

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



CAR-T cells no tratamento do HIV

David Miguel Pinto Lopes

Monografia orientada pelo Professor Doutor
José Miguel Azevedo Pereira, Professor Auxiliar com Agregação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



CAR-T cells no tratamento do HIV

David Miguel Pinto Lopes

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de
Farmácia**

Monografia orientada pelo Professor Doutor
José Miguel Azevedo Pereira, Professor Auxiliar com Agregação

2021

Resumo

Os esforços realizados ao longo das últimas décadas aproximaram a esperança média de vida de um indivíduo infetado com HIV à de um indivíduo saudável.

Os estudos da estrutura e mecanismo de replicação do vírus permitiram identificar potenciais alvos farmacológicos e, com a descoberta dos primeiros fármacos antirretrovirais iniciaram-se os primeiros regimes de terapêutica antirretroviral (TAR), e subseqüentemente TAR combinada.

A infeção por HIV, e potencial progressão para SIDA, tornou-se uma patologia crónica, mas controlável, ao invés de uma doença potencialmente fatal. No entanto, as características do vírus, nomeadamente a sua variabilidade genética e evasão ao sistema imunitário, estabelecendo um perfil de infeção latente, tornaram as estratégias atuais inapropriadas para o controlo desta infeção.

A tecnologia CAR-T, que combina o linfócito T com recetores quiméricos de antigénio, representa uma alternativa promissora para o tratamento da infeção por HIV, que permite complementar a ação das restantes estratégias, sem o risco de desenvolvimento de resistências. Algumas das preocupações que rodeiam a utilização destas células, como a possibilidade de síndrome de libertação de citocinas e neurotoxicidade, condicionam o seu estudo e utilização. Contudo, estudos de índole *in vitro* e *in vivo* demonstram elevada especificidade e reatividade seletiva para células infetadas, o que permite inferir acerca do seu grau de segurança. Além disso, o aprofundamento do estudo desta tecnologia, e a descoberta de novas moléculas, capazes de desempenhar funções de recetores de superfície, concedem uma enorme versatilidade às células CAR-T e permitem ainda o reconhecimento de novas estirpes multirresistentes de HIV.

Apesar dos seus resultados favoráveis no tratamento da infeção por HIV, a utilização destas células a longo termo, especialmente em situações de TAR interrompida, revela ser insuficiente, evidenciando assim a necessidade de melhorar o arsenal terapêutico contra esta infeção.

Neste sentido, têm sido estudadas células duoCAR-T, que possuem um CAR adicional que potencia o seu efeito terapêutico e reconhecimento de antigénios de superfície. Através de vários estudos que comprovam o benefício acrescido da sua utilização comparativamente às células monoCAR-T, o objetivo desta revisão é elucidar sobre o excelente desempenho das células duoCAR-T como estratégia terapêutica para o tratamento de indivíduos infetados com HIV.

Palavras-chave: HIV; CAR-T; duoCAR-T; TAR.

Abstract

The efforts made over the last decades brought the average life expectancy of an individual infected with HIV closer to that of a healthy individual.

The study of the viral structure and replication mechanisms allowed the identification of potential pharmacological targets, and with the discovery of the first antiretroviral drugs, the first antiretroviral therapy (ART) and subsequent combined ART regimens, were initiated.

HIV infection, and potential progression to AIDS, became a chronic but manageable pathology, rather than a potentially fatal disease. However, the characteristics of the virus, namely its genetic variability and immune system evasion, establishing a latent infection profile, made current strategies inappropriate for the control of this infection.

CAR-T technology, that combines the T lymphocyte with chimeric antigen receptors, represents a promising alternative for the treatment of HIV infection, which allows complementing other therapeutic strategies, without the risk of resistance development. Some of the concerns surrounding the use of these cells, such as the possibility of cytokine release syndrome and neurotoxicity, hamper their study and use. However, *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate high specificity and selective reactivity for infected cells, which allows inferences about their safety level. Moreover, the further study of this technology, as well as the discovery of new molecules acting as surface receptors, provide enormous versatility to CAR-T and also allow the recognition of new multi-resistant strains of HIV.

Despite their favorable results in the treatment of HIV infection, the long-term use of these cells, especially in situations of interrupted ART, is insufficient, thus highlighting the need to improve the therapeutic arsenal against this infection.

In this sense, duoCAR-T cells have been studied, which have an additional CAR that enhances their therapeutic effect and recognition of surface antigens. Through several studies that prove the added benefit of their use compared to monoCAR-T cells, the purpose of this review is to shed some light on the excellent performance of duoCAR-T cells as a therapeutic strategy for the treatment of HIV-infected individuals.

Keywords: HIV; TAR; CAR-T; duoCAR-T.

Agradecimentos

A realização desta monografia conclui um longo percurso de cinco anos repletos de memórias que guardarei para a vida.

Gostaria de deixar os meus agradecimentos à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pelos conhecimentos que me facultou ao longo deste curso, e por ter sido uma segunda casa para mim. Gostaria também de agradecer ao meu orientador, professor José Miguel Azevedo Pereira, pelo acompanhamento e constante disponibilidade quer no desenvolvimento desta monografia, quer em ambiente de aula. Sem a sua ajuda este desafio teria sido muito mais difícil, pelo que lhe fico eternamente grato.

Por último, mas não menos importante, um obrigado a todos os que me acompanharam durante o meu percurso académico.

Um agradecimento especial à minha mãe, Elda Lopes, pelo carinho, apoio e inspiração. Quero dedicar esta monografia em tua memória, pois representa a minha ambição e esforço, características que não teria se não fosse pela educação que me deste junto do meu pai.

Um agradecimento ao meu pai Nuno e irmão Ricardo. Obrigado por aguentarem o forte sempre que a pressão se fazia sentir. A vossa presença na minha vida permitiu-me ser a pessoa que sou hoje, ambicioso e resiliente. São também uma inspiração e espero ter-vos orgulhado.

Um agradecimento aos meus companheiros de curso, pelo apoio em tempos difíceis e pela presença nos momentos felizes. É com bastante prazer que me torno farmacêutico junto de vós!

Abreviaturas

RT – Transcriptase reversa

SIV – Vírus de imunodeficiência dos símios

CRF – Formas recombinantes circulantes

URF – Formas recombinantes únicas

TAR – Terapêutica antirretroviral

GALT - *Gut associated linfoid tissue*

CAR – *Chimeric antigen receptor*

TCR – Recetor de células T

HDR – *Homology directed repair*

LRA – *Latency reversing agent*

LTC – Linfócito T citotóxico

TCP – *T cell product*

MHC – Complexo major de histocompatibilidade

LCR – Líquido cefalorraquidiano

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

CRD – Domínio de reconhecimento de carboidratos

CDF – Célula dendrítica folicular

RT-PCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction*

Índice

1.	Introdução	10
2.	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	10
2.1	Introdução.....	10
2.2	Estrutura genómica e formação da partícula viral	10
2.3	Variabilidade e distribuição geográfica do HIV	12
2.4	Ciclo de replicação e mecanismo de infeção	13
2.5	Curso natural da doença	15
2.6	Patogenicidade da infeção por HIV	18
2.7	Reservatórios e latência do HIV	19
2.7.1	Reservatórios de tecido linfoide.....	19
2.7.2	Reservatórios celulares	19
3.	Terapêutica antirretroviral (TAR).....	20
3.1	Quando iniciar o tratamento por TAR?	20
3.2	Regimes terapêuticos e fármacos antirretrovirais	22
3.3	Barreiras ao tratamento	24
4.	Células CAR-T (Chimeric Antigen Receptor)	25
4.1	Introdução e funcionamento	25
4.2	Células CAR-T e HIV	27
4.3	Funcionalidade e seletividade.....	29
4.4	Efeitos na infeção disseminada.....	29
4.5	Desafios e limitações.....	30
4.5.1	Resistência de células CAR-T ao HIV.....	30
4.5.2	Destruição dos reservatórios de HIV latente	31
5.	Células duoCAR-T.....	32
5.1	Introdução	32
5.2	Ensaios <i>in vitro</i>	33
5.3	Células CAR-T <i>versus</i> duoCAR-T.....	34
6.	Conclusão e perspectivas futuras.....	36
7.	Bibliografia.....	37

Índice de imagens

Figura 1: "Genoma do HIV-1"	10
Figura 2: "Estrutura da partícula de HIV-1"	12
Figura 3: "Distribuição global de subtipos e CRFs de HIV-1"	13
Figura 4: "Evolução Clínica da infecção por HIV"	16
Figura 5: "Comparação entre o intervalo de tempo até ao primeiro endpoint primário de indivíduos em TAR imediata versus TAR tardia"	21
Figura 6: "Efeitos do momento de início de TAR no número de linfócitos T CD4+"	21
Figura 7: "Classes de fármacos antirretrovirais e respetivos alvos no ciclo de replicação do HIV"	22
Figura 8: "Efeitos da TAR na supressão da replicação viral do HIV"	24
Figura 9: "Produção de células CAR-T"	26
Figura 10: "Tipos de CARs CD4 ou bNAbs baseados específicos para o HIV e respetiva interação"	28
Figura 11: "Estimulação Env-específica de células CAR-T com expressão de CARs CD4 baseados"	29
Figura 12: "Capacidade supressora de CARs CD4 e CD4-DCSIGN na infecção por HIV disseminada"	30
Figura 13: "A utilização de células duoCAR-T atenua a depleção de linfócitos T CD4+"	33
Figura 14: "Comparação da atividade supressora de células duoCAR-T com células monoCAR-T"	34
Figura 15: "Comparação entre a expansão e capacidade proliferativa de células duoCAR-T e células CAR-T de terceira geração"	35

Índice de tabelas

Tabela 1: "Frequência de sintomas e sinais clínicos associados à infecção por HIV-1"	17
Tabela 2: "Número de células infetadas nos baços de ratos NSG tratados com células monoCAR-T e duoCAR-T"	34

1. Introdução

Atualmente não existe cura para a infecção por HIV, o que se deve à inerente capacidade replicativa e variabilidade genética do vírus, que torna as estratégias terapêuticas atuais improficuas (1,2). A terapêutica atual possui uma vasta gama de fármacos que, embora benéficos, são incapazes de induzir a remissão da infecção por HIV, e eventual progressão para SIDA.

O invariável desenvolvimento de resistências por parte vírus exerce uma enorme pressão sobre a descoberta de uma cura ou de um tratamento mais eficaz. Neste sentido, a combinação da atividade citotóxica dos linfócitos T com a capacidade de reconhecimento de recetores quiméricos de antigénio (CAR), isto é, o desenvolvimento de células CAR-T, constitui uma promissora alternativa terapêutica às estratégias atuais.

2. Human Immunodeficiency Virus (HIV)

2.1 Introdução

Os isolados de HIV, pertencentes ao género *Lentivirus*, da família *Retroviridae*, estão atualmente agrupados em 2 tipos, HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 o principal agente global da SIDA, enquanto o HIV-2 está restrito a regiões como África Central e Ocidental.

Tipicamente, o HIV provoca infeções crónicas com um período clínico de latência prolongado, replicação viral persistente e, em certos casos, envolvimento do sistema nervoso central (mais comum na infecção por HIV-2) (3,4).

2.2 Estrutura genómica e formação da partícula viral

À semelhança de outros retrovírus, o genoma do HIV é composto por duas cópias idênticas de RNA de cadeia simples e é caracterizado pela presença de genes, que codificam para: (i) proteínas estruturais *gag*, *pol* e *env* (3,4), (ii) proteínas reguladoras *tat* e *rev*, e (iii) proteínas auxiliares *nef*, *vpr*, *vif*, *vpu/vpx*, sendo o gene *vpu* específico do HIV-1 e o gene *vpx* específico do HIV-2. (Figura 1) (4,5).

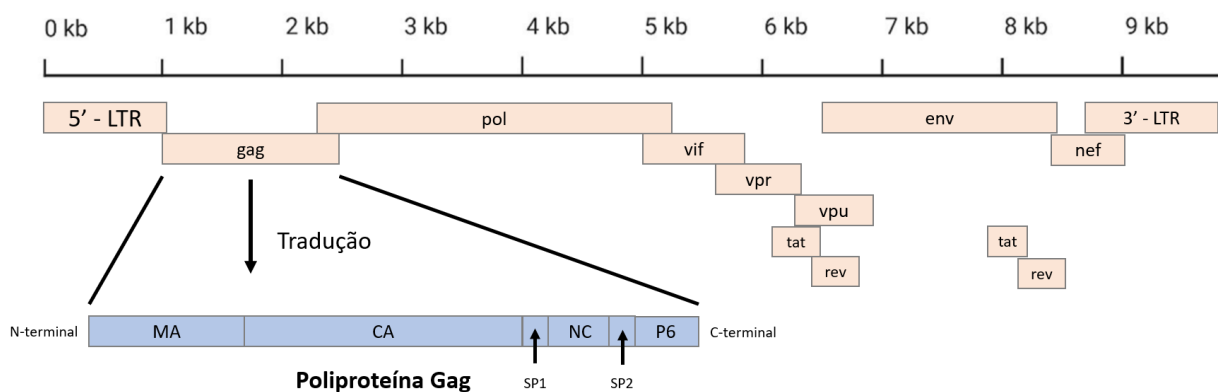


Figura 1: “Genoma do HIV-1”. Adaptado de (4). O gene *gag* codifica para a poliproteína Gag composta pelas proteínas da matriz (MA), cápside (CA) e nucleocápside (NC), pelo péptido P6 e pelos péptidos spacer 1 (SP1) e 2 (SP2).

O gene *gag* codifica para as proteínas estruturais da cápside (p24, p7 e p6) e da matriz (p17) e o gene *env* codifica para as glicoproteínas do invólucro viral (gp120 e gp41) que são responsáveis pelo reconhecimento de recetores celulares de superfície. O gene *pol* codifica para enzimas cruciais à replicação viral como a transcriptase reversa ou RT (p66-p51),

integrase ou IN (p32), que medeia a integração do DNA viral no cromossoma hospedeiro, e a protease, que desempenha um papel importante na fase final da maturação do vírus (1,3,4,6).

O material genético do HIV encontra-se protegido por uma estrutura proteica denominada cápside, formada por cerca de 1000 a 1500 cópias de proteínas da cápside (CA) em forma de cone assimétrico (3).

A cápside é formada por intermédio de uma sequência de rearranjos estruturais que envolvem a clivagem proteolítica da proteína precursora Gag (3,4). A clivagem da proteína precursora Gag ocorre, por ação da protease viral, durante o processo de maturação e após libertação do virião formado.

Depois da clivagem, a proteína CA (ou p24) da poliproteína Gag separa-se da proteína: (i) da matriz (MA ou p17), (ii) do péptido *spacer 1* (SP1), (iii) da nucleocápside (NC ou p7) (iv) e domínio p6 (4,6,7).

A proteína MA medeia a migração da Gag para a membrana plasmática e promove a incorporação de glicoproteínas do Env para a formação de viriões; a proteína NC recruta o RNA viral genómico para os viriões e a proteína p6 recruta o complexo endossomal ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), que catalisa a fase de gemulação por mediação do processo de fissão membranar (7).

