebrais (BMVECs). A BHE é seletivamente permeável e tem como função regular a circulação de células e substâncias entre o parênquima cerebral e a corrente sanguínea, protegendo o cérebro de substâncias estranhas (como agentes infecciosos e substâncias neurotóxicas), hormonas e neurotransmissores presentes na circulação sanguínea. Além de proporcionar um ambiente adequado para a rede neural do cérebro, a BHE atua também como um regulador de metabolitos energéticos, canais iónicos e de transportadores específicos. Danos na BHE ou alterações nos sistemas de transporte podem mediar a patogénese de muitas doenças do SNC, incluindo os distúrbios neurológicos associados à infecção pelo HIV (97,98).

No decurso da infecção, as alterações na permeabilidade e a ativação da BHE resultam da ação conjunta de eventos celulares que envolvem vários tipos de células, proteínas virais e fatores do hospedeiro. Quando uma célula desenvolve infecção ativa expressa um perfil alterado de citocinas, alterando-se também a capacidade de produzir viriões e de secretar proteínas virais (75,99). Vários estudos demonstraram que a presença de viriões na BHE pode não ser suficiente para a sua ativação, contudo verificou-se que células mononucleares infectadas com o vírus foram capazes de induzir essa ativação. Desta forma sugere-se que as células infectadas segregam fatores necessários para alterar a

permeabilidade da barreira durante a infecção, nomeadamente algumas proteínas virais como a gp120, a Tat, a Nef e a Vpr, que atuam como mediadores necessários no comprometimento da integridade da BHE (100,101).

A infecção do SNC é estabelecida após a passagem da BHE, tornando possível o desenvolvimento de disfunções neurológicas. O HIV tem a capacidade de atravessar esta barreira por um dos três mecanismos de infecção direta (Figura 9) seguintes:

1. Infecção de células endoteliais, expressando os receptores de entrada do HIV (CXCR4, CCR3, DC-SIGN);
2. Entrada direta devido ao aumento da permeabilidade, por consequência de outras disfunções e/ou tecido alterado;
3. Transporte do HIV por monócitos e linfócitos infectados - Hipótese do "Cavalo de Troia" (87).

Independentemente do mecanismo de infecção, todos estes processos são reforçados pelo ambiente pró-inflamatório induzido pelo HIV, uma vez que a inflamação aumenta a percentagem de vírus livre e as proteínas virais atravessam a BHE (102).

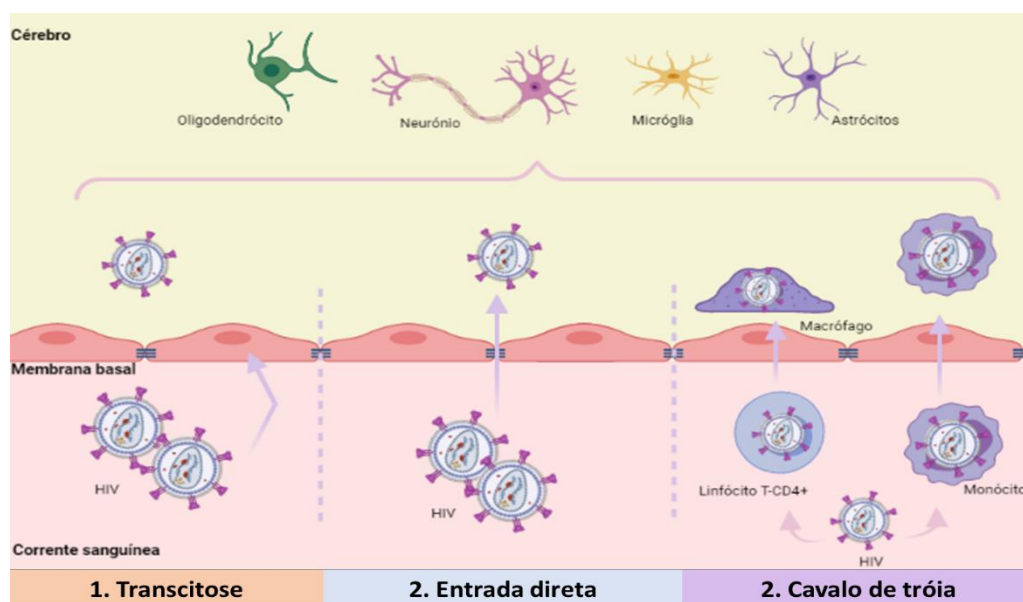


Figura 9: Mecanismos de entrada direta do HIV no SNC: (1) transcitose de células endoteliais, que expressem os recetores de entrada do HIV; (2) entrada direta, devido ao aumento da permeabilidade da membrana; (3) hipótese do "cavalo de Tróia": monócitos e linfócitos infectados atravessam a BHE. As células do SNC suscetíveis à infecção por HIV são micróglia, neurónios, astrócitos e oligodendrócitos.

Atualmente, acredita-se que a entrada do vírus no cérebro ocorre na fase inicial da infecção, não se sabendo, se permanece latente/controlado pela resposta imune ou se é eliminado e volta a reentrar no SNC nas fases tardias da infecção. Alguns investigadores acreditam que o vírus vai entrando no SNC várias vezes ao longo da infecção e que existe uma compartimentalização do vírus no SNC, ou seja, a existência de partículas virais que apresentam diferenças genéticas quando comparadas com as partículas virais que se encontram na corrente sanguínea ou nos nódulos linfáticos do mesmo indivíduo (75,103).

Teoricamente, todas as células do SNC podem ser infectadas pelo HIV, uma vez que possuem os receptores e/ou coreceptores que permitem a sua entrada. Para que as células do SNC sejam infetadas é necessário ultrapassar a BHE, sendo a teoria mais apoiada a do “Cavalo de Troia” (Figura 9)(104). De acordo com este modelo, o HIV e outros lentivírus entram no SNC através de monócitos e linfócitos T CD4+ infectados, capazes de atravessar a BHE, sem que seja detetada a presença do vírus no interior destas células, e propagar a infecção dentro do SNC (105). Após a passagem da BHE, os monócitos e linfócitos T CD4+ libertam partículas virais capazes de infetar células como macrófagos perivasculares e micróglia, contribuindo para o desenvolvimento de uma infecção persistente (106). A replicação viral em macrófagos perivasculares permite a libertação de viriões livres e pode facilitar a infecção de células microgliais. Considera-se que o tropismo para macrófagos é um pré-requisito para o neurotropismo do HIV (98).

Alguns estudos permitiram comprovar esta teoria, recorrendo à hibridação *in situ* e a análises imunohistoquímicas, permitindo perceber que existe uma acumulação viral nas regiões perivasculares da BHE (107–109).

1.14.2 Sistema Nervoso Central - Contextualização

O Sistema Nervoso Central tem sido considerado um compartimento imunologicamente privilegiado que atua como um importante reservatório para o HIV, cujos compartimentos são definidos como locais anatómicos que restringem a circulação do vírus. As células do SNC representam um dos santuários mais importantes para o HIV, no qual a replicação viral é estabelecida precocemente durante a infecção aguda e pode persistir através de células da linhagem mieloide: monócitos, células perivasculares e

micróglia, apesar dos potentes tratamentos antirretrovirais. Isto, porque o vírus pode não ser suprimido corretamente pela terapia antirretroviral devido à diminuição do efeito citopatogénico e não penetração dos antirretrovirais no SNC. A infeção por HIV no SNC pode levar a um amplo espectro de síndromes neurológicas, como demência, distúrbios neurocognitivos leves e comprometimento assintomático (107,110).

A demência não pode ser considerada como uma doença por si só, mas é o termo usado para descrever um conjunto de sintomas resultantes de danos e distúrbios que afetam o cérebro. Estes sintomas aparecem como uma variedade de distúrbios cognitivos, comportamentais, afetivos, motores e psiquiátricos. A demência pode ser causada por uma variedade de doenças, conhecidas como doenças neurodegenerativas (108).

Atualmente e de acordo com os critérios de Frascati, os distúrbios neurocognitivos associados ao HIV (HAND, do inglês *HIV-associated neurocognitive disorders*) categorizam-se por: deficiências neurocognitivas assintomáticas (ANI, do inglês *asymptomatic neurocognitive impairment*), distúrbios neurocognitivos leves (MND, do inglês *mild neurocognitive disorder*) e demência associada ao HIV (HAD, do inglês *HIV-associated dementia*). Estas manifestações clínicas são causadas pela libertação de neurotoxinas por parte de células infetadas (principalmente macrófagos), e também por várias proteínas capazes de ativar a sinalização celular envolvida no controlo da sobrevivência celular e apoptose (107).

1.14.3 Complicações neurológicas associadas à SIDA

As complicações neurológicas associadas à SIDA são causa de morbilidade e mortalidade, interferindo de modo significativo na sobrevivência e na qualidade de vida dos indivíduos infetados por HIV. Estas complicações ocorrem em quase 70% dos indivíduos infetados, verificando-se uma prevalência de alterações neuropatológicas em estudos necrópsicos superior a 90% (111,112). As manifestações neurológicas associadas à infeção por HIV são variadas e podem resultar de: lesões ao nível do SNC por ação direta do vírus, como por exemplo encefalopatia e mielopatia vacuolar; ou indiretamente através de fatores do hospedeiro que incluem fatores humorais, como a libertação de citocinas e quimiocinas por células infetadas e não-infetadas. Grande parte das

complicações neurológicas associadas à infecção por HIV resulta de infecções oportunistas (por exemplo Citomegalovírus, Neurosífilis, Toxoplasmose, entre outras) e neoplasias (por exemplo Linfoma Primário do SNC) que surgem no contexto da imunodeficiência (75,76).

As alterações neurocognitivas no idoso infetado por HIV são frequentes, uma vez que nesta faixa etária o diagnóstico é maioritariamente tardio, pois são considerados menos vulneráveis à infecção e, embora tenham muitos comportamentos de risco, nem sempre os clínicos ou eles próprios estão sensibilizados para a possibilidade de estarem infetados. Por isso são menos testados do que os mais jovens. A infecção não tratada, afeta a biologia do envelhecimento, resultando no aparecimento precoce de comorbilidades, como a síndrome metabólica, a diabetes e as doenças cardiovasculares. Estas comorbilidades bem como a toxicidade associada aos fármacos, as interações farmacológicas e a ação direta e indireta de HIV sobre o SNC, parecem convergir para um processo de neuroinflamação. Inclusive o declínio cognitivo, associado ao envelhecimento prematuro, parece estar relacionado com alterações estruturais e funcionais, observáveis através de técnicas de neuroimagiologia e pela presença de indicadores de neurodegeneração (114).

1.15 Células do Sistema Nervoso Central envolvidas na infecção por HIV

1.15.1 Células da glia

As células da glia, células gliais ou neuróglias incluem diversos tipos celulares presentes no sistema nervoso central, como astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e ependimárias. Estas células não geram impulsos nervosos, não formam sinapses e, ao contrário dos neurónios, são capazes de se multiplicar através do processo de mitose, mesmo em indivíduos adultos. De forma geral, as células da glia têm como função o suporte estrutural e nutricional e estão envolvidas no desenvolvimento do SNC em condições fisiológicas normais. Estas células podem detetar e integrar sinais de dano neuronal, libertar citocinas, interagir e afetar a condição de outras células imunes, bem como desenvolver outros efeitos no cérebro (Tabela 3). Além disso, as primeiras células que entram em contato com células infetadas na região perivascular são micróglia, macrófagos perivasculares e astrócitos.

Devido ao seu papel fulcral na imunidade cerebral, é importante compreender o mecanismo patogénico entre o HIV e as células da glia, tendo em vista novas terapêuticas que permitam a diminuição da incidência de doenças neurodegenerativas em indivíduos com HIV (21,107).

Tabela 3: Tipos de infeção e efeitos no cérebro de células gliais humanas infetadas por HIV, associadas a distúrbios neurocognitivos. (Adaptado de Scutari et al. 2017)

Tipo de célula	Tipo de infeção	Efeitos no cérebro
Astrócito	Restrita	Aumento da permeabilidade da BHE
		Promove a migração de monócitos para o cérebro
		Aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} e glutamato
		Diminui a captação de glutamato
		Aumenta a produção de neurotoxinas
Micróglia	Produtiva	Induz a produção de proteínas virais (gp120, Tat, Vpr)
		Induz a produção de neurotoxinas (mediadores inflamatórios, PDGF, QUIN)
		Replicação viral ativa
Oligodendrócitos	Restrita	Reduz a síntese de mielina
		Aumenta a concentração intracelular dos níveis de Ca^{2+}
		Aumenta a apoptose celular

i. Micróglia

A micróglia representa 10% das células do SNC e consiste em fagócitos mononucleados que têm um papel imunitário muito importante no SNC: responder a todos os tipos de danos neurológicos. A micróglia atua como primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, atuando como mediador celular dos processos neuroinflamatórios, que, conseqüentemente, tende a exacerbar doenças neurológicas pré-existentes. O seu papel no processo inflamatório é libertar proteínas virais, citocinas inflamatórias e neurotoxinas, e induzir a diferenciação de astrócitos, apoptose e a alteração da neurogénese (115,116).

Uma das vias de entrada do HIV no SNC é feita através de monócitos infetados e células T CD4⁺ capazes de passar a BHE e, por consequência podem ativar as células da micróglia por interação com proteínas virais ou por estímulos imunitários. Vários estudos apontam que as estirpes de HIV encontradas no sistema nervoso têm tropismo para células que expressam o co-receptor CCR5, pelo que as células de micróglia são um potencial alvo, sendo também um possível reservatório do vírus latente na fase inicial da infeção. No entanto, após a instalação de uma imunossupressão sistémica, ou seja, numa fase tardia da infeção por HIV, a infeção produtiva tem mais tendência para ocorrer, uma vez que existe uma maior passagem de monócitos infetados pela BHE, devido à degradação da integridade desta (75,105).

ii. Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC, representando cerca de 19-40% das células. Os astrócitos são componentes importantes do SNC, que suportam a função e o metabolismo dos neurónios, a homeostase iónica no SNC, o controlo do estado das sinapses neuronais e a reparação de tecidos. Têm ainda como função a regulação da resposta imune no cérebro (116,117).

Ao contrário das células comumente infetadas pelo HIV, os astrócitos não expressam o receptor CD4 mas expressam os coreceptores CCR5 e CXCR4, mesmo que em quantidades reduzidas quando comparados a outras células. Isto significa que a infeção dos astrócitos ocorre independente do receptor CD4. Alguns estudos demonstraram que a infeção dos astrócitos é conseguida maioritariamente por contacto entre células infetadas e astrócitos não infetados. No entanto, após entrada do vírus nos astrócitos não se observa uma infeção produtiva mas sim um estado de latência do vírus, muitas vezes com integração do genoma viral (77). A infeção dos astrócitos não causa efeito citopático, portanto, o vírus pode permanecer nessas células quase indefinidamente. Em alguns momentos, as células infetadas podem ser transitoriamente ativadas por citocinas inflamatórias e produzirem viriões que podem, potencialmente, infetar outras células do SNC. Esta ativação leva a uma maior proliferação de células da micróglia ou macrófagos perivasculares, favorecendo o aparecimento ou aumento da magnitude das doenças neurodegenerativas (118).

iii. Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são as células gliais responsáveis pela formação e manutenção das bainhas de mielina que envolvem os axónios dos neurónios (75). Tal como os neurónios, também não possuem receptor CD4 e o mecanismo de infeção de oligodendrócitos por HIV também é desconhecido. Estudos detectaram ácidos nucleicos virais, e outros relataram a ausência de marcadores HIV-1 em oligodendrócitos. Estudos *in vitro*, utilizando oligodendrócitos humanos, demonstraram a infeção restrita por estipes R5 e X4 do vírus. Esta infeção do tipo não produtivo parece indicar que estas células funcionem como reservatório viral, sendo importantes na neuropatogénese (119,120).

A perda de integridade das bainhas de mielina pode alterar as vias de sinalização entre estas células e neurónios e originar degeneração neuronal, dando origem a disfunções neurológicas características de doentes com HIV mesmo que sujeitos a terapêutica antirretroviral (121).

1.15.2 Neurónios

Os neurónios são a principal unidade funcional do SNC e são responsáveis pela propagação de impulsos nervosos que originam as funções motoras e cognitivas. Os neurónios não expressam o receptor CD4 e julga-se que os coreceptores de superfície CXCR4 sejam importantes para a migração e desenvolvimento neuronal, bem como para as respostas neuronais de sobrevivência ou de apoptose, e não tanto como portas de entrada para o HIV (75). Na tabela 4 pode encontrar-se de forma sucinta os efeitos causados no cérebro por neurónios infetados por HIV.

Tabela 4: Tipos de infeção e efeitos no cérebro de neurónios infetados por HIV, associadas a distúrbios neurocognitivos. (Adaptado de Scutari et al. 2017)

Tipo de célula	Tipo de infeção	Efeitos no cérebro
Neurónios	Restrita	Aumento da concentração intracelular de Ca^{2+}
		Aumento da ativação de caspases
		Aumento da expressão de p53

Um dos aspectos mais controversos da neuropatogénese do HIV é a sua capacidade de infetar neurónios. No entanto, já foi possível detetar material genético do HIV em estudos *in vitro* com neurónios, bem como alguns estudos também relataram infeção restrita de neurónios primários, e linhas de células neuronais (122–124). Ainda que não esteja esclarecido como o HIV infeta neurónios, é geralmente aceite a ocorrência de disfunções neuronais causadas, principalmente, por libertação de fatores pró-inflamatórios e neurotoxinas pelas outras células do SNC. Estas substâncias são capazes de provocar morte neuronal, com aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, e desregulação da BHE, com a possibilidade de aumentar a entrada de mais partículas virais para o parênquima cerebral, exacerbando os problemas neurológicos (87).

1.16 Vesículas extracelulares: uma via alternativa da neurodegeneração

Quase todas as células vivas libertam vesículas extracelulares (VEs) que facilitam e modulam a comunicação intercelular carregando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A designação de VEs inclui diferentes tipos de vesículas de membranas secretadas, estruturas de dimensão reduzida (geralmente, na ordem dos nanómetros), formadas por uma dupla camada de lipídios e proteínas que envolvem as moléculas contidas no seu interior. Evidências crescentes sugerem que fatores solúveis e Ves, que fazem parte do secretoma, fornecem uma grande contribuição para a atividade parácrina, gerando um microambiente tecidual que pode ser benéfico ou neurotóxico (125).

Tradicionalmente, VEs são divididos em exossomas e ectossomas (também denominados de microvesículas), baseados nos mecanismos de biogénese e propriedades biofísicas, tal como o tamanho e marcadores das proteínas de superfície. Embora tenham sido identificados vários fatores como responsáveis pela neurodegeneração associada ao HIV, a ideia de que a patogénese desta doença pode ser acelerada ou mediada por exossomas e pelas respetivas cargas associadas tem ganho uma elevada importância (126). Exossomas são pequenas partículas homogéneas, com dimensões compreendidas entre 30 e 100 nm formados a partir de membranas endossomais e libertados pela maioria das linhagens celulares do SNC, cuja composição e conteúdo dependem da origem celular. Ectossomas são estruturas heterogéneas delimitadas por uma bicamada fosfolipídica, sendo a sua composição muito semelhante à da célula de origem e a sua

dimensão varia entre 100 e 1000 nm. No entanto, para além destes dois subtipos também podem ser libertados pelas células corpos apoptóticos, vesículas e partículas de membrana semelhantes a exossomas. Estas vesículas são libertadas pelas células, permitindo a sinalização e comunicação entre as células. Sendo responsáveis pelo transporte de macromoléculas, nomeadamente ácidos nucleicos (DNA, mRNAs e microRNAs - miRNAs), proteínas funcionais (incluindo as de origem viral) e outros produtos celulares (Figura 10) (127,128). Além disso, podem atuar como mensageiros parácrinos que afetam as células adjacentes ou como mensageiros endócrinos que circulam na corrente sanguínea (126).

