

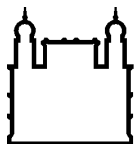
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO HSV-1 SOBRE FATORES DE
RESTRICÇÃO À REPLICAÇÃO IN VITRO DO HIV-1**

VIVIANE MACHADO DE MELLO ANDRADE

Rio de Janeiro
Julho de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VIVIANE MACHADO DE MELLO ANDRADE

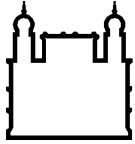
Análise dos efeitos do HSV-1 sobre fatores de restrição à replicação *in vitro* do HIV-1

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador:Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

RIO DE JANEIRO

Julho de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: VIVIANE MACHADO DE MELLO ANDRADE

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO HSV-1 SOBRE FATORES DE RESTRIÇÃO À
REPLICAÇÃO *IN VITRO* DO HIV-1**

ORIENTADOR :Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. DumithChequer Bon-Habib (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fernando Bozza (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Renato Santana (UFRJ)

Prof. Dr. Luciana Arruda (UFRJ)

Prof. Dr. BráuliaCosta Caetano (FIOCRUZ)

*"Se rirem dos teus sonhos, é porque
nunca foram dignos e se permitiram sonhar."*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me proporcionar Fé e fazer acreditar que todos os meus sonhos e objetivos seriam possíveis de alcançar.

Aos meus pais, por me apoiarem em qualquer decisão que escolhi e estarem sempre ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades.

Aos meus irmãos, Livia e Victor, por não serem apenas irmãos, mas amigos confidentes que estarão sempre ao meu lado me ajudando e apoiando.

Ao meu orientador, Thiago Moreno, por me incentivar e instigar o conhecimento e a busca por respostas na ciência, me auxiliando nas escolhas como futura cientista.

Aos meus colegas do LVRS, Milene, Andressa, Carol, Natalia, e Dudu, por além de proporcionarem o ambiente de trabalho muito mais descontraído, estão sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de pesquisa sobre o Timo, Julia, Bruno e Jairo, pelos agradáveis momentos juntos e por colaborarem com discussões científicas.

Às minhas amigas Gabi Rosa, Gabi Erthal, Mayra, Vanessa e Rafaela, por viverem e acompanharem todos meus momentos de estresse e estudo durante a minha seleção de doutorado nos EUA, junto com a realização do mestrado.

Aos pesquisadores Dumith Chequer, Fernando Bozza, Renato Santana, Luciana Arruda e Bráulia Caetano, por aceitarem o convite de fazerem parte da banca avaliadora da minha defesa.

À chefe de laboratório do LVRS, Dra. Marilda Siqueira, por permitir o desenvolvimento do meu projeto no laboratório.

Às agências de fomento FAPERJ e CNPq, por apoiar o desenvolvimento do meu projeto através de recursos financeiros.

À pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por proporcionar minha ida a diversos congressos nacionais e pela realização dos créditos disciplinares.

A todos que ajudaram de forma direta ou indiretamente para que fosse possível o desenvolvimento da minha tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de novas infecções por HIV-1.....	2
Figura 2 - Número global de pessoas infectadas com HIV-1.....	2
Figura 3 - Colonoscopia de um indivíduo negativo e outro positivo para infecção pelo HIV-1.....	5
Figura 4 - Estrutura do HIV-1.....	7
Figura 5 - Estrutura genômica do HIV-1.....	9
Figura 6 - Restrição do HIV-1 por APOBEC3 e sua contra-regulação por Vif.....	12
Figura 7 - Restrição do HIV-1 por teterina e sua contra-regulação por Vpu.....	13
Figura 8 – Restrição do HIV-1 por IFITM3.....	14
Figura 9 - Lesões causadas pelo HSV-1.....	17
Figura 10 - Estrutura do HSV-1 representando o envelope e as glicoproteínas, tegumento, a dupla-fita de DNA e nucleocapsídeo.....	19
Figura 11 - Genoma do HSV-1 contendo mais de 150 mil pares de bases.....	20
Figura 12 - Entrada do HSV-1 na célula hospedeira.....	22
Figura 13 - Latência e Reativação do HSV-1.....	24
Figura 14 - Início da replicação viral, fase alfa.....	25
Figura 15 - Segunda fase da replicação do HSV-1, fase β	26
Figura 16 - Terceira fase da replicação do HSV-1, fase tardia.....	26
Figura 17 - Sinalização de resposta mediada por IFN	29
Figura 18 - Mecanismo de bloqueio da síntese proteica por PKR.....	30
Figura 19 - Aumento da produção de partículas infecciosas de HIV-1 durante a co-infecção com HSV-1.....	43
Figura 20 - Redução de FRs na infecção por HSV-1.....	44
Figura 21 - Cinética de expressão de IFITM3.....	47
Figura 22 - Recuperação dos níveis de IFITM3 após tratamento com ACV ou IFN-2 α	48

Figura 23 - Porcentagem de transfecção e viabilidade celular em macrófagos.....	50
Figura 24 - Recuperação dos níveis de IFITM após silenciamento das proteínas de fase tardia do HSV-1.....	51
Figura 25 - Aumento da produção de HIV-1 na co-infecção em macrófagos após o silenciamento de Us11 e VHS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - resumo das proteínas do HSV-1 inibidoras de IFN e seus mecanismos de ação.....33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -TIF - Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α .

ACV - acyclovir

Ag - antígeno

AIDS- *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

ATP - adenosina 5' trifosfato

cDNA - DNA complementar

DMEM - Dubelcco's modified Eagle medium

DNA- *Desoxyribonucleic Acid*, ou Ácido Desoxirribonucléico

ELISA - *Enzyme linked-Immunsorbent Assay*

FAM - 6-carboxyfluoresceína

FR - fator de restrição

GALT - *Gut associated lymphoid tissue*, ou tecido linfóide associado ao intestino

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

gp - glicoproteína

GPI - glicosilfosfatidilinositol

h.p.i. - horas pós-infecção

HAART- *Highly active antiretroviral therapy*, ou terapia antiretroviral altamente ativa

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*, ou vírus da imunodeficiência humana

HSV-1 - *Herpes Simplex Virus type 1*, ou Vírus herpes simples tipo-1

HVEM – Mediador da entrada de herpesvirus

IL- Interleucina

ISG - *Interferon Stimulated Genes* ou genes estimulados por Interferon

LAT – transcrito associado a latência

LBP 1 e 2 - *LeaderBindingProteins 1 e 2*

LTR - *long terminal repeats*

MDM - macrófagos derivados de monócitos humanos

MHC - *major histocompatibility complex* ou complexo principal de histocompatibilidade

MMLV - transcriptase reversa de vírus da leucemia murina

MOI – *Multiplicity of infection* ou Multiplicidade de infecção

MX-1/2 - Myxovirus tipo 1/2

NGF - Fator de Crescimento do Nervo

NIH - *Nacional Institute of Health*

NK - *natural killer*

OCT-1 e OCT-2 – proteínas reguladoras de transcrição

PBMCs- *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, ou Células Mononucleares de Sangue Periférico.

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PKR - proteína quinase R

RLU - Unidade de luminescência relativa

RNA- *Ribonucleic Acid*, ou Ácido Ribonucléico

RNA_m- RNA mensageiro

RRE - Elementos responsivos ao REV

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

SFB- Soro Fetal Bovino

SH- Soro humano

siRNA - *smallinterferingRNA*

SIV- *Simiam Immunodeficiency Virus*, ou Vírus da Imunodeficiência Símia

SNC - sistema nervoso central

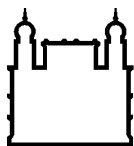
TCID - *tissue culture infectious dose*

TNF - fator de necrose tumoral

Vero - Células de rim de macaco verde africano

VHS – *Virus host shut-off*

WB - Western Blot



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

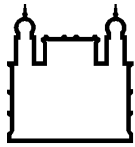
Análise dos efeitos do HSV-1 sobre fatores de restrição à replicação *in vitro* do HIV-1

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Viviane Machado de Mello Andrade

A infecção pelo herpes é causada pelo HSV-1, o qual representa o agente etiológico de uma das infecções mais prevalentes na população mundial. Indivíduos imunodeprimidos, como aqueles infectados pelo HIV-1, possuem maior susceptibilidade de contrair infecções oportunistas, como aquelas causadas por herpesvírus, enfatizando a necessidade de estudos mais profundos à cerca da co-infecção HIV-1/HSV-1. Estudos *in vitro* mostram que a infecção pelo HSV-1 pode modular a replicação do HIV-1 através de ativação transcricional. A partir do ano 2000, diversos estudos sobre fatores de restrição (FRs) à replicação do HIV-1 tem surgido. No entanto, o impacto do HSV-1 sobre os FR's é desconhecido. Observamos um aumento na produção de HIV-1 na co-infecção com HSV-1. Este último vírus levou a redução nos níveis do FR IFITM3. Baseado nesse resultado, nós analisamos as mudanças na expressão de IFITM3 durante as primeiras 24 h de infecção por HSV-1. Durante as primeiras horas, os níveis de IFITM3 encontraram-se ligeiramente aumentados; no entanto, em fases tardias da infecção, seus níveis reduziram significativamente. Em seguida, macrófagos infectados com HSV-1 foram tratados com Acyclovir ou IFN-2 α , a fim de monitorarmos o conteúdo de IFITM3. Nós observamos que a capacidade do HSV-1 de modular negativamente os níveis de IFITM3 foi prevenida em ambos os tratamentos, indicando que a replicação viral e a capacidade de induzir sinalização por IFN é crítica para produzir esse fenômeno. Diversas proteínas de fase tardia do HSV-1 prejudicam a sinalização por IFN, como a ICP34.5, Us3, Us11 e VHS. Realizamos então o *knockdown* desses transcritos e observamos que os dois últimos foram capazes de prevenir a redução do conteúdo de IFITM3 induzida por HSV-1. Além disso, o aumento da replicação do HIV-1 na co-infecção foi prevenida pelos siRNAs para Us11 e VHS. Uma vez que a co-infecção HIV-1/HSV-1 é bastante comum e a presença desse tipo de co-infecção pode definir a progressão clínica para a AIDS, nosso trabalho fornece evidências adicionais relacionadas à imunopatogênese desses vírus em co-infecções.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of HSV-1 effects on restriction factors in HIV-1 *in vitro* replication

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

Viviane Machado de Mello Andrade

Herpes infection is caused by HSV-1 virus, which is one of the most prevalent infection worldwide. Immunocompromised individuals, such as those infected with HIV-1, have an increased susceptibility to contract opportunistic infections, such as those caused by herpesvirus highlighting the necessity of more in-depth investigations on HIV-1/HSV-1 co-infections. *In vitro* studies have shown that HSV-1 can modulate the replication of HIV-1, mainly by means of transcriptional activation. Since the 2000's, several studies on restriction factors (RFs) to HIV-1 replication have emerged. The impact of HSV-1 on such RF is unknown. We observed an increased HIV-1 production during co-infection with HSV-1. This last virus led to a reduction in the levels of the RF IFITM3. Based on that, we analyzed the changes in IFITM3 levels over time, during the first 24 h of HSV-1 infection. During the first hours, IFITM3 levels were found slightly increased; however, at late phase of infection, IFITM3 content declined significantly. Next, HSV-1-infected macrophages were treated with Acyclovir or IFN-2 α to monitor IFITM3 content. We observed that the ability of HSV-1 to downregulate IFITM3 was prevented by both treatments, meaning that viral replication and ability to overcome IFN signaling are critical to produce the observed phenomena. Several HSV-1 late proteins impair IFN signaling, such as ICP34.5, Us3, US11, and VHS. We performed knockdown of these transcripts and observed that the last two prevented HSV-1-induced IFITM3 reduction. Consistently, HSV-1-induced enhancement of HIV-1 replication was prevented by the siRNA against US11 and VHS. Since HIV-1/HSV-1 co-infection is very common and the presence of co-infections such as this may dictate the clinical progression to AIDS, our work provides additional evidence on the immunopathogenesis of these viruses on co-infections.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).....	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2 Patogênese.....	3
1.1.3 Estrutura e ciclo replicativo.....	6
1.1.4 O HIV-1 e os fatores de restrição.....	10
1.2 O Herpes Simples tipo 1.....	16
1.2.1 Classificação e patogênese.....	16
1.2.2 Morfologia.....	17
1.2.3 Ciclo replicativo.....	21
1.2.4 Evasão do HSV-1 à resposta imune inata: participação do IFN.....	27
1.3 Co-infecção HIV-1 e HSV-1.....	33

2 - OBJETIVOS.....36

3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....37

3.1 Cultura Celular primária	37
3.2 Células de linhagem.....	37
3.3 Titulação e produção de estoques virais.....	37
3.4 Infecção experimental com HSV-1 em macrófagos (infectados ou não com HIV-1).....	38
3.5 Ensaios de co-infecção com HIV-1/HSV-1.....	38
3.6 Quantificação por ensaio de luciferase.....	38
3.7 Análise por Western Blot.....	39
3.8 Transfecção por siRNA e <i>knocking down</i>	39
3.9 Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR.....	40

4 - RESULTADOS.....42

4.1 HSV-1 aumenta a produção de HIV-1 em macrófagos	42
4.2 HSV-1 reduz a expressão de fatores de restrição ao HIV-1.....	43
4.3 A redução de IFITM mediada por HSV-1 é um evento tardio durante o ciclo replicativo.....	45

4.4 As proteínas de fase tardia do HSV-1, Us11 e VHS, regulam negativamente o conteúdo de IFITM.....	49
5 - DISCUSSÃO.....	54
6 - CONCLUSÕES.....	57
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – O Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

1.1.1 – Epidemiologia

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) pertence à família *retroviridae* e é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (Dybul & Fauci, 2003; Moir e cols, 2011).

O HIV-1 foi isolado em 1983 (Barre-Sinoussi e cols, 1983) e sua distribuição é irrestrita pelo mundo. Após mais de três décadas do aparecimento dos primeiros casos de aids (Gottlieb e cols, 1981), o número de indivíduos acometidos pela infecção pelo HIV continua elevado. Apesar do número de novas infecções diminuir a cada ano, cerca de dois milhões de novas infecções ainda são registradas (figura 1). Atualmente, estima-se que existam mais de 35 milhões de pessoas infectadas pelo HIV-1 mundialmente (figura 2).

No entanto, com a introdução da terapia anti-retroviral intensiva (HAART), houve um aumento na expectativa de vida dos pacientes HIV positivos, levando conseqüentemente a uma redução na mortalidade dos mesmos. Isso explica o aumento do número global de indivíduos infectados pelo vírus (figuras 1 e 2) (UNAIDS 2013).

Novas infecções por HIV-1 2001 - 2012

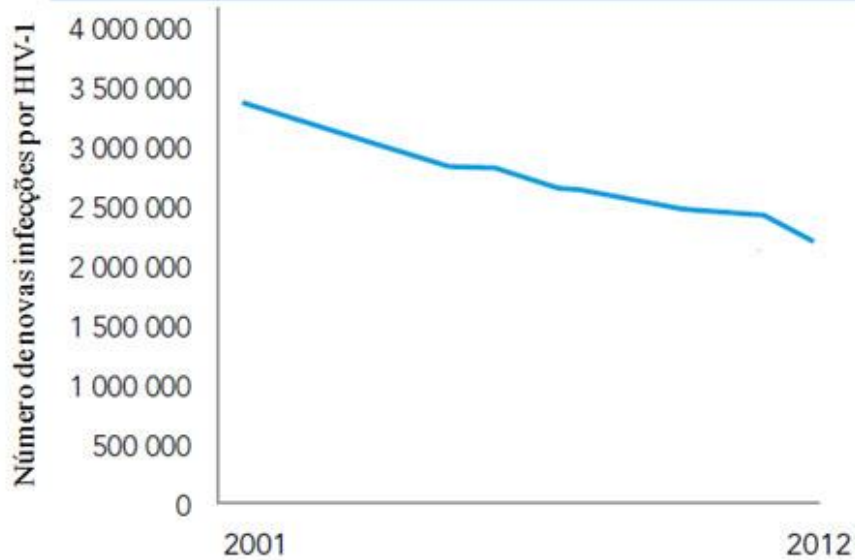


Figura 1 – Número anual de novas infecções por HIV-1 de 2001 a 2012, indicando uma redução do surgimento de novos casos(modificado de UNAIDS 2013)

Número global de pessoas infectadas com HIV-1 2001 - 2012

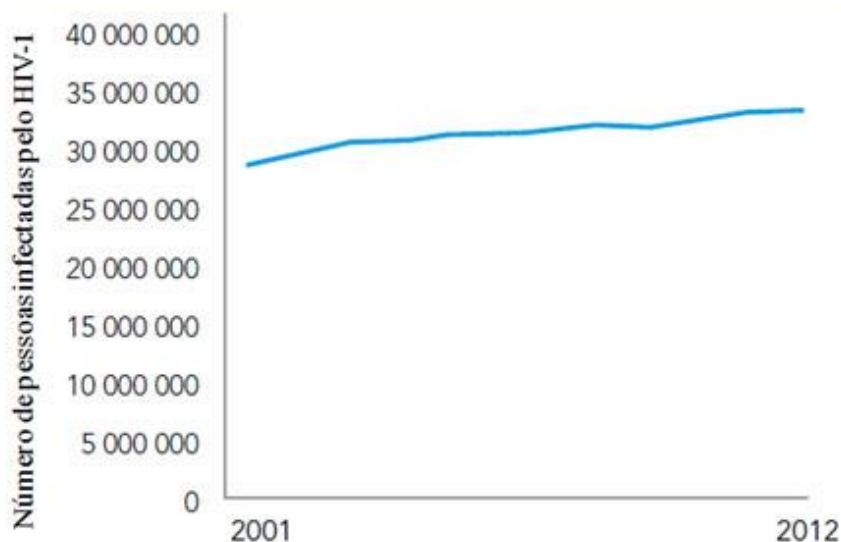


Figura 2 – Número global de pessoas infectadas com HIV-1. Com a introdução da HAART, houve uma redução na mortalidade dos pacientes HIV positivos, contribuindo para o aumento global do número de indivíduos infectados pelo HIV. (Modificado de UNAIDS 2013)

O HIV-1 e o HIV-2 são vírus similares, sendo o HIV-2 menos patogênico do que o HIV-1. A transmissão sexual do HIV-2 é menos frequente do que a do HIV-1 e a sua transmissão vertical é rara (Andreasson e cols, 1993; Kankie cols, 1994). Análises filogenéticas de sequências provirais do HIV-1 revelaram dois grandes grupos genéticos, o M (*main*) e o O (*outlier*). O grupo O é raro e está concentrado no leste Africano. No grupo M, variantes do HIV-1 são classificadas como subtipos (atualmente designados de A a K) de acordo com o seu grau de similaridade genética (Dybul & Fauci, 2003). Em 1998, Simon e colaboradores demonstraram a existência de um novo isolado viral do HIV-1. O isolamento dessa cepa, altamente divergente das demais, indica que o aparecimento de Lentivírus em humanos continua acontecendo e cria um terceiro grupo genético do HIV-1, o grupo N (*non-M/non-O- new*). Além disso, em 2009 outro grupo descrito foi o grupo P, isolado de uma mulher diagnosticada com HIV-1 na França (Plantier e cols., 2009). Sua classificação definitiva depende de novos casos emergentes deste tipo de cepa.

O grupo M é o mais prevalente dos três grupos (M, N e O) e todos seus subtipos se originaram na África central. O subtipo B é o mais prevalente nas Américas (> 80%), seguido de formas recombinantes circulantes (CRFs, que possuem segmentos genômicos derivados de mais de um subtipo), F (8%) e C (1,5%). A incidência do subtipo C vem crescendo rapidamente no Brasil, África e Ásia oriental (Heeney e cols., 2006).

1.1.2 Patogênese

O HIV-1 está incluído na subfamília *Lentiviridae* dos retrovírus humanos (Goff, 2001), que têm como importante característica se manterem por longos períodos de incubação entre a infecção e o início das manifestações clínicas. Desde a identificação da aids, em 1981, sabe-se que a queda no número de linfócitos T CD4+ é uma característica marcante da progressão clínica da enfermidade. Acredita-se que esta perda de células T

CD4+ ocorra por destruição direta ou por mecanismos indiretos. Dentre os fenômenos envolvidos, temos a formação de sincícios, autoimunidade, apoptose e ativação crônica do sistema imune, dentre outros (Dybul & Fauci, 2003; Picker, 2006).

Por muitos anos acreditou-se que a grave imunossupressão que acomete os pacientes com aids resultava de uma crônica e gradual depleção dos linfócitos T CD4+, com consequente destruição do sistema imune. No entanto, trabalhos recentes em modelos animais vêm demonstrando que a chave para o entendimento da gênese da aids pode estar nas primeiras semanas que seguem à infecção (Igarashi e cols., 2001). Nos primeiros dias após a infecção, os vírus e células infectadas pelo HIV-1 atravessam a barreira da mucosa intestinal e promovem a infecção das células-alvo mais abundantes residentes da *lamina própria*, que são as células T CD4+ de memória efetora em repouso. Após o estabelecimento nos tecidos linfóides, um grande número de células CD4+ é infectado. As condições se tornam, então, ideais para uma explosão na produção viral, resultando em uma drástica redução do número de células T CD4+ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT), a maior coleção de tecido linfóide no organismo (Brenchley e cols., 2004; Mehandru e cols., 2004; Picker e cols., 2005) (Figura 3). Em seguida, começa uma fase de controle da replicação viral pela resposta de células T citotóxicas, havendo uma melhora na contagem de linfócitos T CD4+, que só torna a cair mais tardiamente no curso da infecção, com o estabelecimento da aids. No entanto, acredita-se que este primeiro momento da infecção seja decisivo na progressão da doença (Picker e cols., 2005). Em parte, essa teoria é sustentada pela ideia de que neste curto período de infecção, diversos vírus mutantes são produzidos. Alguns desses mutantes seriam resistentes a anticorpos neutralizantes, outros à ação de células T citotóxicas. Além disso, nessa fase se dá o estabelecimento de reservatórios virais, principalmente em macrófagos, e vírus infecciosos que se associam a células foliculares dendríticas, além da redução em massa do número de células T CD4+ e células T CD4+ de memória, particularmente no GALT (Haase, 2005) (Figura 3).