De seguida ocorrem interações entre os resíduos Ala14 e Glu45 de monómeros adjacente de CA, formando-se oligómeros que se agrupam em torno do complexo ribonucleoproteico para formar a cápside cónica (3,4).

Até que o processo de maturação esteja concluído, o vírus não é infeccioso apesar de ter todos os componentes necessários presentes na cápside imatura (3).

Além dos três genes que codificam para proteínas estruturais, os genomas do HIV-1 e 2 possuem ainda uma combinação complexa de genes reguladores que são capazes de modular a replicação viral. Entre estes, são conhecidos os mecanismos das proteínas codificadas pelos genes *tat* e *rev* (1,4).

A proteína Tat (codificada pelo gene *tat*), expressa pouco tempo após a infeção, promove a expressão de genes do HIV, e a proteína Rev (codificada pelo gene *rev*) assegura a correta exportação de RNA mensageiro e RNA genómico para o citoplasma (1,6).

A função das restantes proteínas acessórias não é tão bem conhecida, no entanto algumas evidências apontam para: (i) o envolvimento da proteína Vpr na paragem do ciclo celular e na acessibilidade do DNA, reversamente transcrito, ao núcleo de células incapazes de se dividir, como macrófagos; (ii) um papel da proteína Vpu na correta libertação de partículas virais; (iii) a potenciação da infecciosidade de partículas virais produzidas pela célula infetada, por ação da proteína Vif.

Finalmente a proteína Nef tem múltiplas funções, destacando-se os efeitos na transdução de sinal celular e a diminuição de expressão de recetores CD4 na superfície celular para permitir a formação de vírus em estadios mais tardios do ciclo de replicação viral (1).

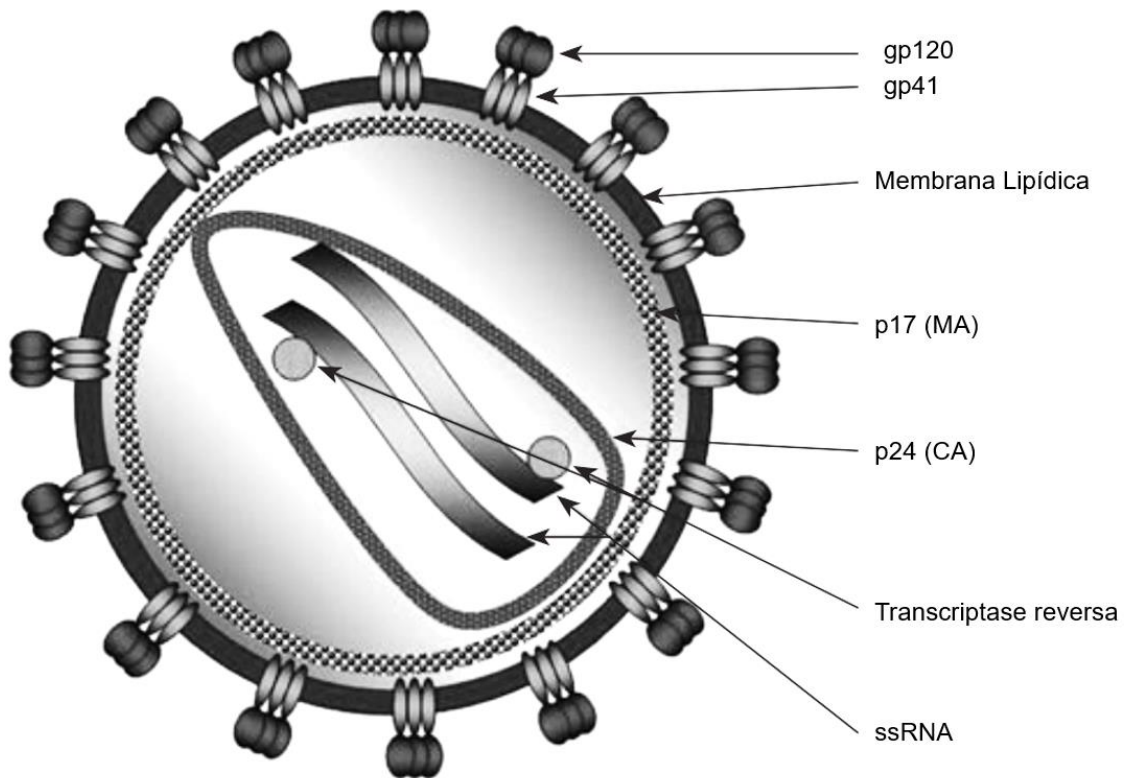


Figura 2: “Estrutura da partícula de HIV-1”. Adaptado de (1).

2.3 Variabilidade e distribuição geográfica do HIV

A variabilidade é a principal característica do HIV que permite a sua persistência no hospedeiro, pois permite que o mesmo escape à resposta imune do indivíduo infetado assim como às intervenções terapêuticas e profiláticas.

A variabilidade do HIV é uma consequência de: (i) replicação viral rápida que produz um elevado número de viriões por dia; (ii) ocorrência de processos de recombinação genética entre dois ou mais vírus diferentes de HIV dentro do mesmo indivíduo; (iii) cronicidade da infeção (1); e (iv) erros introduzidos pela RT aquando da replicação do genoma viral (8).

Os tipos de HIV foram distinguidos entre si através da comparação de sequências homólogas, tendo sido identificado o HIV-1 e HIV-2 (1), no entanto, as numerosas transmissões zoonóticas ao longo de várias décadas deram origem a grupos de HIV-1: M (Major), O (Outlier) e N (non-M/non-O) (1,9) e mais recentemente o grupo P (9). As sequências genéticas do grupo M, N e O são distintas entre si dado que têm origem em diferentes episódios zoonóticos envolvendo diferentes tipos de SIV (Vírus de Imunodeficiência dos Símios) (1).

Os vírus do grupo M são os mais disseminados globalmente, enquanto os grupos O e N, estão mais confinados a áreas restritas como Gabão, Camarões, e países vizinhos, próximos do habitat natural do *P.t troglodytes* (10), hospedeiro natural das estirpes de SIV que deram origem aos elementos desses grupos (1).

O grupo M inclui 9 subtipos (A-D, F-H, J, K), que se têm espalhado com distribuição geográfica específica (Figura 3), sendo que, em particular, nos subtipos A e F podem ser distinguidos pelo menos 6 sub-subtipos (A1, A2, A3, A4 e F1 e F2) (1,9).

Ocasionalmente, dois vírus de diferentes subtipos podem infectar a mesma célula e partilhar o seu material genético, formando assim novos recombinantes. A maioria destes vírus são defetivos, mas os que são capazes de ser transmitidos são denominados como formas circulantes recombinantes ou CRFs (1,9).

A classificação de estirpes de HIV em subtipos, CRFs e URFs (formas recombinantes únicas) é um problema complexo e dinâmico que é influenciado pelas constantes novas descobertas e alterações de definições. Além disso, certos vírus do mesmo subtipo de HIV-1 podem diferir entre si geneticamente em cerca de 20% (1).

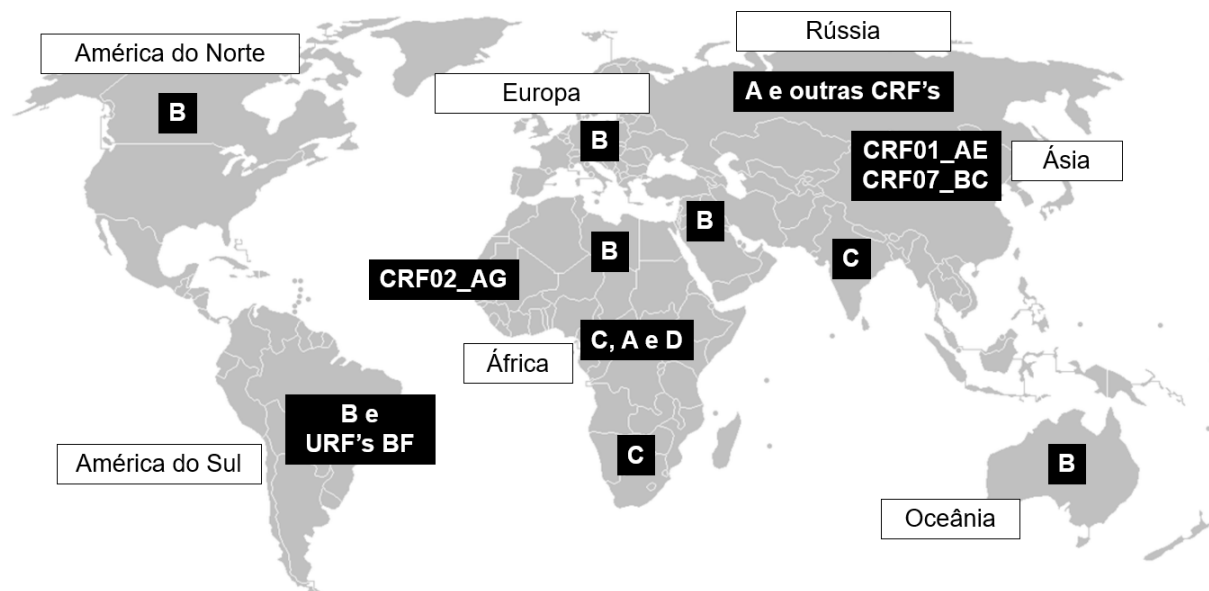


Figura 3: "Distribuição global de subtipos e CRFs de HIV-1". Adaptado de (9).

2.4 Ciclo de replicação e mecanismo de infeção

O ciclo de replicação do HIV pode ser resumido em seis passos: 1) ligação e entrada; 2) descapsidação; 3) transcrição reversa; 4) integração; 5) síntese de proteínas virais 6) gemulação (1,6).

O primeiro passo, ligação e entrada do HIV na célula alvo, pode ser dividido em três eventos: ligação do vírus à célula, ativação e fusão membranar.

O invólucro viral, composto por heterodímeros de proteínas gp120 e gp41 associados num complexo trimérico, desempenha um papel essencial na ligação do vírus à célula alvo e consequente entrada, sendo que este processo é mediado, em grande parte, pela capacidade fusogénica do domínio hidrofóbico da subunidade gp41 (1).

A gp120 liga-se a uma glicoproteína monomérica, denominada por CD4, que se encontra não só na superfície de cerca de 60% dos linfócitos T em circulação, mas também em precursores de linfócitos T na medula óssea e timo, monócitos e macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e da micróglia do SNC (1,6).

A molécula CD4 funciona normalmente como um coreceptor do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe II durante a fase de reconhecimento de um antígeno por parte dos linfócitos T. A ligação da gp120 com o CD4 induz alterações estruturais na gp120 que expõem epitópos que interagem com o coreceptor das quimiocinas na superfície da célula alvo. Devido à alteração conformacional induzida por esta ligação ao coreceptor, o péptido de fusão, localizado na região N-terminal da gp41, penetra na membrana da célula

(11). Após emparelhamento das sequências HR1 e HR2, a porção extracelular da gp41 dobra sobre si mesma de forma a adquirir uma estrutura em gancho (1) que aproxima o vírus e a membrana da célula alvo, facilitando a fusão membranar (1,6).

Os recetores de quimiocinas são classificados com base na posição de resíduos de cisteína na estrutura das respetivas quimiocinas, assim como nos seus efeitos angiogénicos. A nomenclatura mais frequente adota a forma CXC, CC (e por vezes CX3C ou C) seguido de R e um número (1,12).

Entre os coreceptores do HIV, destacam-se como sendo mais comuns o coreceptor CXCR4 e CCR5, embora estejam descritos outros potenciais coreceptores. O CXCR4 é expresso maioritariamente em linfócitos T, enquanto o CCR5 está presente nos linfócitos T CD4+ ativados, monócitos/macrófagos e células dendríticas. As diferenças na utilização destes coreceptores são determinantes no tropismo de estirpes de HIV-1, contribuindo desta forma para uma classificação das mesmas. Como tal temos estirpes: (i) M-Trópicas (Macrófago) ou vírus R5, que apresentam maior afinidade para células que contenham o recetor CCR5; (ii) T-Trópicas (Linfócitos T) ou vírus X4, que apresentam maior afinidade para células que contenham o recetor CXCR4; e (iii) Estirpes que se ligam tanto ao CCR5 como ao CXCR4, são denominadas duo trópicas ou vírus X4R5 (13,14).

A literatura tem sugerido que a descapsidação ocorre breves instantes após a entrada do vírus na célula alvo, no entanto, um estudo recentemente efetuado por Li *et al.* demonstra que a cápside permanece intacta até pouco tempo antes do momento da integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (15).

A transcrição reversa ocorre no interior da capsíde, por ação da RT, que converte o RNA viral de cadeia simples em DNA de dupla cadeia (1). Esta enzima possui duas atividades enzimáticas que asseguram o processo de replicação e, conseqüentemente, o sucesso no passo de integração. Para tal, a RT exerce a função de DNA polimerase e de RNaseH, que leva a degradação da porção de RNA presente no *duplex* RNA-DNA formado (8).

O DNA viral, formado no interior da cápside, é transportado para o núcleo onde será integrado, por ação da integrase de origem viral, no genoma da célula hospedeira, formando o DNA proviral. Após ativação celular, ocorre a transcrição do DNA proviral em RNA mensageiro que codifica as proteínas estruturais, reguladoras e auxiliares necessárias à formação de novos vírus (1,11).

O processo de transcrição inicia-se pela síntese das proteínas reguladoras, Tat e Rev. A proteína Tat liga-se ao TAR (Região de Resposta de Transativação) na região 5' do RNA viral, e estimula a síntese de transcritos de RNA mais longos. A proteína Rev possui dois domínios funcionais: (i) uma sequência rica em arginina (Arg), necessária à ligação ao RNA e localização nuclear e (ii) um domínio hidrofóbico rico em leucina (Leu) que regula o transporte de RNA para fora do núcleo (11).

O RNA mensageiro que codifica para as restantes proteínas, é transportado para o citoplasma onde serão sintetizadas proteínas estruturais. Após clivagem e formação de novas proteínas virais, duas cadeias de RNA viral são associadas, enquanto as proteínas do *core* se reúnem ao seu redor formando a cápside (1,11).

Os componentes da partícula imatura são transportados para a superfície da célula onde ocorre a libertação de partículas virais por gemulação. Após a saída das partículas virais, a protease viral cliva as proteínas precursoras Gag e GagPol para formar as proteínas maduras Gag e Pol que, após rearranjos sequenciais dão origem ao virião maduro (11).

2.5 Curso natural da doença

A patogénese da infeção por HIV e progressão para SIDA são consequência das propriedades infecciosas do vírus e da resposta imunitária inapropriada do hospedeiro. O equilíbrio entre a eficácia destes dois componentes determina o resultado da infeção, sendo este o desenvolvimento de SIDA ou sobrevivência a longo termo (1).