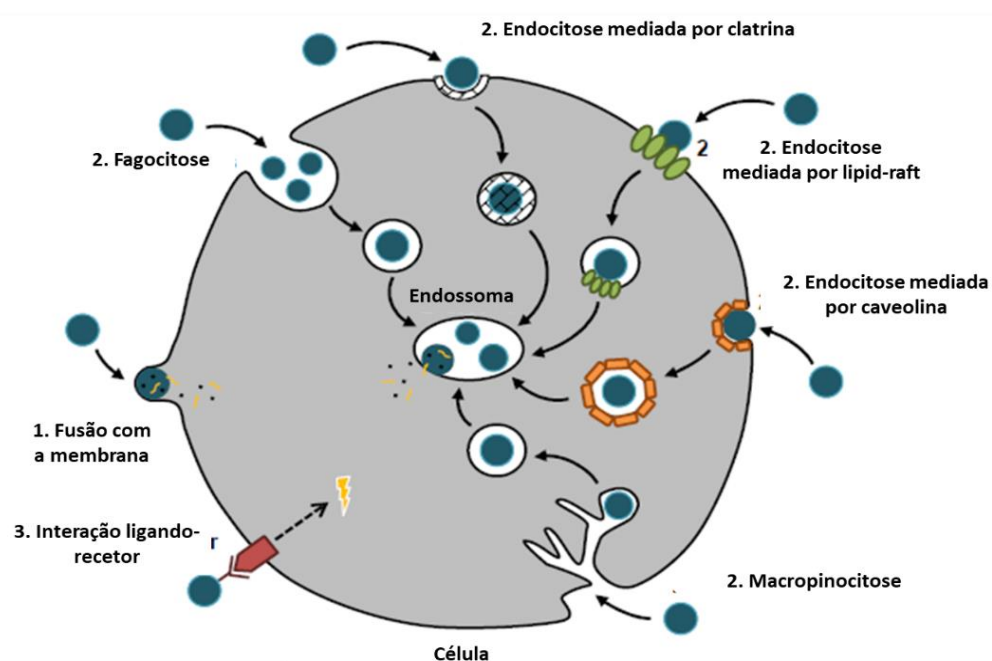


Figura 10: Entrada de exossomas nas células. Exossomas libertados pelas células podem invadir células vizinhas, transferindo proteínas e espécies de RNA funcionais, induzindo alterações na célula receptora. A adesão de exossomas à célula receptora ocorre através da interação entre proteínas de superfície dos exossomas e receptores celulares. Desta forma, torna-se capaz de transferir o seu conteúdo para o citoplasma da célula receptora (1), ser endocitado por fagocitose, micropinocitose e por clatrina, caveolina (2), ou pode induzir a transdução de sinal por meio da interação ligando-receptor (3). (Adaptado de Pinto, 2016) (156)

As VEs estão presentes na maioria dos fluidos biológicos, como fluido sinovial, leite materno, sangue, urina e saliva. VEs também desempenham papéis noutras condições

patológicas, como em doenças inflamatórias, através da libertação de citocinas, e na progressão tumoral, facilitando a disseminação de células cancerígenas e metástases (129,130).

A hipótese do “Exossoma de Troia” sugere que os exossomas têm capacidade para facilitar a disseminação viral de uma forma independente de recetor e independente do Env, fornecendo aos retrovírus e outros vírus a possibilidade de explorar vias intracelulares de transporte vesicular (131). Embora a disseminação viral por via exossomas seja considerado um processo de baixa eficiência e anteriormente desvalorizado, este continua a ser um modo de infeção importante devido às implicações que apresenta na modulação da resposta imunitária do hospedeiro. Demonstra, através da presença de partículas virais no interior dos exossomas, que os retrovírus têm capacidade para contornar a resposta imunitária adaptativa, podendo ajudar a explicar a resistência a anticorpos neutralizantes. Poderá ser esta a razão pela qual as vacinas contra antigénios retrovirais não são suscetíveis de fornecer proteção profilática (132).

Ao longo dos anos, evidências acumuladas demonstram que diversos tipos de células têm capacidade de secretar VEs, incluindo células neuronais e da glia. A transferência de exossomas para os neurónios é mediada por oligodendrócitos, micróglia e astrócitos, capazes de atuar ao nível dos neurónios ou disseminar a doença. Atualmente, existem evidências de que vesículas extracelulares secretadas por neurónios e glia, incluindo exossomas derivados de endossomas e fragmentos da membrana plasmática celular, desempenham um papel fundamental na comunicação intercelular e na neuroinflamação transportando mRNA, miRNA e proteínas. O percurso desde o momento da infeção, capaz de provocar inflamação, à neuroinflamação pode ser observado na Figura 11. Desta forma pode salientar-se que VEs têm a capacidade de interferir na patogénese e disseminação de doenças inflamatórias, além do seu potencial como biomarcadores e veículos terapêuticos (125,130).

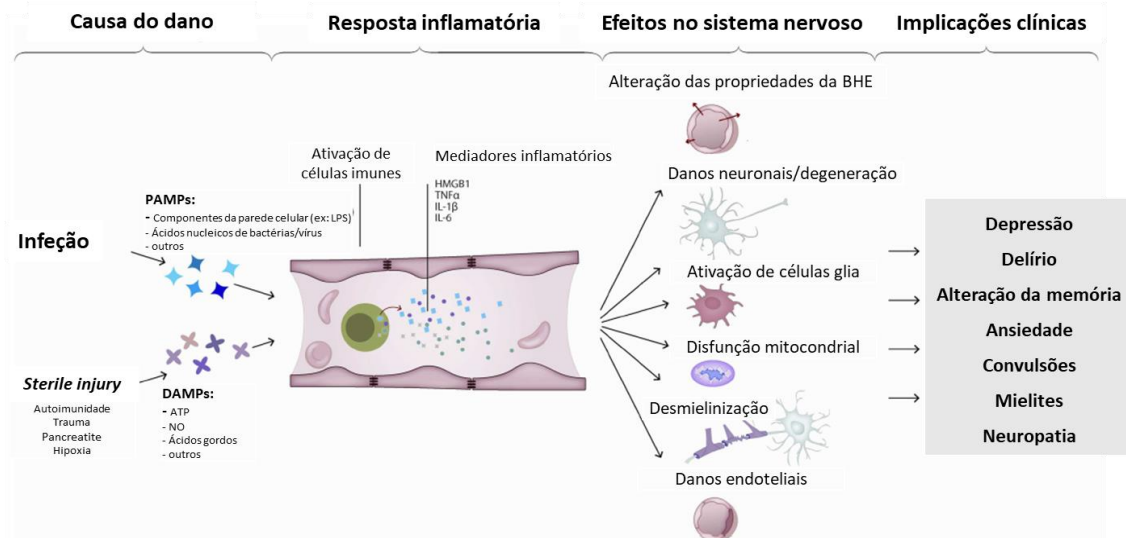


Figura 11: A inflamação causada pela infecção leva à neurodegeneração: a inflamação sistêmica pode ser ativada pela ação de PAMPs e DAMPs, resultantes da atividade de patógenos ou danos causados. Por sua vez, as células imunes periféricas (por exemplo, monócitos) e centrais (por exemplo, micróglia) são ativadas, aumentando a produção e liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e outros péptidos imunologicamente ativos. Como consequência desde acontecimentos podem gerar disfunções neuronais, interferindo na homeostase neuronal ou perturbando o meio neuronal. (Adaptado de Sankoski, 2015)

As vesículas extracelulares constituem uma família heterogênea de partículas que são segregadas para o meio extracelular por uma grande variedade de células e, que em conjunto com os fatores solúveis constituem o secretoma. Estas vesículas transportam diversas moléculas, incluindo proteínas, hormonas, lípidos e ácidos nucleicos, podendo desempenhar diversas funções e são secretadas por mecanismos como a translocação. As proteínas secretadas nos seres humanos representam 13 a 20% de todo o proteoma e incluem fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, proteases e receptores. Além da carga proteica, componentes não proteicos, como lípidios, micro-RNAs e RNA mensageiro, também podem ser secretados pelas células através de microvesículas (133,134).

1.16.1 Papel das vesículas extracelulares no Sistema Nervoso Central

No Sistema Nervoso Central, as VEs estão envolvidas na comunicação entre as diferentes células neurais, incluindo neurónios e células da glia. Neste compartimento as

VEs exercem diferentes funções neurobiológicas, como é o exemplo da sobrevivência neuronal e a modulação da atividade sináptica (135).

Diferentes estudos têm vindo a demonstrar implicações geradas pelos exossomas libertados pelas diferentes células, nomeadamente: uma maior tolerância a condições de stress, com consequente aumento da viabilidade neuronal associado aos oligodendrócitos (136); funções como a regulação da excitabilidade neuronal, início de respostas agudas inflamatórias e a mediação de respostas imunes ao nível da micróglia; funções ao nível da neuroinflamação e neuroproteção em condições de elevada atividade neuronal e stress oxidativo em astrócitos (135); regulação da plasticidade neuronal em neurónios (137).

As vesículas extracelulares contribuem também para a patogénese de diversas doenças neurodegenerativas, como são o exemplo da doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, caracterizadas pela deposição de agregados proteicos no cérebro (138).

1.16.2 O papel das vesículas extracelulares na disseminação do HIV

A comunicação célula-a-célula por parte das VEs assume um papel importante na disseminação do HIV para regiões não afetadas devido à capacidade de transmitirem fatores neurotóxicos e outros agentes causadores de doença. Células produtivamente infetadas são capazes de libertar virões de HIV no interior de vesículas extracelulares cuja biogénese, tamanho e propriedades físicas são semelhantes às dos retrovírus.

As VEs parecem influenciar as infeções virais, ainda que os dados sobre os efeitos das VEs na infeção viral *in vivo* sejam controversos e os mecanismos desses efeitos ainda estejam por investigar. Anush e colaboradores, detetaram a presença de um número significativo de exossomas libertados por células infetadas por HIV que carregam a gp120 (Env), sugerindo que VEs que transportem Env parecem facilitar a infeção pelo HIV em tecidos linfóides Humanos (139). Outros estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a presença de Nef em vesículas extracelulares, tendo como função aumentar a produção de VEs as quais posteriormente utiliza para se disseminar. Entre os componentes virais transportados pelas VEs encontraram também a proteína Gag, cujos efeitos em células não infetadas são atualmente desconhecidos (140). Desta forma, as VEs poderão constituir um novo alvo terapêutico para a estratégia antiviral.

1.17 Objetivos

Perante a necessidade de desenvolver terapêuticas e ferramentas que travem o avanço de doenças neurodegenerativas, nomeadamente dar resposta às comorbilidades como a demência associada ao HIV, é importante compreender melhor os mecanismos de neuroinvasão e neuroinflamação associados ao HIV. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo contribuir para elucidar como decorrem as interações entre o HIV e as células da glia, procurando esclarecer os mecanismos patogénicos associados às doenças neurodegenerativas que ocorrem em indivíduos infetados por HIV e o comportamento das células cerebrais como possíveis reservatórios virais. O objetivo específico do trabalho incide em esclarecer alguns dos mecanismos utilizados pelo HIV para invadir e persistir no SNC, bem como compreender a infeção das células neste compartimento.

No intuito de responder a este paradigma é fundamental compreender de que forma, no contexto da infeção por HIV, a comunicação e interação entre monócitos, linfócitos T CD4+, macrófagos perivasculares, micróglia, astrócitos e células neuronais, promove e amplifica a infeção viral.

Resumidamente, os objetivos específicos do presente trabalho são:

- i. Compreender como se estabelece a infeção das diferentes populações celulares pelas diferentes estirpes primárias de HIV-1 e HIV-2 em estudo, e em que condições a infeção é mais eficaz (infeção *cis*: contacto célula-célula ou infeção *trans*: através de uma barreira física);
- ii. Esclarecer de que forma é mediada a infeção das células da micróglia e astrócitos pelos secretomas produzidos por diferentes células do SNC e corrente sanguínea (linfócitos T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos) infetadas por diferentes estirpes de HIV-1 e HIV-2.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Neste estudo foram seleccionadas estirpes, disponíveis na Viroteca-Seroteca da *Host-Pathogen Interaction Unit* (HPIU) do iMed.Ulisboa (Instituto de Investigação do Medicamento da Universidade de Lisboa), de acordo com os seguintes critérios: (i) utilização de coreceptores (CCR5 vs. CXCR4), e (ii) estadio clínico da infeção (sintomático ou assintomático) (141). Essas estirpes foram: HIV-1^{UCFL1032}, HIV-1^{UCFL1034}, HIV-2^{UCFL2074} e HIV-2^{UFCL2072}; podemos encontrar as características dos diferentes isolados primários na tabela 5.

Tabela 5: Identificação do estadio clínico e biótipo dos diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2.

Isolado	Estadio clínico	Biótipo
UCFL1032	?	X4
UCFL1034	Assintomático	R5
UCFL2074	ND	R5X4
UCFL2072	ND	X4

ND: não definido; ?: sem informação

2.2 Populações celulares

2.2.1 Separação de células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleadas do sangue periférico foram obtidas a partir de *buffy coats* de dadores saudáveis, cedidos pelo Instituto Português do Sangue. Inicialmente procedeu-se à sua diluição numa solução de *MACS Buffer* (tampão de lavagem) (diluição de 1:1). Esta solução é composta por tampão fosfato salino (PBS – *Invitrogen, UK*) pH=7,2 suplementado com 0,5% de soro bovino fetal (SBF – *GE Hyclone, UK*) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – *Invitrogen, UK*) a 2mM.

O isolamento das CMSP foi feito através do método do gradiente de Ficoll. Resumidamente, adicionou-se o volume de sangue na proporção de 2:1 ao Ficoll-PaqueTMPlus (*GE Hyclone, UK*), obtendo-se duas fases distintas de acordo com a

densidade das mesmas. Seguiu-se uma centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha), obtendo-se um anel celular esbranquiçado correspondente às CMSP, como representado esquematicamente na Figura 12.

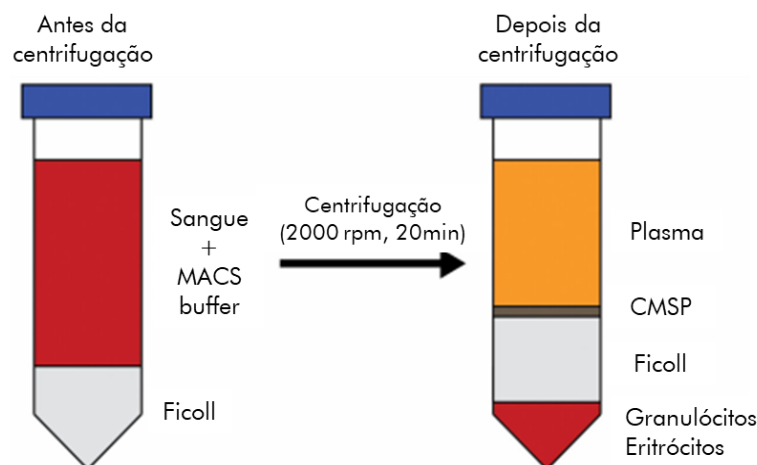


Figura 12: Representação esquemática da separação do sangue periférico humano pelo método do gradiente de Ficoll, antes e após a centrifugação. (adaptado de Mücke and Seidman, 2019)

Recolheu-se o anel celular correspondente à camada de CMSP para um tubo de 50 mL e perfurou-se até ao volume de 40 mL com tampão de lavagem. Com o objetivo de eliminar os resíduos de Ficoll, plasma e outras impurezas, efetuou-se uma primeira centrifugação a 1500 rpm, durante 15 min (5810R, Eppendorf, Alemanha), e de seguida outra centrifugação a 1000 rpm durante 10 min, ambas a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha).

As CMSP foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, UK) suplementado com 15% de SBF (GE Hyclone, UK), L-glutamina 200 mM (GE Hyclone, UK), fungizona 250 µg/mL (GE Hyclone, UK) e gentamicina 50 mg/mL (GE Hyclone, UK). A contagem foi feita a partir de uma diluição de 1:10 da suspensão celular com solução de Turk, que permite distinguir as células mononucleadas, numa câmara de Neubauer (142).

Assim, para calcular o número de células na amostra inicial utilizamos a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{número total de células}}{\text{número de quadrantes}} \times 10^5 \times V_{\text{suspensão celular}}$$

As CMSP obtidas foram colocadas em cultura durante três dias numa densidade celular de 2×10^6 /mL de meio, a 37°C com 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 suplementado como descrito anteriormente. Ao meio foi também adicionado fitohemaglutinina (PHA) numa concentração de 3 µg/mL de meio, para estimulação das células e, portanto, potenciar a sua atividade mitótica para gerar novas células. Após esse período, as culturas de células foram recolhidas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha). As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com interleucina-2 (IL-2; NIH AIDS, EUA) numa concentração de 20 U/mL e colocadas novamente em cultura. A IL-2 tem como função promover a maturação dos linfócitos T CD4⁺ e o aumento da expressão do receptor CCR5 à superfície da célula.

Até ao dia da sua utilização para infeção com HIV, o meio RPMI 1640 suplementado foi substituído sempre que necessário e de acordo com as suas necessidades.

2.2.2 Isolamento de células T CD4⁺

As células T CD4⁺ foram obtidas através de separação imunomagnética, por seleção negativa, recorrendo-se ao kit *CD4⁺ T Cell Isolation Kit, human* (MACS® Miltenyi Biotec, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (143).

Resumidamente, ressuspenderam-se as CMSP em 2,3 mL de MACS buffer e 200 µl de *Biotin-Antibody Cocktail* (composto pela mistura de anticorpos monoclonais anti CD8a, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD132, TcRγ/δ e CD235a (Glicoforina A), conjugados com biotina). Incubou-se 30 minutos a 4°C, com agitação. Após esse tempo adicionou-se 2,1 mL de MACS buffer e 400 µl *Anti-Biotin Microbeads*

(microesferas conjugadas com anticorpo monoclonal anti-biotina e anticorpo monoclonal anti-CD61) e voltou a incubar-se durante 30 minutos a 4°C. Após a incubação adicionou 12 mL de MACS buffer e centrifugou-se a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C (5810R, Eppendorf, Alemanha). O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 5 mL de *MACS buffer*.

As células T CD4⁺ foram obtidas por seleção negativa através da passagem da suspensão celular por uma coluna LS magnética (MACS® *Cell Separation Columns*, Miltenyi Biotec, Alemanha). Uma vez eluída a suspensão celular, lavou-se a coluna para recolher as células T CD4⁺ ainda retidas. A totalidade do volume obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha) e, o *pellet* resultante foi ressuspensionado em meio RPMI 1640, suplementado como anteriormente descrito. As células foram contadas com a solução de azul de tripan (Sigma Aldrich, EUA), que permite distinguir as células viáveis das não viáveis, numa diluição de 1:10 e a concentração celular foi ajustada para 2x10⁶/mL de meio. As células foram ativadas com 3 µg de PHA por mL de meio (SIGMA, EUA) e mantidas em cultura com o meio anteriormente descrito.

2.2.3 Isolamento de monócitos e diferenciação em macrófagos

O isolamento de monócitos (CD14⁺) foi igualmente realizado por separação imunomagnética com o kit *CD14⁺ T Monocyte Isolation Kit* (MACS® Miltenyi Biotec, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (144).

Após o isolamento das CMSP adicionaram-se 4,6 mL de *MACS buffer* e 400 µL de microesferas CD14⁺ (anticorpo monoclonal CD14 conjugado com micropartículas magnéticas). Incubou-se durante por 30 minutos a 4°C, com agitação; após a incubação, foram adicionados 12 mL de *MACS buffer* e centrifugou-se a 1300 rpm, por 10 minutos a 4°C (5810R, Eppendorf, Alemanha), e ressuspendeu-se o *pellet* obtido em 5 mL de *MACS buffer*.

Como foi referido anteriormente, as células CD14⁺ foram isoladas por seleção positiva através da passagem da suspensão celular por uma coluna LS magnética (MACS® *Cell Separation Columns*, Miltenyi Biotec, Alemanha). Após a passagem da suspensão celular, retirou-se a coluna do suporte magnético e adicionou-se 5 mL de

MACS buffer. Aguardou-se que 2 mL passassem a coluna pela ação da gravidade e o restante volume foi forçado com o êmbolo. O volume recolhido foi centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha) e, o *pellet* resultante foi ressuspenso no meio RPMI Glutamax não suplementado. As células foram contadas com recurso à solução de azul de tripan (Sigma Aldrich, EUA) (diluição 1:10) e incubadas durante 2/3h, com 5% de CO₂ de modo a permitir a sua adesão.