Figura 3 – Colonoscopia de um indivíduo negativo (esquerda) e outro positivo para infecção pelo HIV-1 (direita). As áreas amareladas representam o GALT. Fonte: IAS 2007.

A depleção dramática de linfócitos T CD4⁺ que ocorre na mucosa, parece não ser o único fator responsável pela progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida, uma vez que macacos de diversas espécies africanas que são infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) também apresentam essa depleção de células T CD4⁺ sem apresentar quadro clínico semelhante à aids (Pandrea e cols., 2006). Alguns autores defendem que a ativação crônica e generalizada do sistema imune possa ser o fator principal causador da aceleração e progresso da infecção pelo HIV-1 até o quadro clínico de aids (Picker, 2006).

Em humanos e primatas não-humanos, a depleção das células T CD4⁺ na mucosa é rapidamente seguida por um estado de ativação imune generalizada, manifestada na fase crônica da infecção. Os sinais dessa ativação generalizada são o aumento na frequência de células T expressando marcadores de ativação, produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e aumento no “turnover” de células B, T e NK. Essa ativação não ocorre apenas em células específicas contra o HIV ou o SIV, mas sim em diversas células com as

mais diferentes especificidades. Vários autores sugerem que essa ativação generalizada se dá por uma recorrente estimulação antigênica associada à resposta inflamatória (Picker, 2006). Essa ativação crônica levaria à regeneração insuficiente de células T de memória central, morte das células associadas à infecção e destruição da arquitetura dos linfonodos devido à inflamação crônica, além de perda de células T “naive” pela excessiva diferenciação em células de memória e perda da função tímica. Ainda não se sabe o exato papel desses fatores individualmente, ou em combinação, na patogênese da aids.

Nessa linha, Brenchley e colaboradores sugerem que uma aumentada translocação microbiana, provavelmente no trato gastrointestinal, pode contribuir para a ativação generalizada e crônica do sistema imune na infecção pelo HIV-1 (Brenchley e cols., 2006).

1.1.3 – Estrutura e Ciclo Replicativo

A partícula viral infectiva (vírion) do HIV-1 é esférica e apresenta um envelope lipoprotéico formado por uma bicamada lipídica, obtido da membrana plasmática da célula hospedeira (Dybul & Fauci, 2003) (Figura 4). No envelope estão inseridas as glicoproteínas organizadas em trímeros (Welman e cols., 2006). Cada monômero glicoprotéico é formado por duas subunidades, uma glicoproteína de 41kDa (gp 41), transmembranar, e uma glicoproteína solúvel de 120 kDa (gp 120), que está ancorada à gp 41 e localizada externamente à partícula viral (Weiss e cols., 1990). Ambas são originadas de um precursor comum, a glicoproteína gp 160, de 160 kDa, que é clivada durante a maturação viral (McCune e cols., 1998).

Em sua porção interna o vírion possui um core cônico, composto pela proteína do capsídeo (p24). O capsídeo contém o genoma do HIV, o qual é composto por duas cópias de RNA fita simples e está associado a proteínas do nucleocapsídeo (p7), e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Freed& Martim, 2001; Goff, 2001). Em torno

dessa estrutura encontra-se uma matriz protéica formada pela proteína p17 (Goff, 2001; Freed & Martin, 2001).

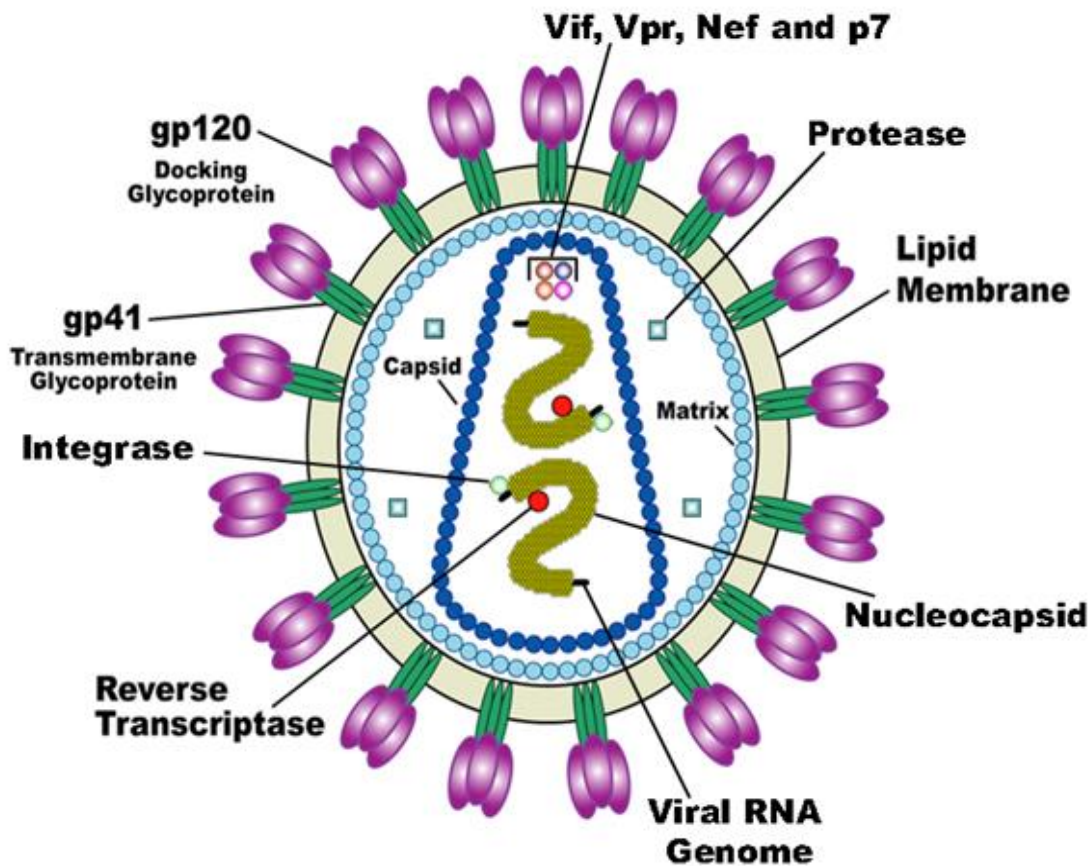


Figura 4 – Estrutura do HIV-1. No envelope estão inseridas as glicoproteínas gp120, responsável pela adsorção e entrada do vírus na célula, e a gp41. Na porção interna do vírus encontra-se a matriz, que contém a enzima protease e o capsídeo. Este último estão localizadas as duas fitas simples de RNA, a transcriptase reversa e a integrase, responsáveis pela produção do DNA complementar e sua integração no DNA genômico, respectivamente. Fonte: <http://www.stanford.edu>

O DNA proviral, formado após a transcrição reversa, apresenta em suas extremidades seqüências LTR-3' e LTR-5' (*long terminal repeats*) (Freed & Martin, 2001) (Figura 5). Entre as extremidades 5' e 3' do genoma são encontrados três genes comuns aos retrovírus: *gag* (antígeno específico do grupo) que codifica uma poliproteína precursora Pr55Gag, que é clivada pela protease viral dando origem às proteínas p17, p24, p7 e p6; *pol* (polimerase) que

codifica também uma poliproteína precursora, a Pr 160 Gag-Pol, que é clivada pela protease dando origem às enzimas transcriptase reversa, protease e integrase; e *env* (envelope) que codifica a proteína do envelope gp160. Além desses genes, há mais seis outros: *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif* (Freed & Martin, 2001) (Figura 5).

A proteína *tat* é crítica para a transcrição dos LTRs do HIV-1, além de ser uma das primeiras proteínas a ser sintetizada. O *rev* possui um papel fundamental no transporte de RNAs virais que não sofreram processamento do núcleo para o citoplasma. A proteína *Vpu* aumenta a liberação de partículas virais durante a replicação e promove a degradação da molécula CD4 na célula hospedeira. Essa degradação contribui para liberação da gp 160 de complexos Env-CD4 no retículo endoplasmático, aumentando a disponibilidade da glicoproteína Env para transporte para a superfície celular. O gene *vpr* codifica uma proteína que é incorporada à partícula viral e que, após a transcrição reversa, auxilia no direcionamento do complexo de pré-integração para o núcleo. O gene *vif* codifica uma proteína essencial para a replicação do HIV-1 em PBMCS, macrófagos e algumas linhagens de células T (Freed & Martin, 2001). A proteína *nef* é uma das primeiras a ser detectada após a infecção pelo HIV-1. Esta proteína contribui para a ativação de linfócitos T, além de promover a redução da expressão de CD4 na superfície celular (permitindo a incorporação de *env* e o brotamento da partícula viral, uma vez que CD4 inibe esse processo) e de MHC de classe I, contribuindo para a evasão do vírus à resposta imune do hospedeiro (Steffens & Hope, 2001).

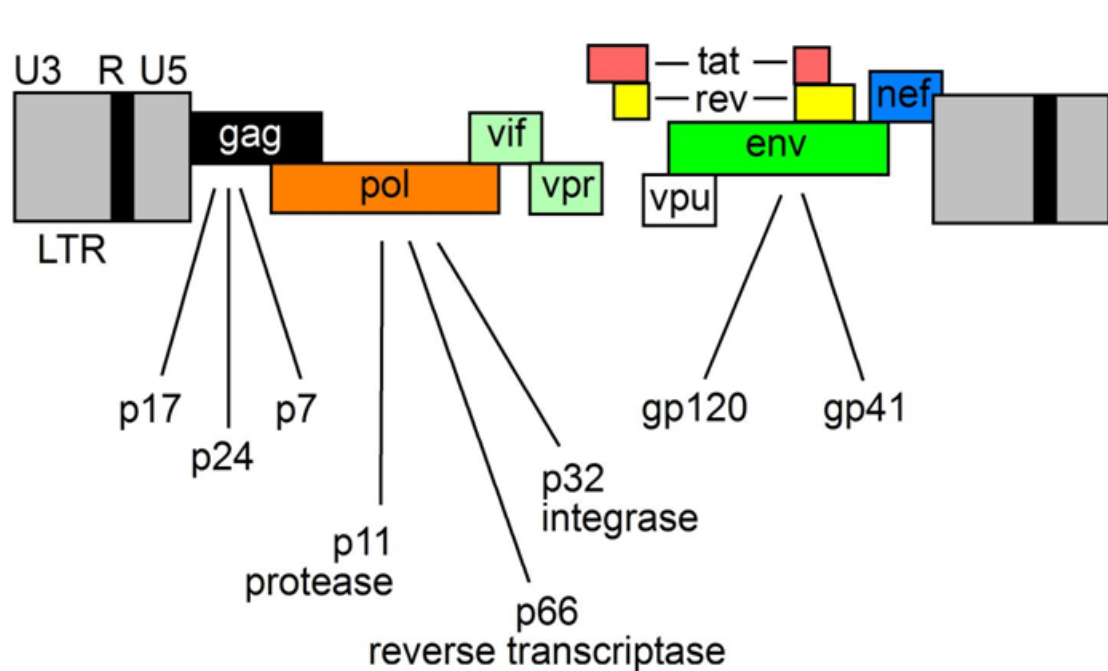


Figura 5 – Estrutura genômica do HIV-1. O genoma do HIV-1 é flanqueado por duas regiões LTR, que contém elementos regulatórios dos genes codificantes do HIV-1. O genoma apresenta 9 sequências abertas de leitura, dando origem a 15 proteínas, através da clivagem de poliproteínas pela protease viral dos produtos gênicos de gag e gag-pol. O transcrito de gag dará origem às proteínas de matriz, nucleocapsídeo, capsídeo e p6. O transcrito de pol dará origem a transcriptase reversa, integrase e protease. Os demais genes regulatórios, que correspondem à *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* e *nef*, darão origem às suas respectivas proteínas, que possuem papel importante na regulação da replicação viral.

O ciclo de replicação do HIV-1 se inicia pela ligação da gp120 ao CD4, o que muda a conformação estrutural de gp120, permitindo a ligação ao co-receptor CCR5 ou CXCR4. Esses achados sugerem que a fusão do vírus à membrana da célula hospedeira segue os seguintes passos: primeiro, a gp120 se liga ao CD4 e, em seguida, ao co-receptor gerando um complexo formado por CD4 e gp120; finalmente mudanças conformacionais na gp41 permitem que esta se insira na membrana celular, levando à fusão do envelope viral com a membrana celular (Berger e cols., 1999). Esta fusão permite o acesso do core viral ao citoplasma, sendo ela, portanto, vital ao processo infeccioso.

Após essa etapa ocorre o desnudamento viral juntamente com o início da transcrição reversa do RNA viral. A transcriptase reversa tem a função de converter os genomas de

RNA em DNA dupla-fita logo após a infecção (Telesnitsky & Goff, 1997). Durante esse processo o DNA viral recém-formado fica associado ao complexo de transcrição reversa, sendo depois transportado para o núcleo como parte do complexo de pré-integração. A transcrição reversa pode introduzir erros no genoma viral a cada ciclo de replicação, resultando em uma progênie viral geneticamente variada (Hottiger & Hubscher, 1996).

A enzima integrase promove a integração do DNA dupla fita linear viral no cromossoma da célula hospedeira (Brown, 1997). O DNA integrado, chamado de provírus, serve como molde para a síntese de RNAs mensageiros (mRNAs) virais, que codificam as proteínas estruturais, regulatórias e acessórias usadas na replicação viral. Essa síntese ocorre pela ação da RNA polimerase II celular auxiliada por fatores de transcrição celulares e pela proteína viral tat (Greene & Peterlin, 2002).

Os primeiros mRNAs formados são completamente processados e originam as proteínas virais regulatórias. Em seguida, com o auxílio de rev, os mRNAs não completamente processados, ou não processados, são transportados para o citoplasma (Hope, 1997). Os mRNAs para env são traduzidos no retículo endoplasmático (Frankel & Young, 1998). Os produtos gerados pela tradução de *gag* e *gag-pol* se associam às novas fitas de RNA genômico do vírus e às proteínas do envelope presentes na membrana celular. As novas partículas virais são liberadas por brotamento e tornam-se infectivas após a clivagem das poliproteínas gag e gag-pol pela protease viral (Frankel & Young, 1998).

1.1.4 – O HIV-1 e os fatores celulares de restrição

Desde o ano 2000, diversos estudos sobre fatores de restrição (FR) à replicação do HIV-1 vêm surgindo com destaque na literatura. Os FRs são proteínas celulares capazes de restringir a infecção de diversos vírus. Os FRs são transcritos na presença de IFN tipo 1, sendo classificados como genes induzidos por IFN (ISGs) (Goujon e cols., 2010). Diversos

FRs capazes de restringir a infecção pelo HIV-1 tem sido descritos, dentre eles os mais estudados são o APOBEC3G (A3G) (Sheery e cols., 2003), teterina (Niel e cols., 2008) e IFITM (Lu e cols, 2011).

O A3G, identificado como inibidor da replicação o HIV-1, codifica uma citidina deaminase. Sua expressão é constitutiva em células que restringem a replicação do HIV-1 com deleção para o gene Vif (Sheery e cols., 2003) (figura 6). O A3G pode ser incorporado dentro da partícula de HIV-1, no qual é empacotado junto a novos vírions. Após uma nova infecção de outras células alvo, o A3G catalisa a deaminação de deoxicitidinas, gerando uma fita negativa de DNA contendo deoxiuracil em abundância. Isso resulta em uma fita positiva de DNA rica em nucleotídeos A e escassa em nucleotídeos G, levando a uma hipermutação em seu genoma. No entanto, o A3G é contra-regulado pela proteína Vif do HIV-1. Esta se liga ao A3G, resultando em sua ubiquitinação e degradação via proteassomas (Sheehy e cols, 2003).

A teterina também é um FR recém-caracterizado, e sua função em restringir a infecção pelo HIV-1 ocorre nas etapas tardias da replicação viral, durante seu brotamento da célula (Figura 7). Sua função foi definida na infecção por cepas de HIV-1 defectivas para o gene Vpu (Niel e cols., 2008; Van Damme e cols., 2008). Na ausência de Vpu, a teterina ancorada à membrana celular é capaz de reter as partículas virais maduras. Essa proteína apresenta um domínio N-terminal citoplasmático, seguido de um domínio transmembrana e sua porção C-terminal contendo uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) voltada para o lado extracelular (Kupzig e cols., 2003). Essa ancora permite a associação com as partículas virais recém-formadas, retendo-as na membrana celular e impedindo seu brotamento (Figura 7).

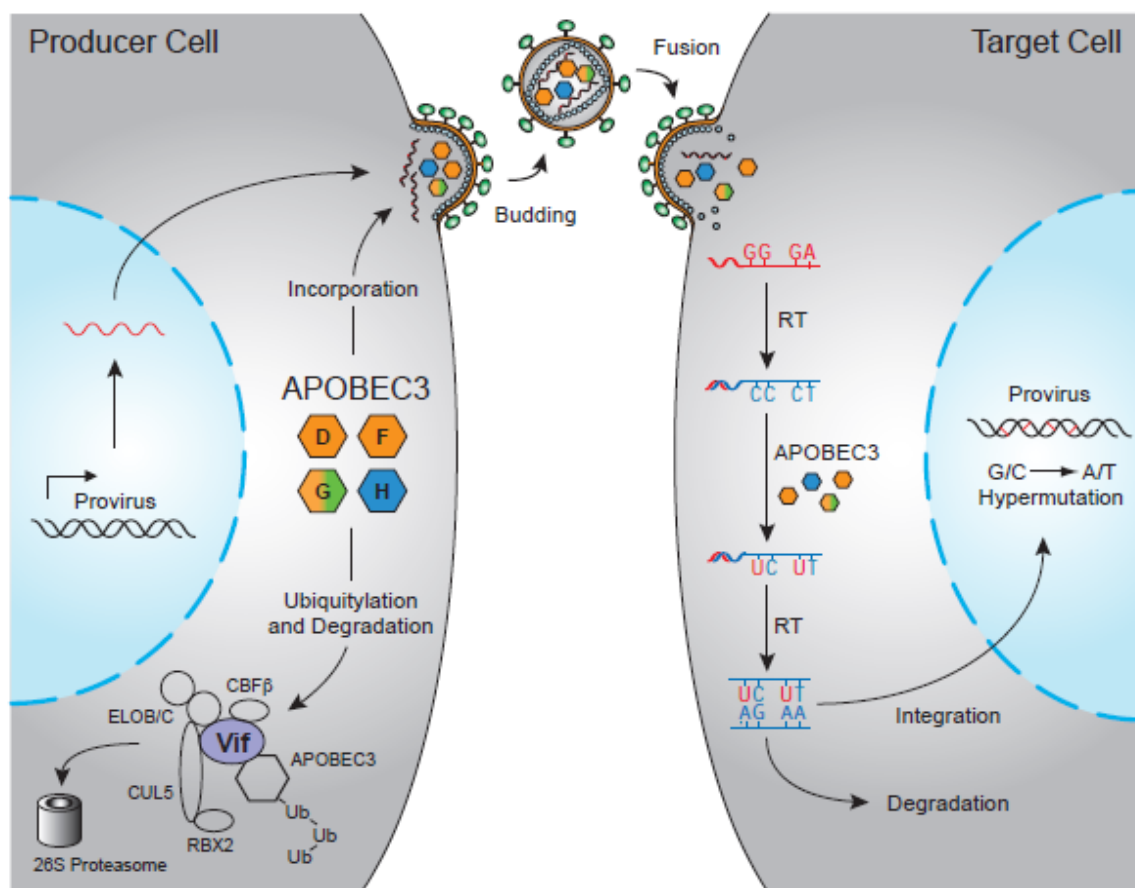


Figura 6 – Restrição do HIV-1 por APOBEC3G e sua contra-regulação por Vif. O APOBEC3G corresponde a uma citidina deaminase, que interfere na transcrição reversa do HIV-1 por induzir a troca de deoxicidina por deoxiuridina, gerando hipermutações no DNA complementar. Sua função é contra-regulada por Vif, que é capaz de levar a ubiquitinação de APOBEC3G e conseqüentemente sua degradação via proteassoma. (Harris e cols, 2012).