A exposição do HIV a detergentes comuns e desinfetantes resulta na sua inativação. Como tal, para que o vírus seja eficazmente transmitido, é necessário que a pele ou mucosa lesada esteja diretamente exposta a sangue infetado ou secreções (16).

Tal é o caso das relações sexuais, uma das principais vias de transmissão do HIV (16,17), em que a microabrasão resultante do ato sexual provoca processos de regeneração tecidual, aumento de vascularidade, recrutamento de células imunitárias e aumento de citocinas inflamatórias. Estes processos estão associados ao recrutamento de neutrófilos e linfócitos T CD4+ (18).

Em circunstâncias normais, o epitélio funciona como uma barreira à infeção viral. No entanto, a exposição das células da mucosa ao HIV induz a expressão de TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-6 e 8, que são responsáveis pela quebra das junções de oclusão do epitélio, tornado esta barreira ineficaz (19).

A infeção das células da mucosa rapidamente progride para a destruição da arquitetura tecidual e subseqüentemente translocação microbiana, devido à infeção dos linfócitos T CD4+ responsáveis pela homeostasia do tecido. Desta forma, ocorre a disseminação da infeção para outros compartimentos (18), com especial destaque para a corrente sanguínea e o compartimento linfoide, ambientes que permitem a sua sobrevivência e estabelecimento de uma infeção viral replicativa (1,18,20).

As células infetadas ficam sujeitas a lise celular ou iniciam um perfil de infeção latente, constituindo assim os reservatórios celulares de HIV (maioritariamente macrófagos e linfócitos T CD4+ em repouso) (17,21). A acumulação de células infetadas resultante deste perfil de latência constitui uma barreira à completa erradicação da infeção, uma vez que permite a permanência da informação genética viral no hospedeiro mesmo durante a aplicação de regimes terapêuticos com fármacos antirretrovirais (20).

O aparecimento da virémia marca um momento crítico na progressão natural da infeção por HIV, pois indica que o individuo infetado adquiriu potencial de transmissão da infeção, fornecendo também a primeira oportunidade de diagnóstico por intermédio de análises sanguíneas. Tipicamente, entre 10 e 12 dias após o início da infeção, o RNA viral é detetável no sangue através de métodos de amplificação, como a técnica *reverse transcription polymerase chain reaction*, ou RT-PCR (1).

Os níveis de virémia no plasma aumentam rapidamente até um valor de aproximadamente 100 milhões de cópias/mL, imediatamente antes da fase de seroconversão. Por norma, os elevados níveis de virémia, verificam-se por curtos períodos de tempo, uma vez que a reposta imunitária humoral e celular do hospedeiro controlam parcialmente a replicação viral. Como tal, após o aparecimento destes picos, ocorre uma diminuição drástica dos níveis de viremia até um valor estável, denominado *setpoint* viral, podendo este valor ser inferior ao limiar de deteção (Figura 4).

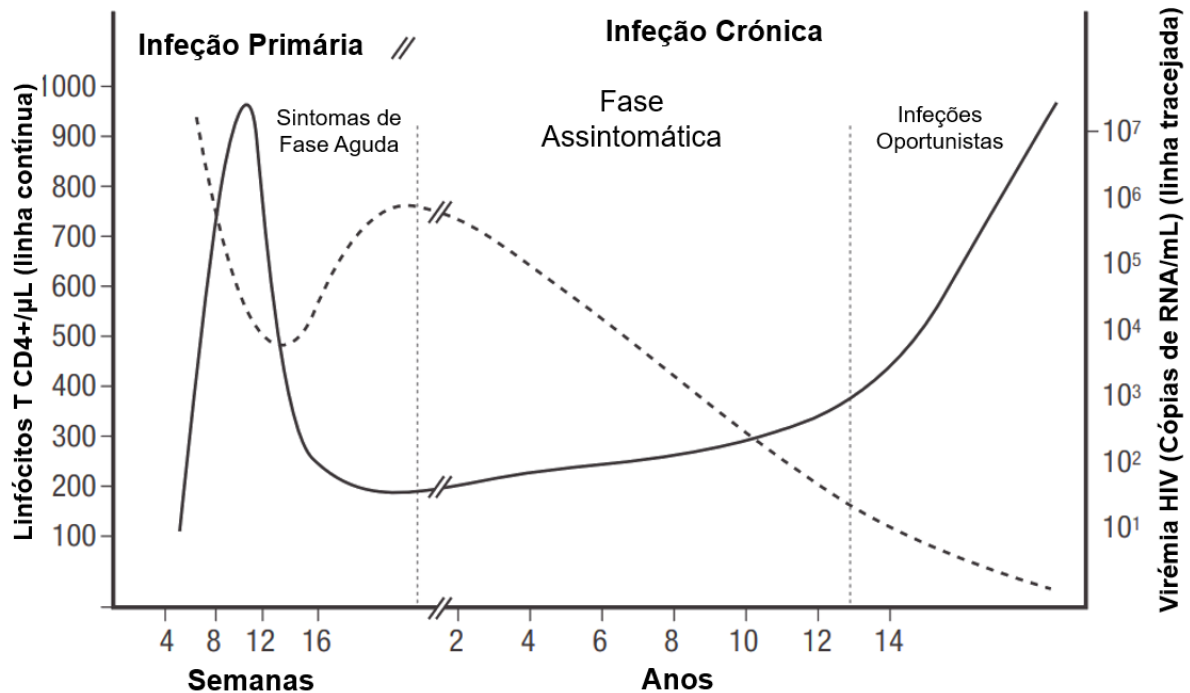


Figura 4: "Evolução Clínica da infecção por HIV". Adaptado de (1). Os valores de virémia são representados pela linha tracejada enquanto a contagem de linfócitos T CD4+ é representado pela linha contínua.

Vários fatores associados com a imunidade antiviral inata e adquirida podem influenciar a replicação viral e o estabelecimento do *setpoint* viral durante esta fase da infecção. No entanto, é de salientar o papel da resposta imunitária vírus-específica mediada por células (atividade citotóxica dos linfócitos T CD8+), que parece ser o ponto central no controlo da replicação viral nesta fase da infecção (1,22) ou seja, antes do aparecimento de anticorpos anti-HIV.

O momento da seroconversão é estimado através da deteção de anticorpos anti-HIV, em amostras sequenciais. Para que este momento seja corretamente estimado, é necessária informação rigorosa quanto ao momento da infecção.

O "período de janela" serológico consiste no intervalo de tempo em que a infecção está presente sem que os anticorpos sejam detetados. Este período pode ser detetado através de testes de terceira geração e, normalmente, adquire uma duração média de 22 dias, no entanto, em casos raros, indivíduos infetados podem permanecer seronegativos durante três meses após transmissão do vírus, o que indica, em certas circunstâncias, uma dificuldade acrescida para a formação de anticorpos HIV-específicos (1).

Tabela 1: "Frequência de sintomas e sinais clínicos associados à infecção por HIV-1".
Adaptado de (13).

Sintoma	Percentagem de indivíduos (%)
Febre	> 80-90
Fadiga	> 70-90
Erupção cutânea	> 40-80
Cefaleia	32-70
Linfadenopatia	40-70
Faringite	50-70
Mialgia ou Artralgia	50-70
Náuseas, vômitos ou diarreia	30-60
Suores noturnos	50
Meningite asséptica	24
Úlceras orais	10-20
Úlceras genitais	5-15
Trombocitopenia	45
Leucopenia	40
Aumento dos níveis de enzimas hepáticas	21

Após exposição ao HIV, entre alguns dias a semanas, a maioria dos indivíduos infectados apresenta sintomas semelhantes aos da gripe ou mononucleose, febre, erupção cutânea, úlceras orais, linfadenopatia, artralgia, faringite, mal-estar, perda de peso e mialgias (13,23).

A fase sintomática da infecção aguda por HIV-1 tem duração de sete a 10 dias e, raramente, mais de 14 dias. Durante este período de infecção, o número de linfócitos T CD4+ diminui drasticamente em associação com elevados níveis de virémia antes do aparecimento da resposta imune específica antiviral (Figura 4) (24).

Algumas semanas após o contágio, os indivíduos infectados entram num período clínico assintomático, associado à diminuição da virémia e ação antiviral exercida pela resposta imunitária inata e adquirida. Durante o período assintomático ocorre o reconhecimento de antígenos HIV por parte de anticorpos, sendo este passo determinante para a prevenção da infecção de células. No entanto, invariavelmente surgem variantes que escapam à resposta imunitária e infectam as células-alvo (1).

Além disso, embora ocorra o reconhecimento, por parte de linfócitos T HIV-específicos, de células infectadas, e consequente eliminação, o HIV assegura a sua replicação, contrariando a resposta imunitária antiviral e induzindo um estado de inflamação sistêmica crônica (17).

2.6 Patogenicidade da infecção por HIV

A replicação anteriormente mencionada ocorre ao nível de reservatórios (sobretudo compartimentos linfoides) com baixa expressão de antígenos virais e elevada frequência de mutações no genoma viral, o que constitui um dos principais mecanismos de evasão à resposta imunitária antiviral (1,17). Além da evasão à resposta imunitária, o rápido estabelecimento e persistência de vários reservatórios do HIV constitui um enorme obstáculo à completa erradicação do vírus do organismo humano mesmo na presença de terapêutica antirretroviral (TAR) (1,2,20).

Durante o decorrer do período assintomático, os efeitos patogénicos associados ao HIV persistem e induzem uma perda progressiva de linfócitos T CD4+ e debilitação imunitária. A progressão para SIDA resulta de vários fatores, nomeadamente a destruição da arquitetura do tecido linfóide, consequência direta da replicação viral, secreção de IL-10 e TGF β (fator de crescimento tumoral β), indução das células do estroma e fibrose (25). Consequentemente, evidencia-se um aumento da transmissão viral para outros linfócitos T CD4+ adjacentes favorecendo a disseminação da infecção.

Particularmente neste estado da infecção, a replicação ocorre maioritariamente a nível da lamina própria e submucosa intestinal e em nódulos linfáticos drenantes, com depleção local de linfócitos T CD4+. A evolução da doença depende da contenção da replicação viral por parte do hospedeiro, acompanhada em simultâneo da reconstituição de linfócitos T de memória na mucosa associada ao tecido linfóide ou nódulos linfáticos. Na ausência desta capacidade de controlo, a destruição de tecido linfóide continua e os níveis de linfócitos T CD4+ atingem níveis inferiores a 200 células/ μ l, nível correspondente a um elevado risco de aparecimento de infeções oportunistas por bactérias, vírus, fungos, parasitas e tumores (1,26,27).

Entre os agentes mais comuns de infeções oportunistas, que definem o estado de SIDA, destacam-se: *Microcystis carinii*, *Candida albicans*, *Cytomegalovirus*, *Herpes zoster* ou parasitas enteropáticos (26,27) que promovem a ocorrência de candidíase oral e esofágica, pneumonia, e em casos mais atípicos, hepatite e insuficiência renal (28) que são responsáveis por grande parte da mortalidade associada à SIDA (26).

Esta fase é normalmente caracterizada pela dilatação difusa de nódulos linfáticos, redução severa de peso corporal, febre e sintomas gastrointestinais e respiratórios. Pode também verificar-se: (i) encefalopatia progressiva (induzida por HIV ou infeções oportunistas), associada a invalidez grave e elevado risco de mortalidade; (ii) doenças neoplásicas (sarcomas ou linfomas) que emergem como consequência da depleção imunitária e enfraquecem o organismo, piorando assim o perfil clínico de progressão da doença (1,26). Durante a fase de SIDA, o número de linfócitos T CD4+ continua a diminuir e é frequentemente detetada anemia e linfopenia (Figura 4).

Apesar da progressão da doença ser extremamente variável, estima-se que, na ausência de tratamento, a esperança média de vida de indivíduos com SIDA esteja compreendida entre dois e seis anos (29).

Perante a diferente progressão clínica da doença, que se manifesta nos níveis de virémia e contagem de linfócitos T CD4+, é possível classificar indivíduos infetados em “progressores”, “progressores rápidos”, “não progressores” e “não progressores de longo termo” (1,30). Surge ainda um grupo, denominado “controladores de elite” que são identificados com base na ausência de deteção de virémia por vários anos.

A distinção entre indivíduos, e os respetivos grupos em que se inserem, é um resultado da avaliação clínica e reflete a resposta individual do portador à infecção por HIV. Além disso, esta

classificação permite o estudo específico de um determinado grupo de doentes, as respetivas características fisiológicas e o seu impacto na progressão da infeção (30).

Na tentativa de investigar a natureza dos fatores associados à proteção antiviral, os “controladores de elite” e os “não progressores de longo termo”, foram alvo de estudo de coorte, mas os resultados destes estudos não evidenciaram qualquer correlação ou mecanismo de proteção definido contra o HIV. Estudos com modelos animais e estudos de vacinação foram também insatisfatórios dada a elevada variabilidade dos vírus assim como a sua capacidade de evasão (1).

2.7 Reservatórios e latência do HIV

Os reservatórios do HIV podem ser divididos em duas grandes categorias: (i) tecidos linfoides que fornecem células alvo ao HIV, promovendo a transmissão célula-a-célula e menor penetração farmacológica; e (ii) reservatórios celulares que consistem maioritariamente em linfócitos T CD4+ e macrófagos que são altamente suscetíveis à replicação viral quando ativados (podendo também ter o genoma viral integrado no seu genoma num estado de latência) (17).

2.7.1 Reservatórios de tecido linfóide

O GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) facilita, ao HIV, um elevado número de células alvo para replicação viral. A elevada replicação viral provoca a depleção de linfócitos T CD4+ associadas ao GALT, sendo esta diminuição frequentemente referida como uma evidência para elevados níveis de replicação de HIV (17), no entanto, tal não constitui o único fator que contribui para a morte celular, já que há evidências de que a contagem de linfócitos T CD4+ associadas ao GALT diminua antes do primeiro pico de virémia (31). Apesar disso o GALT permanece um dos principais tecidos onde ocorre replicação viral em massa, assim como um dos principais reservatórios ao longo de todo o curso da doença, comprovado através de análise citológica de secções de tecido ou células isoladas. Vários estudos demonstram que a presença de HIV no GALT se mantém após vários anos de terapêutica antirretroviral (17).

O motivo da persistência viral no GALT ainda não é determinado, no entanto, sugere-se que a propagação célula-a-célula consista num dos principais contribuintes para a mesma. Esta persistência é assegurada pela abundância de linfócitos T CD4+ ativados (17,32).

À semelhança do GALT, os nódulos linfáticos periféricos também constituem um reservatório de HIV, embora o seu nível de persistência no decorrer de um regime de TAR não esteja bem determinado. Inclusivamente, revelou-se uma proximidade significativa entre o HIV e a rede de células dendríticas foliculares (FDC) que se estabelecem como reservatório nos primórdios da infeção por HIV (20,32).