Após a incubação, verificou-se a aderência de pelo menos 90% dos monócitos ao plástico e adicionou-se meio RPMI Glutamax suplementado duas vezes para compensar o meio não suplementado em que estas células se encontravam. Os suplementos foram adicionados nas seguintes concentrações: 10% SBF, 1 mM de piruvato de sódio (GE Hyclone, EUA), 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GE Hyclone, EUA), 50 mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, UK) e 20 ng/mL de *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF, Immunotools, Alemanha). As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

Um método alternativo para isolar monócitos é o da técnica de aderência ao plástico. Desta forma, a partir da contagem das CMSP colocaram-se as células em cultura com meio RPMI Glutamax (Invitrogen, UK) não suplementado durante três horas a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS aquecido de modo a eliminar as células não aderentes e mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, UK) suplementado duas vezes como descrito anteriormente.

Para qualquer uma das metodologias descritas, ao fim de quatro dias fez-se a manutenção da cultura de macrófagos, adicionando-se meio novo. Após sete dias os macrófagos encontram-se diferenciados e podem ser utilizados nos ensaios de infeção.

2.2.4 Cultura das linhas celulares de micróglia e astrócitos

As linhas celulares representativas do sistema nervoso central utilizadas foram: uma linha celular de micróglia (denominada CHME-3), cedida pelo grupo *Neuron-Glia in Health and Disease*, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; e, uma linha celular de astrócitos (SGV-mm), cedida pela Prof^a Doutora Ana Miguel Matos do *Chemical Engineering Processes and Forest Products Research Center* da Faculdade de

Farmácia da Universidade de Coimbra. A linha celular de CHME-3 foi obtida através da imortalização de uma cultura de células primária de micróglia fetal humana, enquanto SGV-mm foram obtidos de células gliais fetais imortalizadas, ambas com recurso a um mutante do vírus símio 40 (SV40, poliomavírus) (145).

Relativamente à cultura das linhas celulares de micróglia (CHME-3) e astrócitos (SGV-mm), começou-se por descongelar alíquotas de ambas as linhas celulares num banho a 37°C para que a descongelação fosse rápida de modo a evitar possíveis lesões nas membranas celulares causadas pelos cristais de gelo quando existe uma descongelação parcial. Depois de descongeladas, a suspensão celular foi adicionada a um tubo de 15 mL contendo 10 mL de DMEM.

Misturou-se a suspensão celular por inversão e centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 minutos, a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha), para eliminar o meio com sulfóxido de dimetilo (DMSO – Fisher Bioreagents, EUA), que acima dos 4°C torna-se tóxico para as células. O *pellet* celular obtido foi ressuscitado em meio DMEM suplementado de acordo com o tipo de linha celular e a suspensão foi colocada num frasco de cultura T75 e colocado na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF (GE Hyclone, UK), 10 UI/mL penicilina/estreptomicina (GE Hyclone, UK), 2mM de L-Glutamina (GE Hyclone, UK) e 2,5% de fungizona (GE Hyclone, UK). Ao meio para a linha celular de astrócitos foi ainda adicionado 50 µg/mL de gentamicina (GE Hyclone, UK).

As linhas celulares foram tripsinizadas (método que permite a dissociação das células e a sua libertação do suporte sólido) quando o tapete celular era de aproximadamente 90% de confluência. Resumidamente, retirou-se o meio de cultura e lavou-se o tapete celular com PBS (Invitrogen, UK) sem cálcio nem magnésio e com 5% de SBF. Depois de retirado o tampão de lavagem, foram adicionados 3 mL de tripsina pré-aquecida a 37°C, agitou-se suavemente o frasco de forma a que a tripsina cobrisse todo o tapete celular e descartou o excesso de tripsina. Os frascos de cultura foram colocados a incubar na estufa a 37°C durante o tempo necessário para as células se dissociarem.

Após a dissociação das células, adicionou-se meio DMEM suplementado, de acordo com o tipo de linha celular, para inibir a ação da tripsina. Transferiu-se a

suspensão celular para um tubo de 15 mL e centrifugou-se a 1500 rpm, durante 5 minutos a 20°C (5810R, Eppendorf, Alemanha), eliminando assim a tripsina. O *pellet* celular obtido foi diluído em meio de acordo com as necessidades das diferentes linhas celulares e, posteriormente, para contagem das células utilizou-se o corante azul de tripan (Sigma Aldrich, EUA), numa diluição de 1:10. Colocou-se uma quantidade da suspensão celular num novo frasco para que se formasse um novo tapete celular e incubou-se a 37°C com 5% de CO₂.

As células que não foram utilizadas foram posteriormente congeladas num meio de congelação constituído por 90% de SBF e 10% de DMSO (Fisher BioReagents, Canadá), em ampolas de congelação na concentração de 5×10^6 células/mL. O DMSO foi adicionado em último, deixando escorrer lentamente pela parede do criotubo. A congelação foi feita com recurso ao Mr.FrostyTM (Nalgene, Thermo Scientific, EUA), um recipiente com parede dupla que contém isopropanol e que permite uma taxa de arrefecimento de -1°C/minuto até atingir -80°C, ótima para a preservação celular. Com o recipiente refrigerado colocaram-se as ampolas e depois foi colocado a -80°C.

2.3 Ensaios de infecciosidade

2.3.1 Infecção de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetada/os com HIV

Nos ensaios de infecciosidade, com duração de sete dias, foram utilizados os isolados primários HIV-1_{UCFL1032}, HIV-1_{UCFL1034}, HIV-2_{UCFL2074} e HIV-2_{UFCL2072}. A Figura 13 apresenta uma representação esquemática do ensaio correspondente à infecção *trans* de micróglia e astrócitos por células da micróglia ou astrócitos pré-inoculadas durante 3h com as diferentes estirpes de HIV, nas várias condições utilizadas e que serão em seguida descritas.

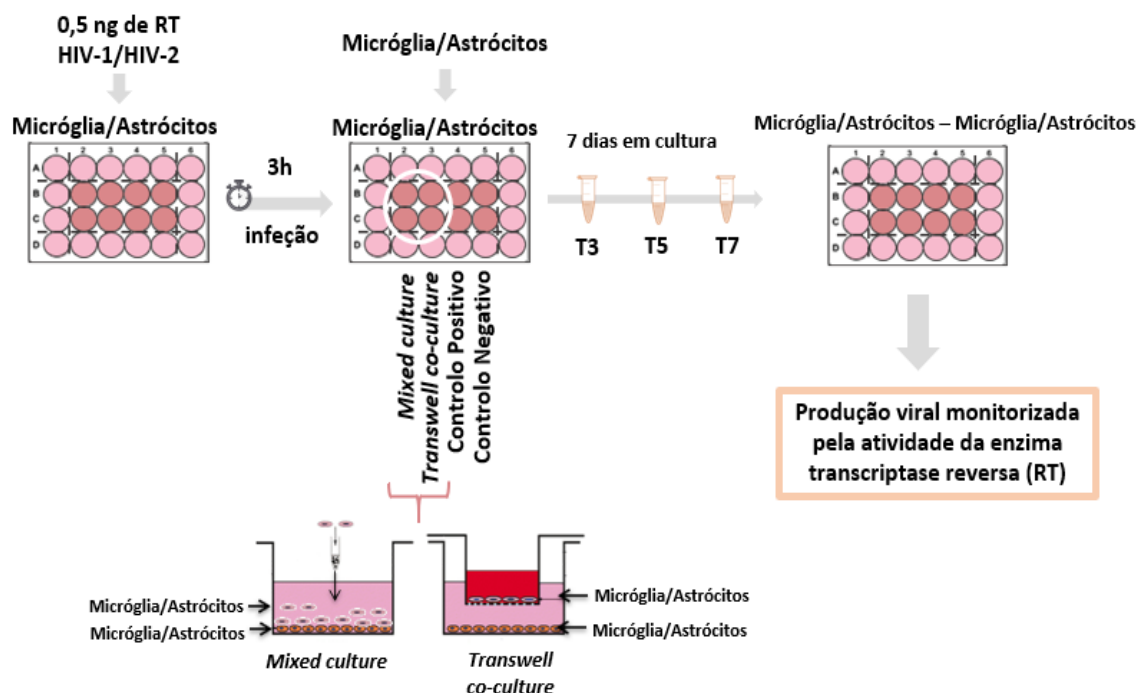


Figura 13: Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade das células do SNC por células idênticas infectadas com diferentes isolados primários de HIV. As células dadoras e as células-alvo (micróglia/astrocitos – micróglia/astrocitos) foram mantidas em cultura durante sete dias; em duas condições distintas: *mixed culture* ou *transwell co-culture*, sendo recolhidas amostras do secretoma produzido aos dias três, cinco e sete.

No dia anterior à infecção, foram plaqueadas as linhas celulares CHME-3 e SGV-mm em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e incubadas durante 24 h a 37°C com 5% de CO₂.

No dia da infecção (dia 0), procedeu-se à descongelação dos vírus a 37°C e, em seguida as células dadoras em placa foram inoculadas com a mesma concentração dos diferentes isolados primários de HIV (0,5 ng/mL de RT), na presença de polibrene (SIGMA®, EUA) numa concentração de 3 mg/mL. O polibrene é um polímero catiónico capaz de neutralizar a repulsão de cargas entre os virões e a superfície da célula, aumentando a eficiência da infecção retroviral. Após inoculação, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 3 horas. Posteriormente, removeu-se o inóculo e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio e magnésio, suplementado com 5% de SBF.

As células-alvo (micróglia ou astrócitos) foram adicionadas às células dadoras (micróglia ou astrócitos) na proporção 1:1 (5×10^5 células/poço), tendo sido mantidas num volume final de 500 µl do meio/poço. As células foram mantidas em duas condições: *mixed cultured* (co-cultura que permite o contacto célula dadora-célula alvo) e *transwell co-culture* (cultura com separação física entre células dadoras e células alvo). Para comprovar a capacidade infecciosa das diferentes estirpes de HIV, foi realizada a infeção *cis* das diferentes populações celulares (controles positivos), assim como a cultura destas diferentes populações não-infetadas (controlo negativo). As células foram mantidas em cultura durante sete dias a 37°C com 5% de CO₂. Ao longo do ensaio foram recolhidas amostras do sobrenadante de cultura aos dias três, cinco e sete.

As amostras foram quantificadas pela atividade da RT no sobrenadante de cultura, através do kit *Reverse Transcriptase Assay, colorimetric* (Roche, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2 Ensaio de infecciosidade com secretomas produzidos em T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos

Com a finalidade de identificar quais os componentes do secretoma que medeiam a infeção de células do sistema nervoso foi necessário produzir secretomas por diferentes populações celulares. Com esse objetivo, infetaram-se células T CD4+, macrófagos, micróglia e astrócitos com diferentes isolados virais de HIV-1 e HIV-2. Posteriormente, os secretomas obtidos foram utilizados para infetar células da micróglia e astrócitos. Na Figura 14 encontra-se uma representação esquemática do ensaio, desde a produção de secretomas à infeção de novas células, sendo em seguida explicadas as metodologias utilizadas.

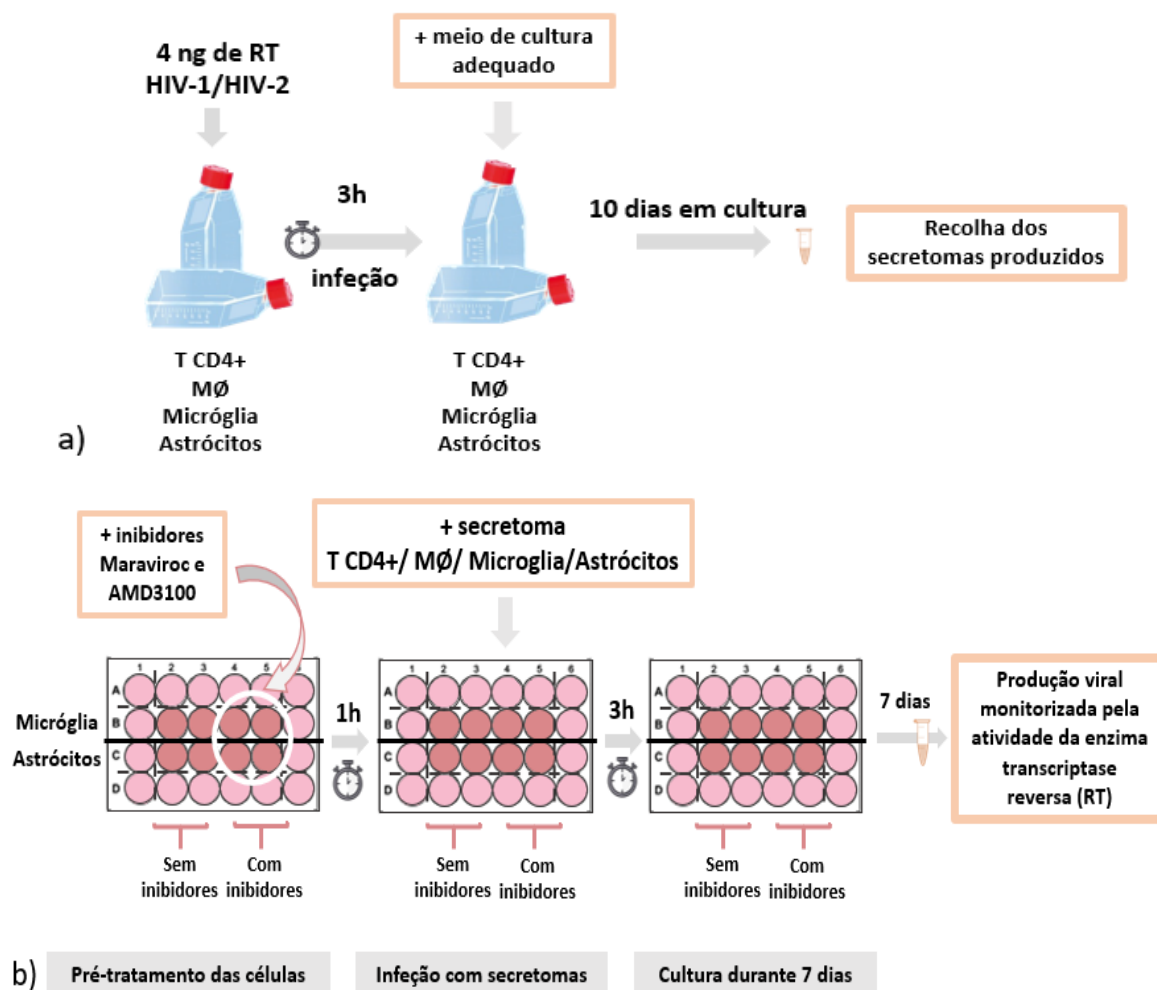


Figura 14: Representação esquemática dos ensaios de infecciosidade com os secretomas.

a) Primeiramente, foram infectadas células T CD4+, macrófagos (MØ), micróglia (CHME) e astrócitos (SGV) com diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2. Estas culturas foram mantidas durante dez dias. b) infecção de células da micróglia e astrócitos com os secretoma produzidos e, na presença ou ausência de inibidores de entrada (Maraviroc e AMD3100).

Os secretomas foram obtidos a partir da infecção de T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos com os isolados virais utilizados nos ensaios anteriores. A densidade celular foi ajustada para que no dia da infecção tivéssemos 1×10^6 células/T25 de macrófagos/ micróglia/ astrócitos e 10×10^6 células/T25 de linfócitos T CD4+. Todos os frascos de cultura foram colocados na estufa a 37°C com 5% de CO₂ até ao momento da infecção.

No dia da inoculação (dia 0), retirou-se todo o volume de meio e adicionaram-se os inóculos virais das diferentes estirpes de HIV numa concentração de 4 ng/mL de cada

inóculo viral e, na presença de 3 mg/mL polibrene (SIGMA®, EUA). Após inoculação, os frascos foram colocados na estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 3 horas num volume mínimo de forma a facilitar a infeção. Posteriormente, de acordo com a densidade celular, adicionou-se meio de cultura adequado ao tipo celular e a produção de secretomas foi mantida durante dez dias, a 37°C com 5% de CO₂.

Numa segunda parte do ensaio com o objectivo de compreender se a infeção estava ou não a ser mediada por partículas virais infecciosas procedeu-se à incubação de células da micróglia e astrócitos com os secretomas produzidos por diferentes populações celulares. Em paralelo, células da micróglia e astrócitos foram pré-tratados durante 1h com os inibidores de entrada Maraviroc e AMD3100 (antagonistas de CCR5 e CXCR4, respetivamente) antes da inoculação com os secretomas.

Em semelhança dos ensaios anteriores, no dia anterior à infeção colocaram-se em placas de 24 poços as células da micróglia e astrócitos numa densidade celular de $1,5 \times 10^5$ células/poço. As placas foram incubadas 37°C com 5% de CO₂ durante aproximadamente 24 horas.

No dia da infeção (dia 0), pré-trataram-se as células com os inibidores Maraviroc (NIH AIDS, EUA), e AMD3100 (Quimigen, ES) na concentração de 2 µM, durante 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação retiraram-se os inibidores e inocularam-se as células com 500 µL de secretoma (produzido em células TCD4+, MØ, micróglia e astrócitos infetadas com diferentes estirpes de HIV). Incubou-se durante 3 horas a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, lavaram-se as células duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio e magnésio, com 5% de SBF. Por fim, adicionou-se aos poços 500 µL de meio com ou sem inibidores, consoante a condição. De dois em dois dias foi reposta a concentração de cada inibidor.

Ao fim de sete dias recolheram-se os secretomas e estes foram quantificados pela atividade da RT no sobrenadante de cultura, através do kit *Reverse Transcriptase Assay, colorimetric* (Roche, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Quantificação da atividade da RT

A atividade da RT foi quantificada recorrendo-se ao kit *Reverse Transcriptase Assay, colorimetric* (Roche, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e como representado na Figura 15 (146).

Resumidamente, procedeu-se ao isolamento de partículas virais nos sobrenadantes obtidos através da centrifugação das amostras a 22.000 g por 2h a 4°C. Com a finalidade de solubilizar as partículas virais, o *pellet* obtido foi ressuspensionado em tampão de lise e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionada a mistura de reação possibilitando a transcrição, por incubação da solução a 37°C. O ensaio imunoenzimático de Transcriptase Reversa, para a determinação quantitativa da atividade da transcriptase reversa retroviral baseia-se na incorporação de nucleótidos dUTP marcados com digoxigenina e biotina na mesma molécula de DNA.

A deteção e quantificação do DNA sintetizado segue um protocolo ELISA sanduíche, dividido em três etapas: a adição da solução com o DNA marcado com biotina à microplaca revestida com estreptavidina, incubada por 1h a 37°C; após várias lavagens com o tampão de lavagem, foi adicionado à placa um anticorpo para digoxigenina, conjugado com peroxidase (anti-DIG-POD), seguindo-se uma nova incubação de 1h a 37°C. Na etapa final, após as lavagens, o substrato de peroxidase ABTS é adicionado e a enzima peroxidase catalisa a clivagem do substrato para produzir um produto de reação colorido. A quantificação do produto é feita por análise espectrofotométrica através da leitura a 405 nm no *Infinite M200* (TECAN, Switzerland). A absorvância das amostras está diretamente correlacionada ao nível de atividade de RT na amostra.

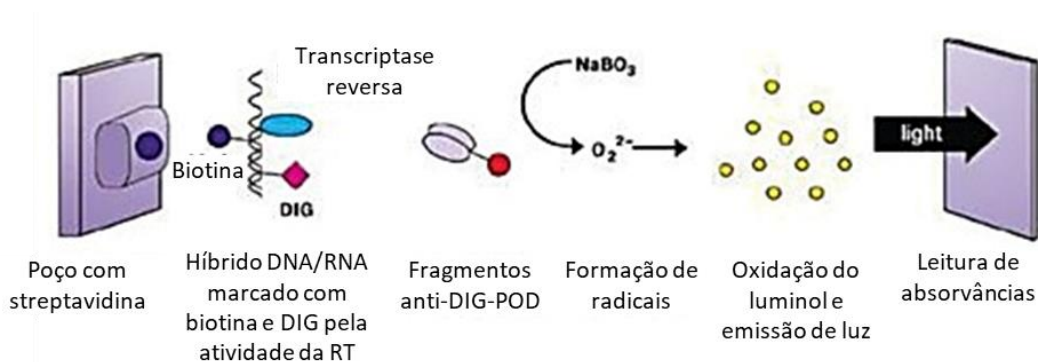


Figura 15: Representação esquemática do princípio do teste para quantificação da atividade da enzima transcriptase reversa (RT).