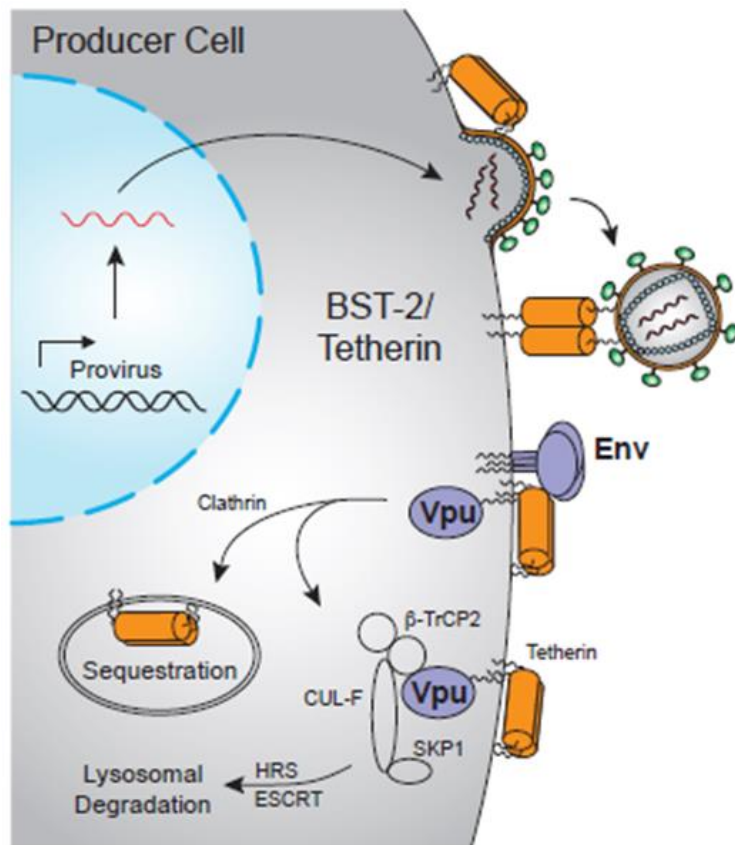


Figura 7 – Restrição do HIV-1 por teterina e sua contra-regulação por Vpu.A teterina é uma proteína ancorada à membrana celular, que é capaz de inibir a infecção por HIV-1, impedindo a difusão de partículas virais após o brotamento das células infectadas. No entanto, sua função é antagonizada pela proteína viral Vpu, que leva à degradação de teterina (Harris e cols, 2012).

Já o IFITM, consiste em uma proteína transmembrana induzida por interferon, identificada primeiramente como potente inibidor da entrada dos vírus Influenza A H1N1, Oeste do Nilo (*West Nile Virus*) e Dengue (Brass e cols., 2009). Esta proteína está constitutivamente expressa em todos os tipos celulares e desempenha papel importante em diversas funções celulares, como oncogênese, adesão celular e sinalização pelo sistema imune (Evans e cols, 1993; Brem e cols, 2003). Existem 4 isoformas diferentes desta proteína, o IFITM 1, 2, 3 e 5. Recentemente, mostrou-se que o IFITM também possui um potente efeito na restrição da replicação do HIV-1 (Lu e cols., 2011). À exceção do IFITM5, que está expresso apenas em osteoclastos e desenvolve função importante na mineralização óssea (Okumura e cols., 2008), as demais isoformas destas proteínas estão relacionadas com

a inibição do HIV-1. Na restrição viral, o IFITM é capaz de inibir a replicação do HIV-1 durante a entrada do vírus na célula (figura 8). Essa inibição ocorre através da mediação de IFITM com as proteínas do envelope viral, por ser uma proteína transmembrana (Brass e cols., 2009).

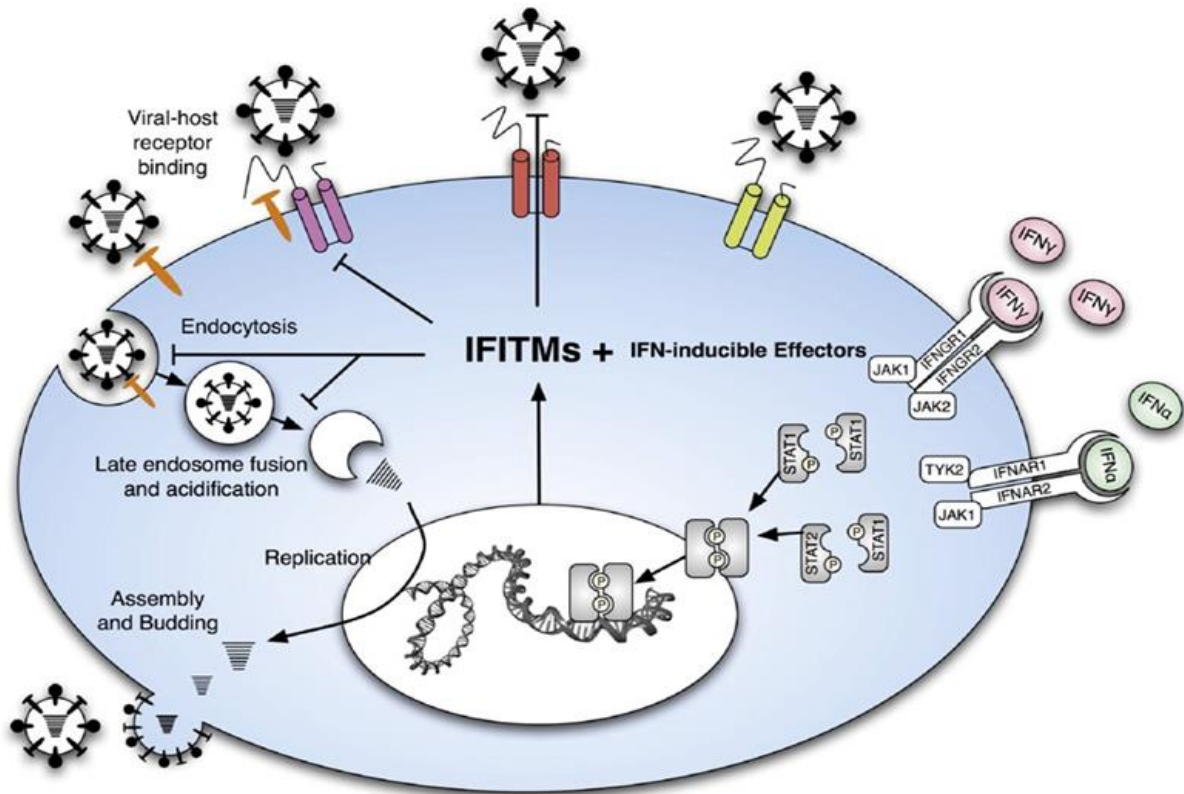


Figura 8 – Mecanismo de ação do FR IFITM3. O modelo apresentado é representativo da restrição por IFITM3 sobre o vírus Influenza. Esse fator também impede a entrada do HIV-1, Dengue, West Nile e outros vírus. O IFITM3 consiste em uma proteína transmembrana induzida por interferon. Durante a infecção por HIV-1, a presença de IFN irá ativar a via das JAK-STATs, aumentando a transcrição de IFITM3, e consequentemente a sua expressão na membrana celular, inibindo a entrada do HIV-1 na célula. (Abraham e cols, 2009)

A proteína de resistência à Myxovírus do tipo 2 (MX2) é induzida por IFN e atua como inibidora da infecção por HIV-1 (Kane e cols, 2013; Goujon e cols., 2013). Alguns dos seus possíveis sítios de ação seriam o capsídeo viral, pois foi observada uma inibição da importação do DNA viral para o núcleo. Além disso, MX2 poderia estar atuando na inibição

de determinada via específica de importação e ainda na desestabilização do DNA viral após sua entrada no núcleo e/ou inibindo a integração no genoma celular (Kane e cols, 2013).

A indução da proteína SAMHD1 via IFN, torna as células dendríticas e mielóides altamente refratárias à infecção por HIV-1 (Kaushik e cols, 2009). Essa proteína é contra regulada pela proteína Vpx, que leva a ubiquitinação de SAMHD1 e sua degradação via proteassoma. A Vpx está presente apenas no HIV-2 e no SIV e sua função está relacionada com a diminuição dos níveis de dNTP celulares. Dessa forma, a falha em sintetizar o cDNA leva a desintegração de componentes virais via nucleases celulares (Laguette e cols, 2011).

Por último, outra proteína descrita como fator de restrição à replicação do HIV-1 é a MCP1P1, capaz de restringir a replicação do HIV-1 através da redução do número de cópias do RNA viral em células T CD4⁺ (Liu e cols, 2013).

1.2 - O Herpes Simples Tipo 1

1.2.1 - Classificação e Patogênese

O vírus herpes simples tipo 1 pertence à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesviridae*, devido às suas características genômicas, sorológicas, ciclo replicativo e latência (Miranda e cols., 2002).

O HSV-1 inicia sua infecção através de contato direto da mucosa ou pele com algum tipo de abrasão com as secreções que contenham o vírus em questão. Após sua entrada, as partículas virais são transportadas retrogradamente, ao longo dos neurônios sensoriais até o gânglio trigêmeo, onde podem estabelecer infecções latentes por toda vida do hospedeiro (Brady e cols., 2004).

A lesão orolabial recorrente causada pelo HSV-1 tem como sintomas uma vermelhidão em torno dos lábios e pode ser precedida por formigamento ou queimação local (Whitley e cols., 2002). O HSV-1 pode causar lesões mucocutâneas, encefalite em pacientes imunocomprometidos e neonatos, e ceratoconjutivite (figura 9), sendo uma das principais causas de cegueira em países em desenvolvimento (Corey & Spear, 1986). Além disso, o HSV-1 pode ser encontrado no trato genital, com conseqüente estabelecimento de latência nos gânglios lombo-sacros (Bhattacharjose e cols., 2005).

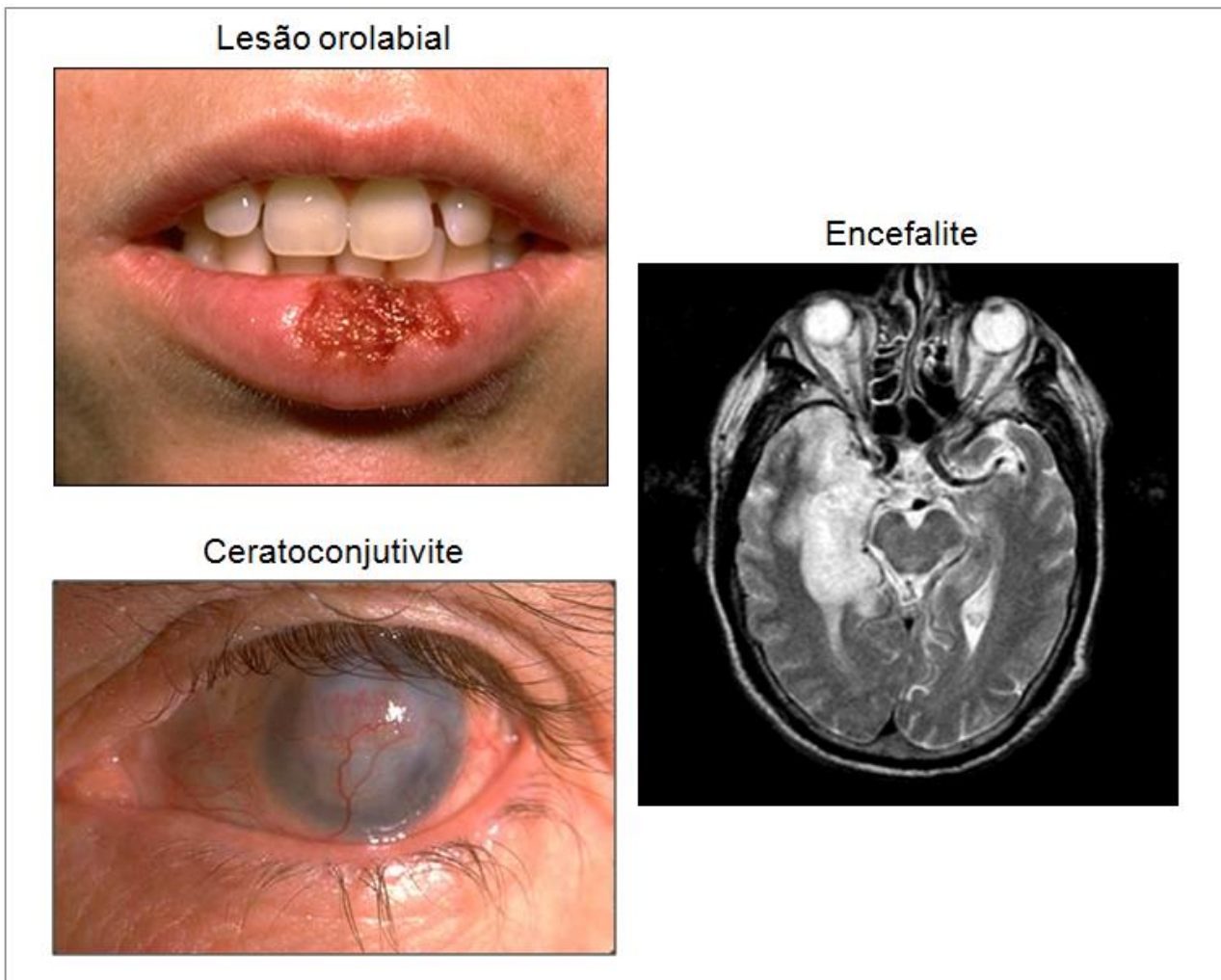


Figura 9 – Lesões causadas pelo HSV-1. A lesão orolabial representa a manifestação mais comum causada por herpesvirus, e se caracteriza por erupções cutâneas na pele. A encefalite e ceratoconjutivite são manifestações mais graves e presente principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Fonte: <http://www.google.com.br>

1.2.2 - Morfologia

A partícula viral completa do HSV-1 mede cerca de 150 nm. Além disso, este vírus apresenta um envelope lipídico, no qual estão inseridas as glicoproteínas virais gC e gD e algumas proteínas de envelope, como gE, gI e C-1, relacionadas com a inibição do complemento pelas vias clássica e alternativa. Outras glicoproteínas virais, como gM, gK e gL, estão relacionadas com o espalhamento do HSV-1 pelas junções intercelulares e pela formação de sincícios (Flakow, 1996).

Internamente ao envelope lipídico a partícula viral apresenta um material protéico e amorfo, denominado tegumento, que é composto pela proteína majoritária ICP5 e também pelas proteínas VHS, responsável pela degradação do RNAm celular e desagregação de polissomas, e α -TIF, responsável pela formação do complexo de pré-iniciação, dando início ao processo de transcrição viral. Além do tegumento, o HSV-1 apresenta um capsídeo, também de natureza protéica, que mede cerca de 100 nm e que serve de cerne para o genoma viral (Figura 10).

O genoma viral é composto por um DNA dupla fita linear que contém cerca de 150 kb, sendo constituído por 2 segmentos: um longo (L) e outro curto (S). Estes segmentos estão ligados covalentemente e são flanqueados por sequências invertidas e repetidas (Figura 11). No genoma viral existem sequências para codificação de cerca de 70 proteínas. Durante a infecção ocorre a circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (Whitley, 2007; Roizman & Sears, 2007).

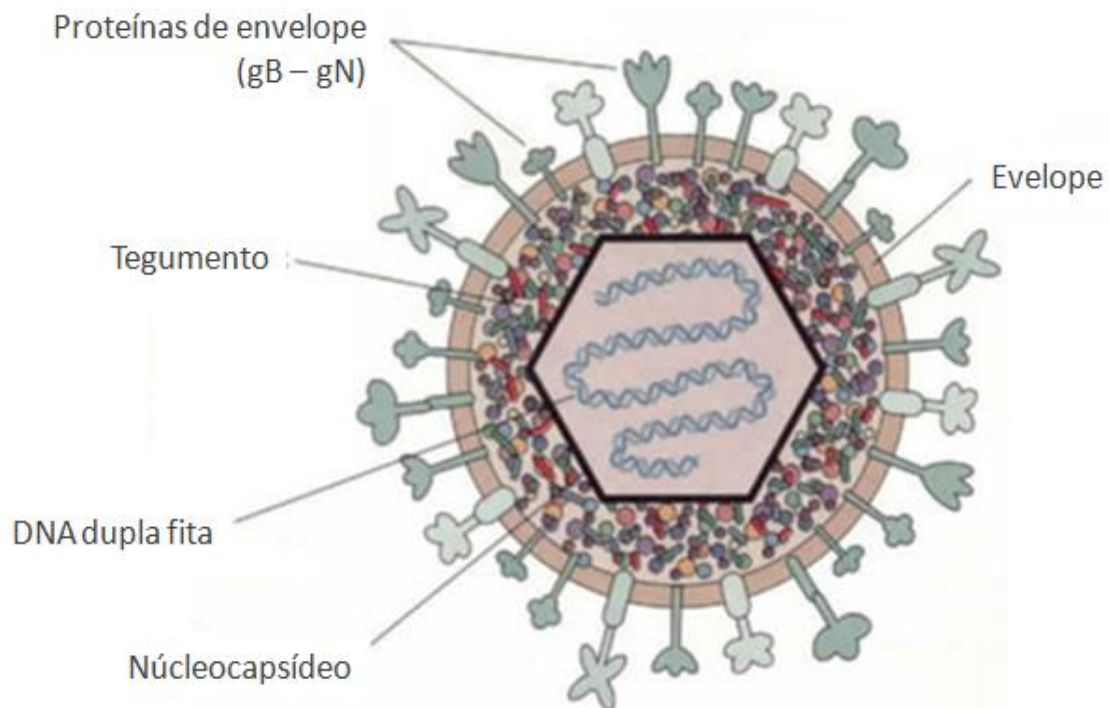


Figura 10 – Estrutura do HSV-1 representando o envelope, que contém as glicoproteínas responsáveis pela adsorção do vírus à célula; o nucleocapsídeo contendo a dupla-fita de DNA e o tegumento localizado entre o envelope e o nucleocapsídeo. Adaptado de <http://www.bio.davidson.edu>

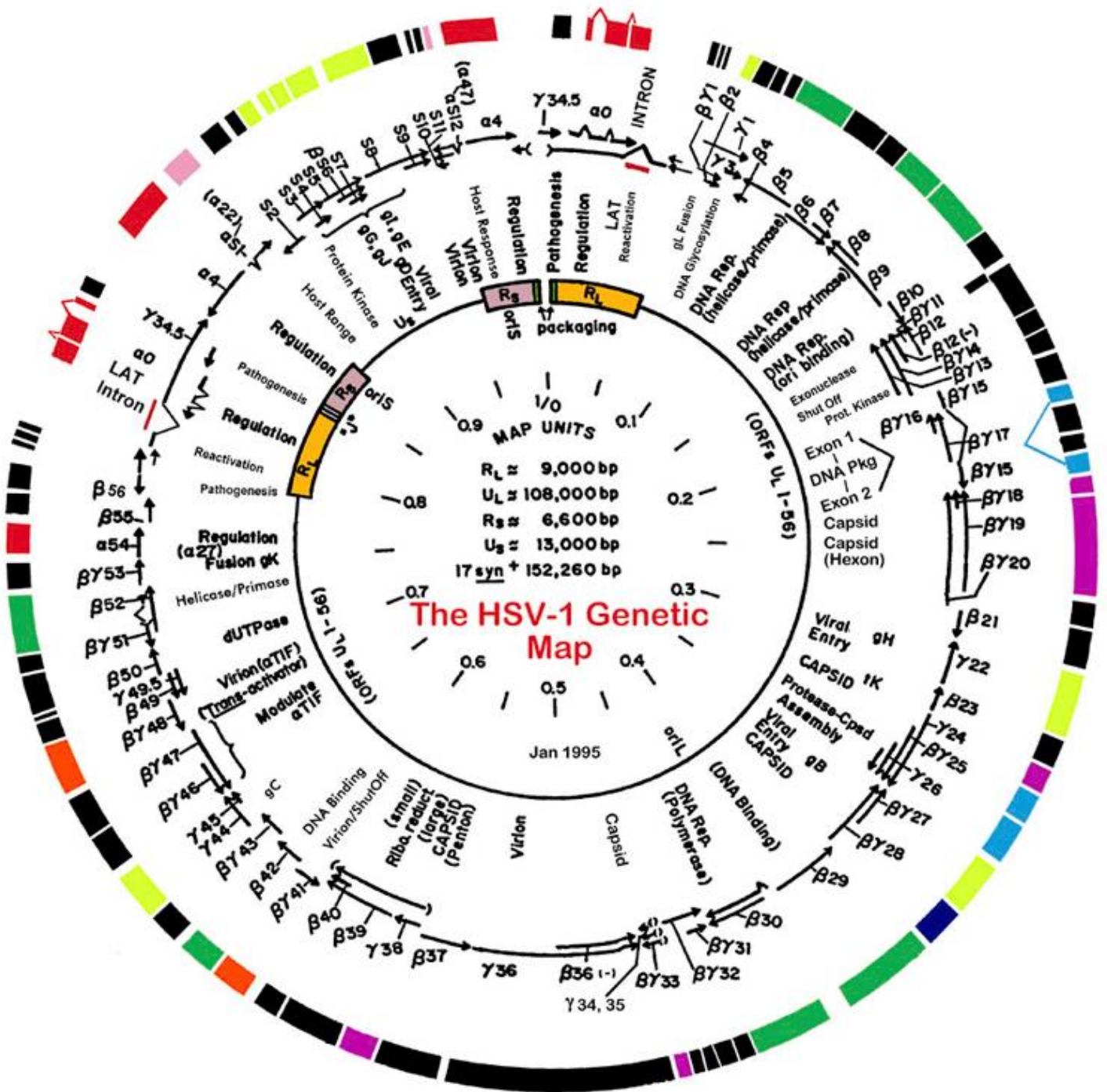


Figura 11 – Genoma do HSV-1. O HSV-1 apresenta um genoma dupla-fita de DNA, linear, contendo mais de 150 mil pares de bases. Na infecção, o DNA é capaz de circularizar e dar origem a quase 100 transcritos e mais de 70 ORFs. (<http://darwin.bio.uci.edu>).