2.7.2 Reservatórios celulares

Em 1995, através de ensaios laboratoriais que demonstraram a existência de um decaimento bifásico da viremia plasmática, obtiveram-se as primeiras evidências de latência do HIV a nível celular especificamente em linfócitos T CD4+ em repouso de indivíduos infetados. No seguimento destes estudos, apesar de apenas 10 milhões de linfócitos T CD4+ serem portadores do vírus, demonstrou-se que estes constituíam um reservatório latente e resistente a regimes de TAR (21).

Além da persistência do HIV em reservatórios latentes, há evidência de baixos níveis de replicação em indivíduos infetados com virémia devidamente suprimida pela TAR por um período de 9 anos. Neste contexto, os linfócitos T CD4+ ativados constituem uma possível fonte de replicação. Estes dados sugerem a ocorrência de *crosstalk* virológica entre linfócitos T CD4+ ativados e em repouso, na ausência de virémia detetável. O estímulo que despoleta estes eventos tem por base a ativação ocasional do sistema imunitário através de estímulos antígenicos como infecções secundárias ou vacinação, que induzem a replicação do HIV (17).

O reabastecimento contínuo de reservatórios virais pode estar associado com a mobilização de células entre o sangue periférico e tecidos linfáticos, como o GALT. Em conjunto com o contributo dos linfócitos T CD4+ ativados e macrófagos para a persistência viral, os reservatórios celulares podem expandir, através de proliferação homeostática das células infetadas em indivíduos linfopénicos e avirémicos para o HIV. Os dados destes últimos estudos sugerem que em indivíduos infetados e avirémicos para o HIV, o tamanho do reservatório é aumentado por subconjuntos de linfócitos T CD4+ que proliferam durante os efeitos imunitários reconstituíntes resultantes da TAR (17).

3. Terapêutica antirretroviral (TAR)

A terapêutica antirretroviral mudou drasticamente a letalidade de infecções virais, tendo tornado uma infeção uniformemente fatal, numa doença potencialmente crónica (33). Desde a sua aplicação, diversos fármacos têm sido utilizados, com algum sucesso, no tratamento da infeção por HIV de tal forma que, doentes com condições para aderir a terapêuticas de combinação tenham alcançado supressão duradoura da replicação viral. No entanto, apesar do sucesso desta estratégia terapêutica algumas limitações permanecem, como a necessidade de adesão rigorosa vitalícia, custos do tratamento, efeitos adversos de curto e longo termo e a incapacidade de restaurar totalmente a saúde do doente (2,34). Indivíduos tratados a longo termo em regimes eficazes demonstram frequentemente disfunção imune persistente e maior risco de complicações não relacionadas com HIV, como doenças cardíacas, ósseas, hepáticas, renais e neurocognitivas (2).

3.1 Quando iniciar o tratamento por TAR?

A maioria das normas de terapia antirretroviral recomendam a sua utilização para todos os indivíduos infetados com HIV de forma a reduzir o risco de progressão da doença, consequentes *endpoints* (Figura 5) e prevenir a transmissão do vírus. (35) Os resultados de ensaios aleatorizados, *START (Strategic Timing of Antiretroviral Treatment)* e *TEMPRANO (Early Antiretroviral Treatment and/or Early Isoniazid Prophylaxis Against Tuberculosis in HIV-infected Adults)* corroboram o início da TAR o mais cedo possível (36).

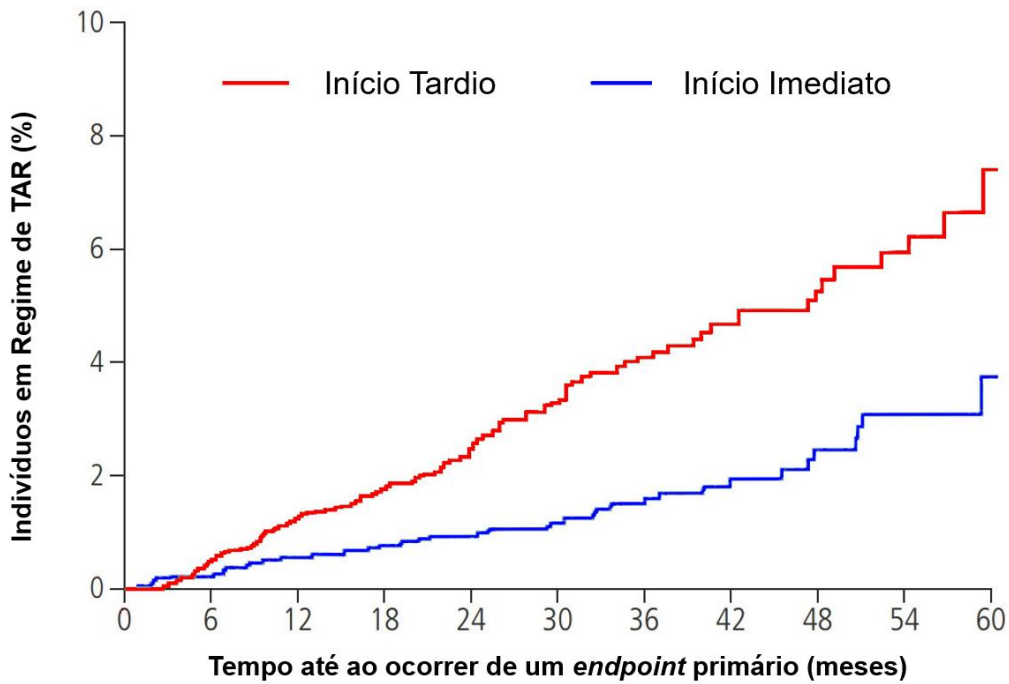


Figura 5: "Comparação entre o intervalo de tempo até ao primeiro endpoint primário de indivíduos em TAR imediata versus TAR tardia". Adaptado de (36). O regime tardio é iniciado com um atraso de 3 meses em comparação ao regime imediato, verificando-se discrepâncias progressivamente maiores entre a taxa de ocorrência de *endpoints* primários entre os dois regimes.

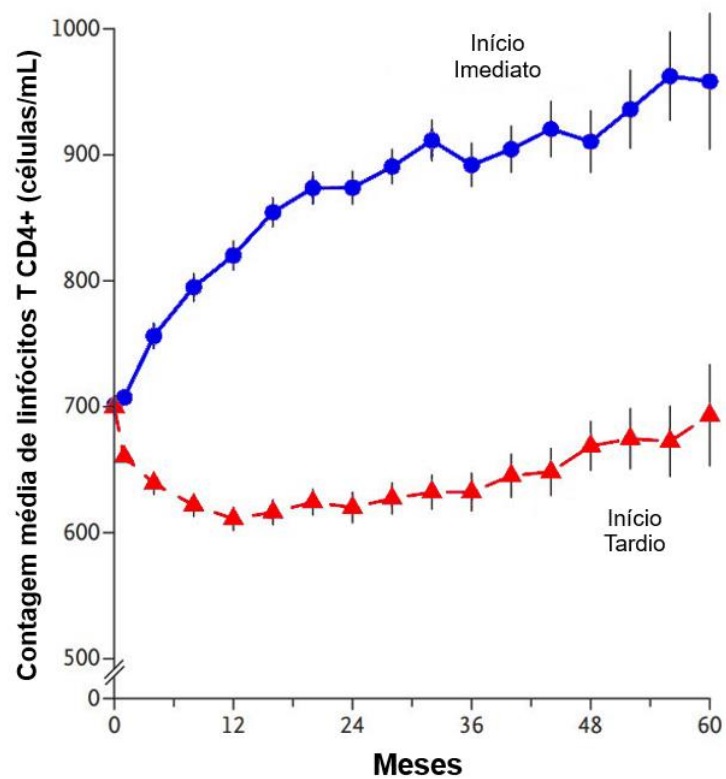


Figura 6: "Efeitos do momento de início de TAR no número de linfócitos T CD4+". Adaptado de (37).

3.2 Regimes terapêuticos e fármacos antirretrovirais

A terapêutica antirretroviral do HIV recorre a fármacos que estão divididos em seis classes e interferem com as cinco fases do mecanismo de infeção do HIV (ligação, fusão, transcrição reversa, integração e clivagem proteolítica). Os fármacos antirretrovirais são classificados em função do passo do ciclo de replicação viral que inibem e, em certos casos, em função da sua estrutura química (2,38,39). Conforme já foi referido, o virião extracelular entra na célula alvo através de um processo de três passos em que ocorre a ligação ao recetor CD4, ligação ao corecetor CCR5, CXCR4 ou ambos, e por último a fusão membranar.

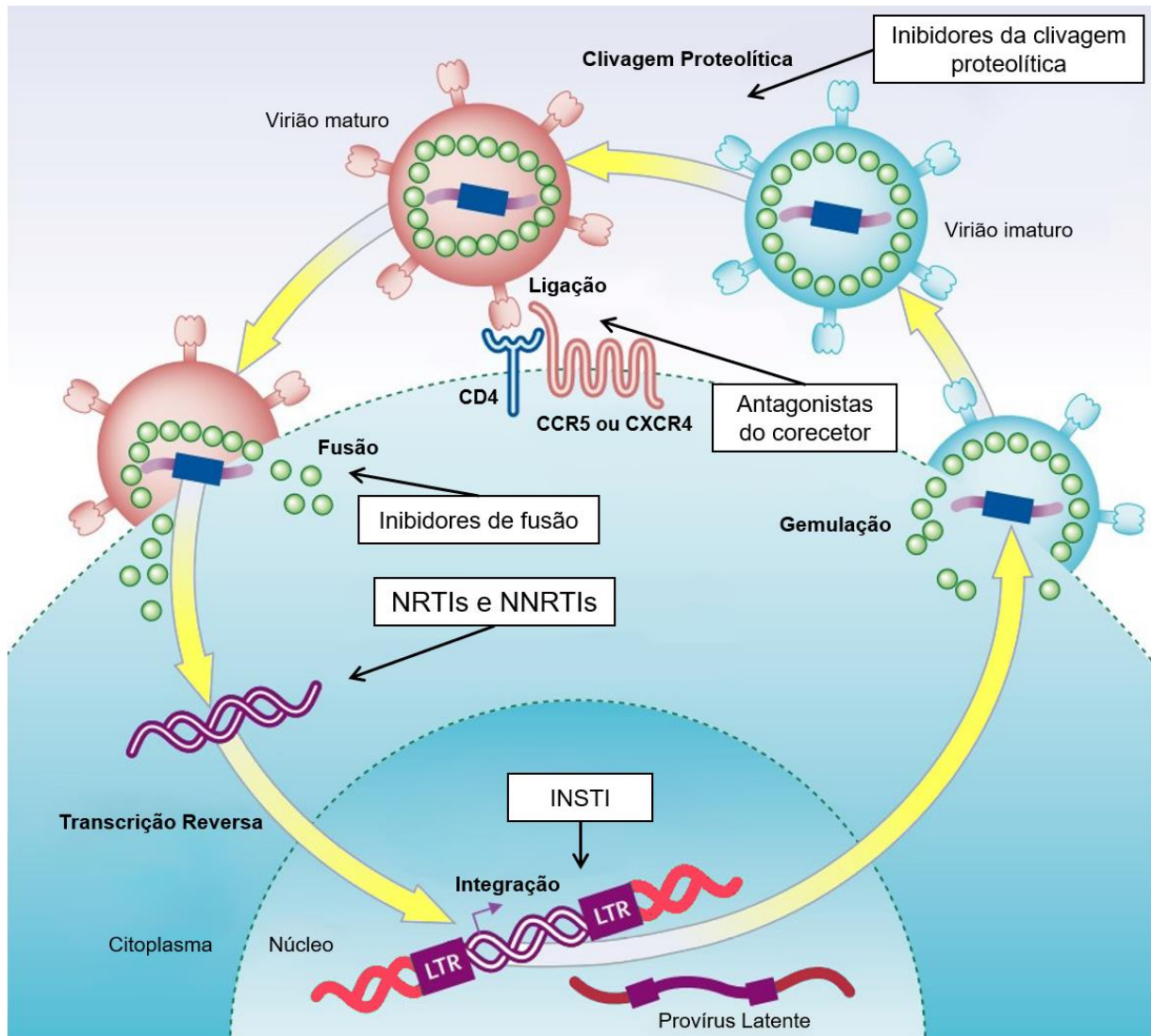


Figura 7: "Classes de fármacos antirretrovirais e respetivos alvos no ciclo de replicação do HIV". Adaptado de (2).

- **Inibidores da transcrição reversa (RTIs)**

Este grupo de fármacos inibe a ação da enzima transcriptase reversa (RT) por: (i) interação com o local ativo da enzima, com inibidores nucleosídicos (NRTI) que desempenham a função de substrato para a enzima, ou (ii) ligação à região hidrofóbica, adjacente ao local ativo da enzima, com inibidores não-nucleosídicos (NNRTI) que desempenham a função de inibidores alostéricos não competitivos (38–40).

Exemplos:

- NRTIs: abacavir, lamivudina, emtricitabina, tenofovir disoproxilo fumarato (TDF), tenofovir alafenamida fumarato (TAF) (39,40) e, mais recentemente amdoxovir, elvicitabina (ainda em ensaios de fase II) e apricitabina (38).

- NNRTIs: etravirina, rilpivirina, delavirdina, efavirenz e nevirapina (39).

- **Inibidores da protease**

Este grupo de fármacos bloqueia a formação de partículas virais com as proteínas da cápside clivadas pela enzima que, em condições normais, maturam e abandonam a célula iniciando assim a disseminação da infecção viral. Devido aos efeitos adversos frequentes da utilização deste grupo de fármacos em regimes de combinação, o seu uso em associação com outros fármacos antirretrovirais é desincentivado (39).

Exemplos:

- Saquinavir, ritonavir, nelfinavir e amprenavir (associados a efeitos adversos graves e resistência cruzada (38)), tipranavir, darunavir, indinavir, atazanavir, lopinavir, fosamprenavir (39,40)

- **Inibidores da integrase (INSTI)**

Os fármacos inibidores da integrase impedem a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. A coadministração de inibidores da integrase e dois NRTIs é atualmente a estratégia de primeira linha de TAR de associação para indivíduos *naive* infetados com HIV-1 (39).

Exemplos:

- Raltegravir, dolutegravir, elvitegravir (38–40) e GSK-1349572, um INSTI de segunda geração que possui atividade contra isolados resistentes à ação dos restantes inibidores da integrase, particularmente raltegravir (38).

- **Inibidores da fusão**

Os fármacos inibidores da fusão, uma vez que atuam fora da célula, possuem uma gama reduzida de efeitos adversos em comparação com os restantes fármacos antirretrovirais (38–40).

Exemplos:

- Enfuvirtide e sifuvirtide

- **Antagonistas do coreceptor**

Antagonistas do coreceptor CCR5:

- Maraviroc e vicriviroc

O antagonismo de outros coreceptores como o CXCR4, com o uso de AMD3100, embora tenha demonstrado capacidade antiviral, não obteve bons resultados devido às características farmacológicas e farmacocinéticas dos fármacos estudados (38).