3. Resultados e discussão

3.1 Ensaios de infecciosidade

Os ensaios de infecciosidade realizados tiveram como objetivo elucidar os mecanismos envolvidos na neuroinvasão e neurodisseminação do HIV no SNC. Numa primeira abordagem pretendeu-se compreender de que forma a infecção de diferentes populações de células do sistema nervoso, micróglia e astrócitos, pelas estirpes em estudo (HIV-1_{UCFL1032}, HIV-1_{UCFL1034}, HIV-2_{UCFL2074} e HIV-2_{UCFL2072}) se processava, e em que condições a infecção era favorecida (*mixed culture* ou *transwell co-culture*). Numa segunda parte do estudo utilizaram-se os secretomas produzidos por células T CD4+, macrófagos, micróglia e astrócitos, com o objetivo de tentar identificar se a infecção em células gliais ocorria e se esta seria devido às partículas virais ou a outros componentes constituintes dos secretomas.

3.1.1 Infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infectada com HIV

Com o objetivo de compreender de que forma é favorecida a propagação da infecção no sistema nervoso central manteve-se em co-cultura as células-dadoras (micróglia infectada com HIV) e células-alvo (micróglia e astrócitos), com e sem separação física entre elas (Figura 16).

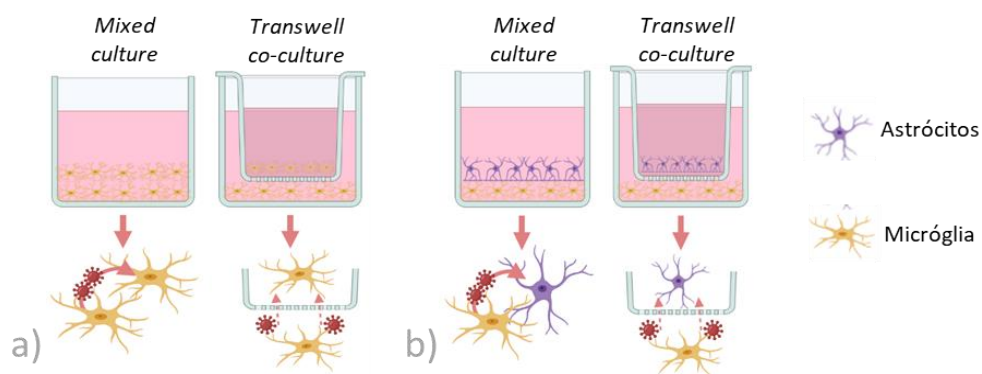


Figura 16: Representação das diferentes condições de cultura, quando as células dadoras são células da micróglia infectada por diferentes isolados primários de HIV e as células alvo são: a) micróglia e b) astrócitos.

Os resultados para as diferentes estirpes demonstraram que todas as células alvo foram infectadas, com exceção de astrócitos na condição em que existia uma barreira física (sistema *transwell*) com micróglia infectada por HIV-2_{UCFL2074}, como se observa na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da infecção *trans* de micróglia e astrócitos por micróglia infectada com diferentes estirpes de HIV.

	Infeção <i>trans</i>			
	Células dadoras	Células alvo	<i>Mixed culture</i>	<i>Transwell co-culture</i>
HIV-1 _{UCFL1032}	Micróglia	Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	+
HIV-1 _{UCFL1034}		Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	+
HIV-2 _{UCFL2074}		Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	-
HIV-2 _{UCFL2072}		Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	+

+ : infecção produtiva; - : ausência de infecção

Apesar dos resultados demonstrarem que houve infecção em ambas as condições é necessário observar se existem diferenças no que diz respeito a níveis de replicação para os diferentes isolados nas duas condições. Nas figuras seguintes (Figuras 17 e 18), podemos observar a evolução da infecção *trans* de micróglia e astrócitos por micróglia infectada pelo HIV-1_{UCFL1032} ou por HIV-1_{UCFL1034}.

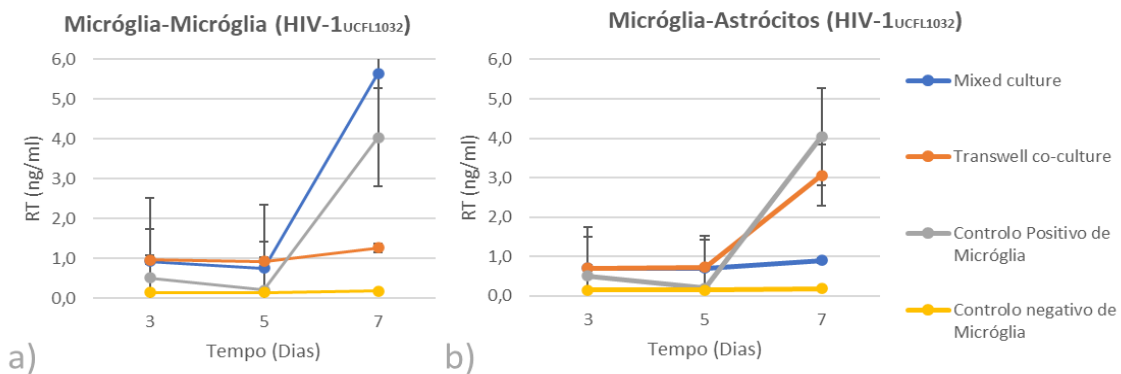


Figura 17: Evolução da infecção de micróglia e astrócitos por micróglia infectada por HIV-1_{UCFL1032}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

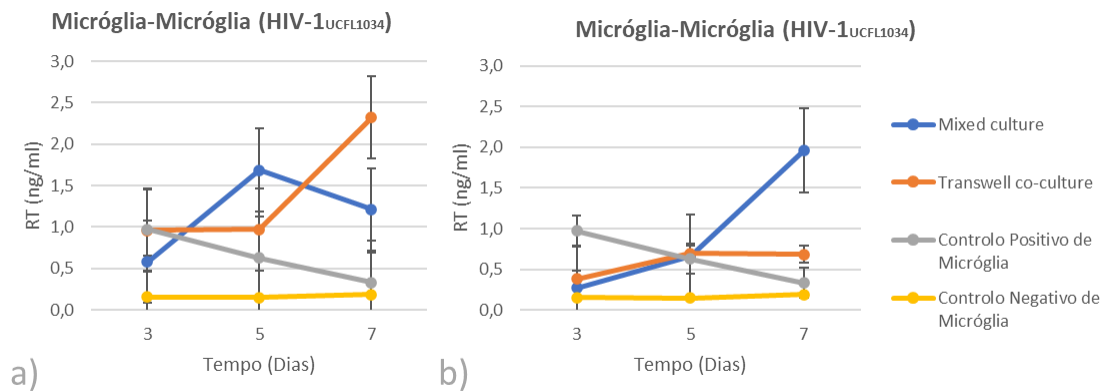


Figura 18: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por micróglia infetada por HIV-1_{UCFL1034}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

Os gráficos obtidos demonstram uma evolução crescente da replicação viral em células infetadas ao longo do tempo, com exceção do que ocorre na condição de *mixed culture* na cultura de células da micróglia envolvendo a estirpe HIV-1_{UCFL1034}. A replicação viral em células da micróglia (células dadoras e recetoras: micróglia) inoculadas com a estirpe HIV-1_{UCFL1032} é superior na condição de *mixed culture*, de aproximadamente 6,0 ng/mL, ao fim de sete dias. Para a mesma estirpe, ao mesmo dia sendo os astrócitos as células alvo, a replicação viral é superior na condição de *transwell co-culture*, sendo esta de 3,0 ng/mL ($p=0,634$). Sugere-se assim, que a infeção por HIV-1_{UCFL1032} é favorecida pelo contacto entre células do mesmo tipo (micróglia-micróglia) e por barreira física quando as células alvo são diferentes (micróglia-astrócitos). A preferência por células da micróglia poderá dever-se à abundância de células da micróglia e à capacidade destas células na sua forma ativa promoverem a migração e ativação de outras células da micróglia. Além disso, os astrócitos expressam baixa quantidade dos receptores envolvidos na entrada do HIV comparativamente a outras células, nomeadamente micróglia (147).

As culturas que envolvem células inoculadas com HIV-1_{UCFL1034} parecem comportar-se de forma oposta nos dias cinco e sete para ambas as células alvo, sendo a replicação superior ao dia sete na condição de infeção *trans*, quando as células alvo são micróglia (aproximadamente 2,5 ng/mL); enquanto ao mesmo dia mas para células alvo astrócitos a replicação viral é superior para infeção em *cis* (aproximadamente 2,0 ng/mL) ($p=0,669$). Considerando que no decorrer dos dias se verifica uma redução da replicação

viral no controlo positivo podemos dizer que a disseminação do vírus é favorecida em qualquer uma das condições, sendo privilegiada a co-cultura em *transwell* para culturas em que as células dadoras e recetoras são as mesmas (micróglia-micróglia) e, *mixed culture* quando as células são diferentes (micróglia-astrócitos). Esta diferença poderá ser explicada, em parte devido ao biótopo das estirpes: X4 para HIV-1_{UCFL1032} e R5 para HIV-1_{UCFL1034}, mediante os coreceptores expressados pelas células em cultura. Quando estão envolvidos astrócitos na cultura temos de ter em conta que estes expressam os coreceptores CXCR4 e CCR5 em baixas quantidades, sendo que CCR5 pode nem ser expresso, pelo que quando a cultura envolve astrócitos observa-se uma menor taxa de replicação em comparação com cultura que envolva exclusivamente células da micróglia. Contudo, astrócitos infetados podem ser transitoriamente ativados por citocinas inflamatórias, levando à produção de viriões capazes de infetar outras células do SNC.

Ainda relativamente aos resultados obtidos para a co-cultura de células da micróglia em *transwell*, estudos anteriores descreveram que as células da micróglia podem libertar quimiocinas capazes de bloquear a entrada viral nas células. Ou seja, ainda que as células da micróglia possam ser consideradas alvos preferenciais para a infeção comparativamente aos astrócitos, o contacto célula-a-célula poderá resultar numa infeção não produtiva. Contudo, a presença da membrana (sistema *transwell*) poderá impedir que as quimiocinas libertadas pelas células atravessem os poros ou mesmo que atravessem não atuem da mesma forma sobre outras células em cultura mantendo o decurso esperado da infeção (147).

Tal como para as estirpes de HIV-1 também se analisou a infeção em *trans* de micróglia e astrócitos por micróglia inoculada com as seguintes estirpes seleccionadas: de HIV-2 seleccionadas: HIV-2_{UCFL2074} e HIV-2_{UCFL2072}, cujos resultados obtidos são apresentados nas Figuras 19 e 20.

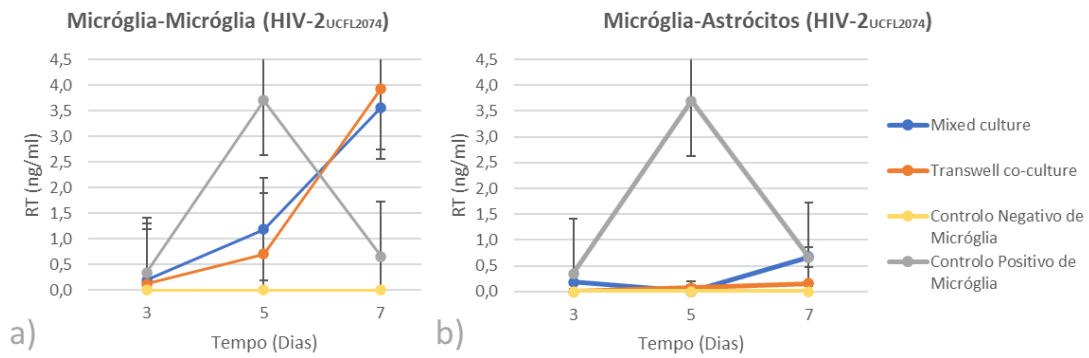


Figura 19: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por micróglia infetada por HIV-2_{UCFL2074}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

No que diz respeito à replicação viral em co-culturas nas quais as células dadoras eram células da micróglia inoculadas com HIV-2_{UCFL2074}, observou-se que esta atinge o pico máximo da replicação ao sétimo dia tanto na infeção em *cis* (3,5 ng/mL) como em *trans* (4,0 ng/mL) ($p = 0,9695$). No entanto o mesmo não se observa quando as células alvo são astrócitos, em que a replicação viral é muito inferior (< 1 ng/mL). É interessante salientar que células de micróglia infetadas com a estirpe de HIV-2_{UCFL2074} (controlo positivo) atingem um valor de RT superior a 3,5 ng/mL ao quinto dia da infeção, seguindo-se de uma redução abrupta da replicação, podendo isso dever-se ao efeito citopático do vírus em estudo. Assim, no que diz respeito à disseminação e tendo em conta os resultados obtidos para a estirpe HIV-2_{UCFL2074}, esta parece ocorrer de forma idêntica para ambas as condições de cultura em ambas as células alvo. Porém a disseminação parece ser apenas potenciada pela comunicação entre células do mesmo tipo (micróglia-micróglia), o que poderá ser apoiado pelo biótipo desta estirpe (R5X4). Pois os coreceptores envolvidos na entrada do vírus na célula são mais abundantes em células da micróglia quando comparados a astrócitos.

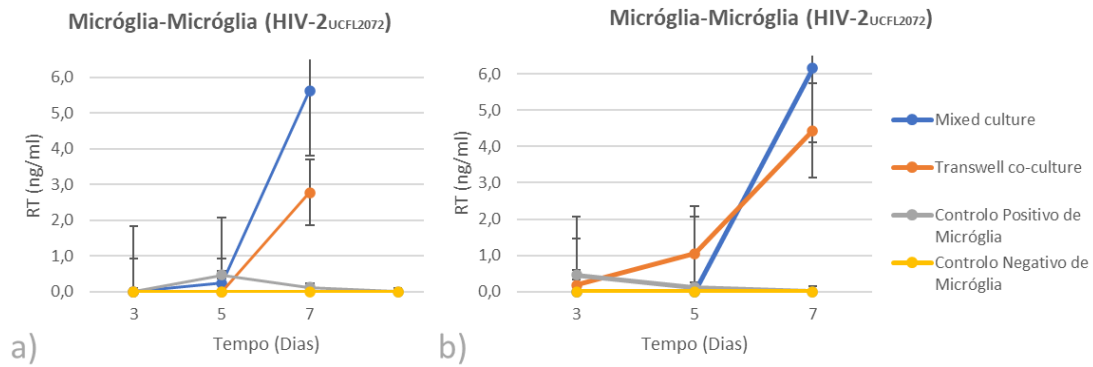


Figura 20: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por micróglia infetada por HIV-2UCFL2072, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

No caso em que as células da micróglia foram inoculadas com HIV-2UCFL2072, verificou-se uma replicação viral superior quando as células alvo são astrócitos. Na co-cultura de micróglia-micróglia em que não existia uma separação física a replicação viral é aproximadamente de 6,0 ng/mL e, quando separadas por membrana é de 3,0 ng/mL ($p=0,650$). No caso dos astrócitos em *mixed culture* o valor é idêntico (6,0 ng/mL) mas quando na presença de membrana têm o valor de aproximadamente 4,5 ng/mL ($p=0,949$). Pelo que, independentemente das células alvo, é privilegiado o contacto entre as células em cultura para potenciar a disseminação da infeção, ainda que a replicação viral seja elevada para ambas as condições de cultura. As diferenças ao nível da replicação viral para ambas as estirpes não é concordante face ao esperado uma vez que a estirpe HIV-2UCFL2074 tem tropismo para ambos os coreceptores enquanto HIV-2UCFL2072 tem apenas para CXCR4. Ou seja, seria expectável que a replicação viral fosse superior para as culturas que envolvem células da micróglia, e mais evidente quando estivesse envolvida a estirpe HIV-2UCFL2074. Contudo, poderão estar envolvidas outras vias de entrada que não envolvam o uso de coreceptores.

3.1.2 Infeção de micróglia e astrócitos por astrócitos infetados com HIV

Utilizando as mesmas estirpes de HIV (HIV-1UCFL1032, HIV-1UCFL1034, HIV-2UCFL2074 e HIV-2UCFL2072) e à semelhança do ensaio anterior, procedeu-se à co-cultura de células da micróglia e astrócitos com astrócitos pré-inoculados com as diferentes estirpes de HIV (Figura 21).

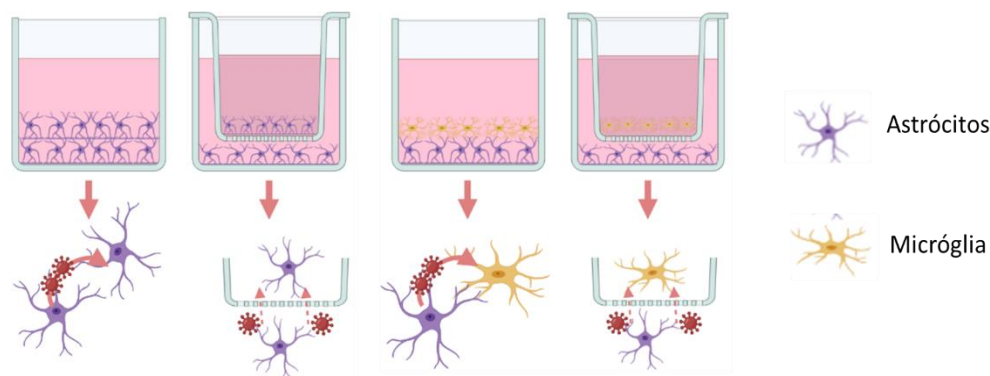


Figura 21: Representação das diferentes condições de cultura, quando as células dadoras são células da micróglia infectada por diferentes isolados primários de HIV e as células alvo são: a) astrócitos e b) micróglia.

A inoculação de células neurogliais com astrócitos infectados por diferentes isolados de HIV-1 e HIV-2, após 7 dias, demonstrou que na maioria dos isolados e para as diferentes condições resultou na infecção dessas mesmas células (Tabela 7). Os casos em que não se detetou replicação viral produtiva foram: células dadoras (astrócitos) infectadas com HIV-1_{UCFL1034} em ambas as condições, *mixed culture* e *transwell co-culture*, co-cultivadas com micróglia e astrócitos; células dadoras infectadas com HIV-2_{UCFL2072} na condição *mixed culture*, co-cultivadas com micróglia e astrócitos.

Tabela 7: Resultados da infecção *trans* de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados com diferentes estirpes de HIV.

	Infecção <i>trans</i>			
	Células dadoras	Células alvo	<i>Mixed culture</i>	<i>Transwell co-culture</i>
HIV-1 _{UCFL1032}	Astrócitos	Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	+
HIV-1 _{UCFL1034}		Micróglia	-	-
		Astrócitos	+	+
HIV-2 _{UCFL2074}		Micróglia	+	+
		Astrócitos	+	+
HIV-2 _{UCFL2072}		Micróglia	-	+
		Astrócitos	-	+

+ : infecção produtiva; - : ausência de infecção

Nas figuras seguintes (Figuras 22, 23, 24 e 25), podemos observar a evolução da infeção *trans* de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados pelas diferentes estirpes.

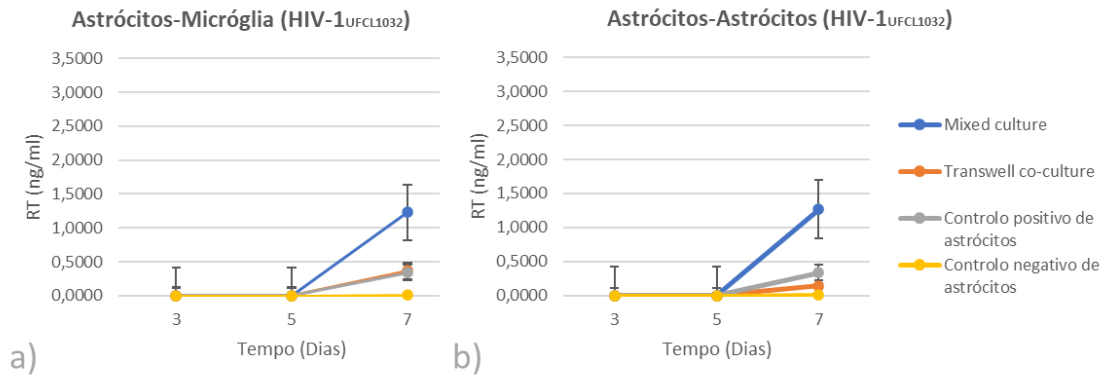


Figura 22: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-1_{UCFL1032}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

Observou-se, no caso da estirpe de HIV-1_{UCFL1032}, que a replicação viral para as células alvo micróglia e astrócitos parece ser idêntica para a condição *mixed culture* (próxima de 1,5 ng/mL, ao sétimo dia). Na condição de *transwell co-culture* a replicação é semelhante, contudo é igual ou inferior ao controlo positivo, pelo que não podemos afirmar que houve infeção das células receptoras. Desta forma, note-se que para a estirpe HIV-1_{UCFL1032} a infeção ocorrerá maioritariamente através do contacto entre as células sejam elas micróglia ou astrócitos, expostos a astrócitos infectados. Comparativamente ao que se observou quando as células dadoras eram células da micróglia, partindo de astrócitos infectados verifica-se uma replicação viral inferior, porém idêntica para ambas as células alvo. No caso, concreto de astrócitos enquanto células alvo é muito interessante verificar-se que a infeção resulta do contacto entre células idênticas e, que mesmo possuindo uma menor expressão de coreceptores o comportamento é idêntico ao que acontece em micróglia.