1.2.3 - Ciclo Replicativo

A primeira etapa da infecção viral se inicia com a adsorção do HSV-1 na célula hospedeira. Nesta etapa, ocorre a interação das glicoproteínas virais gC e gB com proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de heparan sulfato. Após este processo, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 12): o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM –*herpesvirus entry mediator*), um membro da superfamília dos receptores do TNF/NGF; os receptores da família da Nectina-1 e Nectina-2, membros da superfamília das imunoglobulinas; e moléculas de heparan sulfato modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3 – O – sulfotransferase (Spear e cols., 2000; Spear & Longnecker, 2003; Spear, 2004; Spear e cols., 2006).

Após o processo de adsorção ocorre a exposição de resíduos hidrofóbicos de diversas glicoproteínas virais, como gD e gH/gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. Em seguida, as proteínas do tegumento, juntamente com o nucleocapsídeo, são liberadas no citoplasma da célula hospedeira. O nucleocapsídeo será, então, transportado via citoesqueleto para a área perinuclear, onde o capsídeo é desmontado, ocorrendo a liberação do genoma viral no núcleo da célula hospedeira (Figura 12) (Roizman & Sears, 2007).

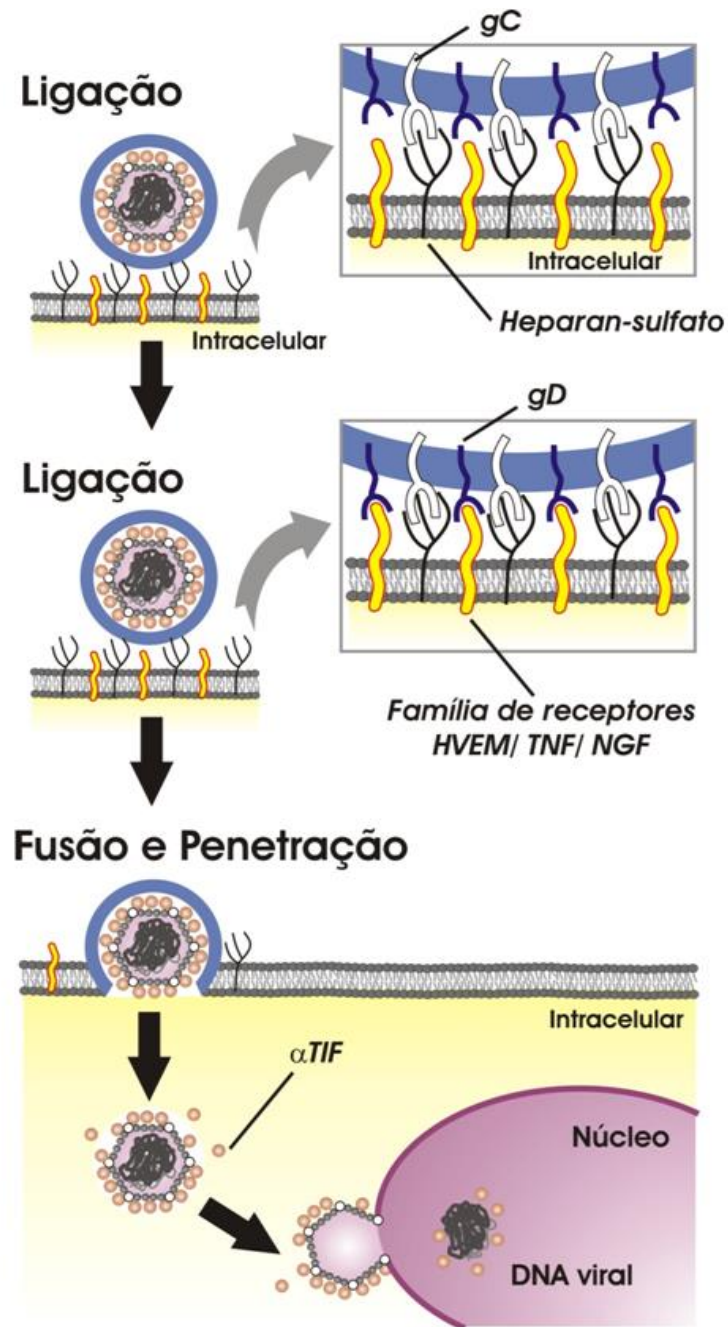


Figura 12 - Entrada do HSV-1 na célula hospedeira. O HSV-1 adsorve à membrana plasmática da célula através da ligação da gC às moléculas de heparan sulfato presentes na membrana e da ligação de gD aos receptores de HVEM, e à receptores da família TNF/NGF (Abrantes & Souza, 2010).

Após a sua entrada, o HSV-1 pode estabelecer a latência ou o ciclo lítico. Apesar dos fatores que determinam o estabelecimento da latência ou do ciclo produtivo ainda não serem bem estabelecidos, pesquisas indicam que a presença de Fator de Crescimento do Nervo

(NGF) pode induzir a latência em gânglios da raiz dorsal pela indução da transcrição do gene viral LAT (*Latency-Associated-Transcript*) (Preston, 2000; Mitchell e cols., 2003).

Durante o período de latência, o HSV-1 associa-se a histonas, formando um DNA episomal. Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação à isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral α -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA Box do genoma do HSV-1, iniciando a transcrição de genes de fase alfa e consequente infecção produtiva (Preston, 2000).

Algumas situações como estresse, hipertermia, aumento das concentrações citosólicas de AMPc, transplante de órgãos e imunossupressão, o HSV-1 pode ser reativado (Kuo e cols., 1987) (Figura 13). Durante a reativação, as partículas virais são transportadas via transporte anterógrado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos, causando a infecção produtiva, podendo provocar lesões no tecido mucocutâneo. Em alguns casos, como em pacientes imunocomprometidos e neonatos, as partículas virais podem migrar em direção ao sistema nervoso central, podendo provocar quadros de encefalite e ceratoconjuntivite (Corey & Spear, 1986; Roizman & Sears, 2007; Brady e cols., 2004).

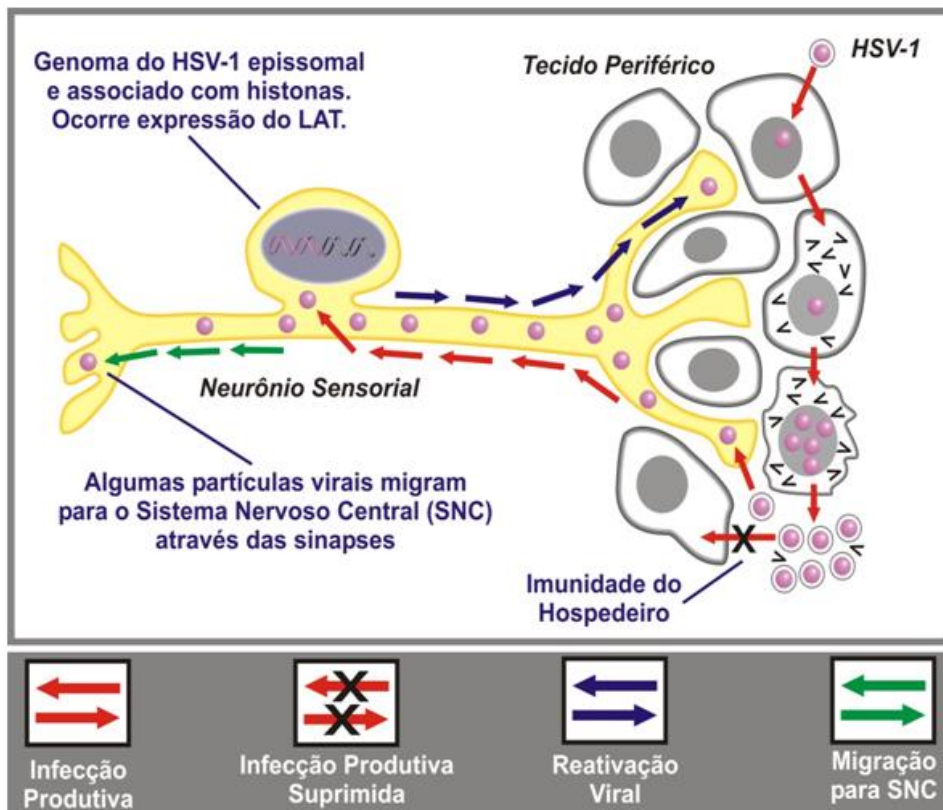


Figura 13 - Latência e Reativação do HSV-1. O HSV-1 estabelece latência nos gânglios sensoriais do SNP, principalmente nos gânglios trigeminal. Durante a fase de latência, apenas o gene LAT é expresso, levando a associação do DNA viral à histonas, formando um DNA episomal. (Abrantes & Souza, 2010).

O ciclo produtivo do HSV-1 pode ser cineticamente dividido em três fases (Figuras 14, 15 e 16). A primeira delas é denominada fase alfa (*Immediately-early*), que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral α -TIF, associada aos fatores nucleares OCT-1 e HCF, se liga ao TATA Box no genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral (Figura 14). Inicia-se, então, a síntese de proteínas de fase alfa, como ICP4, ICP27 e ICP47, responsáveis pela regulação positiva das fases beta e gama. Após a fase alfa inicia-se a fase beta (*delayed-early*), na qual são sintetizadas enzimas análogas às celulares e que possibilitam a replicação do DNA, como a timidinacina (TK) e UL30/UL42 (DNA polimerase viral) (Figura 15). A última fase é denominada fase gama (*Late*), na qual são produzidas as proteínas estruturais do vírion, ocorrendo a montagem da partícula viral (Roizman & Sears, 2007; Whitley, 2007; Boehmer & Lehman, 1997) (Figura 16).

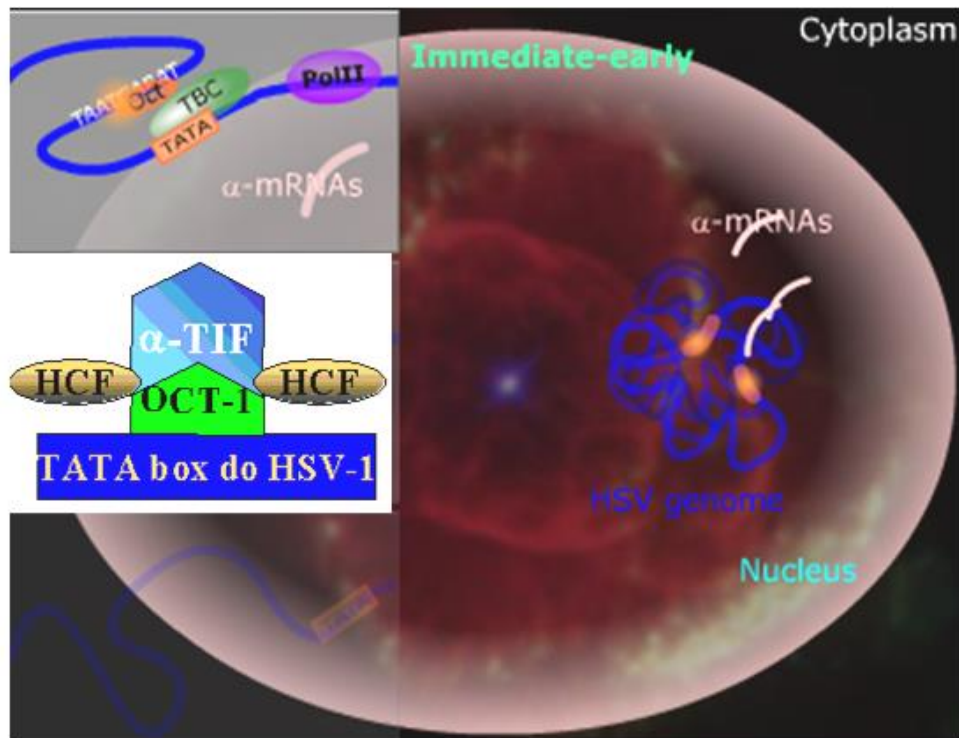


Figura 14 - Início da transcrição viral, fase alfa. Nessa fase, a proteína α -TIF se liga ao receptor OCT-1, que se ligará a região do TATA box, ativando os promotores de fase alfa. Os transcritos darão origem às proteínas responsáveis por regular as demais etapas da transcrição viral. (adaptado de Roizman & Sears, 1996 e <http://darwin.bio.uci.edu>)

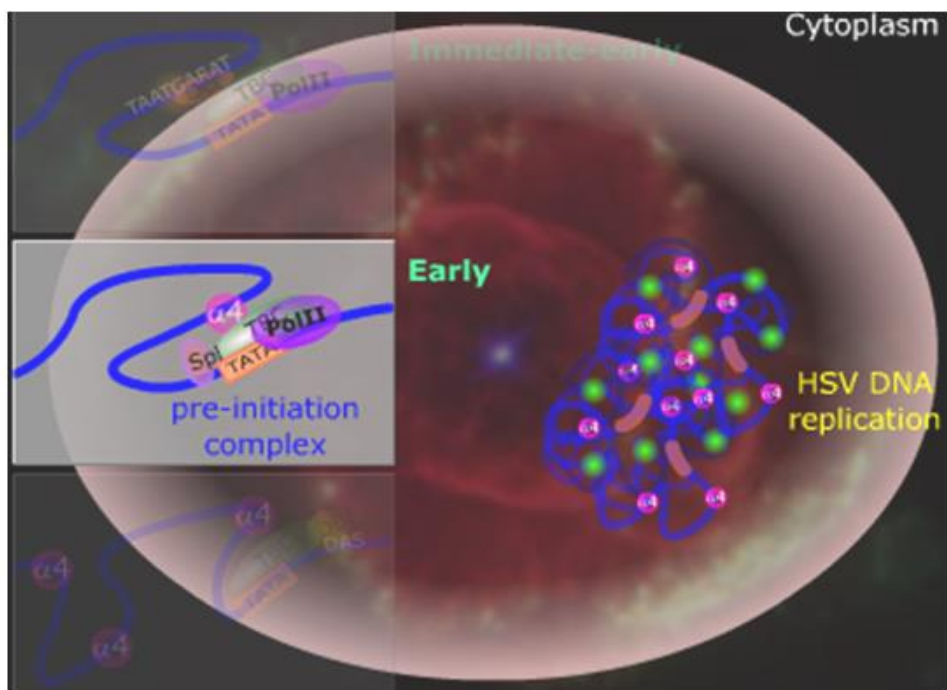


Figura 15 - Segunda fase da replicação do HSV-1, fase β . Nessa fase, os transcritos formados darão origem às proteínas responsáveis pela regulação da replicação do genoma viral. Fonte: <http://darwin.bio.uci.edu>

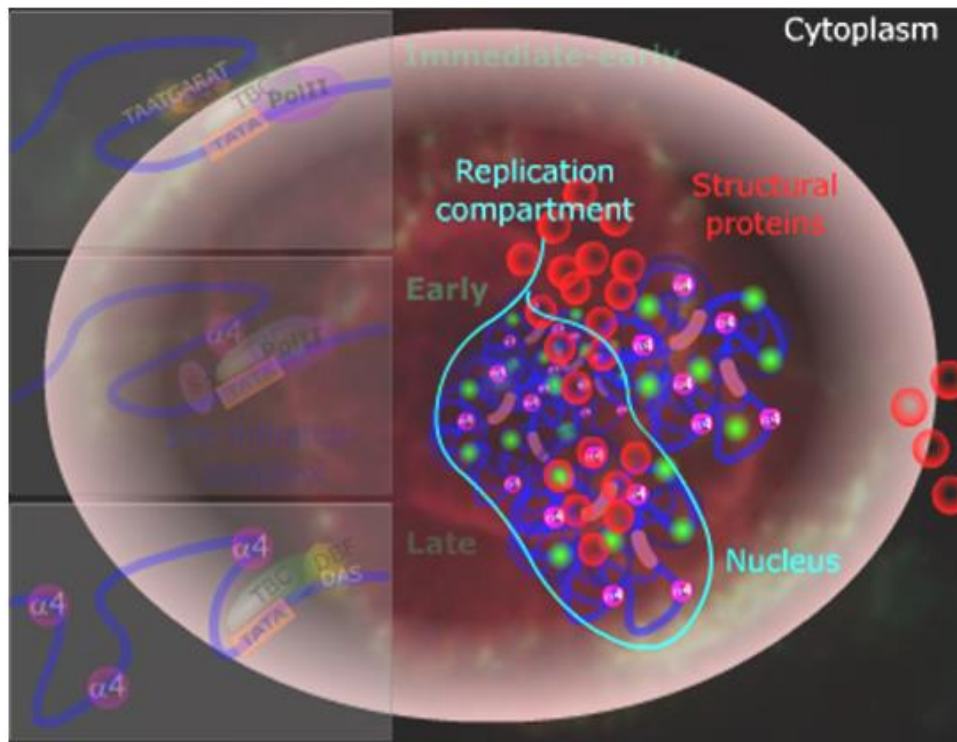


Figura 16 - Terceira fase da replicação do HSV-1, fase gama. Os transcritos formados nessa fase darão origem às proteínas estruturais do HSV-1 e posteriormente a montagem da partícula viral. Fonte: <http://darwin.bio.uci.edu>

Após a montagem das partículas virais no núcleo da célula hospedeira, o nucleocapsídeo viral é envelopado, através da fusão com a membrana nuclear interna. Para que as partículas virais possam ser liberadas do núcleo da célula hospedeira, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa, havendo um acúmulo de capsídeos sem envelope no citoplasma. Os capsídeos são então re-envelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Acredita-se que esta etapa seja mediada por interações entre proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de glicoproteínas virais, que já estariam inseridas nas vesículas derivadas do Golgi (Melancon e cols., 2004).

1.2.4. Evasão do HSV-1 à resposta imune inata: participação do IFN

A resposta imune inata representa a primeira linha de defesa contra infecções virais. Um dos mecanismos pelo qual a resposta inata regula suas funções, é através de respostas

induzidas por IFN. O IFN pertence à família de citocinas responsáveis pela indução da resposta inata contra diversos microorganismos patogênicos, que conseqüentemente influencia no processo da resposta adaptativa (Stark e cols, 1998).

A família de IFN está dividida entre três tipos: IFN do tipo I, II e III, de acordo com o tipo de receptor o qual se ligam. O IFN do tipo I corresponde a 13 subtipos de IFN α em humanos, IFN β , IFN κ , IFN ϵ , IFN ω , IFN τ e IFN δ , e tem como alvo o receptor IFNAR, expresso de forma ubíqua e é composto por IFNAR1 e IFNAR2. O IFN do tipo II corresponde ao à proteína IFN γ que se liga ao seu receptor IFNGR e é responsável por uma ampla resposta preferencialmente a patógenos. O IFN do tipo III, descrito mais recentemente é representado por IFN λ , que sinaliza através dos receptores IFNLR1 e IL-10R2. Apesar de suas funções não serem totalmente elucidadas, sabe-se que o IFN do tipo III está relacionado com a regulatória resposta antiviral.

O início da cascata de sinalização ocorre com a ligação de IFN ao seu receptor IFNAR, associando-se às Janus quinase (JAKs), que por sua vez, fosforilam resíduos de tirosina no domínio citoplasmático dos receptores. Os resíduos fosforilados dos receptores recrutam e ligam as chamadas proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs). As STATs fosforiladas sofrem dimerização e migram para o núcleo, onde se ligam a sequências de DNA nos promotores de diversos elementos regulatórios. Esse processo leva a ativação de mais de 300 genes estimulados por IFN (ISGs) (Figura 17) (Der e cols., 1998). Alguns ISGs codificam proteínas que estão relacionadas diretamente com a atividade antiviral, incluindo aquelas que remodelam o citoesqueleto, induzem apoptose, e regulam eventos pós-transcricionais, assim como modificações pós-traducionais. O fator de regulação de IFN (IFR) tipo 3 é capaz de induzir a transcrição do gene de IFN tipo I, e o aumento da produção desse tipo de IFN leva à indução de IFR7. A proteína IFR7 quando fosforilada, responde à infecções virais e ativa outros membros da família IFN α , levando a uma alta produção de IFN.