- **Pharmacoenhancer**

- Cobicistate (ou GS-9350)

Este fármaco permite o aumento da concentração de fármacos antirretrovirais visto que é utilizado como um inibidor metabólico. Apesar de ser desprovido de ação antiviral e ter o mesmo efeito anti-metabólico que o ritonavir (que também é utilizado como bloqueador do metabolismo), o cobicistate possui maior especificidade para o CYP3A do que o ritonavir (39).

3.3 Barreiras ao tratamento

O ciclo de replicação do HIV necessita da permanente integração da informação genética do vírus no genoma da célula hospedeira (preferencialmente de linfócitos T CD4+ e macrófagos). Embora a maioria das células infetadas sejam destruídas rapidamente, uma pequena porção reverte a um fenótipo de memória em repouso que alberga DNA viral. Visto que estas células apresentam elevada longevidade, a infecção por HIV pode persistir por décadas num estado latente, que é inacessível ao sistema imunitário ou à atual terapêutica antirretroviral. Apesar das atuais estratégias terapêuticas serem eficazes na prevenção de infecções *de novo* de novas células alvo, a longevidade inerente dos reservatórios implica que se possam passar décadas até que células previamente infetadas sejam destruídas (2).

A existência destes reservatórios possibilita uma replicação viral subsequente que, mesmo que em valores baixos, são capazes de sustentar a evolução sistêmica da doença assim como eventual resistência a fármacos (33).

Independentemente da causa, a persistência do HIV durante a terapia pode provocar inflamação crônica, imunodeficiências persistentes e elevado risco de lesão de órgãos. A resposta imunitária de longo termo é também altamente variável. Embora, normalmente, os doentes revelem um aumento sustentável de linfócitos T CD4+, muitos dos doentes tratados atingem um *plateau* estável, mas inferior ao intervalo de valores normais (Figura 8)(2).

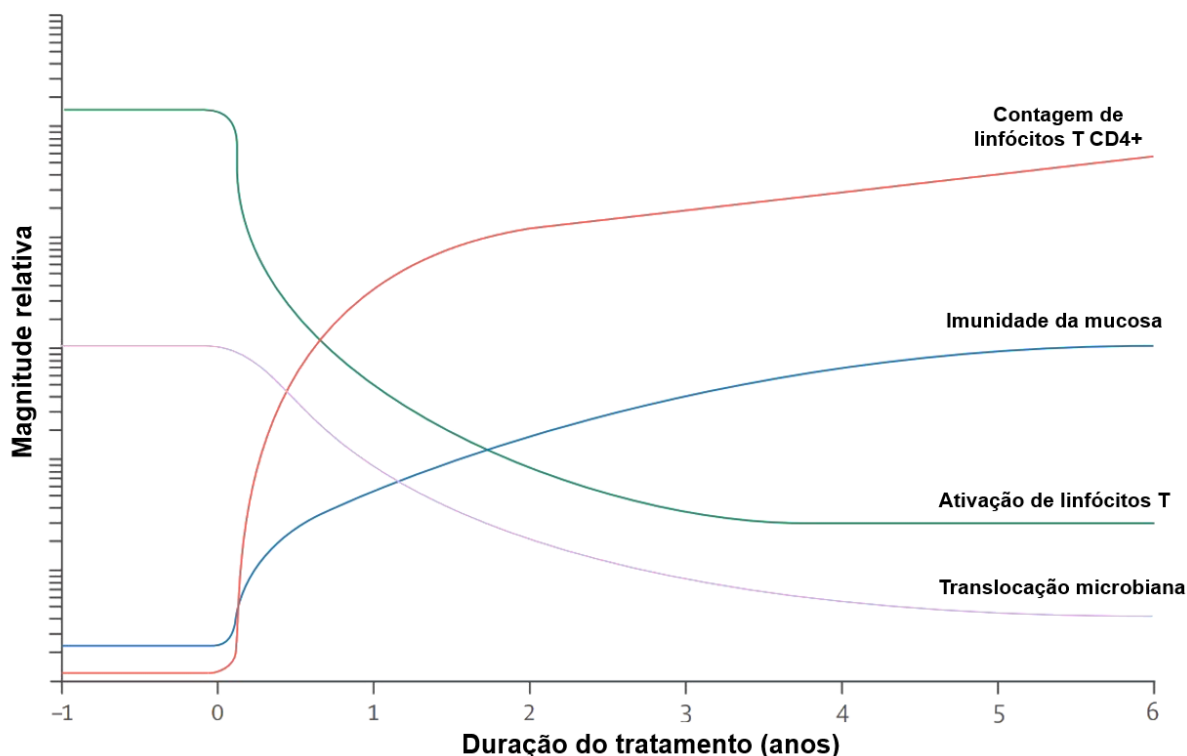


Figura 8: "Efeitos da TAR na supressão da replicação viral do HIV". Adaptado de (2).

Um caso reportado de um indivíduo seropositivo que evidenciou erradicação do HIV após transplante de células estaminais de um dador geneticamente desprovido de CCR5 potenciou a procura por uma cura para o HIV (41).

Na ausência de uma vacina eficaz contra o HIV, e porque a terapêutica atual é cara e incapaz de restaurar completamente a saúde do doente infetado, existe um consenso crescente em relação à necessidade de estudo de métodos de erradicação do HIV dos seus reservatórios.

Surgem assim algumas possíveis abordagens como o uso de fármacos que ativam a transcrição do DNA, forçando a produção de viriões de HIV e morte da célula infetada, ou fármacos que ativem preferencialmente o sistema imunitário, que poderá forçar a conversão de uma célula de memória de longa vida numa célula efetora de vida curta. Outras abordagens incluem a terapia genética com o intuito de reconstituir o sistema imunitário com linfócitos T não suscetíveis à infeção por HIV (2).

As iniciativas de desenvolvimento de vários fármacos bem tolerados, e com elevada eficácia relativamente a vírus com resistências adquiridas contra fármacos antirretrovirais de primeira geração, tem vindo a reduzir o número de indivíduos infetados com estripes multirresistentes de HIV. Este sucesso, apesar de inquestionável, uma vez que os avanços desta área tornaram a infeção por HIV numa doença controlável (33), não é completo, uma vez que ainda existem ocorrências na prática clínica de multirresistências a fármacos (2).

Um estudo realizado em doentes tratados revelou que cerca de 9% dos indivíduos em estudo apresentou evidências de falência virológica a pelo menos três classes de fármacos ao longo de 10 anos. Tal instância é corroborada através de coortes africanas onde se verificam taxas de resistência mais elevadas que o esperado, nas quais as opções farmacológicas para regimes terapêuticos de segunda e terceira linha são escassas (42). A longo prazo, a ausência da contínua descoberta de fármacos pode eventualmente constituir uma enorme desvantagem para o tratamento bem-sucedido do HIV (2), pelo que é importante manter um número considerável de alternativas terapêuticas, de forma a garantir a exequibilidade da TAR.

4. Células CAR-T (Chimeric Antigen Receptor)

4.1 Introdução e funcionamento

Ao longo das últimas décadas tem sido desenvolvido, no contexto oncológico, um enorme interesse em aproveitar a capacidade do sistema imunitário para a erradicação de cancros avançados. De forma a alcançar este objetivo, com o acumular de conhecimentos de várias décadas, foram iniciadas tentativas de manipulação genética de linfócitos T, traduzidas na criação da terapia por células CAR-T e outras terapias celulares como o desenvolvimento de recetores de células T modificados (TCRs) (43).

A tecnologia CAR-T é baseada na engenharia de linfócitos T geneticamente modificados de forma a expressar recetores sintéticos (*chimeric antigen receptors* - CAR), ao invés dos recetores de antigénios fisiológicos (43,44), com elevada afinidade para o antigénio de superfície tumoral (Figura 9). Estes CAR *constructs* foram desenvolvidos com o propósito de combinar as capacidades de reconhecimento de tumores por parte de anticorpos com a potente ação antitumoral dos linfócitos T (43). As células CAR-T são ampliadas *in vitro* e injetadas no doente de forma a atacar e destruir as células neoplásicas presentes nos cancros resistentes a quimioterapia (Figura 9) (45).

Ao contrário dos recetores fisiológicos, que apenas conseguem reconhecer antígenos na presença do MHC (complexo major de histocompatibilidade), as células CAR-T são capazes de reconhecer qualquer recetor presente na superfície celular, independentemente da apresentação por parte do MHC. Como tal, obtém-se uma larga gama de antígenos que a célula T pode reconhecer e interagir, resultando em citotoxicidade (43,46).

Geralmente as células CAR-T são compostas por um domínio extracelular de reconhecimento de antígeno, frequentemente um fragmento variável de um anticorpo, ligado a um *spacer*. Esta estrutura está ancorada a um componente transmembranar que permite a sua ligação a moléculas intracelulares envolvidas nas vias de sinalização da célula T (Figura 10) (43).

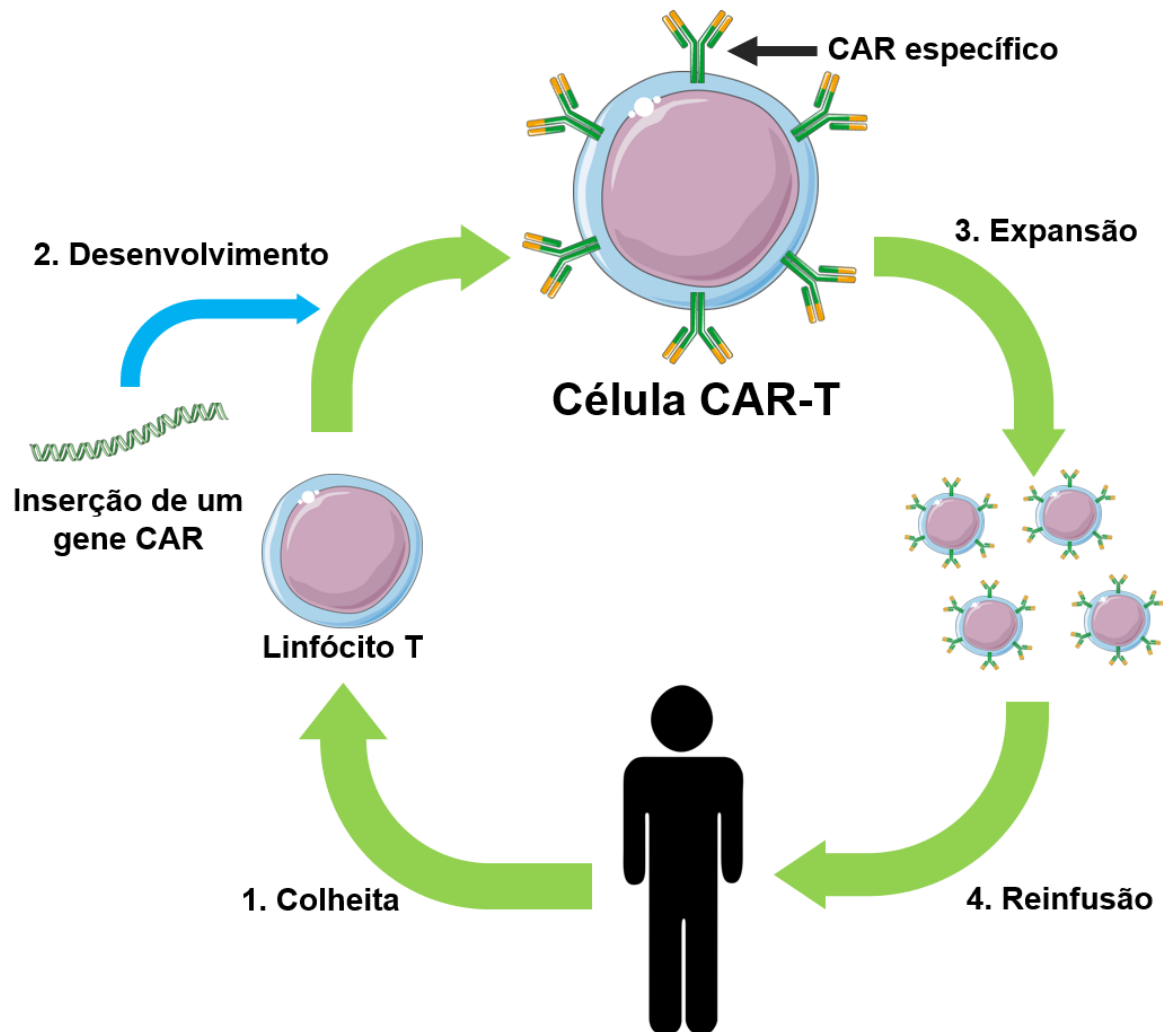


Figura 9: “Produção de células CAR-T”. Adaptado de (22). Os linfócitos T são recolhidos do doente e transfetados com um gene que codifica para um recetor quimérico de antígenos específico para as proteínas do invólucro viral. Após verificação da atividade anti-HIV da célula CAR-T produzida, a linhagem celular é expandida e administrada ao doente.

4.2 Células CAR-T e HIV

Como já foi referido, a estratégia terapêutica mais frequentemente utilizada para controlar a infeção por HIV é incapaz de o erradicar, já que as células infetadas persistem nos reservatórios celulares possibilitando picos subsequentes de virémia, após interrupção da TAR (47–49).

Como tal, são necessárias alternativas terapêuticas capazes de manter a remissão do vírus na ausência de TAR. A criação de linfócitos T com CARs dirigidos para as proteínas do invólucro do HIV poderá melhorar a resposta imunitária adaptativa, que é geralmente observada no seguimento da infeção por HIV-1 mas é ineficaz no controlo da virémia (47).

Através de estudos realizados em grupos de controladores de elite, que são capazes de controlar a replicação do HIV na ausência de tratamento, foi possível concluir que o controlo espontâneo da replicação viral é maioritariamente mediado pela resposta de linfócitos T citotóxicos (LTCs)(22). No entanto, devido à elevada pressão seletiva induzida pela resposta dos LTC, o HIV obtém rapidamente mutações que permitem a evasão ao reconhecimento por parte destas células (50). Para evitar que os vírus latentes adquiram mutações que permitam a evasão a LTCs, é importante implementar um regime de TAR combinada nos primeiros estadios de infeção. Para tal torna-se necessário equipar os linfócitos T CD8+ com CARs capazes de reconhecer vários antígenos HIV, sendo que este processo define um passo crucial no progresso para a cura do HIV (22).

Foram conduzidos, entre 1995 e 2005, os primeiros ensaios clínicos com o objetivo de investigar a eficácia e segurança de células CAR-T. Para o efeito, foi utilizado o domínio de sinalização CD4ζ. Os resultados obtidos, embora satisfatórios do ponto de vista de segurança e aplicabilidade *ex vivo*, foram considerados como insuficientes devido à incapacidade de reduzir a carga viral em circulação e nos reservatórios, o que provocou alguma preocupação quanto à capacidade das células CAR-T constituírem uma alternativa terapêutica contra o HIV e utilização *in vivo* (48,51,52). Uma das principais limitações dos ensaios anteriormente mencionados, foi a utilização de células CAR-T de primeira geração, que possuíam apenas um domínio de sinalização.