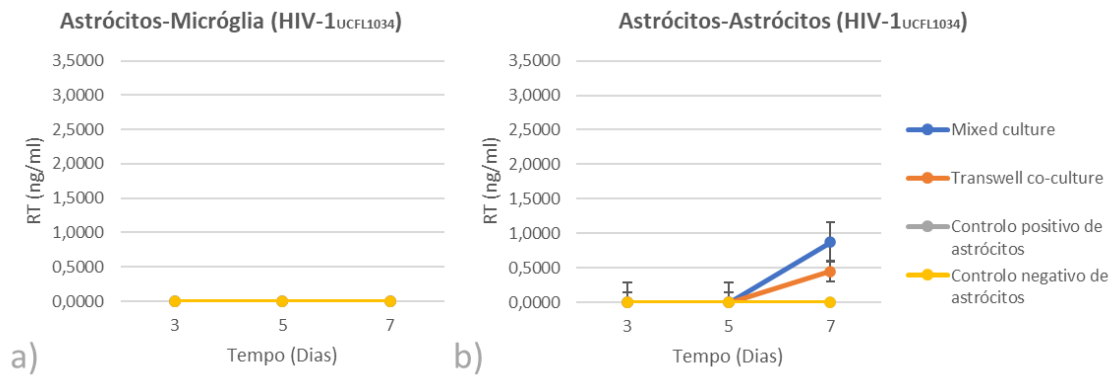


Figura 23: Evolução da infeção de micrógli e astrócitos por astrócitos infetados por HIV-1_{UCFL1034}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

Relativamente aos resultados obtidos com a estirpe UCFL1034, verificou-se que apenas houve replicação viral na condição em que ambas as células, dadoras e alvo, eram astrócitos. Sendo de 0,5 ng/mL para *transwell co-culture* e 1,0 ng/mL para *mixed culture* ($p = 0,696$). Desta forma, poderia coloca-se a hipótese de não ter ocorrido infeção e daí a ausência de resultados ou, por outro lado e com maior concordância face aos resultados visíveis no gráfico da Figura 23b supõe-se que o vírus possa estar presente nas células dadoras (astrócitos) na sua forma latente. Estando o vírus na sua forma latente não há replicação, porém quando em cultura com células idênticas (astrócitos) e ao fim de alguns dias, o vírus terá induzido a formação de partículas virais infecciosas capazes de invadir outras células, sendo a infeção favorecida pelo contacto entre elas. Em concordância com os resultados obtidos, estudos realizados por Xiaoyu Luo e colaboradores permitiram demonstrar que apenas o contacto célula-a-célula resulta no estabelecimento bem-sucedido da infeção por HIV em astrócitos. Mais surpreendentemente, demonstraram que a infeção de astrócitos por HIV leva a um nível tão baixo de replicação persistente nos astrócitos que apenas o contacto celular é capaz de recuperar os vírus infecciosos da progenitura. Pois, apesar de não permitir a infeção de linfócitos T CD4⁺ os vírus podem ser transmitidos continuamente aos linfócitos T CD4⁺ através do contacto celular. Estas descobertas sugerem que a replicação de HIV em astrócitos é competente, embora a um nível extremamente baixo (148).

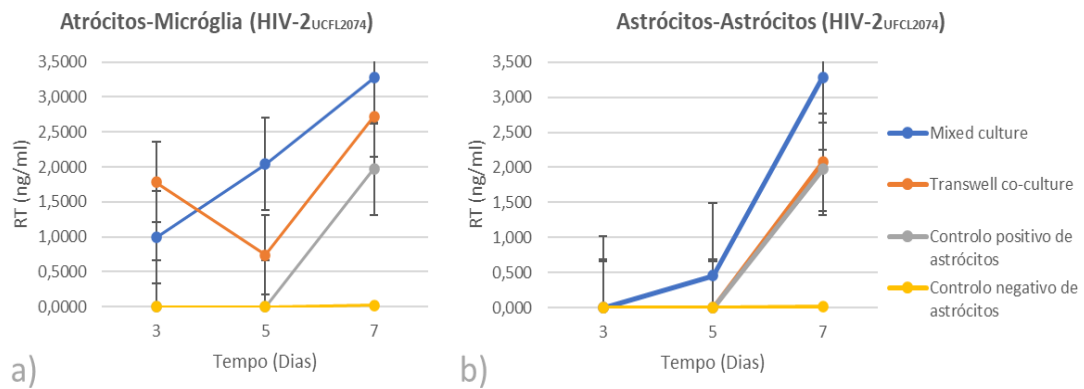


Figura 24: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por astrócitos infectados por HIV-2_{UCFL2074}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

A infeção promovida por astrócitos inoculados com HIV-2_{UCFL2074} em co-cultura com micróglia apresentam valores de RT, ao sétimo dia, de aproximadamente 3,0 ng/mL e 3,5 ng/mL ($p=0,707$) para *transwell co-culture* e *mixed culture*, respetivamente. Os resultados obtidos quando as células alvo são astrócitos, ao sétimo dia, apresentam valores próximos aos da cultura com micróglia: de 2,0 ng/mL e aproximadamente 3,5 ng/mL ($p=0,679$) para *transwell co-culture* e *mixed culture*, respetivamente. A replicação viral é idêntica e elevada para micróglia e astrócitos (células alvo), sendo a infeção potenciada pelo contacto entre células.

No seguimento e, em concordância com o raciocínio apresentado para HIV-1_{UCFL1034}, os astrócitos tendem a apresentar-se como potenciais reservatórios virais, sendo desencadeada a ativação do vírus mais tardiamente ou pela presença de células não infectadas, como demonstram os resultados das culturas nas diferentes condições quando a estirpe envolvida é HIV-2_{UCFL2074}.

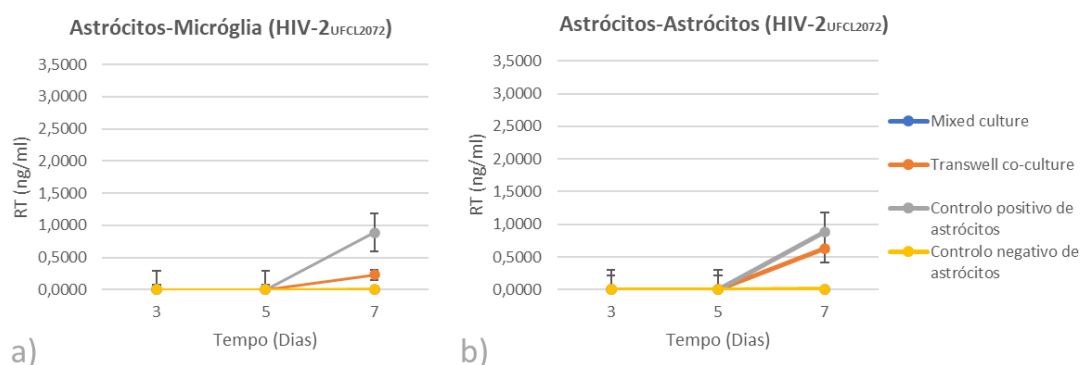


Figura 25: Evolução da infeção de micróglia e astrócitos por astrócitos infetados por HIV-2_{UCFL2072}, nas condições de *mixed culture* e *transwell co-culture*, ao longo de sete dias.

Na infeção mediada por astrócitos infetados com HIV-2_{UCFL2072} não houve replicação viral na condição *mixed culture* e, no caso de *transwell co-culture* a replicação é inferior à do controlo positivo que como anteriormente referido corresponde a astrócitos infetados com a estirpe HIV-2_{UCFL2072}. Considerando os resultados apresentados pode-se colocar como hipótese que se o ensaio continuasse haveria elevada probabilidade de se detetar uma taxa de replicação superior. Isto, porque parece que a estirpe em causa possa ser menos infecciosa comparativamente às restantes.

Analizando tanto os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos por micróglia como por astrócitos, infetados pelas diferentes estirpes, os resultados demonstram na sua maioria que a disseminação da infeção é favorecida pelo contacto entre células (*mixed culture*), tal como podemos ver na tabela 8.

Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetados com diferentes estirpes de HIV, assinalando-se a cinzento a condição da cultura que apresentou valores de RT (ng/mL) superiores.

	Micróglia – Micróglia		Micróglia – Astrócitos		Astrócitos – Micróglia		Astrócitos – Astrócitos	
	MC	TW	MC	TW	MC	TW	MC	TW
HIV-1 _{UCFL1032}	6,0	1,0	1,0	3,0	1,5	0,5	1,5	--
HIV-1 _{UCFL1034}	1,0	2,5	2,0	0,5	--	--	1,0	0,5
HIV-2 _{UCFL2074}	3,5	4,0	0,5	--	3,5	3,0	3,5	2,0
HIV-2 _{UCFL2072}	6,0	3,0	6,0	4,0	--	0,5	--	0,5

MC: *mixed culture*; TW: *transwell co-culture*; --: ausência de infeção

Na mesma tabela podemos observar que independentemente da estirpe utilizada a infecção ocorrerá essencialmente entre células idênticas quando em contacto, ou seja na condição de *mixed culture* (MC) para micróglia-micróglia e astrócitos-astrócitos. Além disso, observa-se maior replicação viral quando as células envolvidas são células da micróglia, nomeadamente para as estirpes HIV-1_{UCFL1032} e HIV-2_{UCFL2072}. Assim, mais uma vez os astrócitos apresentam-se como possíveis reservatórios virais, ou seja, retêm maioritariamente o vírus na sua forma latente (148).

3.1.3 Ensaio de infecciosidade com secretomas produzidos por células T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos

A cultura de micróglia e astrócitos mantida durante sete dias após o contacto direto com os secretomas anteriormente produzidos por células T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores de entrada Maraviroc e AMD3100 (inibidores de CCR5 e CXCR4, respetivamente), pretendeu elucidar de que forma decorre o percurso da infecção no SNC. O princípio do ensaio encontra-se representado esquematicamente na Figura 26.

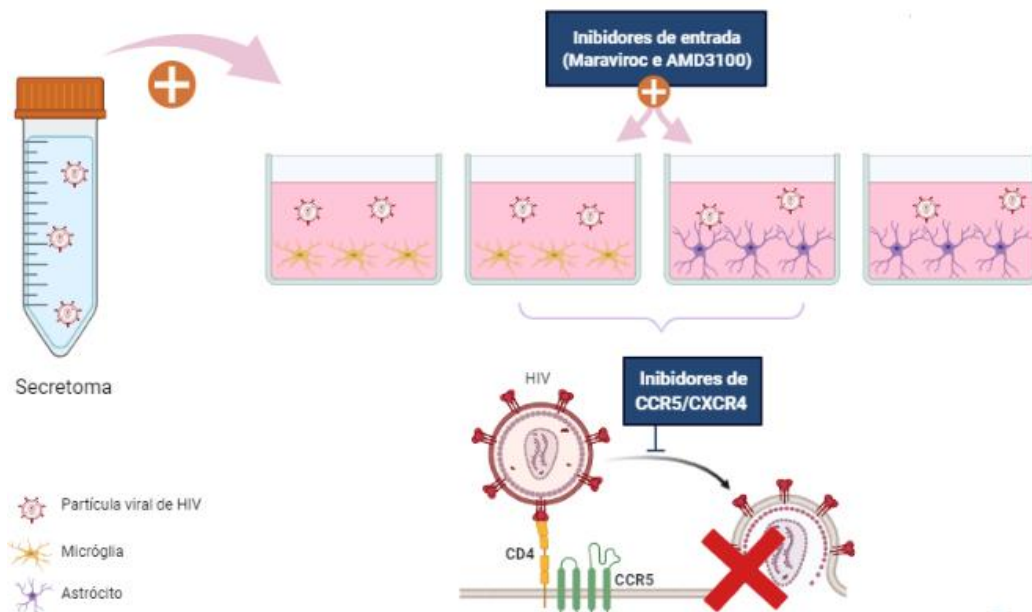


Figura 26: Representação esquemática do princípio do ensaio de infecciosidade de células neurogliais com diferentes secretomas, na presença ou ausência de inibidores de entrada (Maraviroc e AMD3100).

Deste ensaio obtiveram-se resultados muito interessantes, visto que se observou a existência de replicação viral apesar da presença de inibidores. Isto é, uma vez que estão bloqueadas as vias de entrada normais a infecção não estará então a ser mediada por partículas virais, ou mesmo que seja haverá um contributo de outros componentes presentes no secretoma. Não acontece de forma padronizada para todas as estirpes envolvidas, contudo acontece para diferentes secretomas produzidos em diferentes células infetadas com diferentes isolados primários de HIV, conforme podemos observar na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do ensaio de infecciosidade de células neurogliais (micróglia e astrócitos) com diferentes secretomas produzidos em T CD4+, MO, Micróglia e astrócitos, infetados por diferentes isolados primários de HIV-1 e HIV-2.

		Micróglia		Astrócitos	
		Sem inibidores	Com inibidores	Sem inibidores	Com inibidores
Secretoma de T CD4+	HIV-1 _{UCFL1032}	+	+	-	-
	HIV-1 _{UCFL1034}	-	+	-	-
	HIV-2 _{UCFL2074}	+	+	+	+
	HIV-2 _{UCFL2072}	-	-	-	-
Secretoma de MØ	HIV-1 _{UCFL1032}	+	+	-	+
	HIV-1 _{UCFL1034}	-	+	-	-
	HIV-2 _{UCFL2074}	+	-	+	+
	HIV-2 _{UCFL2072}	-	-	+	-
Secretoma de Micróglia	HIV-1 _{UCFL1032}	+	+	-	-
	HIV-1 _{UCFL1034}	-	+	-	-
	HIV-2 _{UCFL2074}	+	-	+	+
	HIV-2 _{UCFL2072}	+	-	+	-
Secretoma de Astrócitos	HIV-1 _{UCFL1032}	-	+	-	-
	HIV-1 _{UCFL1034}	+	+	-	-
	HIV-2 _{UCFL2074}	+	-	+	-
	HIV-2 _{UCFL2072}	-	-	-	-

+ : infeção produtiva; - : ausência de infeção

A totalidade dos sobrenadantes de culturas foram quantificados de acordo com a atividade da enzima RT e os resultados obtidos para cada uma das diferentes estirpes de HIV encontram-se nas Figuras 27 a 30.

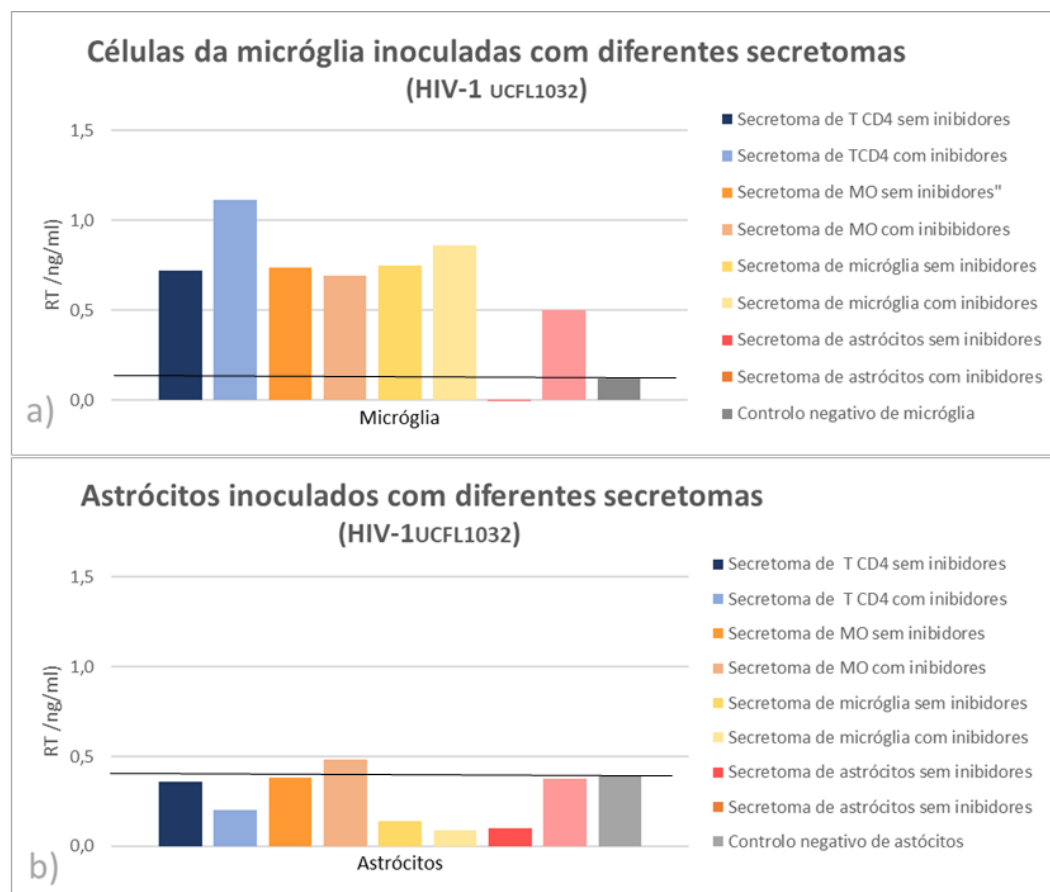


Figura 27: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infeção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-1_{UCFL1032}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b). A linha preta horizontal delimita o valor associado ao controlo negativo, permitindo eliminar o ruído de fundo.

Relativamente aos resultados obtidos para o ensaio de infecciosidade em células da micróglia e astrócitos com os secretomas produzidos por células T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos inoculadas anteriormente com HIV-1_{UCFL1032} observaram-se valores superiores para células da micróglia (valor máximo próximo de 1,0 ng/mL, correspondente ao secretoma de T CD4+ na ausência de inibidores) comparativamente aos sobrenadantes de cultura produzidos por astrócitos (valor máximo aproximado de 0,5 ng/mL, correspondente ao secretoma de MØ na presença de inibidores). Estes resultados

demonstram que em células da micróglia a replicação viral é semelhante quando em contacto com os diferentes secretomas, ainda que em algumas das situações seja ligeiramente superior na presença de inibidores. Pelo que a infeção estará a ser mediada por partículas virais e não só. Contudo, é necessário observar o que acontece para as diferentes células do SNC quando inoculadas com cada um dos secretomas (Figura 28).