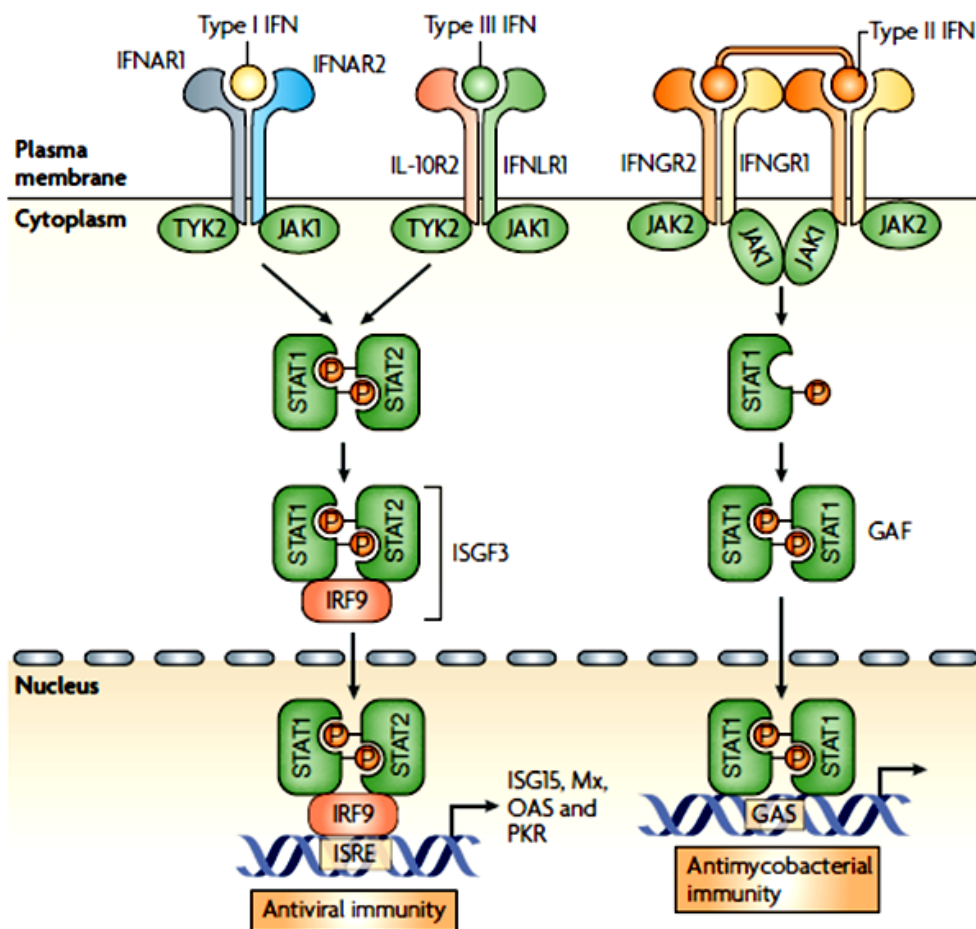


Figura 17 – Sinalização de resposta mediada por IFN. A cascata de resposta ao IFN inicia-se com a ligação de IFN aos receptores IFNAR1 e IFNAR2. O receptor de IL-10 (IL-10R2) se associa com o receptor de IFN λ (IFNLR1) para se ligar aos três subtipos de IFN λ . Após a ligação de IFN, a transdução de sinal se inicia com a associação de tirosinas quinase (JAK e TYR2), que fosforila IFNAR1, levando ao recrutamento de STATs. Os heterodímeros de STAT se associam com IRF9 para formar o fator gênico estimulado por IFN (ISGF3) ou GAF. Ambos os complexos são translocados para o núcleo que irão induzir a transcrição de ISGs. (Sadler & Williams, 2008)

Algumas das proteínas expressas em resposta ao IFN, como a proteína quinase R (PKR), possui um domínio regulatório que se liga à dupla-fita de RNA (dsRNA). Quando ocorre essa ligação, geralmente em infecções virais, a PKR dimeriza, auto-fosforila e torna-se ativada. O fator de transcrição de eucariotos (eIF2 α) é um dos principais alvos de fosforilação por PKR. A fosforilação de eIF2 α resulta na sua inativação, levando a uma inibição da síntese protéica celular (figura 18). Essa fosforilação em células infectadas leva a redução da expressão de proteínas virais e conseqüentemente da replicação. Outra proteína ativada em presença de dsRNA durante a infecção viral é a 2',5'- oligoadenilatosintetase

(OAS). Sua ativação catalisa a síntese de 2',5'- oligoadenilatos, que se ligam à RNase L monomérica inativada, induzindo sua dimerização e ativação (Jacobs e cols., 1996). A RNase L ativada é capaz de clivar tanto RNAm quanto RNAr, levando a inibição da síntese protéica. A proteína GTPase de resistência a mixovírus (Mx) tem sido descrita por conferir resistência à infecções por diversos vírus de RNA. Apesar do seu mecanismo de ação ainda não ter sido completamente elucidado, modelos experimentais suportam a hipótese de que *Mx* interfere no tráfego e na transcrição de complexos ribonucleoprotéicos virais (Weber e cols, 2000). Modelos animais mostraram que camundongos *knock out* para *Mx* apresentam maior susceptibilidade à infecções virais (Pavlovic e cols, 1995).

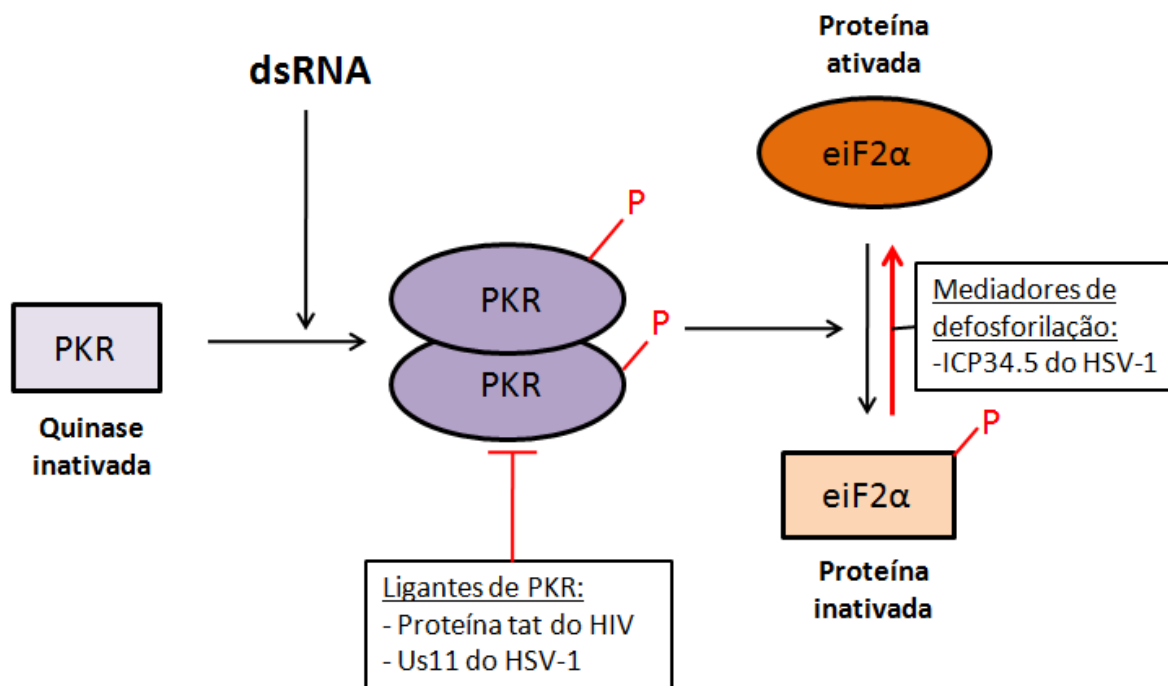


Figura 18 – Mecanismo de bloqueio da síntese protéica por PKR. Em presença a dupla-fita de RNA, a PKR se dimeriza e auto-fosforila, tornando-se ativada. Sua ativação leva à fosforilação de eIF2 α , levando a sua inativação e consequentemente bloqueando a síntese protéica. Alguns produtos virais são capazes de interferir na via de PKR, como as proteínas Us11 e ICP34.5 do HSV-1 e a proteína tat do HIV. (Adaptado de Levy & García-Sastre, 2001)

Apesar do IFN desempenhar funções importantes em infecções virais, alguns vírus possuem mecanismos de evadir essa resposta. Nesse contexto, a infecção por HSV-1 desempenha papel importante, uma vez que suas proteínas são capazes de contra regular a resposta de IFN durante a infecção, através da redução da síntese de RNAm e de proteínas celulares. As principais proteínas relacionadas com esse processo são: ICP0, ICP27, ICP34.5, Us3, Us11 e VHS (tabela 1).

A ICP0 é uma proteína da fase alfa, que desempenha um papel multifuncional e crítico durante a replicação ativa, latência e reativação, através do bloqueio de IRF3 e STAT1, levando a evasão da resposta de IFN (Hagglung e Roizman, 2004). A ICP27 é uma fosfoproteína de fase alfa classicamente conhecida por inibir a resposta antiviral através do bloqueio da transcrição e estabilidade do RNAm celular, atuando também inibindo a síntese de proteínas celulares e no *splicing* do RNAm. Além disso, essa proteína também desempenha função semelhante à ICP0 na evasão da resposta ao IFN.

Já a ICP34.5 é uma proteína produzida nos estágios finais da replicação viral, principalmente durante a fase gama, e é considerada o principal fator de neurovirulência. Sua principal função é impedir a inibição da síntese protéica mediada por PKR (Chou e cols, 1995). Além disso, a ICP34.5 interage com a proteína fosfatase-1 α e reverte a fosforilação de eIF-2 α mediada por PKR, mantendo ativada a síntese protéica (figura 17) (He e cols, 1997). Uma função de ICP34.5 descoberta recentemente está relacionada com a inibição da ativação de IRF3 e da indução de ISGs, em que a porção N-terminal da ICP34.5 forma um complexo com TBK-1 (Veeporten e cols, 2008).

A Us3 é uma proteína de fase gama que atua como uma proteína quinase, induzindo a via anti-apoptótica (Nishiyama, 2004). Além disso, também atua promovendo a expressão dos genes virais através da inibição da deacetilação de histonas (Poon e cols, 2003; Poon e cols, 2006b). Recentemente demonstrou-se que Us3 contra-regula os efeitos de IFN I e II

através da alteração da sinalização mediada por TLR3, causando efeitos pós traducionais nos receptores de IFN tipo II (Peri e cols, 2008).

A Us11 é uma proteína de fase gama que se liga à subunidade ribossomal 60S, levando ao acúmulo de espécies de RNA (Roller e Roizman, 1990, 1992). Sua principal função está relacionada com a inibição da resposta ao IFN através da inibição de PKR e RNase L, e sua atividade depende da expressão prévia de ICP34.5 para produzir uma resposta eficiente (Mulvey e cols, 2004).

A VHS (*virus host shutoff*) é uma proteína produzida na fase tardia γ da replicação do HSV-1, e é classicamente conhecida por sua habilidade em inibir a síntese de proteínas e degradação de RNAm celulares. Com relação à resposta de IFN, a VHS é capaz de inibir a cascata de IFN I e II, como também o inúmeros transcritos de ISGs (Smiley, 2004). A resposta antiviral de IFN do tipo II é prejudicada, uma vez que VHS impede a indução de ISGs específicas para IFN γ .

Tabela 1: Resumo das proteínas do HSV-1 inibidoras de IFN e seus mecanismos de ação. (adaptado de Paladino e cols, 2009)

Proteína do HSV-1	Etapa da Replicação	Mecanismo de bloqueio ao IFN
ICP0	α	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inibição da indução de IFR3 e IFR7 mediada por ISG; ✓ Antagonização da ativação de STAT-1;
ICP27	α	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inibição da ativação de IRF3 ✓ Inibição da ativação de STAT-1
ICP34.5	γ	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Prevenção da ativação de IRF3 ✓ Inibição a fosforilação de eIF-2α
Us3	γ	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Modulação dos níveis de transcritos de TLR3; ✓ Modificações pós-traducionais no receptor de IFN tipo II e subsequente inibição da indução de ISG
Us11	γ	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Prevenção da produção de 2'-5' OAS ✓ Interação com PKR e prevenção da produção de eIF-2α
VHS	γ	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Intervenção na produção de transcritos de ISGs durante estágios tardios da infecção ✓ Inibição da fosforilação de STAT-1; ✓ Inibição da formação do complexo STAT-1/2 ✓ Relacionado com a prevenção da fosforilação de eIF-2α

1.3 – Co-infecção HIV-1 e HSV-1

A infecção por HIV-1 leva a uma ativação crônica do sistema imune, gerando um imunocomprometimento de indivíduos infectados. Essa deficiência do sistema imune leva a uma resposta policlonal, que reduz as chances de respostas específicas contra agentes oportunistas (Douek e cols, 2007). Conseqüentemente, essas infecções podem ser responsáveis por influenciar diretamente a história natural da infecção pelo HIV-1. Dentre elas, a infecção por HSV-1 é considerada uma das mais importantes em termos de patogênese, uma vez que o vírus possui distribuição ubíqua na população mundial.

O HSV-1 é capaz de alcançar a corrente sanguínea e vasos linfáticos, uma vez que seus receptores de entrada, como o HVEM, são abundantes em linfócitos. A infecção produtiva e latente em macrófagos infectados com HSV-1 também foi demonstrada, indicando a possibilidade de co-existência desses dois vírus dentro de uma mesma célula. Margolis e colaboradores observaram a redução da replicação do HIV-1 e inibição da sua transcriptase reversa em tonsilas de indivíduos HIV-1 positivos tratadas com ACV (Margolis e cols, 2008). O ACV é um análogo de guanosina que torna-se ativo quando fosforilado por proteínas quinases de herpes vírus, quando incorporado à cadeia nascente do DNA viral, e atuando como um terminador de cadeia. Dessa forma, se o ACV inibe a replicação do HIV-1 em tonsilas de indivíduos soropositivos, isso significa que esses tecidos estavam co-infectados com herpes vírus. Esse achado demonstra que em um contexto real, a co-infecção HIV/HSV é recorrente.

Estudos *in vitro* iniciais da co-infecção sugerem uma ativação da infecção por HIV-1. Um desses estudos mostrou que células de linhagem de linfócitos CD4⁺ (CEM), quando co-infectadas com HIV-1 e HSV-1 em altos MOIs, produzia uma quantidade abundante do retrovírus (Albrecht et al, 1989). Quando essas células eram infectadas com cepas de HSV-1 mutantes para proteínas regulatórias de fase, foi observado que a proteína ICP4 poderia estar envolvida no aumento da replicação do HIV-1 na co-infecção, por ativar a região LTR no RNAm do HIV-1. Essa região possui homologia com promotores de células eucariotas, incluindo o TATA box, sítios de ligação à Sp1 e NF-κB e a elementos regulatórios negativos (NRE). Dessa forma, a homologia entre HSV-1, HIV-1 e promotores eucariotos poderia explicar porque a proteína ICP4 se liga à região LTR e regula a transcrição retroviral. Também foi observado que a proteína ICP0 pode estar relacionada com esse evento de regulação, através da ativação da região LTR via NF-κB e Sp1 (Margolis, 1992). Mais tarde foi descrito que ICP0 e ICP4 ativavam a região LTR por outros mecanismos além de NF-κB e Sp1. Ambas as proteínas são ativadas através da indução de LBP-1 e 2

(*LeaderBindingProteins* 1 e 2) e do seu receptor HLP-1. Esses ligantes são encontrados na região LTR próximo à região de início da transcrição e por isso conduzem a transcrição do HIV-1 independente de NF-kB e Sp1 (Vlach et al, 1992).

Além do impacto das proteínas de fase alfa na replicação do HIV-1, foi observado que a proteína Us11 do HSV-1, que é empacotada juntamente com a formação de novos *vírions*, é capaz de se ligar aos elementos responsivos ao REV (RRE) no RNAm do HIV-1. Essa ligação irá influenciar diretamente a formação de novas proteínas do HIV-1, como aquelas codificadas pelo gene de envelope ENV (Diaz e cols., 1996). Entre as proteínas do HIV-1 críticas na indução da replicação estimuladas por HSV-1, a Tat desempenha uma função importante. A indução da replicação do HIV-1 por HSV-1 só é possível na presença de Tat, sugerindo que o HSV-1 não é capaz de induzir o ciclo replicativo completo do HIV-1. No entanto, foi observada uma eficiente síntese de proteínas do HIV-1, mesmo com a integração do provirus de HIV-1 defectivo para Tat. (Popik e cols., 1994).

2 - OBJETIVOS

Verificar o efeito do HSV-1 sobre fatores de restrição na infecção por HIV-1 em macrófagos primários humanos.

Nossos objetivos específicos foram:

- Estudar se os efeitos do HSV-1 sobre a replicação do HIV-1 dependem da modulação de fatores de restrição à replicação deste retrovírus;
- Explorar de que maneira e em qual momento do ciclo replicativo o HSV-1 estaria interferindo na produção do HIV-1;
- Verificar se a inibição da expressão de genes do HSV-1 envolvidos com o bloqueio da resposta ao IFN previne a redução nos níveis de IFITM e o aumento da produção de HIV-1 na co-infecção;
- Realizar ensaios funcionais que demonstrem a importância da inibição de fatores de restrição à replicação do HIV-1 frente à infecção por HSV-1;

3 -MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura Celular primária: macrófagos derivados de monócitos humanos (MDM) foram obtidos a partir de PBMCs, que foram isoladas por centrifugação através de um gradiente de densidade a partir da preparação de *buffycoats* de doadores saudáveis obtidas do Banco de Sangue do HUCFF, e em seguida cultivadas em placas de cultura ou garrafas com DMEM contendo 5% de Soro humano (SH) (Millipore), penicilina e streptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas a 37 °C em 5% CO₂ por 6-7 dias para diferenciação de monócitos em macrófagos e então lavadas para retirada daquelas não aderentes. Os macrófagos restantes foram mantidos em DMEM 5% SH.

Células de linhagem: células Vero (células renais de macacos verdes africanos), e TZM-bl (HeLas contendo o gene reporter para luciferase, ativado pela região LTR do HIV-1), foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), 100 U/mL penicilina, e 100 µg/mL streptomicina e incubadas a 37 °C em 5% CO₂.

Titulação e produção de estoques virais: os estoques virais de HIV-1 foram crescidos com a cepa monocitotrófica CCR5 HIV-1_{Ba-L} (cedido pelo programa de reagentes NIH AIDS), e expandidos em PBMCs de doadores saudáveis, ativadas com fito-hemaglutinina (Lima e cols., 2002). A replicação do HIV-1 foi quantificada através do sobrenadante da cultura celular por um kit comercial de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (ZeptoMetrix) de acordo com instruções do fabricante. Uma outra quantificação foi realizada através da infecção de células TZM-bl e a produção de luciferase foi medida por unidades de luminescência relativa (RLU) 24 h p.i. Para o crescimento do HSV-1, células Vero foram infectadas com a cepa AR-29 em MOI de 0,1. Após 24 h de infecção, as células foram

lisadas por congelamento e descongelamento e centrifugadas a $400\times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Os sobrenadantes foram estocados à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. O título viral foi determinado por $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ (*tissue culture infectious dose*) em células Vero.

Infecção experimental com HSV-1 em macrófagos (infectados ou não com HIV-1): macrófagos cultivados em placas de 24 poços foram infectados com HSV-1 nos MOIs de 0,1 e 1 por 1 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células foram lisadas em diferentes períodos de tempo pós-infecção como tampão A (0,2% azul de bromofenol; 0,5% β -mercaptoetanol; 1 M Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS; 1% glicerol) para posterior análise dos níveis de proteínas por Western Blot. Também foi realizada a extração de RNA através do kit RNeasy mini kit (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante. Os títulos da replicação do HSV-1 foram obtidos em células Vero, através dos sobrenadantes de macrófagos infectados. Como controle positivo da indução de ISGs, foi utilizado o IFN- 2α a 10 ng/mL . Para bloquear os eventos tardios do ciclo replicativo do HSV-1, o ACV foi utilizado em diferentes concentrações.

Ensaio de co-infecção com HIV-1/HSV-1: macrófagos foram infectados com HIV-1 ($5\text{-}10\text{ ng/mL}$ do antígeno p24) por exposição *overnight*. As células foram lavadas para remover os vírus não internalizados e adicionado meio novo. Após 12 dias de infecção, o HSV-1 foi adicionado às células no MOI de 1.0. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação da produção viral após 48 h p.i. com HSV-1 (ou 14 dias p.i. com HIV-1). Sob nossas condições experimentais, o pico de produção do HIV-1 em macrófagos ocorre em torno de 14 dias p.i. (Souza e cols, 2011).

Quantificação por ensaio de luciferase: Células TZM-bl (10^4) em placas de 96 poços foram infectadas com o sobrenadante proveniente da infecção do HIV-1 em macrófagos, por 1h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células foram lavadas e 24 h p.i. lisadas. A quantificação dos níveis de

luciferase foram feitos através do kit comercial (Luciferase Assay System, Promega), de acordo com instruções do fabricante. Essas células apresentam um gene repórter da luciferase, flanqueado por duas regiões LTR. Portanto, a quantificação dos níveis de luciferase é proporcional à infecção por HIV-1. A leitura foi realizada no luminômetro Optima versão 2.20R2. Em todos os ensaios, células não infectadas foram utilizadas como branco. Como controle de alguns experimentos, TZM-bl infectadas com HSV-1 também foram utilizadas como branco. A quantificação por RLU de células infectadas ou não com HSV-1, foi subtraída do valor daquelas infectas com HIV-1. Os sobrenadantes provenientes da infecção por HSV-1 em macrófagos não foram citotóxicos ou patogênicos.