Através de avanços na área da engenharia celular, foi possível a inclusão de domínios de sinalização coestimulatórios capazes de modificar as características da célula T, como os domínios CD28 e 4-1BB (um importante regulador da resposta imunitária que é capaz de potenciar a ativação de LTCs (53)).

Estes domínios são capazes de não só alterar o desenvolvimento da memória celular, mas também de influenciar o metabolismo das células CAR-T, o que por sua vez, poderá induzir uma menor suscetibilidade à exaustão, assim como diferenças funcionais (54–56). A construção de um CAR que possua o domínio de sinalização 4-1BB promove um fenótipo de memória central e dependência metabólica sobre processos de fosforilação oxidativa. Já a construção de um CAR que possua o domínio de sinalização CD28 promove um fenótipo de memória efetora em linfócitos T e aumento da glicólise (48,57,58).

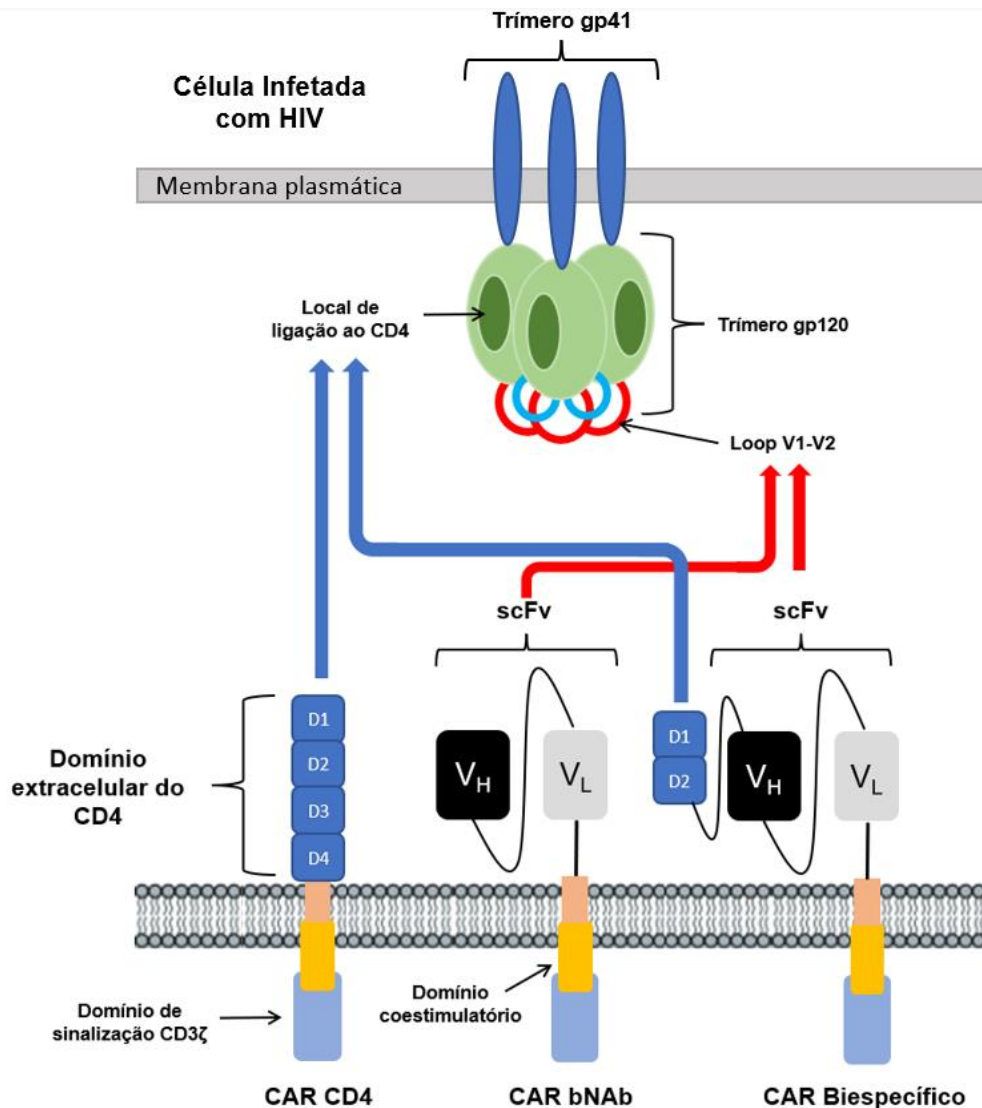


Figura 10: "Tipos de CARs CD4 ou bNAbs baseados específicos para o HIV e respetiva interação". Adaptado de (48).

Atualmente, o recetor CD4 e os bNAbs (*broadly neutralizing antibodies*) são utilizados como base para a construção de CARs anti-HIV (Figura 10). Tal deve-se à forte interação do CD4 e bNAbs (como o PGT-128, PGT-145, VRC07-523 e 10E8 (59)) com locais de ligação da gp120. Na co-cultura com linfócitos T infectados, na presença de TAR, os linfócitos T humanos combinados com CARs bNAbs demonstraram ativação específica e destruição de células infectadas (22).

Adicionalmente, verificou-se a permanência de células CAR-T no LCR (líquido cefalorraquidiano) por cerca de 6 meses após infusão no doente (60,61) e, pelo menos durante um período de observação de oito semanas em circulação atingindo um ano em alguns casos (avaliada através da presença de células CAR-T em 1-3% PBMCs) (62) o que permite atenuar algumas das preocupações no que diz respeito à sobrevivência das células CAR-T. Nestes ensaios obteve-se um decréscimo logarítmico médio de RNA viral superior a 0,5 no tecido retal, durante pelo menos 14 dias, o que permite concluir que ocorre atividade antiviral por parte das células CAR-T CD4-bNAbs (62).

4.3 Funcionalidade e seletividade

Um estudo, efetuado por Ghanem *et al.*, permitiu avaliar a funcionalidade das células CAR-T, através da libertação de INF, no seguimento do reconhecimento de células CHO transfetadas com o gene *env*, de forma a expressar proteínas de superfície do invólucro viral do HIV-1.

A ausência de libertação de IFN no decorrer da cocultura com células CHO sem o gene *env*, e da atividade induzida pelas glicoproteínas do Env nos grupos de controlo UTD e CAR não específica (CAR 139), demonstraram a especificidade das células CAR-T (Figura 11A)(63).

De forma a avaliar a reatividade seletiva das células CAR-T, foram utilizadas células 293T transfectadas com os ligandos gp160, ICAM-2 e ICAM-3. Embora ocorra a interação das proteínas DC-SIGN nativas (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) com as moléculas de adesão celular (ICAM-2 e 3) o acoplamento com o domínio CD4 parece conferir seletividade para alvos infetados, pelo que não se verificou qualquer atividade com os mesmos, em comparação com o ensaio de controlo (CAR 139)(Figura 11B)(63). Como tal, conclui-se que as células CAR-T apresentam elevada especificidade para proteínas do Env. Além disso, os ensaios que demonstram a sua seletividade comprovam o risco reduzido de reconhecimento de células não infetadas, e subsequentes reações adversas.

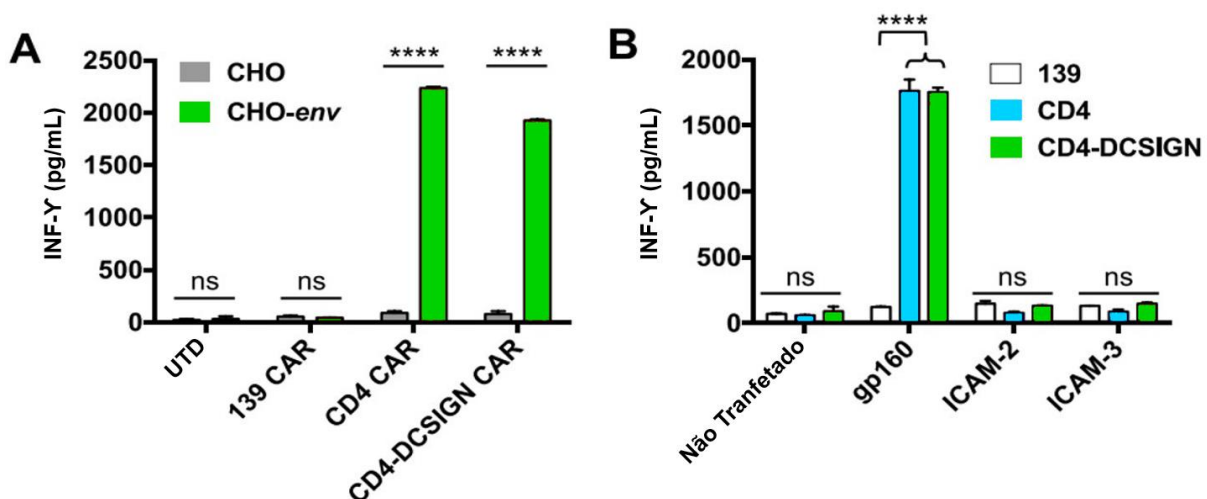


Figura 11: "Estimulação Env-específica de células CAR-T com expressão de CARs CD4 baseados". Adaptado de (63). (A) Comparação entre a indução da resposta inflamatória resultante do reconhecimento de células CHO *wildtype* (cinzento) e CHO transfetadas com o gene *env* (verde). (B) Comparação da atividade de CARs de base CD4 (azul) ou CD4-DCSIGN (verde) no reconhecimento de células 293T transfectadas. (A e B) Em ambos os ensaios foram utilizados CAR 139 (CAR inespecífico) como controlo.

4.4 Efeitos na infeção disseminada

O estudos dos efeitos da capacidade supressora de infeções disseminadas foi avaliada através da monitorização do valor da concentração de p24, que representa os níveis de replicação viral (63).

Ambas as células CAR-T em estudo demonstraram capacidade supressora em comparação com o controlo negativo (Figura 12A).

Adicionalmente, foram examinadas células com mutações pontuais nas proteínas CD4 e DC-SIGN (Figura 12B). Observou-se que qualquer mutação no domínio de reconhecimento CD4 eliminou a capacidade supressora da célula, revelando assim o papel crucial que este domínio desempenha no processo de reconhecimento de células infectadas. Já as mutações pontuais no domínio CRD (*carbohydrate recognition domain*) inibiram parcialmente a supressão da infecção. Tal deve-se à inibição da interação entre o CD4 e a gp120 que é mediada por ligações de lectina a regiões do Env com oligomanose.

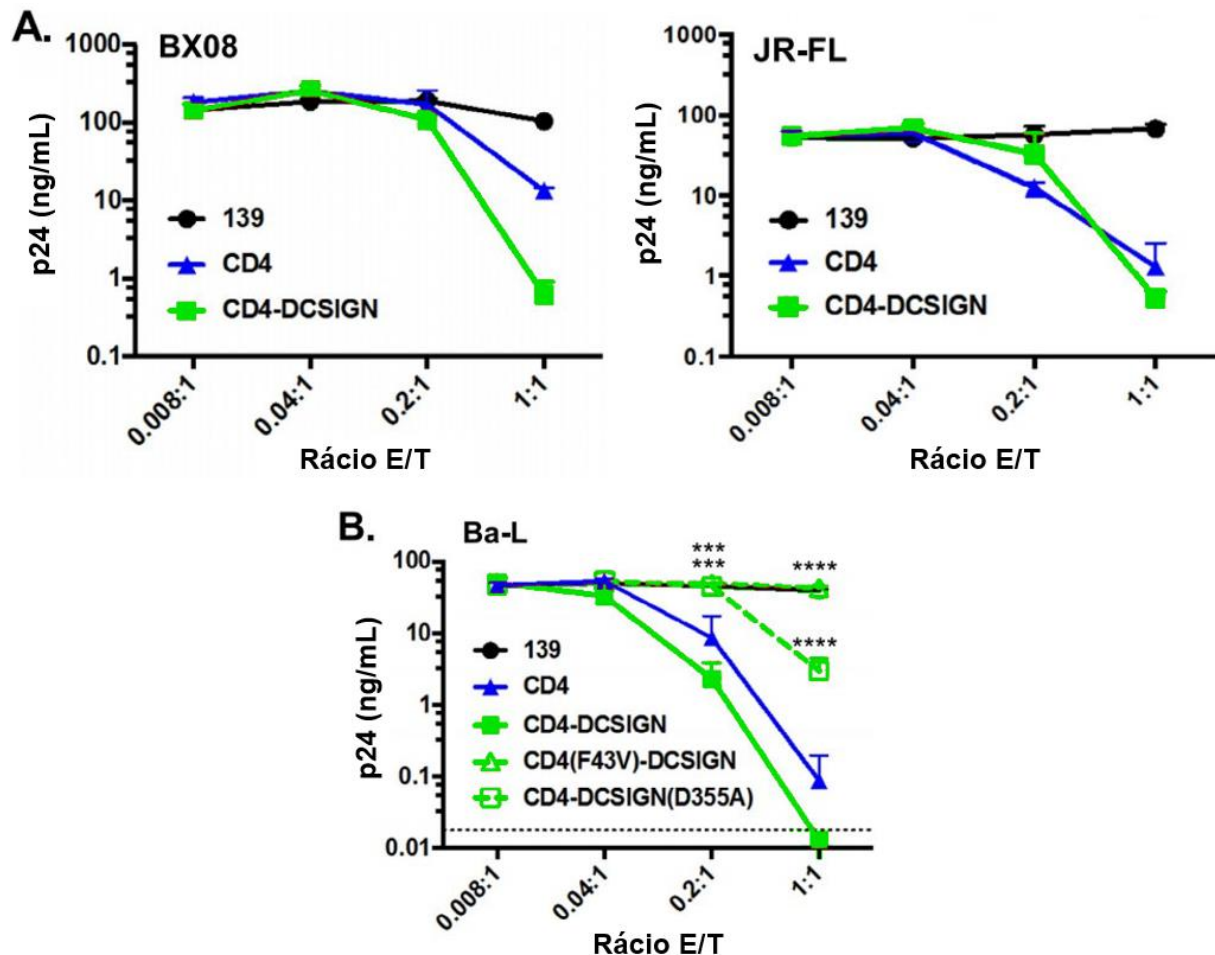


Figura 12: "Capacidade supressora de CARs CD4 e CD4-DCSIGN na infecção por HIV disseminada". Adaptado de (63). (A) Atividade de CARs de base CD4 (azul) e de base CD4-DCSIGN (verde) contra isolados BX08 e JR-FL de HIV-1. (B) Atividade de CARs de base CD4 (azul), CD4-DCSIGN (verde) e mutantes do CAR CD4-DCSIGN (padrão triangular e quadrangular) contra o isolado Ba-L de HIV-1. A mutação F43V (padrão triangular) no domínio CD4 aboliu, na totalidade, a interação CD4/gp120, eliminando assim a capacidade supressora do CAR. A mutação D355A no domínio CRD diminuiu significativamente a atividade supressora do CAR. (A e B) Os níveis de p24 no sobrenadante das culturas permite avaliar os efeitos dos CARs na replicação viral. Em ambos os ensaios foram utilizados CAR 139 (CAR inespecífico) como controle.