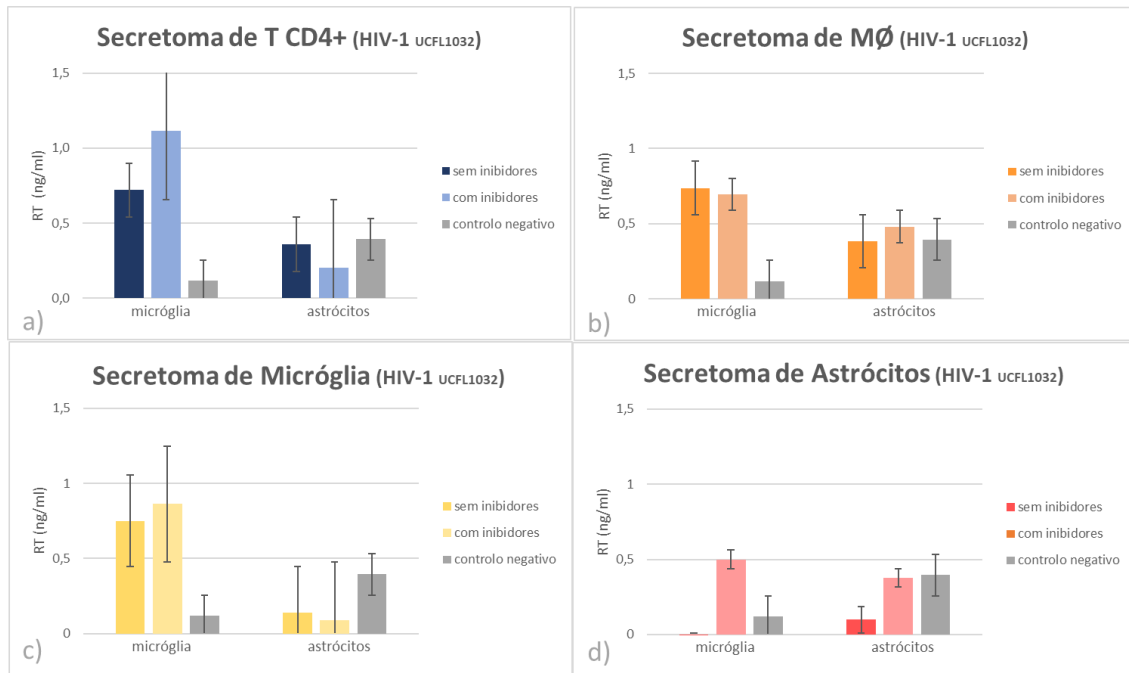


Figura 28: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infeção de diferentes substratos celulares com HIV-1_{UCFL1032}: a) secretoma de T CD4+; b) secretoma de MØ; c) secretoma de Micróglia; d) secretoma de Astrócitos.

Observando os gráficos da Figura 28, é-nos possível constatar que para culturas com células da micróglia a replicação viral é superior na presença de inibidores, exceto para o secretoma obtido de macrófagos infetados, no qual não se verifica uma grande diferença na presença ou ausência de inibidores com este secretoma. Isto sugere que maioritariamente a infeção poderá ser mediada por outros componentes presentes no secretoma que não as partículas virais. Outra hipótese poderá estar relacionada com o uso de outros coreceptores que não foram bloqueados pela ação dos inibidores de entrada utilizados. Para culturas com astrócitos a replicação viral no controlo negativo é sempre

superior às condições em que as células foram expostas aos secretomas obtidos em células T CD4+, astrócitos e micróglia, o que nos leva a pressupor que não houve infecção nestas condições e que o que está a ser detetado é uma interferência inerente ao kit utilizado. Contudo, nas situações em que se observam replicação viral na presença de inibidores terá ocorrido infecção produtiva, porém muito reduzida.

Cada isolado primário tem as suas características e daí a importância de repetir o ensaio com mais do que uma estirpe, assim na Figura 29 observamos os resultados para a estirpe de HIV-2_{UCFL1034} para cada linha celular e, na Figura 30 o ensaio de acordo com cada um dos secretomas utilizados.

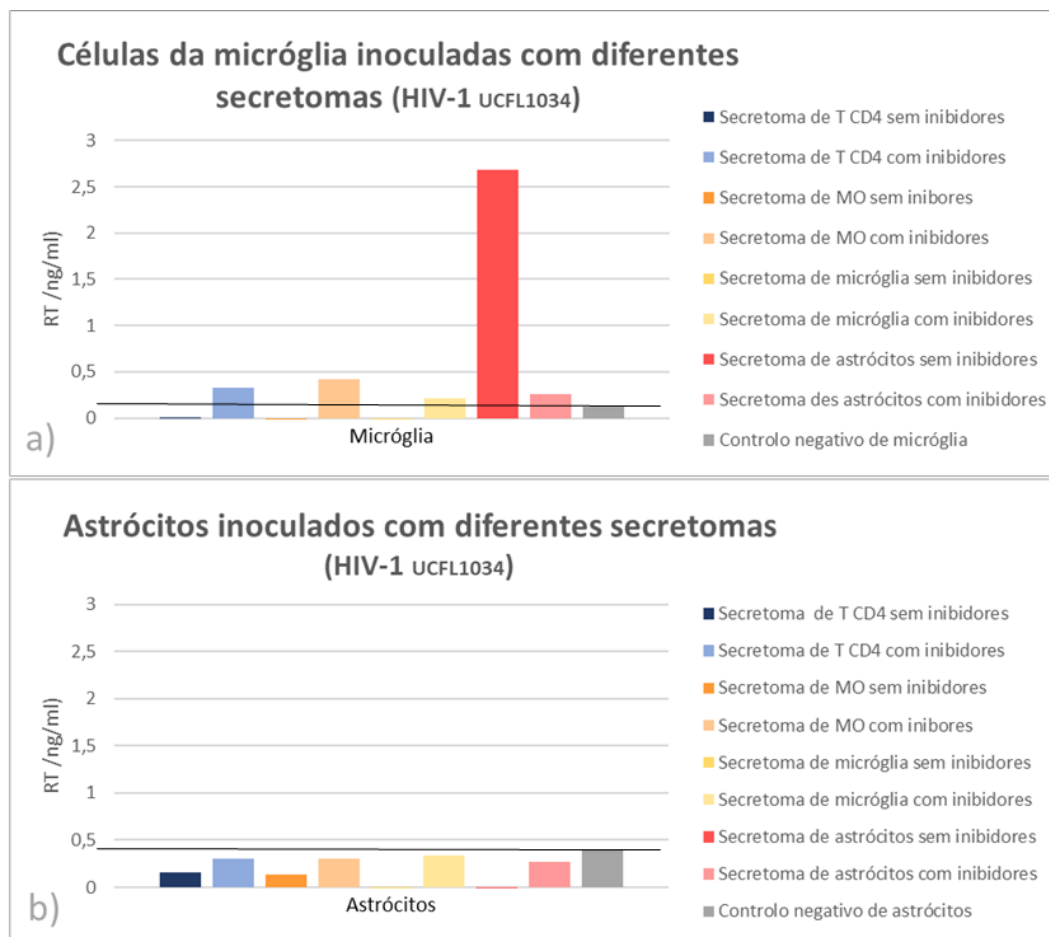


Figura 29: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infecção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-1_{UCFL1034}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b). A linha preta horizontal delimita o valor associado ao controlo negativo, permitindo eliminar o ruído de fundo

Observando os gráficos da Figura 29, é-nos possível constatar que a replicação viral é semelhante nas culturas de micróglia e astrócitos (próximos de 0,5 ng/mL), contudo para micróglia destaca-se replicação viral associada ao secretoma de astrócitos sem inibidores (> 2,5 ng/mL). Contudo no gráfico 29b observa-se que o controlo negativo de astrócitos é superior em todas as condições, não permitindo obter qualquer informação.

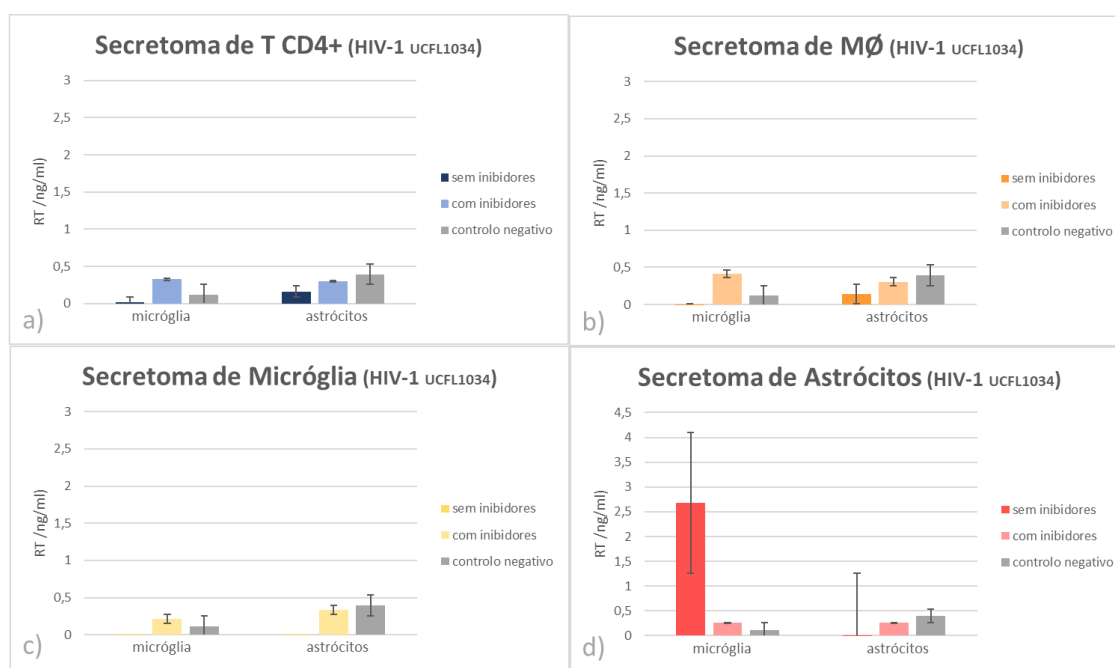


Figura 30: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infeção de diferentes substratos celulares com HIV-1_{UCFL1034}: a) secretoma de T CD4+; b) secretoma de MØ; c) secretoma de Micróglia; d) secretoma de Astrócitos.

Observando os gráficos individuais para cada secretoma e de acordo com o controlo negativo destaca-se apenas a existência de replicação viral para sobrenadantes produzidos por células da micróglia. No que diz respeito a estes sobrenadantes a replicação viral é maioritariamente superior na presença de inibidores, comparativamente ao que acontece na ausência de inibidores, ainda que os valores associados à replicação viral sejam inferiores a 0,5 ng/mL. Existe uma exceção que corresponde à cultura de células da micróglia expostas ao secretoma produzido por astrócitos, cuja replicação viral é superior na ausência de inibidores (aproximadamente 2,5 ng/mL), o que nos leva a

pensar que a infeção estará a ser mediada apenas por partículas virais infecciosas porque ao adicionarmos inibidor existe uma taxa de inibição muito elevada. O sobrenadante de cultura obtido desta infeção em contacto com células da micróglia potenciou consideravelmente a replicação viral.

Em relação aos resultados obtidos para HIV-2, foi possível observar uma maior replicação viral em culturas que envolvam astrócitos, ao invés do que se observa para as estirpes de HIV-1, o que se pode observar na Figura 31 e 32 para ambas as estirpes de HIV-2 testadas.

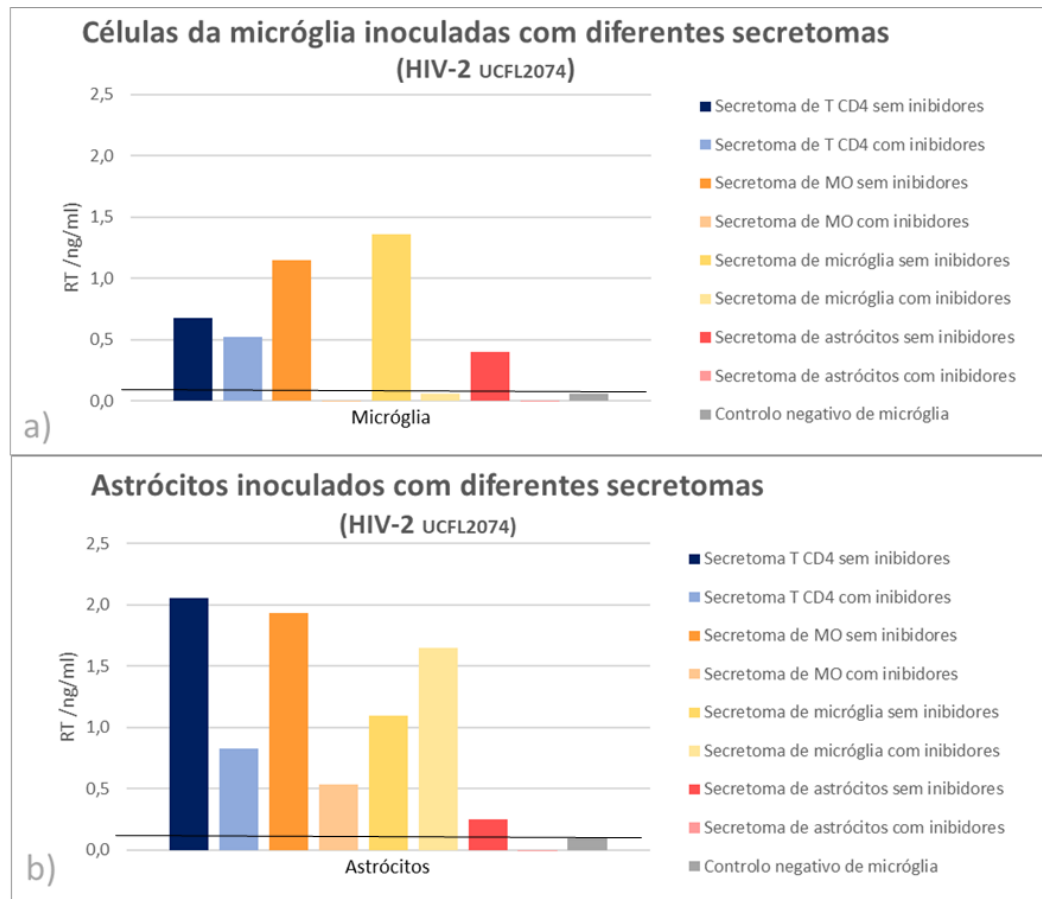


Figura 31: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infeção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-2_{UCFL2074}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b). A linha preta horizontal delimita o valor associado ao controlo negativo, permitindo eliminar o ruído de fundo.

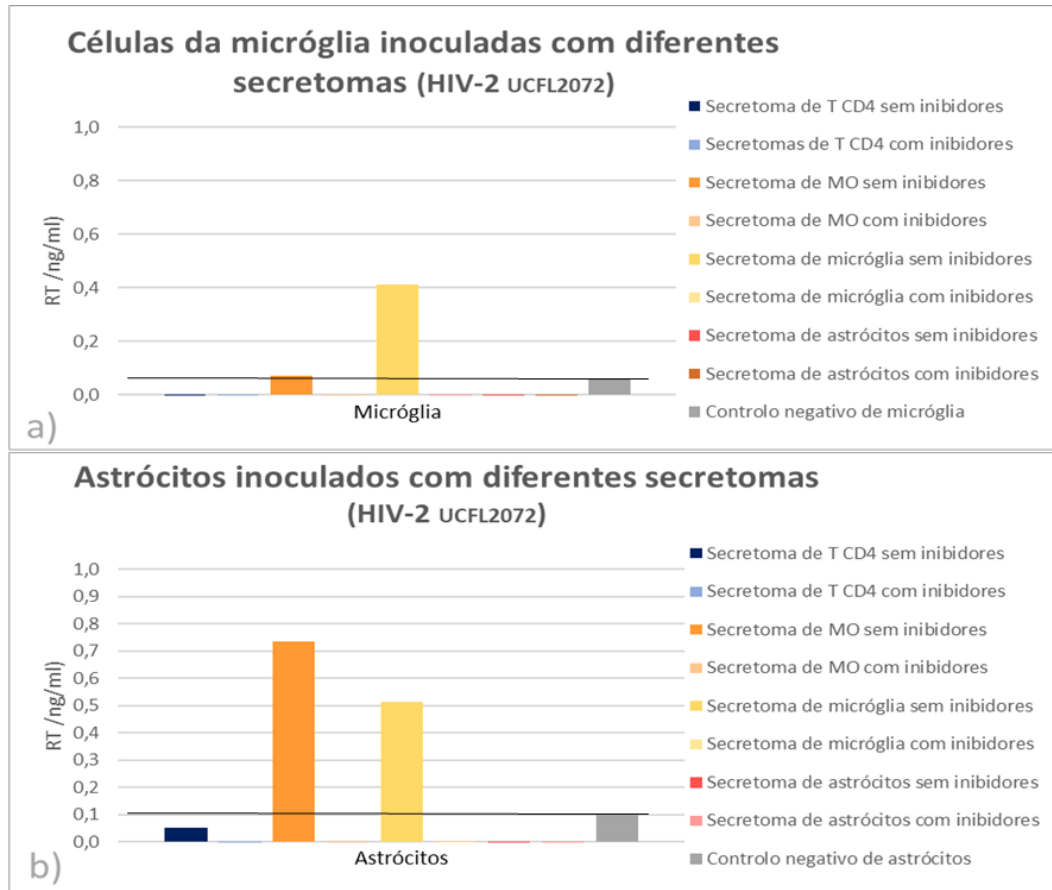


Figura 32: Atividade enzimática dos sobrenadantes de cultura obtidos a partir do ensaio de infecciosidade com diferentes secretomas, resultado da infeção de células T CD4, MØ, micróglia e astrócitos com HIV-2_{UCFL2072}, em células da micróglia (a) e astrócitos (b). A linha preta horizontal delimita o valor associado ao controlo negativo, permitindo eliminar o ruído de fundo

Analisando as Figuras 31 e 32 podemos observar comportamentos completamente diferentes para as culturas que envolvem diferentes estirpes de HIV-2. A replicação viral em células da micróglia inoculadas com diferentes secretomas (HIV-2_{UCFL2074}) varia entre 0 e aproximadamente 1,5 ng/mL (valor correspondente à cultura de micróglia com o secretoma micróglia, na ausência de inibidores). Os sobrenadantes de cultura de astrócitos têm valores superiores aos das culturas com micróglia, variando entre 0 e 2,0 ng/mL (correspondente à cultura de astrócitos com o secretoma de T CD4+ sem inibidores). Quando a estirpe envolvida é UCFL2074 e as células alvo são micróglia, os resultados sugerem que a infeção ocorra por partículas virais e outros componentes presentes no secretoma, dado que na presença de inibidores a replicação viral é superior. Para a mesma estirpe, mas tendo como células alvo astrócitos a maioria das células dadoras parece

conseguir infectar astrócitos, ainda que na presença de inibidores se observe um decréscimo acentuado na replicação viral, sugerindo que a infecção ocorra por partículas virais.

No que diz respeito aos resultados associados à estirpe de HIV-2_{UCFL2072} apenas há replicação viral quando envolvidos os secretomas produzidos em macrófagos e micróglia, para ambos as células ainda que estes sejam superiores nas culturas com astrócitos (aproximadamente 0,5 e 0,7 ng/mL, respetivamente). Além disso a atividade detetada ocorre ao nível de células expostas aos secretomas na ausência de inibidores, colocando como possível hipótese única da infecção a existência de partículas virais.

Podemos observar os resultados para as culturas de micróglia e astrócitos com os secretomas produzidos pelas diferentes populações celulares nas figuras seguintes.

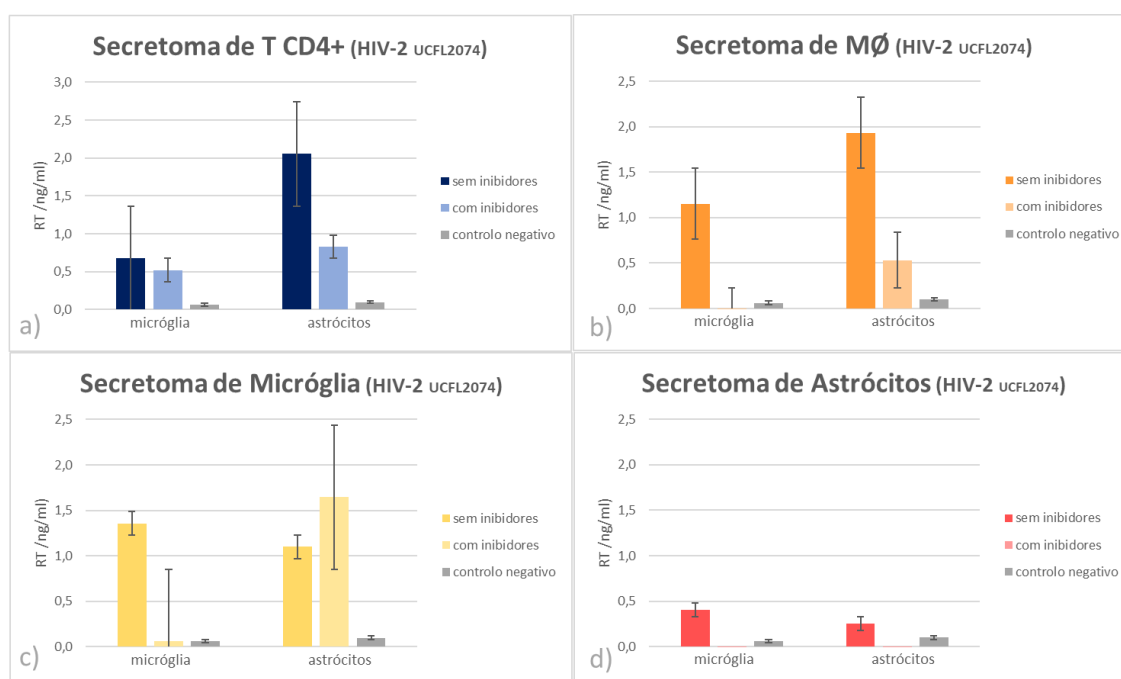


Figura 33: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-2_{UCFL2074}: a) secretoma de T CD4+; b) secretoma de MØ; c) secretoma de Micróglia; d) secretoma de Astrócitos.