Análise por Western Blot: com o objetivo de investigar se a infecção por HSV-1 altera o conteúdo de alguns fatores de restrição celulares, realizamos ensaios por western blot. 20 a 30 µg das proteínas lisadas foram separadas por eletroforese de gel de 10% SDS-poliacrilamida e transferidas em seguida para membrana de polividina, que foi bloqueada e incubada com anticorpo policlonal de coelho anti-IFITM1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, CA), APOBEC3G ou BST-1 (abcam), ou monoclonal de camundongo anti- α -tubulina (Sigma) por exposição *overnight*. O sinal de proteínas foi detectado pelo método de quimioluminescência após incubação com anticorpo secundário anti-*rabbit* ou *mouse* conjugado com uma peroxidase (GE Healthcare Life Sciences). Análises de densitometria foram realizadas através do software ImageJ 1.44p.

Transfecção por siRNA e *knockingdown*: em estudos anteriores, nós observamos que a eficiência de transfecção por siRNA em macrófagos primários varia substancialmente (Miranda e cols, 2014). Dessa forma, nós inicialmente testamos diferentes concentrações de lipofectamina 2000® (Invitrogen) e de siRNA (10, 20, 50, 100 e 200 pmol), na proporção de 2,5:1 (µg siRNA : µg lipofectamina 2000®), durante 6-24 h pós transfecção em macrófagos,

e determinamos a concentração não-tóxica ideal. Para essa análise, foi utilizado uma sonda de siRNA para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) marcada com FAM (Ambion, USA cat#AM4650) e observada em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71). As imagens foram capturadas nas melhores condições observadas (Olympus E420 Evolt). A eficiência de transfecção foi calculada através da contagem do número de células FAM positivas sobre o total de células. A eficiência de transfecção foi alcançada em mais de 90% (Figura 23).

Com as condições estabelecidas na figura 20, nós realizamos a transfecção com os siRNAs para diferentes transcritos de fase tardia do HSV-1, ICP34.5, VHS, US3 e US11 (Life Technologies). As sequências dos Stealth siRNAs foram: US3 (5'-CCGTATACCACGACCGTCGACATTT-3'), ICP34.5 (5'-GCCCACTTCCCGGTATGGTAATTAA-3'), US11 (5'-CACTACGATCTCGAAGCCATCTGAA-3'), VHS (5'-GACATGGGTTTGTTCGGGATGATGA-3'), ou controles *scrambled* (SCR) (5'-CACTAGCGCTCCGAAGTACTATGAA-3' e 5'-GACTGGGTGTTGGCTGTAGATATGA-3'). Os siRNAs foram misturados com lipofectamina 2000® e incubados aos macrófagos infectados ou não com HIV-1, em placas de 24 poços por 20-24 h. Em seguida, nós infectamos com HSV-1 no MOI 1 por 24 h. O RNA total foi extraído da monocamada, e o silenciamento de cada transcrito do HSV-1 foi avaliado por qPCR.

Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR: a extração de RNA foi realizada com RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, utilizamos 300 ng de *Random Hexamer Primer* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para medida da expressão gênica do HSV-1, ou kit RT² first strand (Qiagen) para o *array* da expressão dos FRs; transcriptase reversa MMLV (Invitrogen) e 1 µg de RNA. A quantificação por tempo-real foi realizada com 1,5 µl cDNA usando SYBR Green qPCR mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA) no aparelho Applied Biosystems

Prism7500 Sequence Detection System. Para a análise da expressão dos genes do HSV-1 Us3, Us11, VHS e ICP34.5, 300 nM dos seguintes primers foram utilizados: US3F – 5'-CCTTTTATACCCAGCCGAG-3', US3R – 5'-GTCCTGGTTTCCGTACATCTG-3', US11F – 5'-GGCGACCCAGATG-TTACTTA-3', US11R – 5'-ACCCGAATCTCCACATTGC-3', ICP34.5F – 5'-TGCCTGTCAAACCTCTACCAC-3', ICP34.5R – 5'-GTTACCTGGGACTGTGCG-3', VHSF – 5'-TGGGCTGTGATATTGTGTTGG-3', VHSR – 5'-GTAGGTGTTATT-GGGATGGAGG-3'. Para quantificar a expressão dos fatores de restrição celulares e de outros transcritos associados com a resposta imune inata, nós desenhamos uma placa de qPCR contendo os primers para os diversos FRs (Qiagen). Para isso, os seguintes primers foram selecionados: teterina (cat#PPH05790B), IFITM1 (cat#PPH05981C), IFITM2 (cat#PPH05548F), IFITM3 (cat#PPH02872E), MX1 (cat#PPH01325A), MX2 (cat#PPH01326F), SAMHD1 (cat#PPH18140A), APOBEC3G (cat#PPH06904A), MCPIP1 (cat#PPH16134B), IFN1 α (PPH01321B), receptor de IFN (PPH00869F), GAPDH (cat#PPH00150F) e β -actina (PPH00073G). A quantificação dos transcritos foi realizada através do método $\Delta\Delta C_t$ utilizando as condições mock e infectado, e os genes de referência RNaseP ou GAPDH como *housekeeping*.

4 - RESULTADOS

HSV-1 aumenta a produção de HIV-1 em macrófagos primários humanos: infecções oportunistas são extremamente comuns entre indivíduos HIV-1 positivos (Douek, 2007). O HSV-1 é considerado ubíquo entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, podendo causar manifestações severas quando reativado (Corey e cols., 1986). Embora estudos anteriores mostrem que algumas proteínas de fase inicial do HSV-1 podem aumentar a transcrição dos genes do HIV-1 (Mossman e Ashkar, 2005), pouca atenção tem sido dada à co-infecção, no contexto da resposta imune inata. Dessa forma, nós infectamos macrófagos com o HIV-1 e após 12 dias, co-infectamos com HSV-1 em diferentes MOIs por 2 dias. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e os títulos de HIV-1 foram medidos em células TZM-bl. Nós observamos que a produção de HIV-1 encontrava-se aumentada na co-infecção, e esse aumento era MOI-dependente. (Figura 19). Nos MOIs de 0,1 e 1 a produção de HIV-1 estava aumentada em 3 e 7 vezes, respectivamente (Figura 19). Ainda, a produção de HSV-1 em macrófagos foi marginal, porém proporcional ao MOI utilizado, como observado na titulação em células Vero: 10^2 e 10^3 TCID/mL para os MOIs de 0,1 e 1, respectivamente. Dessa forma, nossos resultados confirmam que a co-infecção HSV-1/HIV-1 favorece a replicação deste retrovírus.

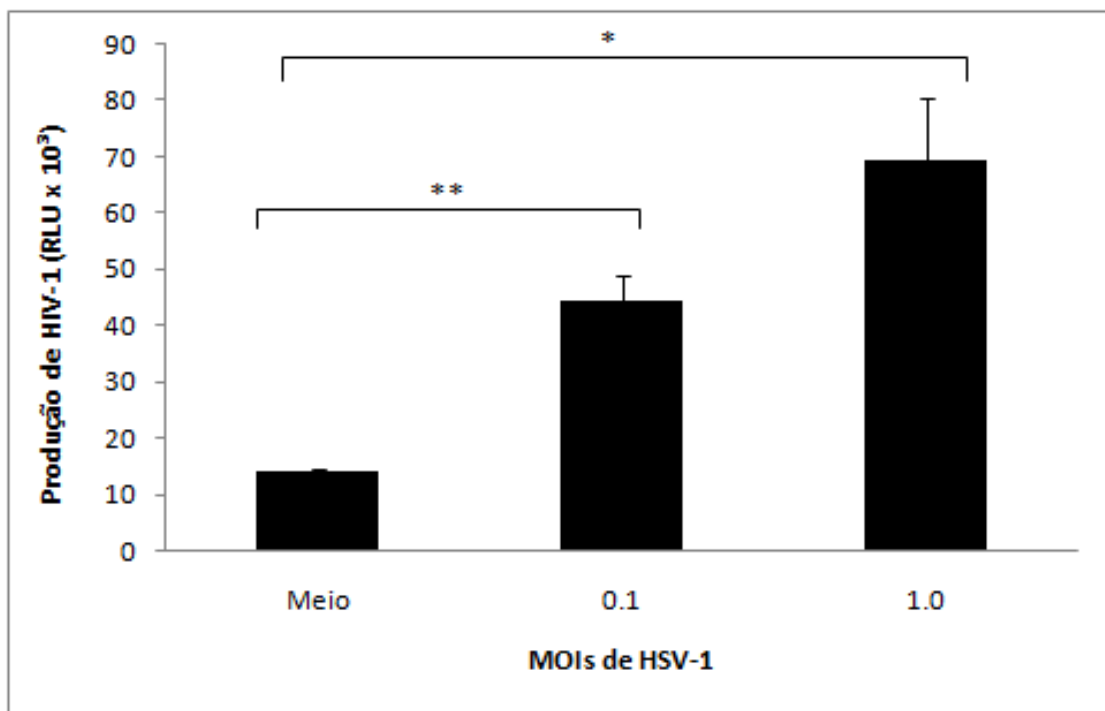
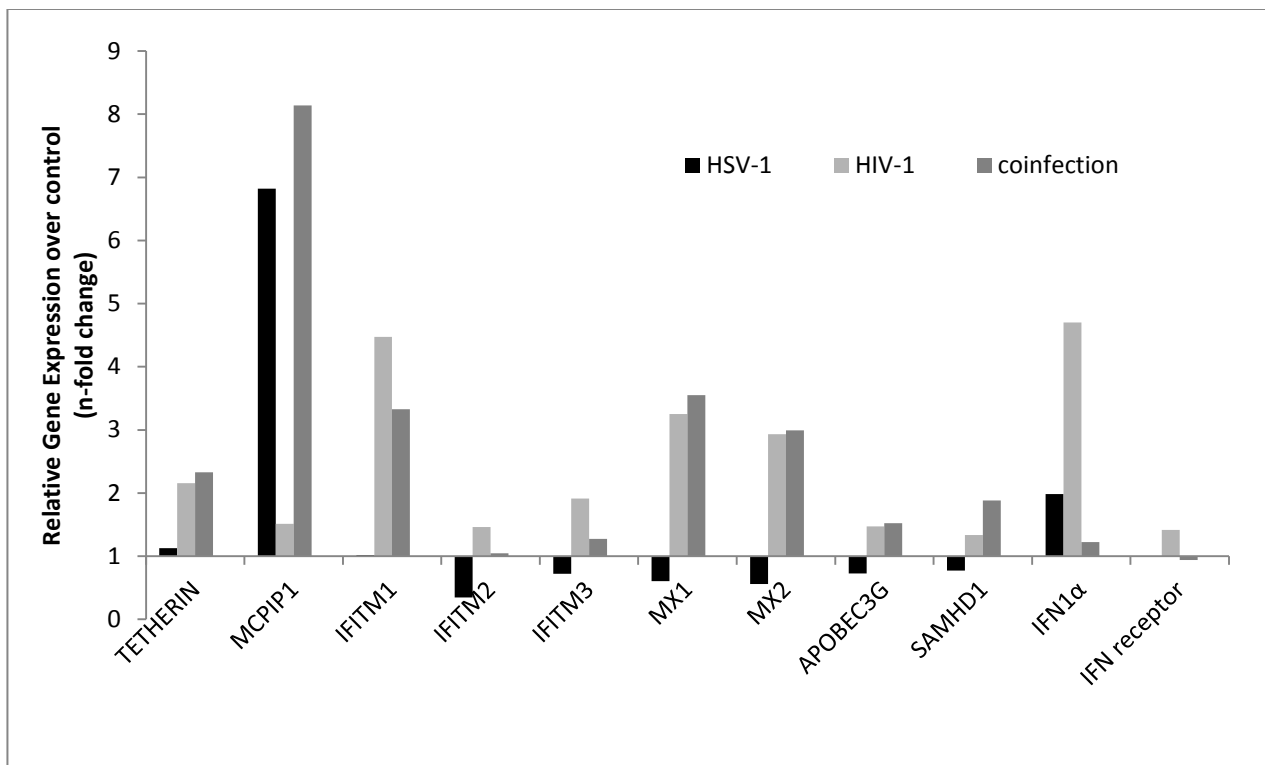


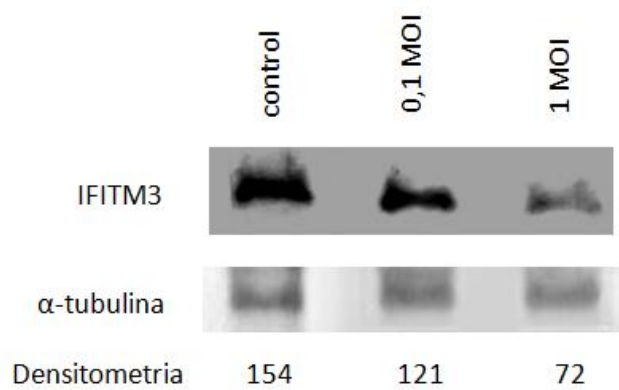
Figura 19 – Aumento da produção de partículas infecciosas de HIV-1 durante a co-infecção com HSV-1. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (10 ng/mL do Ag p24). Após 12 dias de infecção com HIV-1, os macrófagos foram co-infectados com HSV-1 nos MOIs indicados. Após 2 dias de co-infecção com HSV-1 (14 dias p.i. com HIV-1), os sobrenadantes foram coletados e titulados em TZM-bl. A quantificação por RLU dos pontos experimentais foi subtraída dos valores basais de RLU das células não infectadas. * $P < 0.001$. ** $P < 0.01$. (n = 3).

O HSV-1 reduz a expressão de fatores de restrição ao HIV-1: O HSV-1 é capaz de contra-regular a sinalização por IFN (Paladino e Mossman, 2009) e silenciar a síntese de proteínas celulares (Smiley e cols., 2001). Dessa forma, a infecção por HSV-1 poderia estar regulando negativamente a expressão de FRs, levando a um aumento da produção de HIV-1 na co-infecção. Inicialmente, nós avaliamos os níveis de diversos transcritos associados com a resposta imune inata. Nós observamos que o HSV-1 diminui a expressão de IFITM2, IFITM3, MX1, MX2, A3G e SAMHD1 (Figure 20A). No entanto, a diminuição da expressão gênica na co-infecção, comparada com a infecção pelo HIV-1, ocorreu apenas em

IFITM2 e 3 (Figura 20A). Dessa forma, nós decidimos avaliar a expressão protéica de IFITM2 e IFITM3 em macrófagos infectados pelo HSV-1. Assim como observado na figura 20A, o HSV-1 foi capaz de reduzir os níveis apenas de IFITM3 (figura 20B).



A



B

Figura 20 – Expressão dos níveis dos FRs na infecção por HSV-1. a) Macrófagos derivados de monócitos foram infectados com HIV-1, e após 12 dias as células foram co-infectadas com HSV-1 no MOI de 1. Em 14 dias p.i. com o HIV-1 (e 2 dias de infecção com HSV-1), as células foram lisadas e o RNA extraído. Em seguida, a produção do cDNA foi feita utilizando oligo dT e o PCR em tempo real para os transcritos indicados foi realizado. Trabalhamos com 4 grupos experimentais: células não-infectadas; infectadas com HSV-1 apenas; com HIV-1 apenas; e co-infectadas. A quantificação dos transcritos foi feita pelo método de $\Delta\Delta CT$, usando como referência a expressão de GAPDH. b) Macrófagos foram infectados com HSV-1 nos MOIs indicados, e 2 dias p.i. lisados com tampão T0. O lisado (20 μ g) foi submetido a eletroforese SDS-PAGE, transferência e imunoblotting. As bandas referentes a IFITM3 e α -tubulina foram analisadas com o programa ImageJ 2.01 e a razão da expressão destas proteínas é apresentada em unidades arbitrárias de densitometria. número de doadores = 3. As figuras são representativas de 1 doador.

A redução de IFITM3 mediada por HSV-1 é um evento tardio durante o ciclo replicativo. Uma vez que a replicação do HSV-1 obedece a uma acentuada cinética temporal de expressão das proteínas virais, nós avaliamos os níveis de IFITM3 em diferentes momentos após a infecção por HSV-1 em macrófagos. Nós observamos que a redução de IFITM3 associada com a infecção por HSV-1 acontece nos estágios tardios da replicação, de 12 h em diante (Figura 21). Ainda, um pequeno aumento de IFITM3 foi observado nas primeiras 6 h após a infecção por HSV-1, diminuindo em seguida (Figura 21). Como controle, nós utilizamos IFN-2 α para elevar os níveis de IFITM3, que se iniciaram a partir de 6 h p.i. (Figura 21).

Nossos resultados sugerem uma sobreposição entre o pico de expressão das proteínas de fase tardia do HSV-1 e a redução do conteúdo de IFITM. Para confirmar essa observação, os níveis de IFITM3 foram analisados em células infectadas com HSV-1 e tratadas em

diferentes concentrações de ACV. O ACV inibe a DNA polimerase do HSV-1 (Elion, 1983), que corresponde ao principal evento durante a fase β do ciclo replicativo do HSV-1. A inibição de uma das fases do ciclo replicativo prejudica as fases subsequentes de replicação do HSV-1 (Reardon e Spector, 1989). Nós podemos observar na figura 22A que a redução dos níveis de IFITM3 causada pela infecção por HSV-1, foi prevenida com o tratamento por ACV, de maneira dose-dependente. Portanto, nós confirmamos que, se os eventos que ocorrem durante a fase tardia da replicação do HSV-1 estiverem comprometidos, a capacidade do HSV-1 de modular negativamente a expressão de IFITM3 também ficaria prejudicada.

Além disso, como algumas proteínas do HSV-1 tem sido descritas como inibidoras da resposta ao IFN (Paladino e Mossman, 2009), nós resolvemos medir os níveis de IFITM3 em macrófagos infectados com HSV-1 e tratados com IFN- 2α . Na figura 22B, podemos observar uma recuperação dos níveis de IFITM3 em macrófagos infectados com HSV-1 e tratados com IFN- 2α exógeno, em relação ao controle não tratado e não infectado. Esse resultado, em associação com o tratamento com ACV, sugere que algumas proteínas do HSV-1 responsáveis pela inibição da resposta ao IFN, estariam afetando diretamente os níveis de IFITM3 em eventos tardios da infecção.

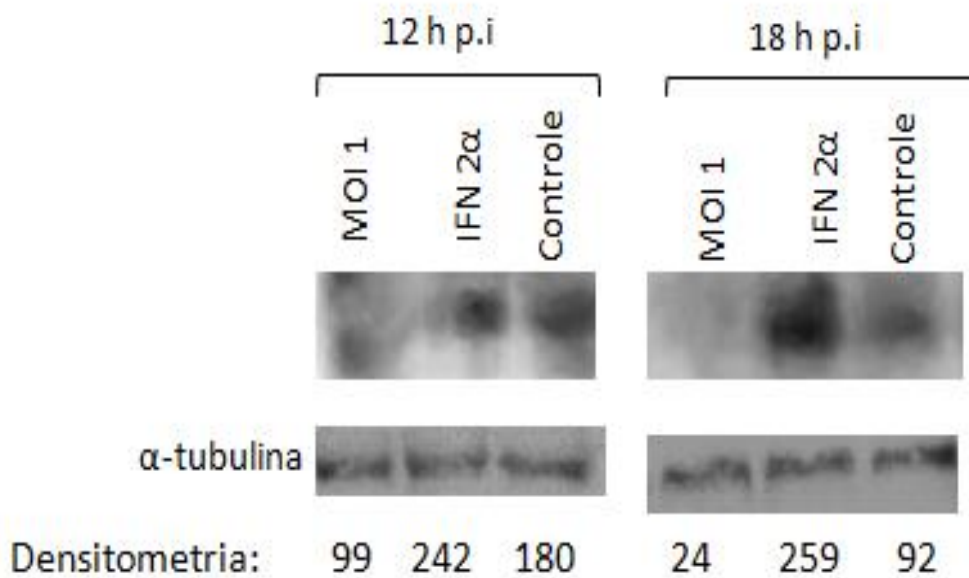
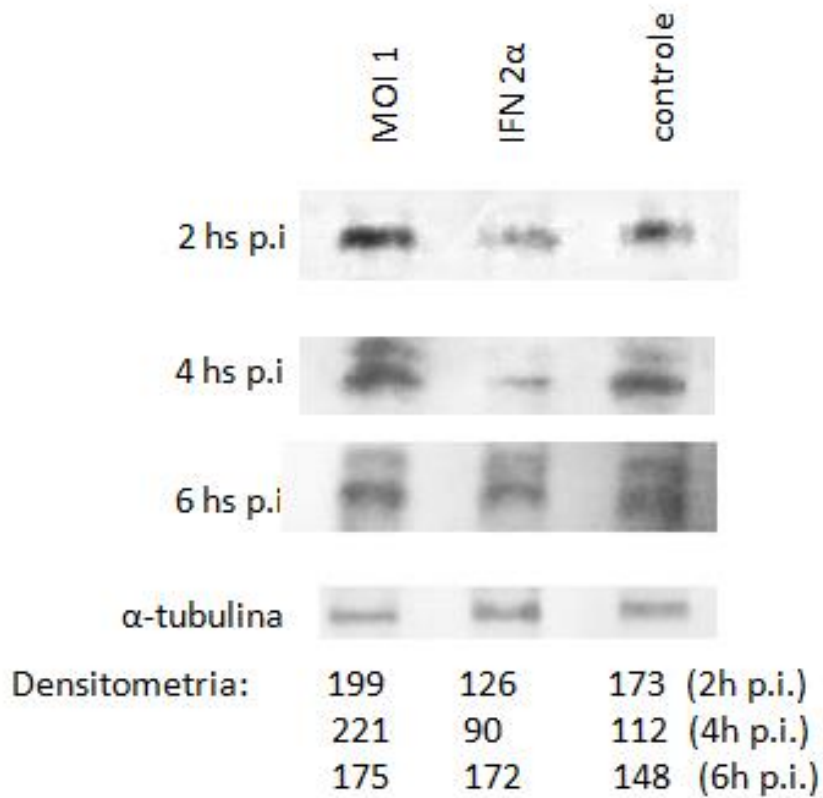
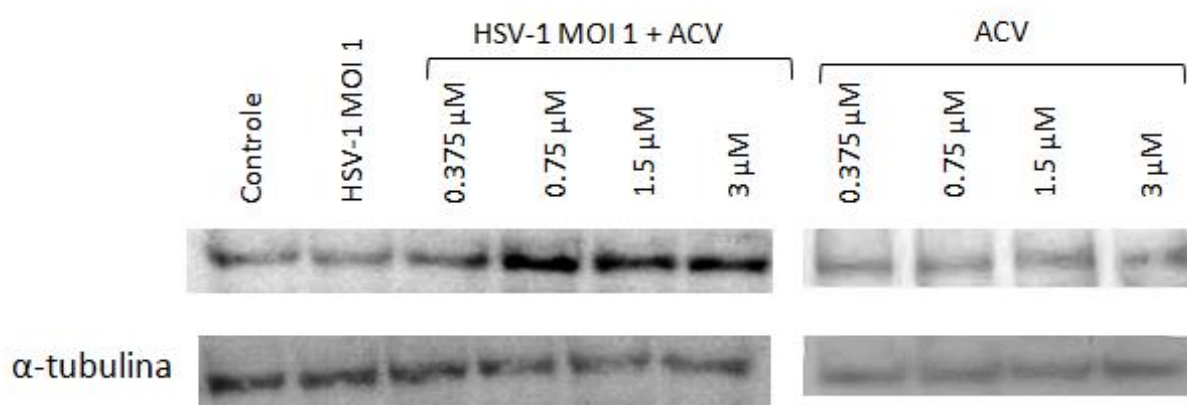
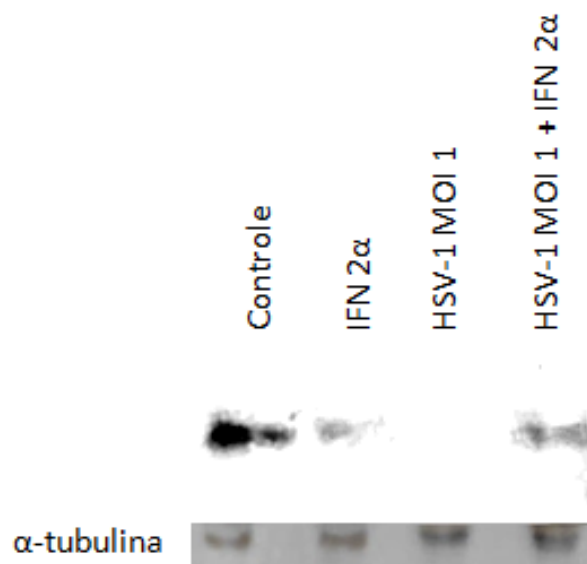