4.5 Desafios e limitações

4.5.1 Resistência de células CAR-T ao HIV

A capacidade terapêutica das células CAR-T é condicionada pela sua exposição, e suscetibilidade significativa, à infecção por HIV. Como tal, são necessários esforços que permitam assegurar o maior potencial terapêutico das células CAR-T através da sua proteção contra infecções. De forma a atingir este objetivo, impedir a entrada de vírus na célula parece

ser a estratégia mais eficaz (64). Ao bloquear a entrada do vírus na célula impede-se a propagação viral e integração no genoma hospedeiro, onde se poderia despoletar uma infecção latente. Assim, de forma a impedir a infecção de células CAR-T, foram avaliadas várias estratégias de edição genética. Uma das possíveis abordagens estudadas foi a utilização de nucleases zinc-finger capazes de tornar o gene que codifica para o coreceptor CCR5 não funcional (65,66).

A alteração da expressão de CCR5 foi estudada com a aplicação de uma *nucelase megaTAL* alvo-específica, transfetada num molde de um vetor AAV (*adeno-associated virus donor*) que codificava um CAR com base scFv (*single chain variable fragment*).

A aplicação de HDR (*homology-directed repair*) é um passo fundamental na construção das células CAR-T em estudo, uma vez que assegura o correto rearranjo genético e, conseqüentemente, o aumento do grau de segurança do procedimento (59,67).

Este método permitiu produzir células CAR-T específicas para o HIV sem a expressão do recetor CCR5, e assim protegidas da infecção pelo vírus. Estas células foram capazes de suprimir a replicação viral *in vitro* com maior extensão do que uma célula CAR-T construída através dos métodos convencionais, nomeadamente transdução lentiviral (48,59).

No entanto, a tecnologia de HDR apresenta alguns inconvenientes ao nível de aplicação clínica, apesar dos seus bons resultados *in vitro*. Em alternativa, a proteção de células CAR-T pode ser atingida através da cotransdução ou integração de genes de resistência no vetor lentiviral que contem o CAR HIV-específico desejado (48).

Ainda no contexto da proteção das células CAR-T, podem ser utilizadas estratégias como: (i) a coexpressão de variações de sequência do *gp41*, que inibem a fusão do vírus nas sinapses virológicas; (ii) e a coexpressão de shRNAs (*small hairpin RNA*), que diminuem a expressão de CCR5 nas células CAR-T reduzindo a entrada do vírus na célula, com LTRs (*long terminal repeat*), que medeiam a degradação de RNA viral (48).

Além disso, a proteção de células CAR-T pode tomar como referencia as estratégias utilizadas para proteger outros alvos, como o domínio de ligação CD4. No entanto, é de salientar que esta aplicação pode ser mais complicada em células CAR-T, dado que possuem ativação basal reduzida, mas constante, e conseqüentemente maior suscetibilidade à infecção por HIV (64).

4.5.2 Destruição dos reservatórios de HIV latente

Um dos principais obstáculos para se atingir a cura do HIV deriva da persistência dos reservatórios virais latentes, apesar dos efeitos da TAR combinada (1,2). Como tal, de forma a alcançar uma cura definitiva, é crucial atingir a completa destruição destes reservatórios. É este o principal objetivo da estratégia "*shock and kill*", que utiliza LRAs (*latency-reversing agents*) que perturbam a quiescência do vírus (20,68).

Esta estratégia depende da reativação das células infetadas, e conseqüente destruição, como resultado dos efeitos citopáticos induzidos pelo vírus ou por lise mediada por células imunitárias. No entanto, isoladamente, os LRAs não conseguem reduzir o tamanho de reservatórios latentes, principalmente por insuficiente reativação viral (48,69–71).

Acredita-se que existam outros mecanismos que contribuem para a insuficiência terapêutica dos LRAs. Tal é o caso de linfócitos T CD4+ que possuem provírus intactos com capacidade replicativa, que parecem ser a causa da virémia recrudescente. Estes linfócitos, em situações de TAR interrompida, escapam à ação de linfócitos T CD8+ através da desregulação de apresentação de antígenos, por intermédio do fator Nef (72).

Embora esta característica não influencie a ação das células CAR-T, já que não necessitam da apresentação de antígenos por parte do MHC (43,46), a tecnologia CAR ainda possui obstáculos no combate às células latentemente infetadas em reservatórios (48).

Além de células infetadas em nódulos linfáticos, os folículos de células B constituem um obstáculo às células CAR-T, visto que representam um compartimento de replicação viral persistente, inclusive durante regimes de TAR (48,73). Neste ambiente, tanto linfócitos T-*helper* foliculares como T-reguladores foliculares apresentam elevada permissividade para o HIV, em comparação aos subconjuntos de células extrafoliculares (73). Além disso, embora tenham sido detetados LTCs vírus-específicos em nódulos linfáticos, tal não se verifica em folículos de células B, já que os LTCs não expressam o recetor de *homing* folicular CXCR5 (48,73). A ausência da capacidade citotóxica no ambiente folicular torna-o mais suscetível à presença de viriões extracelulares que se acumulam tendencialmente à superfície de células dendríticas foliculares (CDFs)(73).

Adicionalmente dados recentes evidenciam a reduzida capacidade citotóxica dos LTCs no tecido linfoide, através de níveis de expressão reduzidos de perforinas e granzimas. No entanto, o fenómeno responsável por esta atenuação ainda não é conhecido (48,74).

Uma das possíveis abordagens para ultrapassar esta barreira tem por base a engenharia das células CAR-T de forma a expressarem o recetor de *homing* folicular CXCR5, que possibilita a entrada da célula CAR-T no folículo de células B onde poderão reconhecer linfócitos T CD4+ foliculares infetados.

Com o intuito de avaliar a capacidade de *homing* de linfócitos T CD8+ do sangue periférico, Ayala *et al.* avaliou os efeitos da expressão do recetor CXCR5 em linfócitos T CD8+ de modelos animais infetados com SIV. Após infusão, os linfócitos T CXCR5-CD8+ migraram para folículos de células B no baço e nódulos linfáticos, reconhecendo as células infetadas com SIV. Acredita-se que esta abordagem possa ser aplicada igualmente a células CAR-T no tratamento do HIV (75) e em combinação com o uso de LRAs para permitir uma destruição de reservatórios mais eficaz.

5. Células duoCAR-T

5.1 Introdução

Embora revolucionária e eficaz na destruição de células infetadas, a utilização de células CAR-T CD4 baseadas possui algumas limitações. A ineficácia terapêutica em perfis de tratamento crónico, casos de supressão de TAR, e a suscetibilidade à infeção por HIV (64,76), revelam a constante necessidade de aprofundamento do conhecimento desta tecnologia.

Na tentativa de ultrapassar estas limitações foram implementadas estratégias que possibilitaram o aumento: (i) da sobrevivência *in vivo*, e (ii) da potência e especificidade.

O primeiro objetivo foi alcançado através da combinação com domínios coestimulatórios (CD28 ou 4-1BB). O segundo objetivo pode ser atingido através do uso de fragmentos derivados de bNAbs. Porém, tal implica uma necessidade de engenharia celular, já que os bNAbs possuem reduzida eficácia terapêutica, devido à incapacidade de neutralizar todos os isolados de HIV (77).

A construção de células duoCAR-T viabiliza a combinação das várias características fulcrais à utilização de células CAR-T, como sobrevivência, segurança e eficácia terapêutica, sem comprometer a especificidade, suscetibilidade à exaustão e resistência à infeção por HIV (76,77).

5.2 Ensaio *in vitro*

O estudo efetuado por Maldini *et al.* (2020) permitiu concluir que o rato BLT constitui um modelo animal adequado ao estudo e construção de CAR TCPs (*T cell product*). Esta conclusão foi retirada devido à semelhança demonstrada entre o perfil de supressão viral, cinética de expansão e expressão de citocinas pró-inflamatórias de células CAR-T de origem humana e de origem BLT (76).

Como já foi referido, os domínios coestimulatórios, CD28 e 4-1BB, melhoram a eficácia terapêutica das células CAR-T. Especificamente, o domínio CD28 possui elevada função efetora, enquanto o domínio 4-1BB apresenta melhor sobrevivência *in vivo* (48,57,58). Com o intuito de combinar a função efetora e sobrevivência conferidas por estes domínios, foi construída uma célula duoCAR-T com expressão de ambos os CARs CD4 (CAR-BBζ e CAR-28ζ). As células obtidas foram prontamente ampliadas e avaliadas quanto à sua capacidade de supressão de infeção por HIV.

Os resultados obtidos (Figura 13), embora positivos, não corresponderam à expectativas esperadas relativamente à sua capacidade de supressão da virémia. No entanto, os grupos de estudo tratados com células duoCAR-T apresentaram um atraso na perda de memória celular CD4+, revelando assim um aumento da sobrevivência celular, em comparação com o grupo de controlo. Conclui-se desta forma que a implementação de células duoCAR-T no tratamento de indivíduos infetados, poderá reduzir eficazmente a depleção de linfócitos T CD4+ induzida pela patogenicidade viral.

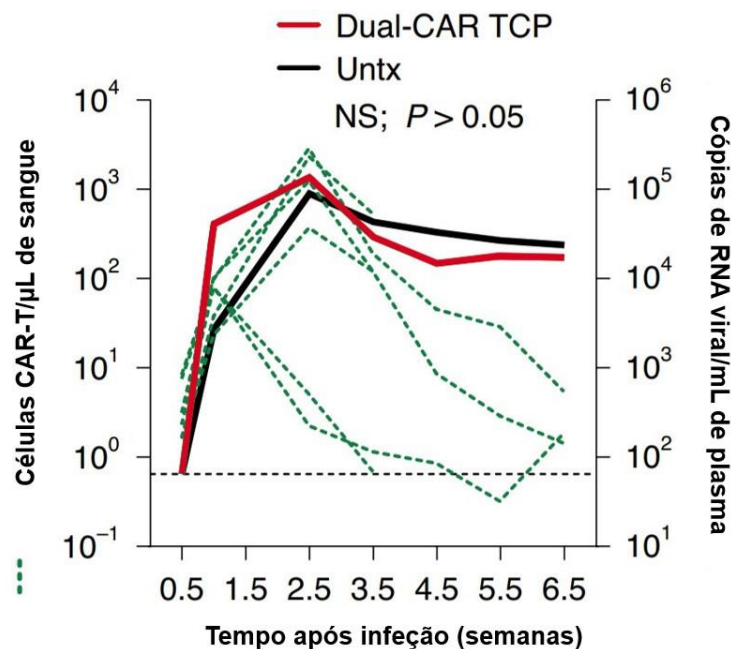


Figura 13: "A utilização de células duoCAR-T atenua a depleção de linfócitos T CD4+". Adaptado de (76). Concentração total de células CAR-T periféricas (linhas verdes tracejadas) e células duoCAR-T (linha vermelha) em comparação ao ensaio de controlo (linha preta); o valor P foi calculado entre os dados obtidos de ratos infetados com estirpes de HIV_{JRCSF} (n=12) e HIV_{MJ4} (n=12) tendo sido obtida uma diferença não significativa (NS). A linha preta tracejada representa o limite de quantificação.

5.3 Células CAR-T versus duoCAR-T

Perante a eficácia terapêutica e segurança *in vitro* comprovada pelos ensaios anteriormente mencionados, torna-se importante avaliar o potencial terapêutico das células duoCAR-T *in vivo* (77).

O estudo efetuado por Anthony-Gonda *et al.* permitiu fazer a comparação entre a eficácia *in vivo* de células monoCAR-T e duoCAR-T. Foram utilizadas células monoCAR-T mono-específicas (M1) e biespecíficas (M13) e células duoCAR-T (D13) (Figura 14).

A quantificação de HIV foi medida nos cinco grupos de estudo (controlo, UTD, M1, M13 e D13). A redução da infeção no baço do grupo de estudo tratado com células duoCAR-T foi significativamente maior (D13: 97,5%) que nos restantes grupos (M1: 42%; M13: 61%) (Figura 14)(77). Além disso, o vírus utilizado no presente estudo tem mutações que lhe conferem resistência aos bNAbs, o que permite avaliar não só a eficácia *in vivo* das células em estudo, mas também a potência das células duoCAR-T em situações de resistência viral.

O estudo de Anthony-Gonda *et al.*, demonstrou a potente atividade supressora das células duoCAR-T, e o benefício acrescido da sua utilização em comparação a células monoCAR-T. Esta conclusão foi corroborada pelos valores obtidos em ensaios de PCR quantitativo em tempo real, tendo-se obtido quantidades indetetáveis nos grupos de estudo tratados com células duoCAR-T não se verificando o mesmo para os restantes grupos (Tabela 2)(77).

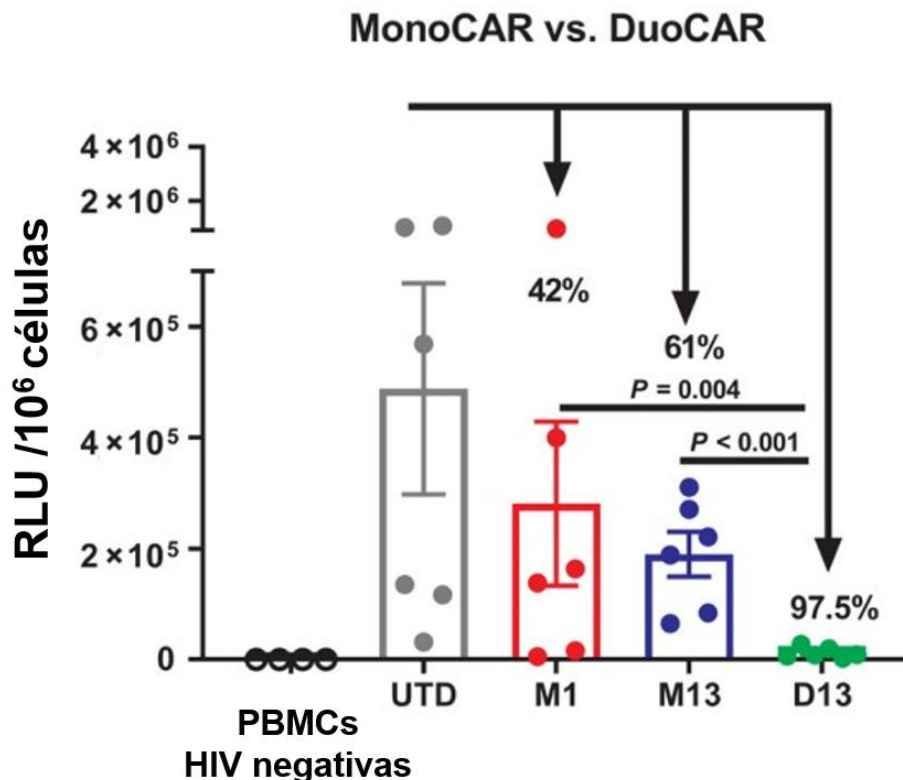


Figura 14: "Comparação da atividade supressora de células duoCAR-T com células monoCAR-T". Adaptado de (77). Os níveis de atividade de RLU (*Renilla luciferase*) representam a replicação viral. A cocultura de células PBMC infetadas com células CAR-T M1 (monoCAR-T), M13 (monoCAR-T biespecífica) e D13 (duoCAR-T) obteve reduções de 42%, 61% e 97,5%, respetivamente.