A Figura 33 permite observar que para ambas as células em cultura inoculadas com os diferentes secretomas a infecção é essencialmente mediada por partículas virais, exceto quando os astrócitos são expostos ao secretoma de micróglia. Neste último caso, a replicação viral é superior na presença de inibidores sugerindo que a infecção será mediada por outros componentes do secretoma que não as partículas virais. Este tipo de contribuição também é demonstrado em células expostas ao secretoma de T CD4+ e astrócitos expostos ao secretoma de macrófagos, ainda que não sejam o(s) principal(ais) mediador(es) da infecção. De um modo geral, os resultados associados à estirpe de HIV-2_{UCFL2074} demonstram que o pré-tratamento com inibidores diminui a produção viral, quando em comparação com a condição em que não foram adicionados inibidores, com exceção do que ocorre em astrócitos expostos ao secretoma produzido por micróglia. Logo, o único sobrenadante que seria interessante estudar ao nível do seu conteúdo seria este último.

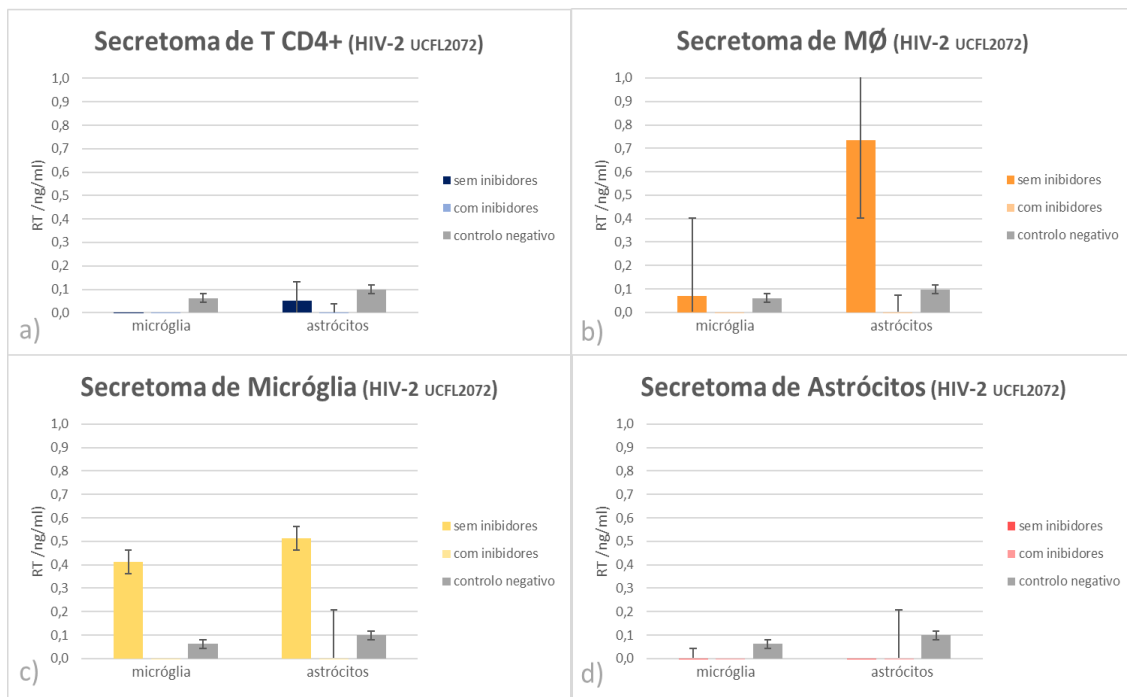


Figura 34: Atividade enzimática da RT (ng/mL) nos sobrenadantes de cultura resultantes da cultura de micróglia e astrócitos, na presença ou ausência de inibidores, com os secretomas obtidos da infecção de diferentes substratos celulares com HIV-2_{UCFL2072}: a) secretoma de T CD4+; b) secretoma de MØ; c) secretoma de Micróglia; d) secretoma de Astrócitos.

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que para o ensaio em que se utilizou secretomas obtidos de populações celulares inoculadas com HIV-2_{UCFL2072}, apenas houve replicação viral na cultura de astrócitos que estiveram em contacto com o secretoma obtido em macrófagos e sem inibidores (aproximadamente 0,7 ng/mL); e, para ambos os substratos celulares em contacto com o secretoma obtido em micróglia e, na ausência de inibidores (0,4 ng/mL para micróglia e 0,5 ng/mL para astrócitos). Os resultados evidenciam que nas situações em que ocorreu infecção esta foi provavelmente mediada pela ação de partículas virais.

De forma geral, os dados obtidos para os ensaios de infecciosidade com secretomas produzidos por T CD4+, MØ, micróglia e astrócitos, demonstram situações em que a replicação viral é superior na presença de inibidores tal como outras em que predomina na ausência de inibidores. A primeira opção verifica-se maioritariamente em estirpes de HIV-1 e, mais evidente quando os secretomas são inoculados em células da micróglia. Na segunda opção e, portanto, na ausência de inibidores a replicação viral é mais evidente nos resultados obtidos para as estirpes de HIV-2 e, verifica-se tanto em células da micróglia como astrócitos. Estes resultados demonstram que a infecção será mediada por partículas virais mas de igual forma ou por vezes até mais evidente estarão associadas outras possíveis vias ou componentes do secretoma que precisam de ser explorados para melhor compreendermos de que forma se estabelece a infecção. Por exemplo, para estirpes de HIV-1 a causa da infecção terá de ser explorada ao nível dos componentes no secretoma uma vez que a replicação viral é superior na presença de inibidores, sendo que quando utilizado o secretoma de macrófagos nos dois tipos de células e o secretoma de micróglia com células da micróglia a replicação viral é semelhante na presença ou ausência dos inibidores de entrada e de fusão, sugerindo que a infecção é mediada por partículas virais e não só. Interessante verificar que ocorre situação inversa para HIV-2, mais concretamente com a estirpe HIV-2_{UCFL2072}, em que o secretoma produzido em células T CD4+ e em células da micróglia inoculado com astrócitos demonstra maior replicação viral na ausência de inibidores ainda que se detete atividade próxima na cultura com inibidores.

Apesar da informação obtida nos resultados é importante ter em conta que as estirpes provêm de isolados primários que não se comportam de igual forma, tal como os secretomas foram obtidos através da infecção de diferentes células. As variações entre

resultados realçam isso mesmo e reforçam que a comunicação entre as diferentes células não ocorre da mesma forma. Exemplo disto, é o facto de para diferentes condições (por exemplo os resultados obtidos para astrócitos inoculados com secretoma de T CD4⁺ (HIV-1_{UCFL1032}) ou quando inoculados com o secretoma de astrócitos (HIV-2_{UCFL2072})) várias vezes não ocorreu replicação viral significativa em astrócitos. Estas células têm a capacidade de atuar como reservatórios virais e o mesmo está evidenciado para macrófagos.

Considerações finais

Atualmente a epidemia HIV/SIDA permanece ainda um problema de saúde pública pois, apesar dos progressos científicos e tecnológicos ainda não existe uma cura, ainda que seja possível que os indivíduos infectados vivam mais tempo desde que sob terapêutica antiretroviral (63). A terapêutica permite impedir a replicação viral levando à diminuição da carga viral no sangue dos indivíduos, contudo o aumento da esperança média de vida faz com que estes indivíduos venham a apresentar cada vez mais comorbilidades associadas à infeção como é o caso das doenças neurodegenerativas, nomeadamente a demência (77). Uma das causas da limitação da terapêutica deve-se à incapacidade dos antiretrovirais conseguirem ultrapassar a BHE, em que se estes não conseguirem atingir o alvo terapêutico não será suprimida a replicação viral e, por consequência, os sintomas e complicações neurológicas persistirão nos indivíduos infectados. Ao longo do tempo e com a evolução da infeção para fases mais avançadas existe um maior comprometimento da BHE favorecendo a penetração da terapêutica mas igualmente de partículas virais presentes no sangue periférico, por consequência do aumento da permeabilidade da membrana associada aos efeitos da neuroinvasão (87,97,104).

No intuito de compreender de que modo o vírus atravessa a BHE e, posteriormente se dissemina no SNC, desenvolveram-se os ensaios já descritos e dos quais se obtiveram resultados interessantes, nomeadamente de que forma é privilegiada a disseminação do HIV, mais concretamente entre células da micróglia e astrócitos. É importante salientar que células da micróglia e astrócitos expressam predominantemente os receptores de quimiocinas CCR3, CCR5 e CXCR4 (149). Estes coreceptores em conjunto com CD4, permitem a entrada do vírus na célula, mas estudos mais recentes têm vindo a demonstrar que o vírus se adaptou às células da micróglia e astrócitos que apresentam menor expressão ou ausência do recetor CD4 (150). Estudos *in vitro* tem vindo a demonstrar a existência de diversos coreceptores para HIV, ainda que não se consiga demonstrar o seu uso *in vivo* (144-147). Porém, outros estudos têm vindo a demonstrar a entrada de HIV nas células por via alternativa aos receptores, nomeadamente a entrada independente do recetor celular CD4 (35,37,79).

Os resultados para os ensaios de infecciosidade de micróglia e astrócitos por micróglia ou astrócitos infetados pelas diferentes estirpes demonstram que a neurodisseminação é favorecida pelo contacto entre células, independentemente das estirpes. Os resultados obtidos demonstram também que a separação de células dadoras e células alvo por membrana (sistema *transwell*) não é impeditiva da infeção, havendo situações em que a infeção é favorecida nesta condição (por exemplo o que acontece para o secretoma produzido por astrócitos inoculados com micróglia infetada pela estirpe HIV-1_{UCFL1032} – 1,0ng/mL quando há contacto entre as células e 3,0ng/mL quando separadas por membrana) e sugerindo que a comunicação entre células envolve fatores solúveis como as citocinas libertadas pelas células infetadas. Estes resultados são de facto muito curiosos, visto que na literatura está descrito que a disseminação viral ocorre essencialmente através de fatores solúveis não implicando um contacto físico entre as células. Ainda assim, não existe muita informação de como ocorre ao nível da interação de células da micróglia e astrócitos, daí a importância deste estudo. Podemos sim encontrar alguns estudos que descrevem a interação entre neurónios e células da micróglia através do contacto entre elas (152) e ao nível dos astrócitos que o contacto entre células contribui para a transferência e persistência de partículas virais nestas mesmas células (148).

De acordo com os resultados observados ao nível da replicação viral a infeção ocorrerá essencialmente de células da micróglia para micróglia e, em alguns casos de micróglia para astrócitos. Note-se que astrócitos não expressam CD4 impedindo que ocorra a interação com coreceptores CCR5 (expressos em baixa quantidade ou inexistentes (153). O coreceptor CCR5 é preferencial para a estirpe HIV-1_{UCFL1034} e possível de ser utilizado por HIV-2_{UCFL2074} o que de acordo com os resultados a sua ausência não impede que sejam infetados por estas estirpes. Apesar disso, quando comparados com a estirpe do mesmo tipo de HIV os valores são inferiores quando as células dadoras são micróglia. Quando as células dadoras são astrócitos mantêm-se o mesmo padrão para HIV-1_{UCFL1034}, mas para HIV-2 a estirpe UCFL2074 tem uma replicação viral é superior à estirpe UCFL2072. No caso de HIV-2, esta diferença poderá ser explicada pelo uso de diferentes coreceptores uma vez que para HIV-2_{UCFL2074} está descrito o uso de sete receptores transmembranares que permitem a entrada de HIV nas células independentemente de CD4 (154). Sendo os astrócitos células mais abundantes no SNC, comparativamente a

micróglia os resultados sugerem então que estes podem atuar como importantes reservatórios virais e possíveis disseminadores da infecção para outras células do SNC. O uso de células como reservatórios pelo HIV não é uma novidade e encontram-se evidências claras que demonstram o papel de monócitos e macrófagos como reservatórios de HIV (70,81,84,95). Com o crescente interesse em esclarecer a invasão e disseminação do SNC pelo HIV já existem estudos que, evidenciam micróglia, e astrócitos como possíveis reservatórios, em que no caso de micróglia depende da presença de uma proteína proapoptótica. Castellano e colaboradores demonstram que macrófagos e células da micróglia sobrevivem à infecção aguda do HIV, e que apesar da replicação do vírus ser silenciada pode ser reativada nestas células. Uma característica única da sobrevivência dos macrófagos infetados latentemente é a significativa regulação e recrutamento da proteína Bim nas mitocôndrias. A proteína Bim está envolvida no metabolismo dos reservatórios virais, pelo que permite a sobrevivência destas células infetadas (69). No caso de astrócitos estão descritas várias características que os tornam nos principais reservatórios de HIV no SNC. Tal como referido anteriormente, Xiaoyu Luo e colaboradores demonstraram que a infecção por HIV persiste em astrócitos na sua forma latente e, apesar de não permitir a infecção de outras células os vírus podem ser transmitidos continuamente aos linfócitos T CD4⁺ na sua forma imatura, através do contacto celular (148).

Perante estes resultados sabemos agora um pouco mais como as células do SNC interagem para propagar a infecção, havendo ainda muito para clarificar, mas através dos resultados dos ensaios de infecciosidade com os diferentes secretomas produzidos podemos colocar também algumas hipóteses de como ocorrerá a neuroinvasão. Nos últimos tempos verificou-se um crescente interesse em vesículas extracelulares, nomeadamente exossomas, como veículo de propagação da infecção (94,126,135,138,155). Como referido anteriormente as semelhanças entre as partículas virais de HIV e os exossomas dificultam o isolamento destes últimos e a restrição à análise destes exclui todos os outros componentes presentes no secretoma e que também podem estar envolvidos no processo de neurodisseminação. Por este motivo, recorreremos à adição de inibidores dos dois principais coreceptores do HIV. Os resultados obtidos demonstram que muitas vezes existe replicação viral tanto na presença como ausência de inibidores de entrada, sugerindo que a infecção poderá estar a ser mediada por partículas

virais, mas provavelmente também por componentes dos secretomas produzidos pelas diferentes populações celulares.

O facto de estarmos a realizar ensaios recorrendo a estirpes primárias levou-nos a observar que estas se comportam de forma diferente independentemente do tipo de HIV. Verificou-se maior atividade em estirpes de HIV-1 na presença de inibidores pelo que a infeção terá que ocorrer maioritariamente por alternativa à infeção por partículas virais. De outra forma, teríamos que pôr em causa a ação dos inibidores ou o próprio método de quantificação, o que não é suportado pelos resultados obtidos. Na ausência de inibidores a replicação viral é superior nas estirpes de HIV-2 e verifica-se tanto em células da micróglia como astrócitos, pelo que a infeção será essencialmente mediada por partículas virais. O que é um facto é que não podemos com segurança propor de que forma preferencial a disseminação ocorre visto que em muitas situações tivemos uma replicação viral semelhante para ambas as condições.

As células infetadas não se comportam da mesma forma para todas as estirpes, pois umas são mais permissivas que outras o que se traduz na presença e abundância relativa de receptores celulares. Isto é claramente evidenciado pela discrepância observada ao nível da replicação viral nas diferentes células alvo (micróglia e astrócitos).

Ainda assim, sabe-se que linfócitos T CD4⁺ são altamente permissivos à infeção e esperava-se verificar essa atividade para as diferentes estirpes o que não aconteceu. Exemplo disto mesmo, são os resultados obtidos para micróglia e astrócitos inoculados com secretoma produzido em células T CD4⁺ infetadas com HIV-1_{UCFL1034} e HIV-2_{UCFL2072}. Isto, não torna os resultados inválidos porque todos os secretomas foram testados antes de utilizados no ensaio, mas sim reforça a complexidade da infeção por HIV.

Os secretomas produzidos em macrófagos e em células da micróglia, infetados pela estirpe HIV-1_{UCFL1032}, apresentam resultados muito interessantes que oferecem uma oportunidade de explorar futuramente quais os componentes desses secretomas capazes, de promover a infeção, e desta forma tentar esclarecer o que está a mediar a infeção além das partículas virais.

No que diz respeito a HIV-2 um outro resultado muito interessante e que poderá também clarificar a neurodisseminação é o secretoma produzido em micróglia infetada

com HIV-2_{UCFL2074}, mas apenas quando as células alvo são astrócitos. Nesta condição a replicação viral é semelhante com e na ausência de inibidores (diferem em aproximadamente 0,5 ng/mL) ainda que superior na presença de inibidores.

Como referido ao longo do trabalho toda a análise foi feita através da quantificação da atividade da RT, e houve situações em que não existiu replicação viral. A ausência de replicação poderá justificar-se pelo limite da sensibilidade do método ser superior à quantidade de RT produzida nas culturas. Outra causa possível pode ser consequência de algum fator de inibição que esteja a atuar na fase do ciclo de replicação pós-transcrição reversa e integração, não permitindo a produção de viriões.

Considerando os resultados obtidos, o próximo passo passará então por analisar os componentes dos secretomas que evidenciaram atividade de RT na presença de inibidores. Uma das hipóteses é que sejam vesículas extracelulares a mediar a disseminação viral. Será uma das hipóteses a explorar através da avaliação do seu conteúdo e de que forma o mesmo contribuiu para os processos infecciosos e inflamatórios que o HIV promove no SNC. Os secretomas que suscitaram maior interesse como meio de clarificar como é mediada a infeção no SNC para cada estirpe foram os seguintes:

- HIV-1_{UCFL1032}: secretoma de T CD4⁺, secretoma de micróglia e secretoma de astrócitos;
- HIV-1_{UCFL1034}: Secretoma de MØ;
- HIV-2_{UCFL2074}: Secretoma de micróglia.

Uma vez que se identifiquem as vesículas extracelulares que medeiam a infeção será necessário avaliar a sua contribuição e caracterizar o seu conteúdo.

Em suma, este estudo permitiu:

- aferir a capacidade do HIV para infetar astrócitos tal como tem vindo a ser demonstrado nos estudos mais recentes e, que contrariam os primeiros estudos sobre a temática face à ausência ou expressão residual de CCR5;
- observar que a disseminação do HIV não ocorre de igual forma em células da micróglia e astrócitos, variando tanto consoante as células alvo como para os diferentes isolados clínicos responsáveis pela infeção;
- observar que a separação de células dadoras e células alvo por membrana (sistema *transwell*) não é impeditiva da infeção, havendo situações em que a infeção é

favorecida nesta condição e outras em que é privilegiado o contacto célula-célula;

- observar efeitos da infeção mais notórios em células da micróglia e com preferência para o contacto entre células idênticas;
- destacar o papel de astrócitos como reservatórios virais, sendo a transmissão do HIV entre astrócitos e a sua permanência nestes favorecida pelo contacto entre células;
- elucidar que a disseminação ocorrerá por responsabilidade de partículas virais e não só, à exceção do que foi demonstrado pelos diferentes secretomas (HIV-2_{UCFL2072});
- colocar a hipótese de que a infeção causada por estirpes de HIV-1 dever-se-á maioritariamente a componentes presentes no secretoma que não sejam partículas virais e, quando causada por estirpes de HIV-2 é maioritariamente originada por partículas virais;
- direccionar os próximos passos do estudo, que passarão pela análise do conteúdo dos secretomas mencionados ao nível da expressão de miRNAs que funcionem como marcadores da inflamação.