Figura 21 – Cinética de expressão de IFITM3 em macrófagos infectados com HSV-1. Macrófagos infectados com HSV-1 no MOI de 1, ou tratados com IFN-2α (10

ng/mL), foram lisados a cada 2 horas p.i. durante as primeiras 24 h, e os níveis de IFITM3 analisados por western blotting. O IFN-2 α foi utilizado como controle positivo. As bandas referentes a IFITM3 e α -tubulina foram analisadas com o programa ImageJ 2.01 e a razão da expressão destas proteínas é apresentada em unidades arbitrárias de densitometria. número de doadores = 3. As figuras são representativas de 1 doador.



A



B

Figura 22 – Recuperação dos níveis de IFITM3 após tratamento com ACV ou IFN-2 α . Macrófagos foram infectados ou não com HSV-1 no MOI de 1 e tratados com ACV

em diferentes concentrações (A) ou IFN-2 α (10 ng/mL) (B). Após 24 h, as células foram lisadas e os níveis de IFITM3 analisados por western blotting. As bandas referentes a IFITM3 e α -tubulina foram analisadas com o programa ImageJ 2.01 e a razão da expressão destas proteínas é apresentada em unidades arbitrárias de densitometria. número de doadores = 3. As figuras são representativas de 1 doador.

As proteínas de fase tardia do HSV-1, Us11 e VHS, regulam negativamente o conteúdo de IFITM3. A partir dos resultados obtidos, resolvemos investigar se as proteínas do HSV-1, ativadas durante a fase tardia da replicação do vírus, estariam sendo responsáveis pela modulação de IFITM3. Estudos mostram que algumas proteínas do HSV-1, inibem a resposta de IFN (Paladino e Mossman, 2009). Essa inibição possivelmente resultaria em uma menor produção de IFITM3, e conseqüentemente prejudicaria sua resposta. Dessa forma, realizamos ensaios com siRNAs, para silenciar os genes de fase tardia ICP34.5, Us3, Us11 e VHS, responsáveis por inibir a produção de IFN. Macrófagos foram transfectados *overnight* e então infectados com HSV-1 por 24 h. Podemos observar que na condição de 10 pmol de siRNA, a transfecção apresentou eficiência de mais de 90 % (figura 23). Essas condições foram utilizadas nas demais etapas do nosso estudo.

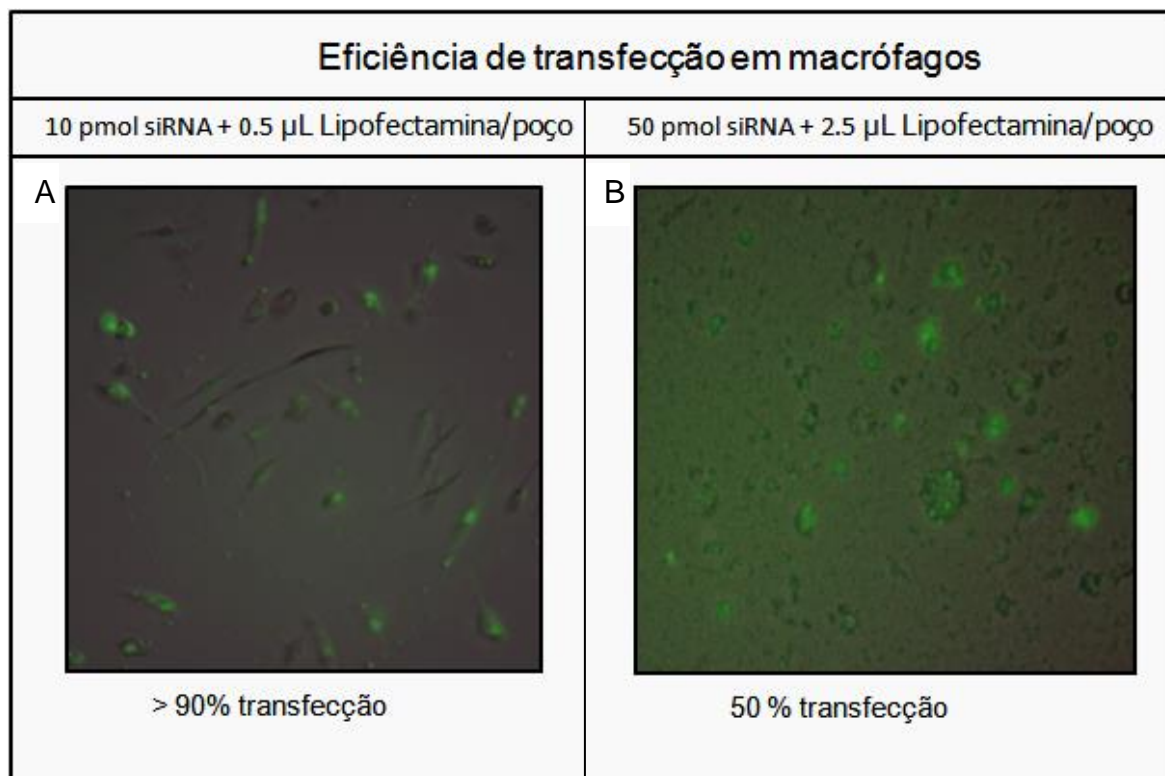


Figura 23: Eficiência de transfecção de Macrófagos com siRNA. Macrófagos foram transfectados com diferentes concentrações de siRNA (GAPDH-FAM) + Lipofectamina. A fluorescência foi analisada em amostras *in natura* ao microscópio óptico invertido (modelo), em diferentes tempos pós-transfecção. As imagens dos painéis A e B representam, respectivamente, a melhor e pior condição de transfecção após exposição *overnight* com siRNA e lipofectamina 2000®.

Após a transfecção, realizamos a quantificação por qRT-PCR dos transcritos do HSV-1, para confirmar o silenciamento gênico. Os transcritos Us11 e VHS foram inibidos em 72 e 78 %, respectivamente (Figura 24A). Em seguida, avaliamos os níveis de IFITM3 após o silenciamento desses genes, e podemos observar que os níveis dessa proteína recuperaram ao nível do controle (Figura 24B). Esse resultado confirma a participação das proteínas de fase tardia Us11 e VHS do HSV-1 na redução dos níveis de IFITM3 durante a infecção.

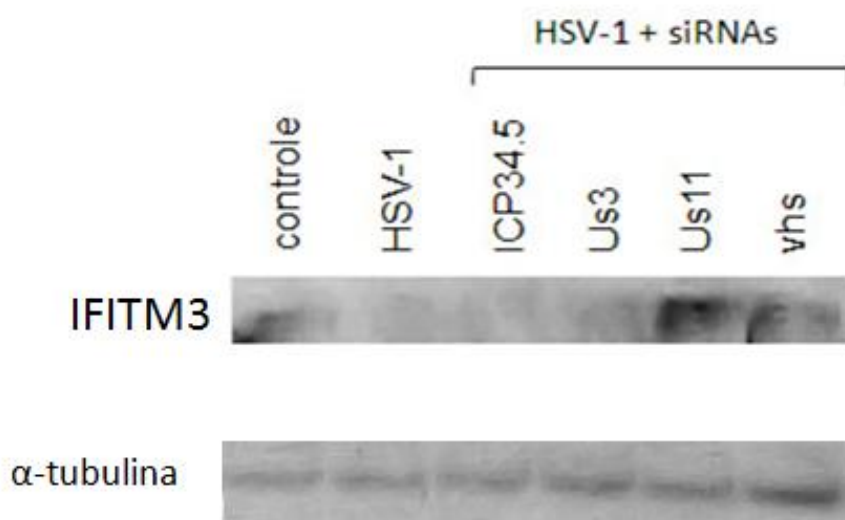
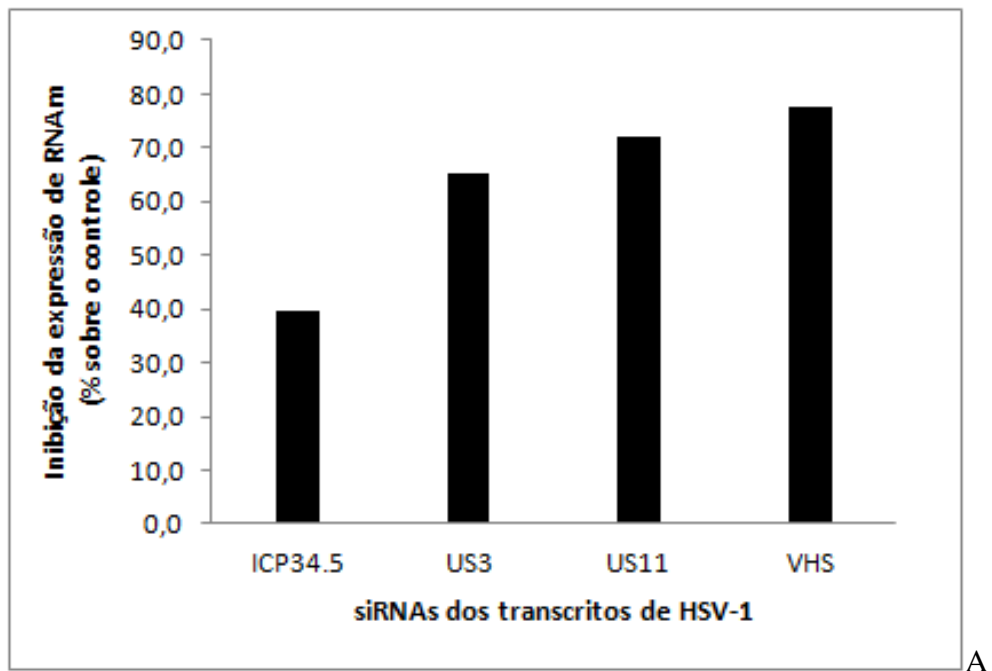


Figura 24 – Recuperação dos níveis de IFITM3 após silenciamento das proteínas de fase tardia do HSV-1. Macrófagos foram transfectados com siRNAs para os transcritos ICP34.5, Us3, Us11 e VHS, e infectados com HSV-1 no MOI 1. As células foram lisadas para extração do RNA total, produção do cDNA e quantificação dos transcritos por qPCR em tempo real (A). Para análise da expressão de IFITM3, macrófagos foram lisados e a expressão foi avaliada por western blotting (B). As bandas referentes a IFITM3 e α -tubulina foram analisadas com o programa ImageJ 2.01 e a razão da expressão destas proteínas é

apresentada em unidades arbitrárias de densitometria. número de doadores = 3. As figuras são representativas de 1 doador.

Com o objetivo de verificar se o silenciamento dos transcritos de Us11 e VHS reduziria a produção de HIV-1 na co-infecção, avaliamos os títulos de HIV-1 através do ensaio de luciferase em células TZM-BI com o sobrenadante da co-infecção em macrófagos transfectados. Como podemos observar na figura 25, os títulos de HIV-1 caíram meio log em relação ao controle co-infectado, chegando a ser menor que a produção de HIV-1 na infecção. Esse dado confirma a participação de Us11 e VHS como principais fatores responsáveis pela redução de IFITM3, contribuindo para o aumento da infecção por HIV-1 em macrófagos co-infectados por HSV-1.

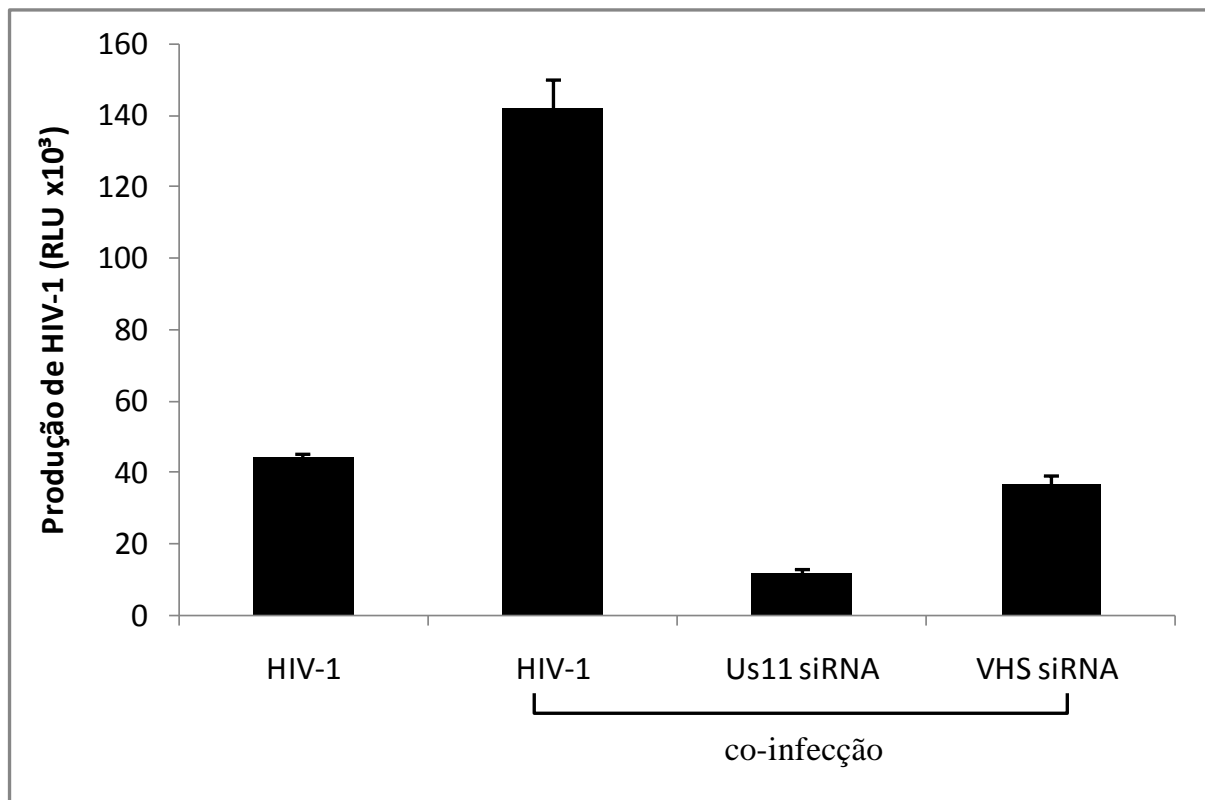


Figura 25 - Aumento da produção de HIV-1 na co-infecção com o HSV-1 em macrófagos após o silenciamento de Us11 e VHS. Macrófagos primários foram infectados com HIV-1 (10

ng/ml), e após 12 dias foram transfectados com siRNA para Us11 e VHS. Após 24 h de transfecção, as células foram co-infectadas com HSV-1. Num total de 14 dias p.i. com HIV-1 (ou 2 dias p.i. com HSV-1) o sobrenadante das culturas foi coletado. A quantificação do HIV-1 nos sobrenadantes foi realizada em células TZM-bl e expressa por RLU. Os valores de RLU dos pontos experimentais foram subtraídos dos valores basais de RLU das células não infectadas. Número de doradores = 3. Número de replicatas experimentais = 3.

5 - DISCUSSÃO

A infecção por HIV-1 leva a uma ativação crônica do sistema imune e ao mesmo tempo uma diminuição do número de células T CD4+, tornando o organismo suscetível a doenças oportunistas (Douek e cols, 2007). Dentre elas, o HSV-1 possui grande prevalência e importância, pois causa manifestações clínicas graves em pacientes imunocomprometidos. Alguns estudos mostraram que a infecção por HSV-1 aumenta a replicação do HIV-1 (Albrecht et al, 1989), no entanto, ainda sabe-se pouco a respeito das interações biológicas estabelecidas por esses dois vírus em co-infecções.

Estudos de co-infecção HIV-1/HSV-1 em PBMCs e linhagens de linfomas são abundantes na literatura, e apontam para um aumento da replicação do HIV-1. Nosso estudo buscou estudar o comportamento desses dois vírus em macrófagos humanos primários, que representam o principal reservatório do HIV-1 na infecção (Corey e cols, 2013). Corroborando os estudos em linfócitos, nossos dados demonstraram um aumento da produção de HIV-1 em macrófagos na co-infecção (Figura 19), indicando uma modulação positiva do HSV-1 na replicação do HIV-1.

O HIV-1 é classicamente descrito por aumentar a resposta e produção de IFN, e consequentemente ativar a cascata de transcrição de ISGs. Essa resposta pode ser exemplificada pela expressão dos fatores de restrição. Os FRs são proteínas celulares expressas em resposta ao aumento de IFN, e sua principal função é restringir a replicação do vírus na célula (Harris e cols, 2012). No entanto, esses fatores somente foram descritos recentemente e ainda existem poucas proteínas classificadas como FR do HIV-1, e os estudos sobre seus mecanismos de ação são escassos.

Ao contrário do HIV-1, o HSV-1 possui a capacidade de regular negativamente a cascata de resposta ao IFN, através de proteínas produzidas durante a fase tardia da replicação, interferindo assim na resposta celular antiviral. Nosso estudo foi capaz de

estabelecer uma relação entre as ações antagônicas de resposta ao IFN desses dois vírus. Dentre os FRs descritos na literatura, nossos dados revelam que, apesar do HSV-1 reduzir a expressão de diversos FRs (Figura 20A), apenas o IFITM2 e 3 foram regulados negativamente na co-infecção (Figura 20B). Além disso, apenas o conteúdo protéico de IFITM3 apresentou-se expressivamente reduzido na infecção por HSV-1 (Figura 20C), e essa redução iniciou-se à partir de momentos tardios da infecção (Figura 21). Esses dados se sobrepõe ao momento de produção das proteínas de fase tardia da infecção do HSV-1 e, portanto, sugerem uma forte interferência dessas proteínas no bloqueio à resposta de IFN, e consequentemente na redução dos níveis de IFITM3. Nossos resultados fortalecem ainda mais essa hipótese, com a prevenção da redução dos níveis de IFITM3 no tratamento com ACV e IFN, em macrófagos infectados com HSV-1 (Figura 22A e B).