Tabela 2: “Número de células infectadas nos baços de ratos NSG tratados com células monoCAR-T e duoCAR-T”. Adaptado de (77).

	PBMCs HIV-negativas	UTD	M1	M13	D13
Rato 1	ND < 1	ND < 1	253000	7910	ND < 1
Rato 2	ND < 1	1130	-	11600	ND < 1
Rato 3	ND < 1	2110	ND < 1	ND < 1	ND < 1
Rato 4	ND < 1	1260	9020	14900	ND < 1
Rato 5	N/A	21200	417	12100	ND < 1
Rato 6	N/A	21200	3410	ND < 1	28500

A capacidade de proliferação das células duoCAR-T também revela ser maior do que a das células monoCAR-T de terceira geração, conforme o estudo de Maldini *et al.* (2020). As células CAR-T de terceira geração (3G CAR) atingem um valor máximo no sangue cerca de uma semana após a infusão, iniciando de seguida um declínio acentuado. Por outro lado, as células duoCAR-T demonstram uma expansão mais lenta e constante (Figura 15)(76,77).

O conjunto destes estudos permite concluir que as células duoCAR-T representam uma forte e promissora opção terapêutica no combate à infecção por HIV devido: (i) à sua elevada potência e especificidade (Figura 14), e (ii) capacidade proliferativa e sobrevivência (Figura 15)(76,77).

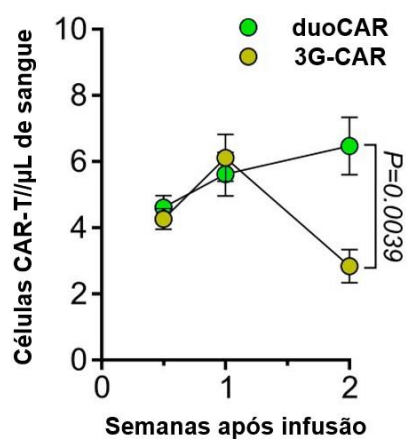


Figura 15: "Comparação entre a expansão e capacidade proliferativa de células duoCAR-T e células CAR-T de terceira geração". Adaptado de (76). Apesar da sua expansão mais lenta, as células duoCAR-T apresentam melhor perfil de sobrevivência a longo termo o que permite concluir que constituem um modelo celular próprio para tratamentos a longo prazo.

6. Conclusão e perspectivas futuras

A aplicação de células CAR-T no tratamento de doentes infetados com HIV apresenta excelentes resultados em termos de eficácia, segurança e especificidade comparativamente às alternativas terapêuticas atualmente utilizadas, o que as torna num modelo bastante promissor.

Uma das limitações mais frequentes, e atuais, no combate a este vírus é a sua capacidade inerente de acumular mutações. Apesar disso, as células CAR-T não são igualmente suscetíveis a este fenómeno uma vez que, para além de não existir desenvolvimento de resistências (como para fármacos antirretrovirais) por parte do vírus, a constante adaptação deste modelo celular permite uma enorme versatilidade a nível dos CARs utilizados que, conseqüentemente, ultrapassam o obstáculo criado por uma eventual mutação que induza a expressão de um novo antígeno de superfície.

Embora o sucesso terapêutico das células CAR-T possa ser comprometido a longo termo, a descoberta de novas moléculas aptas a ser utilizadas como recetores de superfície confere uma capacidade inerente de adaptação a esta tecnologia, característica que as restantes opções terapêuticas carecem.

Neste sentido, a descoberta de novas moléculas permitiu o desenvolvimento de novos modelos celulares, as células duoCAR-T, capazes de suprimir infeções com maior eficácia, sem comprometer características funcionais da célula e a segurança do doente. No entanto, a capacidade de evasão viral parece ser o único mecanismo através do qual os viriões tornam esta terapêutica improfícua, e como tal, insuficiente em regimes de tratamento único.

A combinação do tratamento com células CAR-T e TAR revelam ser a melhor opção terapêutica para o combate à infeção por HIV. Este regime terapêutico é capaz de suprimir a virémia e induzir a expressão do genoma viral nas células que constituem os reservatórios de latência, permitindo a ação conjunta de ambas as estratégias.

A utilização das células CAR-T apesar de extremamente promissora, necessita não só de maior aprofundamento científico, mas também de uma melhor gestão económica, uma vez que se trata de uma terapêutica muito dispendiosa para o utente. Com o aprofundamento da pesquisa é esperado que as relações custo-tempo alcancem um melhor equilíbrio, quer para os fornecedores de cuidados de saúde, quer para os doentes.

O futuro das células CAR-T é incerto, mas promissor, uma vez que estas células podem ser combinadas com uma diversidade de moléculas como: (i) inibidores de histona deacetilases, que induzem a expressão do genoma latente; ou (ii) ciclosporina A em conjugação com TAR, que bloqueia a ativação celular limitando deste modo o estabelecimento de um reservatório viral latente.

Além disso, a articulação da tecnologia CAR-T com técnicas de edição genómica, como por exemplo a técnica CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), surge como uma possível combinação terapêutica, no entanto, a sua incorporação nos atuais esquemas terapêuticos encontra-se dependente de futura investigação.

7. Bibliografia

1. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5–14.
2. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet* [Internet]. 2010;376(9734):49–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60676-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60676-9)
3. Chen B. HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure. *Biochemistry*. 2016;55(18):2539–52.
4. Rossi E, Meuser ME, Cunanan CJ, Cocklin S. Structure, function, and interactions of the hiv-1 capsid protein. *Life*. 2021;11(2):1–25.
5. Seissler T, Marquet R, Paillart JC. Hijacking of the ubiquitin/proteasome pathway by the hiv auxiliary proteins. *Viruses*. 2017;9(11):1–21.
6. Ferguson MR, Rojo DR, Von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med*. 2002;22(3):611–35.
7. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015;13(8):484–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3490>
8. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10):1–22.
9. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(3):153–60.
10. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, et al. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids*. 1997;11(4):493–8.
11. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001;26(1–6):13–33.
12. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Van Damme J, Mantovani A. Chemokine receptors: interaction with HIV-1 and viral-encoded chemokines. *Pharm Acta Helv*. 2000;74(2–3):305–12.
13. Khan, James O., Walker BD. Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. 1998;339:33.
14. Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol*. 1997;62(1):20–9.
15. Li C, Burdick RC, Nagashima K, Hu WS, Pathak VK. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(10).
16. Patton LL. HIV disease. *Dent Clin North Am*. 2003;47(3):467–92.
17. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:223–48.
18. Burgener A, McGowan I, Klatt NR. HIV and mucosal barrier interactions: Consequences for transmission and pathogenesis. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2015;36:22–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.004>
19. Tugizov S. Human immunodeficiency virus-associated disruption of mucosal barriers and its role in HIV transmission and pathogenesis of HIV/AIDS disease. *Tissue Barriers* [Internet]. 2016;4(3):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21688370.2016.1159276>
20. Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E. Understanding HIV latency: The road to an HIV cure. *Annu Rev Med*. 2015;66:407–21.

21. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*. 1997. p. 188–91.
22. Qi J, Ding C, Jiang X, Gao Y. Advances in Developing CAR T-Cell Therapy for HIV Cure. *Front Immunol*. 2020;11(March):1–13.
23. Hoenigl M, Green N, Camacho M, Gianella S, Mehta SR, Smith DM, et al. Signs or symptoms of acute HIV infection in a cohort undergoing community-based screening. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(3):532–4.
24. Korb R, Richman D, Bierer B, Krzyzstof G, Gryglewski R. Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N Engl J Med*. 1993;29(328 (17)):1230–5.
25. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. 1996;124(7):654–63.
26. Bowen LN, Smith B, Reich D, Quezada M, Nath A. HIV-associated opportunistic CNS infections: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2016;12(11):662–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.149>
27. Brooks JT, Kaplan JE, Holmes KK, Benson C, Pau A, Masur H. HIV-associated opportunistic infections - Going, going, but not gone: The continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):609–11.
28. Vergis EN, Mellors W, Syndrome C. NATURAL HISTORY OF HIV-1 INFECTION. 2000;14(4):809–26.
29. Poorolajal J, Hooshmand E, Mahjub H, Esmailnasab N, Jenabi E. Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. *Public Health* [Internet]. 2016;139:3–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2016.05.004>
30. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(4):311–7.
31. Lay MDH, Petravic J, Gordon SN, Engram J, Silvestri G, Davenport MP. Is the Gut the Major Source of Virus in Early Simian Immunodeficiency Virus Infection? *J Virol*. 2009;83(15):7517–23.
32. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993;362(6418):355–8.
33. Iyidogan P, Anderson KS. Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses*. 2014;6(10):4095–139.
34. Yazdanpanah Y, Schwarzingler M. Generic antiretroviral drugs and HIV care: An economic review. *Med Mal Infect* [Internet]. 2016;46(2):67–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2016.01.003>
35. EACS. European guidelines for clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe. *Fam Court Rev*. 2020;58(4):867–9.
36. Johnson SC. Antiretroviral Therapy for HIV Infection: When to Initiate Therapy, Which Regimen to Use, and How to Monitor Patients on Therapy. 2016;23(5).
37. Lundgren, Jens D; Babiker, Abdel G; Gordin F et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *New Engl J Med*. 2015;2(9):1–13.
38. Ghosh RK, Ghosh SM, Chawla S. Recent advances in antiretroviral drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(1):31–46.
39. Atta MG, De Seigneux S, Lucas GM. Clinical pharmacology in HIV therapy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(3):435–44.

40. Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: Current drugs. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2014;28(3):371–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2014.06.001>
41. Ganepola S, Müßig A, Allers K, Ph D, Schneider T, Hofmann J, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New Engl J Med* [Internet]. 2009;360(7):692–7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0802905>
42. Hawkins CA, Chaplin B, Idoko J, Ekong E, Adewole I, Gashau W, et al. Clinical and genotypic findings in HIV-infected patients with the k65r mutation failing first-line antiretroviral therapy in Nigeria. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;52(2):228–34.
43. Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol* [Internet]. 2020;21(3):e168–78. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30823-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30823-X)
44. Mohanty R, Chowdhury CR, Arega S, Sen P, Ganguly P, Ganguly N. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep*. 2019;42(6):2183–95.
45. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol*. 2019;94(S1):S3–9.
46. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J* [Internet]. 2021;11(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
47. Kuhlmann AS, Peterson CW, Kiem HP. Chimeric antigen receptor T-cell approaches to HIV cure. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018;13(5):446–53.
48. Maldini CR, Ellis GI, Riley JL. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018;18(10):605–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0042-2>
49. Solomon DA, Sax PE. Current state and limitations of daily oral therapy for treatment. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;10(4):219–25.
50. Borrow P, Hahn BH, Johnson VA, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Publ Gr*. 1997;4:303–8.
51. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(9):566–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.97>
52. Van Der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015;14(7):499–509. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4597>
53. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Rep*. 2014;47(3):122–9.
54. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(6):581–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3838>
55. Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, Krenciute G, Dakhova O, Zheng Y, et al. Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep* [Internet]. 2017;21(1):17–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>

56. Leibman RS, Richardson MW, Ellebrecht CT, Maldini CR, Glover JA, Secreto AJ, et al. Supraphysiologic control over HIV-1 replication mediated by CD8 T cells expressing a re-engineered CD4-based chimeric antigen receptor. *PLoS Pathog*. 2017;13(10):1–30.
57. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* [Internet]. 2016;44(2):380–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>
58. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry R V, Rathmell JC, Plas DR, et al. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity*. 2002;16:769–77.
59. Malika H, Mesojednik T, Romano Ibarra GS, Sahni J, Bernard A, Sommer K, et al. Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther* [Internet]. 2017;25(3):570–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.023>
60. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509–18.
61. Thompson KA, Cherry CL, Bell JE, McLean CA. Brain cell reservoirs of latent virus in presymptomatic HIV-infected individuals. *Am J Pathol* [Internet]. 2011;179(4):1623–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.039>
62. Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT, et al. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 ζ gene-modified autologous CD4+ and CD8+ T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood*. 2000;96(3):785–93.
63. Ghanem MH, Bolivar-Wagers S, Dey B, Hajduczki A, Vargas-Inchaustegui DA, Danielson DT, et al. Bispecific chimeric antigen receptors targeting the CD4 binding site and high-mannose Glycans of gp120 optimized for anti–human immunodeficiency virus potency and breadth with minimal immunogenicity. *Cytotherapy* [Internet]. 2018;20(3):407–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.11.001>
64. Leibman RS, Riley JL. Engineering T cells to functionally cure HIV-1 infection. *Mol Ther* [Internet]. 2015;23(7):1149–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.70>
65. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):808–16.
66. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV . *N Engl J Med*. 2014;370(10):901–10.
67. Sather BD, Ibarra GSR, Sommer K, Curinga G, Hale M, Khan IF, et al. Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(307):1–29.
68. Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang HC, et al. Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity* [Internet]. 2012;36(3):491–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.014>
69. Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon A, et al. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: A phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV*. 2014;1(1):e13–21.

70. Søggaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* 2015;11(9):1–22.
71. Spivak AM, Andrade A, Eisele E, Hoh R, Bacchetti P, Bumpus NN, et al. A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2014;58(6):883–90.
72. Huang SH, Ren Y, Thomas AS, Chan D, Mueller S, Ward AR, et al. Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ t cells. *J Clin Invest.* 2018;128(2):876–89.
73. Bronnimann MP, Skinner PJ, Connick E. The B-cell follicle in HIV infection: Barrier to a cure. *Front Immunol.* 2018;9(JAN):1–13.
74. Reuter MA, Del Rio Estrada PM, Buggert M, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Nguyen S, et al. HIV-Specific CD8+ T Cells Exhibit Reduced and Differentially Regulated Cytolytic Activity in Lymphoid Tissue. *Cell Rep.* 2017;21(12):3458–70.
75. Ayala VI, Deleage C, Trivett MT, Jain S, Coren L V., Breed MW, et al. CXCR5-Dependent Entry of CD8 T Cells into Rhesus Macaque B-Cell Follicles Achieved through T-Cell Engineering. *J Virol.* 2017;91(11):1–17.
76. Maldini CR, Claiborne DT, Okawa K, Chen T, Dopkin DL, Shan X, et al. Dual CD4-based CAR T cells with distinct costimulatory domains mitigate HIV pathogenesis in vivo. *Nat Med [Internet].* 2020;26(11):1776–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-1039-5>
77. Anthony-Gonda K, Bardhi A, Ray A, Flerin N, Li M, Chen W, et al. Multispecific anti-HIV duoCAR-T cells display broad in vitro antiviral activity and potent in vivo elimination of HIV-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Transl Med.* 2019;11(504):1–17.