Referências Bibliográficas

1. Peeters M, Jung M, Ayoub A. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(9):885–96.
2. UNAIDS. Global Hiv Statistics. End AIDS epidemic. 2015;(June):1–3.
3. Grady M. Seizing the moment. *Can Packag*. 2019;72(1–2):8–9.
4. DGS, INSA. Infecção VIH e SIDA em Portugal - 2019 [Internet]. 2019. 106 p. Available from: <https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2019/11/Relat-VIH-SIDA-2019.pdf>
5. Cunha-Oliveira A, Cunha-Oliveira J, Cardoso SM. VIH/ Sida: situação da prevenção em Portugal e o contexto europeu. *Debater a Eur*. 2016;(14):141–74.
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV Taxonomy history: Human immunodeficiency virus [Internet]. EC 51, Berlin, Germany, July 2019. 2019 [cited 2019 Sep 26]. Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201905030
7. Rosa MC da, Silva NMO da, Hora VP da. Pathogenesis of Hiv - Classification, Characteristics of the Virus and Mother To Child Transmission. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2016;48(4):301–6.
8. Norkin LC. Virus receptors: Implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(2):293–315.
9. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* (80-). 1984;224(4648):497–500.
10. Hill A, Balkin A. HIV evolutionary dynamics within and among hosts. 2010;(July 2006).
11. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009;15(8):871–2.
12. National HIV Curriculum. HIV-2 Infection Pathogenesis and Natural History of HIV-2. 2019;(Figure 1):1–26.
13. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Pornillos O. Assembly and architecture of HIV. Vol. 726, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. 441–465 p.
14. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1–25.
15. Grotto RMT, Pardini MIMC. Biologia molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS Molecular biology of the HIV-1 and genetics of human resistance to AIDS. *Arq Ciênc Saúde*. 2006;13(3):61–4.
16. Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol*. 1991;65(4):1910–5.

17. Seitz R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy*. 2016;43(3):203–22.
18. Freed EO. HIV-1 Replication. 2002;26(November 2001):13–33.
19. Hunter E. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. Vol. 5, *Seminars in Virology*. 1994. p. 71–83.
20. Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:1–20.
21. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*. 2005;34(4):233–44.
22. Li C, Burdick RC, Nagashima K, Hu WS, Pathak VK. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(10).
23. Shah VB, Aiken C. HIV nuclear entry: Clearing the fog. *Viruses*. 2010;2(5):1190–4.
24. Jablonski JA, Buratti E, Stuani C, Caputi M. The Secondary Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcript Modulates Viral Splicing and Infectivity. *J Virol*. 2008;82(16):8038–50.
25. Karn J. Control of human immunodeficiency virus replication by the tat, rev, nef and protease genes. *Curr Opin Immunol*. 1991;3(4):526–36.
26. Darlix J-L, Lastra M, Mély Y, Roques B. Nucleocapsid protein chaperoning of nucleic acids at the heart of HIV structure, assembly and cDNA synthesis. *HIV Seq Compend*. 2002;(January):69–88.
27. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: Distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*. 2005;2:1–14.
28. Espirito-Santo M, Santos-Costa Q, Calado M, Dorr P, Azevedo-Pereira JM. Susceptibility of HIV type 2 primary isolates to CCR5 and CXCR4 monoclonal antibodies, ligands, and small molecule inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(5):478–85.
29. de Araújo Stefani MM, Bevilacqua Vieira RB, de Souza Pereira GA, Teixeira Junior J, Ordália Ferro M. Entendendo Como O Hiv Infecta Células Humanas: Quimiocinas E Seus Receptores. *Rev Patol Trop*. 2007;27(1).
30. Clapham PR, McKnight Á. HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull*. 2001;58:43–59.
31. Mansinho K, Moniz-pereira J. Identification and characterization of HIV-2 strains obtained from asymptomatic patients that do not use CCR5 or CXCR4 coreceptors. 2003;313:136–46.
32. Santos-costa Q, Parreira R. Molecular Characterization of the env Gene of Two CCR5 / CXCR4-Independent Human Immunodeficiency 2 Primary Isolates. 2009;1881(July):1869–81.
33. Hoffmann C. T e hiv c t. 2007;385–90.
34. Kolchinsky P, Mirzabekov T, Farzan M, Kiprilov E, Cayabyab M, Mooney LJ, et

- al. Adaptation of a CCR5-Using, Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate for CD4-Independent Replication. *J Virol*. 1999;73(10):8120–6.
35. Thomas ER, Shotton C, Weiss RA, Clapham PR, McKnight Á. CD4-dependent and CD4-independent HIV-2: Consequences for neutralization. *Aids*. 2003;17(3):291–300.
36. Azevedo-Pereira JM, Santos-Costa Q, Taveira N, Veríssimo F, Moniz-Pereira J. Construction and characterization of CD4-independent infectious recombinant HIV-2 molecular clones. *Virus Res*. 2003;97(2):159–63.
37. Zerhouni B, Nelson JAE, Saha K. Isolation of CD4-Independent Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates That Are Syncytium Inducing and Acutely Cytopathic for CD8⁺ Lymphocytes. *J Virol*. 2004;78(3):1243–55.
38. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657–700.
39. Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *J Pathol*. 2015;235(2):229–41.
40. Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* [Internet]. 2009;137(3):433–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.046>
41. Sagar M. HIV-1 transmission biology: selection and characteristics of infecting viruses. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl:289–96.
42. Chowdhury A, Silvestri G. Host-pathogen interaction in HIV infection. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2013;25(4):463–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.003>
43. Gigantesco A, Giuliani and M. Quality of life in mental health services with a focus on psychiatric rehabilitation practice. *Ann Ist Super Sanità*. 2011;47(4):363–72.
44. Forsman A, Weiss RA. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol*. 2008;16(12):555–60.
45. Rowland-Jones SL. AIDS pathogenesis: What have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):343–8.
46. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: Infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):859–68.
47. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:223–48.
48. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(2):197–216.
49. Wilson SS, Wiens ME, Smith JG. Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol* [Internet]. 2013;425(24):4965–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038>
50. Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis.

- Rev Med Virol. 2013;23(4):221–40.
51. Kannangai R, Ramalingam S, Prakash KJ, Abraham OC, George R, Castillo RC, et al. A peptide enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human immunodeficiency virus type-2 (HIV-2) antibodies: An evaluation on polymerase chain reaction (PCR) confirmed samples. *J Clin Virol*. 2001;22(1):41–6.
 52. Alter G, Moody MA. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl(Suppl 2).
 53. Hessel AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, et al. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature*. 2007;449(7158):101–4.
 54. n, Eunsung Mouradian MM. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
 55. de Silva TI, Aasa-Chapman M, Cotten M, Hue S, Robinson J, Bibollet-Ruche F, et al. Potent Autologous and Heterologous Neutralizing Antibody Responses Occur in HIV-2 Infection across a Broad Range of Infection Outcomes. *J Virol*. 2012;86(2):930–46.
 56. Davenport MP, Petravic J. CD8+ T cell control of HIV - A known unknown. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):1–3.
 57. Duvall MG, Jaye A, Dong T, Brenchley JM, Alabi AS, Jeffries DJ, et al. Maintenance of HIV-Specific CD4 + T Cell Help Distinguishes HIV-2 from HIV-1 Infection . *J Immunol*. 2006;176(11):6973–81.
 58. Alexander TS. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(4):249–53.
 59. Nat H-. Recommended Laboratory HIV Testing Algorithm for Serum or Plasma Specimens. 2016;3–4.
 60. Recommendations U. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection Updated Recommendations. 2018;
 61. Saag M, Michael J, Emery S, McMichael A. HIV-1 and HAART : A time to cure , a time to kill. 1999;5(6):5–7.
 62. Cortez KJ, Maldarelli F. Clinical management of HIV drug resistance. *Viruses*. 2011;3(4):347–78.
 63. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: Scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 2012;72(9):1–25.
 64. Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Res*. 2010;85(1):210–31.
 65. WHO. Global Action Plan on HIV Drug Resistance 2017-2021: 2018 Progress Report - Hiv Drug Resistance [Internet]. 2018. 14 p. Available from: <http://apps.who.int/bookorders.%0Ahttps://clintonhealthaccess.org/content/uploads/2017/09/2017->
 66. Colin L, Van Lint C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency:

- Implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology*. 2009;6(3):1–29.
67. Pedro KD, Henderson AJ, Agosto LM. Establishment of the Latent Reservoir. *Virus Res*. 2019;265:115–21.
68. Cary DC, Fujinaga K, Matija Peterlin B. Molecular mechanisms of HIV latency. *J Clin Invest*. 2016;126(2):448–54.
69. Castellano P, Prevedel L, Eugenin EA. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–16.
70. Kruize Z, Kootstra NA. The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. *Front Microbiol*. 2019;10(December):1–17.
71. Given BA, Given CW, Sherwood P. The Challenge of Quality Cancer Care for. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2012;28(4):205–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2012.09.002>
72. Williams KC, Hickey WF. Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:537–62.
73. Gabuzda D, Wang J. Chemokine receptors and mechanisms of cell death in HIV neuropathogenesis. *J Neurovirol*. 2000;6(SUPPL. 1):24–32.
74. Noursadeghi M, Katz DR, Miller RF. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(12):794–804.
75. González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):69–81.
76. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* [Internet]. 2015;74(1):5–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
77. Ghafouri M, Amini S, Khalili K, Sawaya BE. HIV-1 associated dementia: Symptoms and causes. *Retrovirology*. 2006;3(May 2014).
78. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13193–7.
79. Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, et al. CD4-Independent Infection of Astrocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1: Requirement for the Human Mannose Receptor. *J Virol*. 2004;78(8):4120–33.
80. Chen P, Chen BK, Mosoian A, Hays T, Ross MJ, Klotman PE, et al. Virological synapses allow HIV-1 uptake and gene expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(3):496–507.
81. Kedzierska K, Crowe S. The Role of Monocytes and Macrophages in the Pathogenesis of HIV-1 Infection. *Curr Med Chem*. 2012;9(21):1893–903.

82. Whitelaw DM. Observations on Human Monocyte Kinetics After Pulse Labeling. *Cell Prolif.* 1972;5(4):311–7.
83. Al. U et. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
84. Valcour VG, Shiramizu BT, Shikuma CM. HIV DNA in circulating monocytes as a mechanism to dementia and other HIV complications. *J Leukoc Biol.* 2010;87(4):621–6.
85. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: Viral latency and reservoirs. *Retrovirology.* 2009;6:1–12.
86. Carter CA, Ehrlich LS. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:425–43.
87. Scutari R, Alteri C, Perno CF, Svicher V, Aquaro S. The role of HIV infection in neurologic injury. *Brain Sci.* 2017;7(4):10–8.
88. Chougnet C, Gessani S. Role of gp120 in dendritic cell dysfunction in HIV infection. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):994–1000.
89. Castell-Rodríguez A, Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez M, Jarquín-Yáñez K, Medina-Solares I. Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. *Biol Myelomonocytic Cells.* 2017;
90. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol [Internet].* 2014;35(3):114–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.10.003>
91. Nobile C, Petit C, Moris A, Skrabal K, Abastado J-P, Mammano F, et al. Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes. *J Virol.* 2005;79(9):5386–99.
92. Tsunetsugu-Yokota Y, Muhsen M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: Antiviral immunity versus HIV transmission. *Front Microbiol.* 2013;4(JUL):1–10.
93. Tang et al. 2005. Neuropathogenesis of HAND: Roles for immune activation, HIV blipping, and viral tropism. *Bone.* 2008;23(1):1–7.
94. Ellwanger JH, Veit TD, Chies JAB. Exosomes in HIV infection: A review and critical look. *Infect Genet Evol [Internet].* 2017;53:146–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.021>
95. McDonald D. Dendritic cells and HIV-1 trans-infection. *Viruses.* 2010;2(8):1704–17.
96. Coleman CM, Gelais CS, Wu L. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 2013;762:109–30.
97. Atluri VSR, Hidalgo M, Samikkannu T, Venkata Kurapati KR, Jayant RD, Sagar V, et al. Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: An update. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(June):1–10.
98. McRae MP. HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. *Tissue*

- Barriers. 2016;4(1):0–6.
99. Nakagawa S, Castro V, Toborek M. Infection of human pericytes by HIV-1 disrupts the integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Mol Med*. 2012;16(12):2950–7.
100. MacLean AG, Rasmussen TA, Bieniemy D, Lackner AA. Activation of the blood-brain barrier by SIV (simian immunodeficiency virus) requires cell-associated virus and is not restricted to endothelial cell activation. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(5):750–2.
101. Lindl KA, Marks DR, Kolson DL, Jordan-Sciutto KL. HIV-associated neurocognitive disorder: Pathogenesis and therapeutic opportunities. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010;5(3):294–309.
102. Spudich S, González-scarano F, Walker B, Mcmichael A, Wilen CB, Tilton JC, et al. HIV-1-Related Central Nervous System Disease : 2012;1–18.
103. Chen NC, Partridge AT, Sell C, Torres C, Martín-García J. Fate of microglia during HIV-1 infection: From activation to senescence? *Glia*. 2017;65(3):431–46.
104. Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe*. 2013;13(4):379–93.
105. Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 2001;410(6831):988–94.
106. Williams KC, Corey S, Westmoreland S V., Pauley D, Knight H, DeBakker C, et al. 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*. 2001;193(8):905–15.
107. Scutari R, Alteri C, Perno CF, Svicher V, Aquaro S. brain sciences The Role of HIV Infection in Neurologic Injury. 2017;10–8.
108. Amini S, Khalili K. HIV-1 associated dementia: Symptoms and causes. 2006;(May 2014).
109. Fischer-Smith T, Croul S, Adeniyi A, Rybicka K, Morgello S, Khalili K, et al. Macrophage/microglial accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in the central nervous system in human immunodeficiency virus encephalopathy. *Am J Pathol*. 2004;164(6):2089–99.
110. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004;1:1–4.
111. Rodrigues R, Silva R, Moreira S. Complicações neurológicas associadas à infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) Neurological complications of Human Immunodeficiency Virus (HIV). 2018;18:21–34.
112. Brew B, Carroll A. HIV-associated neurocognitive disorders: Recent advances in pathogenesis, biomarkers, and treatment. *F1000Research*. 2017;6:1–11.
113. Gomes BC, Nunes J, Pinto J, Gouveia P, Pais RP. Neuroimagem na Infecção Vírus da Imunodeficiência Humana. *Acta Med Port*. 2012;25(S1):7–12.
114. Antunes F, Maltez F. Tópicos em Tópicos em Destaque

115. Barat C, Proust A, Deshiere A, Leboeuf M, Drouin J, Tremblay MJ. Astrocytes sustain long-term productive HIV-1 infection without establishment of reactivable viral latency. *Glia*. 2018;66(7):1363–81.
116. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2020;11(February):1–16.
117. Desforgues M, Le Coupanec A, Dubeau P, Bourgouin A, Lajoie L, Dubé M, et al. Human coronaviruses and other respiratory viruses: Underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? *Viruses*. 2019;12(1):1–28.
118. De Almeida SM. Cerebrospinal fluid analysis in the HIV infection and compartmentalization of HIV in the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015;73(7):624–9.
119. Neumann M, Afonina E, Ceccherini-Silberstein F, Schlicht S, Erfle V, Pavlakis GN, et al. Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: Decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein. *J Cell Sci*. 2001;114(9):1717–29.
120. Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res*. 2005;111(2 SPEC. ISS.):194–213.
121. Possomato-Vieira, José S. and Khalil RAK. White matter loss and oligodendrocyte dysfunction in HIV: a consequence of the infection, the antiretroviral therapy or both? *Physiol Behav*. 2016;176(12):139–48.
122. Liu H, Xu E, Liu J, Xiong H. Oligodendrocyte injury and pathogenesis of HIV-1-associated neurocognitive disorders. *Brain Sci*. 2016;6(3):1–14.
123. Situ I, Chain P, Nuovo GJ, Gallery F, Macconnell P, Braun A. Short Communication Reaction-Amplified HIV-1 Nucleic Acids and Nervous System. *Situ*. 1994;144(4):659–66.
124. Obregón E, Punzón C, Fernández-Cruz E, Fresno M, Muñoz-Fernández MA. HIV-1 infection induces differentiation of immature neural cells through autocrine tumor necrosis factor and nitric oxide production. *Virology*. 1999;261(2):193–204.
125. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and depression: Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(DEC):1–20.
126. Hu G, Yang L, Cai Y, Niu F, Mezzacappa F, Callen S, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders: Focus on HIV-associated neurological complications. *Cell Death Dis* [Internet]. 2016;7(11):e2481-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.336>
127. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010;11(5):675–87.
128. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1).
129. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: Novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of

- neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(FEB):1–20.
130. Ellwanger JH, Veit TD, Artur J, Chies B. PT. *Infect Genet Evol.* 2017;
 131. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JEK. Evidence That HIV Budding in Primary Macrophages Occurs through the Exosome Release Pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(52):52347–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309009200>
 132. Loscalzo DEHRCJ. Biochemical and Biologic Characterization of Exosomes and Microvesicles as Facilitators of HIV-1 Infection in Macrophages. *Bone.* 2011;23(1):1–7.
 133. Uhlén M, Karlsson MJ, Hober A, Svensson AS, Scheffel J, Kotol D, et al. The human secretome. *Sci Signal.* 2019;12(609):1–9.
 134. Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics.* 2007;4(2):239–48.
 135. Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(3):160–72.
 136. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biol.* 2013;11(7).
 137. Goldie BJ, Dun MD, Lin M, Smith ND, Verrills NM, Dayas C V., et al. Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(14):9195–208.
 138. Zappulli V, Pagh Friis K, Fitzpatrick Z, Maguire CA, Breakefield XO. Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1198–207.
 139. Arakelyan A, Fitzgerald W, Zicari S, Vanpouille C, Margolis L. Extracellular Vesicles Carry HIV Env and Facilitate HIV Infection of Human Lymphoid Tissue /631/326/596/1787 /631/326/596/2555 /13 article. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
 140. Giannessi F, Aiello A, Franchi F, Percario ZA, Affabris E. The role of extracellular vesicles as allies of HIV, HCV and SARS viruses. *Viruses.* 2020;12(5).
 141. Calado AMC. O receptor das quimiocinas CCR8 – sua relevância como co-receptor alternativo para isolados primários de HIV-1 e HIV-2. 2011.
 142. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF-κB: An essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2013;69(2):89–94.
 143. Bsa M, Solution S, Solution MR, Ls C, Preparar P, Cd C, et al. CD4 + T Cell Isolation Kit - Human (Miltenyi). 2019;(130):5–6.
 144. References M, Bsa M, Solution S, Solution R, Product C, Columns SM, et al. CD14 MicroBeads human. *Work.* 326(130):1–4.
 145. Nagai A, Nakagawa E, Hatori K, Choi HB, McLarnon JG, Lee MA, et al. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: Expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis.* 2001;8(6):1057–68.
 146. Roche. Reverse Transcriptase Assay, colorimetric. *Prod Man.* 2010;13.0(11).

147. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):942–64.
148. Luo X, He JJ. Cell–cell contact viral transfer contributes to HIV infection and persistence in astrocytes. *J Neurovirol.* 2015;21(1):66–80.
149. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. *Acta Med Port.* 2011;24(SUPPL.4):967–76.
150. Rossi F, Querido B, Nimmagadda M, Cocklin S, Navas-Martín S, Martín-García J. The V1-V3 region of a brain-derived HIV-1 envelope glycoprotein determines macrophage tropism, low CD4 dependence, increased fusogenicity and altered sensitivity to entry inhibitors. *Retrovirology.* 2008;5:1–22.
151. Willey SJ, Reeves JD, Hudson R, Miyake K, Dejucq N, Schols D, et al. Identification of a Subset of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), HIV-2, and Simian Immunodeficiency Virus Strains Able To Exploit an Alternative Coreceptor on Untransformed Human Brain and Lymphoid Cells. *J Virol.* 2003;77(11):6138–52.
152. Vilhardt F. Microglia: Phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(1):17–21.
153. Li GH, Maric D, Major EO, Nath A. Productive HIV infection in astrocytes can be established via a nonclassical mechanism. *Aids.* 2020;34(7):963–78.
154. Reeves JD, McKnight Á, Potempa S, Simmons G, Gray PW, Power CA, et al. CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): Use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology.* 1997;231(1):130–4.
155. Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods.* 2008;338(1–2):21–30.
156. Pinto SFC da C. ALS pathogenesis : role of motor neuron-derived exosomes in microglia activation and dysfunction. 2016;