Alguns dos principais mecanismos de inibição da resposta de IFN desencadeados pelas proteínas de fase tardia ICP34.5, Us3, Us11 e VHS são o bloqueio da síntese protéica de PKR (Chou e cols, 1995); alteração da sinalização mediada por TLR3, causando efeitos pós traducionais nos receptores de IFN tipo II (Peri e cols, 2008); e inibição da fosforilação de STAT-1, bloqueando a cascata de sinalização por IFN (Smiley, 2004). Através do *knock down* dessas proteínas do HSV-1, nós pudemos identificar as principais proteínas responsáveis pela redução da expressão de IFITM3. O silenciamento de Us11 e VHS levou a uma recuperação dos níveis de IFITM3 (Figura 24) e ainda preveniu o aumento nos títulos de HIV-1 na co-infecção (Figura 25).

Portanto, nosso estudo foi capaz de identificar as principais proteínas do HSV-1 responsáveis pelo aumento da produção do HIV-1 na co-infecção, e pela redução dos níveis de IFITM3 na infecção por HSV-1. O HSV-1 é um vírus ubíquo na população e, portanto, extremamente prevalente em indivíduos imunodeprimidos. Entender de que forma o HSV-1 interfere na infecção por HIV-1 é de extrema importância para o avanço do conhecimento acerca da patogênese na co-infecção. Nosso estudo revela um importante mecanismo de ação

desenvolvido pelo HSV-1 que poderia estar contribuindo para um aumento da infecção do HIV-1 em indivíduos infectados por ambos os vírus. Além disso, a presença da co-infecção em tecidos celulares não é incomum. Um estudo feito por Margolis e colaboradores, demonstrou que indivíduos portadores do HIV-1, quando tinham seus tecidos de tonsilas tratados com ACV, apresentavam uma inibição da replicação do HIV-1. O ACV como pró-droga, é um antiviral seletivo para herpesvírus, pois sua ativação ocorre na presença da DNA polimerase desses vírus. Portanto, esse estudo demonstra que, mesmo na ausência de manifestações clínicas, o vírus é extremamente prevalente em indivíduos HIV-1 positivos, pois a maioria é portadora do HSV-1 (Margolis e cols, 2008). Ainda, esses dados poderiam levar a estudos que comprovassem a eficiência de um possível tratamento com ACV em indivíduos HIV-1 positivos, mesmo na ausência de manifestações clínicas, como tratamento complementar para a redução da carga viral. Além disso, estudos de co-infecção com outros herpesvírus já foram realizados e seus resultados também apontam para um aumento da replicação do HIV-1, indicando que esse mecanismo pode não ser exclusivo do HSV-1 e que outros herpesvírus utilizem mecanismos semelhantes que levem a esse aumento.

Dessa forma, nosso estudo colabora para um acréscimo no conhecimento relacionado à patogênese da co-infecção e com o bloqueio da resposta de IFN desencadeada pela infecção com HSV-1. O conhecimento sobre os mecanismos de ação envolvidos no bloqueio dessa resposta, dá abertura ao desenvolvimento de estudos aprofundados no âmbito da imunopatogênese da co-infecção, contribuindo para o esclarecimento das interações existentes entre esses dois vírus. Além disso, nosso estudo leva ao desenvolvimento de pesquisas em alvos que bloqueiam os mecanismos de ação pelos quais as proteínas inibidoras da resposta ao IFN atuam.

6 - CONCLUSÕES

- Confirmamos que a co-infecção induz um aumento da replicação do HIV-1.
- Apenas o conteúdo de IFITM2 e IFITM3 encontraram-se reduzidos tanto na infecção por HSV-1 quanto na co-infecção;
- A redução nos níveis de IFITM3 na infecção por HSV-1 ocorre tardiamente (à partir de 12h p.i.);
- As proteínas de fase tardia caracterizadas por inibir a resposta de IFN, são responsáveis pela redução dos níveis de IFITM3, e consequentemente pelo aumento dos títulos de HIV-1 na co-infecção;
- O silenciamento das proteínas de fase tardia Us11 e VHS foi capaz de diminuir a replicação do HIV-1 na co-infecção;

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ALBRECHT MA, DELUCA NA, BYRN RA, SCHAFFER PA, HAMMER SM.** The herpes simplex virus immediate-early protein, ICP4, is required to potentiate replication of human immunodeficiency virus in CD4+ lymphocytes. *Journal of Virology* 1989 May;63(5):1861-8.
- **ANDREASSON, P. A.; DIAS, F.; NAUCLER, A.; ANDERSSON, S. & BIBERFELD, G.** A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *AIDS* 1993. 7: 989 - 93.
- **BARRE-SINOUSI, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W. & MONTAGNIER, L.** Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983. 220: 868 - 871.
- **BERGER, E.A.; MURPHY, P.M. & FARBER, J.M.** Chemokine receptors as HIV-1 co-receptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Reviews of Immunology* 1999. 17: 657 - 700.
- **BHATTARAKOSOL, P., VISAPROM, S., SANGDARA, A. & MUNGMEE, V.** Increase of genital HSV-1 and mixed HSV-1 and HSV-2 infection in Bangkok, Thailand. *J. Med. Assoc. Thai* 2005.88, 300-304.
- **BOEHMER, P. E. & LEHMAN, I. R.** Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem* 1997. 66, 347 - 384.
- **BRADY, R.C. & BERNSTEIN, D.I.** Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 2004. 61, 73 - 81.

- **BRASS AL, HUANG IC, BENITA Y, JOHN SP, KRISHNAN MN, FEELEY EM, RYAN BJ, WEYER JL, VAN DER WEYDEN L, FIKRIG E, ADAMS DJ, XAVIER RJ, FARZAN M, ELLEDGE SJ.** The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 2009 Dec 24;139(7):1243-54.
- **BREM R, ORASZLAN-SZOVIK K, FOSER S, BOHRMANN B, CERTA U.** Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon-alpha-responsive and non-responsive cell lines. *Cell Molecular Life Science*. 2003 Jun;60(6):1235-48.
- **BRENCHLEY, J.M.; SCHACKER, T.W.; RUFF, L.E.; PRICE, D.A.; TAYLOR, J.H.; BEILMAN, G.J.; NGUYEN, P.L.; KHORUTS, A.; LARSON, M.; HAASE, A.T. & DOUEK, D.C.** CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine* 2004. 200: 749 - 759.
- **BROWN, P. O.** Integration. In: Retroviruses. Coffin, J. M. & Varmus, H. E. Cold Spring Harbor: *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1997. 161 - 203.
- **CALISTRI A, PAROLIN C, PIZZATO M, CALVI P, GIARETTA I, PALU` G.** Herpes simplex virus chronically infected human T lymphocytes are susceptible to HIV-1 superinfection and support HIV-1 pseudotyping. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 21:90-98.
- **CHOU J, CHEN JJ, GROSS M, ROIZMAN B.** Association of a M(r)90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. 92(23):10516-10520.

- **COREY L, SPEAR PG.** Infections with herpes simplex viruses (1). *New England Journal Medicine* 1986 Mar 13;314(11):686-91. Review.
- **CORY TJ, SCHACKER TW, STEVENSON M, FLETCHER CV.** Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Current Opinion HIV AIDS*. 2013 May;8(3):190-5.
- **DER, S. D., ZHOU, A., WILLIAMS, B. R. & SILVERMAN, R. H.** Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998. 95, 15623–15628.
- **DIAZ JJ, DODON MD, SCHAEERER-UTHURRALT N, SIMONIN D, KINDBEITER K, GAZZOLO L, MADJAR JJ.** Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein. *Nature* 1996.379:273–277.
- **DOUEK D.** HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med* 2007 Aug-Sep;15(4):114-7.
- **DYBUL, M. & FAUCI, A. S.** Immunology of HIV infection. In: *Fundamental Immunology*, 5th Edition. 2003 Paul, W. E. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia. 1285 - 1318.
- **ELION GB.** The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy*. 1983 Sep;12Suppl B:9-17. Review.
- **EVANS SS, COLLEA RP, LEASURE JA, LEE DB.** IFN- α induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells. *Journal Immunology* 1993 Feb 1;150(3):736-47.
- **FLAKOW.** Molecular Virology in Principles of Microbiology, Ronald Atlas. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 2nd edition 1996 (November 18).
- **FRANKEL, A. D. & YOUNG, J. A. T.** HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry* 1998. 67: 1 - 25.

- **FREED, E. O. & MARTIN, M. A.** HIV's and their replication. In: Fields' Virology, 6th Edition, Vol. 2. 2013 Knipe, D. M. &Howley, P. M. 1971 - 2041.
- **GOFF, S. P.** Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: Fields' Virology, 6th Edition, Vol. 2 2013. Knipe, D. M. &Howley, P. M. 1871 - 1939.
- **GOTTLIEB, M. S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H. M.; WEISMAN, J. D.; FAN, P. T.; WOLF, R. A. & SAXON, A.** *Pneumocystis cariniipneumonia* and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *The New England Journal of Medicine* 1981. 305: 1425 -1431.
- **GOUJON C, MALIM MH.** Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. *Journal of Virology* 2010 Sep;84(18):9254-66.
- **GOUJON C, MONCORGÉ O, BAUBY H, DOYLE T, WARD CC, SCHALLER T, HUÉ S, BARCLAY WS, SCHULZ R, MALIM MH.** Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):559-62.
- **GREENE, W. C. & PETERLIN, B. M.** Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine* 2002. 7: 673 - 680.
- **HAASE, A.T.** Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature Reviews Immunology* 2005. 5: 783 - 792.
- **HAGGLUND R, ROIZMAN B.** Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 2004. 78(5):2169–2178.
- **HARRIS RS, HULTQUIST JF, EVANS DT.** The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem*. 2012 Nov 30;287(49):40875-83.
- **HE B, GROSS M, ROIZMAN B.** The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by

double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997. 94(3):843–848.

- **HEENEY, J. L.; DALGLEISH, A. G. & WEISS, R. A.** Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 2006. 313: 462 - 466.
- **HENGMC, HENG SY, ALLEN SG.** Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. *Lancet* 1994. 343:255–258.
- **HOPE, T. J.** Viral RNA export. *Chemistry and Biology* 1997. 4: 335 - 344.
- **HOTTIGER, M.; PODUST, V. N.; THIMMIG, R. L.; MCHENRY, C. & HUBSCHER, U.** Strand displacement activity of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer and its individual subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 1994. 269: 986 - 991.
- **IGARASHI, T.; BROWN, C. R.; ENDO, Y.; BUCKLER-WHITE, A.; PLISHKA, R.; BISCHOFBERGER, N.; HIRSCH, V. & MARTIN, M. A.** Macrophages are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4 T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus - HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections on humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001. 98: 658 - 653.
- **JACOBS BL, LANGLAND JO.** When two strands are better than one: The mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 1996;219:339–49.
- **KANE M, YADAV SS, BITZEGEIO J, KUTLUAY SB, ZANG T, WILSON SJ, SCHOGGINS JW, RICE CM, YAMASHITA M, HATZIOANNOU T, BIENIASZ PD.** MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 2013 Oct 24;502(7472):563-6.

- **KANKI, P.J.; TRAVERS, K.U.; MBOUP, S.; HSIEH, C.C.; MARLINK, R.G.; GUEYE-NDIAYE, A.; SIBY, T.; THIOR, I.; HERNANDEZ-AVILA, M. & SANKALE, J.L.** Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 1994. 343: 943 - 946.
- **KAUSHIK R, ZHU X, STRANSKA R, WU Y, STEVENSON M.** A cellular restriction dictates the permissivity of nondividing monocytes/macrophages to lentivirus and gamma retrovirus infection. *Cell Host Microbe* 2009. Jul 23;6(1):68-80.
- **KUO, Y.C., LIN, C.Y., CHENG, S.F., LIN, C.C. & LIU, W.T.** Impaired natural killer cytotoxicity during recrudescence of recurrent herpes simplex virus type 1 infection. *Cancer Detect. Prev* 1987. 1, 51 - 55.
- **KUPZIG S, KOROLCHUK V, ROLLASON R, SUGDEN A, WILDE A, BANTING G.** Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 2003 Oct;4(10):694-709. PubMed PMID: 12956872.
- **LAGUETTE N, SOBHIAN B, CASARTELLI N, RINGEARD M, CHABLE-BESSIA C, SÉGÉRAL E, YATIM A, EMILIANI S, SCHWARTZ O, BENKIRANE M.** SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011 May 25;474(7353):654-7.
- **LIMA RG, VAN WEYENBERGH J, SARAIVA EM, BARRAL-NETTO M, GALVAO-CASTRO B, BOU-HABIB DC.** The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Infectious Diseases.* 2002; 185(11):1561-1566.
- **LISCO A, VANPOUILLE C, TCHESNOKOV EP, GRIVEL JC, BIANCOTTO A, BRICHACEK B, ELLIOTT J, FROMENTIN E, SHATTOCK R, ANTON P, GORELICK R, BALZARINI J, MCGUIGAN C, DERUDAS M, GÖTTE M, SCHINAZI RF, MARGOLIS L.** Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse

transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues. *Cell Host Microbe* 2008 Sep 11;4(3):260-70.

- **LIU S, QIU C, MIAO R, ZHOU J, LEE A, LIU B, LESTER SN, FU W, ZHU L, ZHANG L, XU J, FAN D, LI K, FU M, WANG T.** MCP1P1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4+ T cells. *ProcNatlAcadSci U S A*. 2013 Nov19;110(47):19083-8.
- **LU J, PAN Q, RONG L, HE W, LIU SL, LIANG C.** The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *Journal of Virology* 2011 Mar;85(5):2126-37.
- **MARGOLIS DM, RABSON AB, STRAUS SE, OSTROVE JM.** Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes. *Virology*. 1992 Feb;186(2):788-91.
- **MCCUNE, J. M.; RABIN, L. B.; FEINBERG, M. B.; LIEBERMAN, M.; KOSEK, J.C.; REYES, G. R. & WEISSMAN, I. L.** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 1988. b53: 55 - 67.
- **MEHANDRU, S.; POLES, M. A.; TENNER-RACZ, K.; HOROWITZ, A.; HURLEY, A.; HOGAN, C.; BODEN, D.; RACZ, P. & MARKOWITZ, M.** Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine* 2004. 200: 761 - 770.
- **MELANCON, J. M., FOSTER, T. P. & KOUSOULAS, K. G.** Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL 20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *Journal of Virology* 2004. 78(14), 7329 -7343.
- **MESQUITA M, FINTELMAN-RODRIGUES N, SACRAMENTO CQ, ABRANTES JL, COSTA E, TEMEROZO JR, SIQUEIRA MM, BOU-HABIB DC, SOUZA TML.** HIV-1 and its gp120 inhibits the Influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. *Plos One* 2014 *In press*.

- **MIRANDA, M. M. F. S.** Viroses dermatópicas *In: Introdução a virologia humana* (Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg, M.D.) 1ed. 2002. GuanabaraKoogan., 75 - 85.
- **MITCHELL, B.M.; BLOOM, D.C.; COHRS, R.J.; GILDEN, D.H. & KENNEDY, P.G.** Herpes simplex virus-1 and varicella zoster virus latency in ganglia. *Journal of Neurovirology* 2003. 9, 194 - 204.
- **MOIR S, CHUN TW, FAUCI AS.** Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2011; 6:223-48.
- **MOSSMAN KL, ASHKAR AA.** Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunology* 2005. 18(2):267–281.
- **MULVEY M, CAMARENA V, MOHR I.** Full resistance of herpes simplex virus type 1-infected primary human cells to alpha interferon requires both the Us11 and gamma(1)34.5 gene products. *Journal of Virology* 2004. 78(18):10193–10196.
- **NISHIYAMA Y.** Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well. *Rev Med Virology* 2004. 14(1):33–46.
- **OKUMURA, A.** HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* 2008. 373:85–97.
- **PALADINO P, MOSSMAN KL.** Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *Journal of Interferon Cytokine Research* 2009 Sep;29(9):599-607.
- **PANDREA, I.; SILVESTRI, G.; ONANGA, R.; VEAZEY, R. S.; MARX, P. A.; HIRSCH, V. & APETREI, C.** Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences. *Journal of Medical Primatology* 2006. 35: 194 - 201.

- **PAVLOVIC J, ARZET HA, HEFTI HP, FRESE M, ROST D, ERNST B, KOLB E, STAEHELI P, HALLER O.** Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol* 1995;69:4506–10.
- **PERI P, MATTILA RK, KANTOLA H, BROBERG E, KARTTUNEN HS, WARIS M, VUORINEN T, HUKKANEN V.** Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Virology Journal* 2008. 5:140.
- **PICKER, L. J. & WATKINS, D. I.** HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nature Immunology* 2005. 6: 430 - 432.
- **PICKER, L. J.** Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Current Opinion in Immunology* 2006. 18: 399 - 405.
- **PLANTIER JC, LEOZ M, DICKERSON JE, DE OLIVEIRA F, CORDONNIER F, MEMÉE V, DAMOND F, ROBERTSON DL, SIMON F.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* 2009. 15 (8): 871-2.
- **POON AP, BENETTI L, ROIZMAN B.** U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *Journal of Virology* 2006A . 80(8):3752–3764.
- **POON AP, GU H, ROIZMAN B.** ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006b. 103(26):9993–9998.
- **POPIK W, PITHA PM.** The presence of tat protein or tumor necrosis factor alpha is critical for herpes simplex virus type 1-induced expression of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 1994 Mar;68(3):1324-33.
- **PRESTON, C. M.** Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *Journal of General Virology* 2000, 81, 1 - 19.

- **REARDON, J.E., AND SPECTOR, T.** Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *Journal of Biology Chemistry* 1989. 264,7405–7411.
- **ROIZMAN, B. & SEARS, A. E.** Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D. &Howley, P. (Eds.). *Fields Virology*, 5th ed. 2007. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia. 2231 – 2295.
- **ROLLER RJ, ROIZMAN B..** The herpes simplex virus 1 RNA binding protein US11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *Journal Virology* 1992. 66(6):3624–3632.
- **SADLER AJ, WILLIAMS BR.** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Review Immunology* 2008. 8(7):559–568.
- **SHEEHY, A. M.; GADDIS, N. C. & MALIN, M. H.** The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature Medicine* 2003. 9: 1404 - 1407.
- **SMILEY JR, ELGADI MM, SAFFRAN HA..**Herpes simplex virus vhs protein. *Meth Enzymol*2001. 342:440–451.
- **SMILEY JR.** Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *Journal of Virology* 2004. 78(3): 1063–1068.
- **SOUZA TM, RODRIGUES DQ, PASSAES CP, BARRETO-DE-SOUZA V, AGUIAR RS, TEMEROZO JR, MORGADO MG, FONTES CF, ARAUJO EG, BOU-HABIB DC.**The nerve growth factor reduces APOBEC3G synthesis and enhances HIV-1 transcription and replication in human primary macrophages. *Blood* 2011 Mar 10;117(10):2944-52.
- **SPEAR, P. G. & LONGNECKER, R.** Herpesvirus entry: an update. *Journal of Virology* 2003.77(19), 10179 –10185.

- **SPEAR, P. G.** Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology* 2004. 6, 401 - 410.
- **SPEAR, P. G., ELISENBERG, R. J. & COHEN, G. H.** Three Classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 2000. 275, 1 - 8.
- **SPEAR, P. G.; MANOJ, S.; YOON, M.; JOGGER, C. R.; ZAGO, A. & MYSCOFSKI, D.** Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology* 2006. 344, 17-24.
- **STARK GR, KERR IM, WILLIAMS BR, SILVERMAN RH, SCHREIBER RD.** How cells respond to interferons. *Annual Review Biochemistry* 1998. 67:227–264.
- **STEFFENS, C. M. & HOPE, T. J.** Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *AIDS* 2001. 15: S21-S26.
- **TELESNITSKY, A. & GOFF, S. P.** Reverse transcription and the generation of retroviral DNA. In: *Retroviruses 1997*. Coffin, J. M.; Hughes, S. H. & Varmus, H.E. Cold spring Harbor: Cold spring Harbor Laboratory press. 121 - 160.
- **UNAIDS** Global Report 2013.
- **VAN DAMME N, GOFF D, KATSURA C, JORGENSON RL, MITCHELL R, JOHNSON MC, STEPHENS EB, GUATELLI J.** The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is down regulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*. 2008 Apr 17;3(4):245-52.
- **VERPOOTEN D, MA Y, HOU S, YAN Z, HE B.** Control of TANK binding Kinase 1-mediated Signaling by the 134.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Biology Chemistry* 2008. 284(2):1097–1105.

- **VLACH J, PITHA PM.** Activation of human immunodeficiency virus type 1 provirus in T-cells and macrophages is associated with induction of inducer-specific NF-kappa B binding proteins. *Virology*. 1992 Mar;187(1):63-72.
- **WEBER F, HALLER O, KOCHS G.** MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol* 2000;74:560–3.
- **WEISS, C. D.; LEVY, J. A. & WHITE, J. M.** Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology* 1990. 64: 5674 - 5677.
- **WELMAN, M.; LEMAY, G. & COHEN, E.A.** Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex. *Virus Research* 2007. 124: 103 - 112.
- **WHITLEY, R. J.** Herpes simplex viruses. In: Knipe, D. &Howley, P. (Eds.). *Fields Virology*, 5rd edição. 2007. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 2297 – 2342.
- **WHITLEY, R.J.** Herpes simplex virus infection. *Semin.Pediatr. Infect. Dis.* 2002. 13, 6 - 11.
- **NEIL SJ, ZANG T, BIENIASZ PD.**Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008 Jan 24;451(7177):425-30.