

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Mecanismos envolvidos na latência do HIV

Joana Raquel Lemos Santos

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

2017

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Mecanismos envolvidos na latência do HIV

Joana Raquel Lemos Santos

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à

Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Doutor José Miguel Azevedo Pereira

2017

Abstract

HIV-1 infection currently infects millions of people globally and is still one of the world's largest pandemic. Current antiretroviral therapy has improved the quality of life of people living with HIV-1 but these therapies do not target latent proviral HIV. The existence of these latently infected cells represents the major barrier to virus eradication. HIV-1 will persist integrated into the host cell genome without producing viral particles, but remain replication-competent. In this latent state the virus is able to escape the immune system and the effects of antiretroviral therapy. This review aims to present the main mechanisms involved in the establishment and maintenance of viral latency, the cellular and anatomical reservoirs where the virus persists, and the therapeutics under study for the elimination of these latently infected reservoirs.

Keywords: HIV; Latency; Persistence Mechanisms; Reactivation; Reservoirs; Therapy

Resumo

A infecção pelo HIV-1 infeta atualmente milhões de pessoas globalmente, sendo ainda uma das maiores pandemias mundiais. A terapia antirretroviral atual permite aos indivíduos infectados uma qualidade de vida considerável, mas tem de ser mantida ao longo de toda a vida do indivíduo. A existência de células latentemente infectadas é o maior obstáculo à erradicação deste vírus. O HIV-1 vai permanecer integrado no genoma da célula hospedeira, sem produção de partículas virais, mas mantendo a sua capacidade replicativa. Neste estado latente, o vírus consegue escapar ao sistema imunitário e aos efeitos da terapia antirretroviral. Esta monografia pretende apresentar os principais mecanismos envolvidos no estabelecimento e manutenção da latência viral, os reservatórios celulares e anatómicos onde o vírus persiste, e ainda as terapêuticas em estudo para a eliminação destes reservatórios latentemente infectados.

Palavras-chave: HIV; Latência; Mecanismos de persistência; Reativação; Reservatórios; Terapia

Abreviaturas

HIV: Human Immunodeficiency Virus

SIDA: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SIV: Simian Immunodeficiency vírus

WHO: World Health Organization

HAART: High Active Antirretroviral Therapy

LTR: Long Terminal Repeats

dN: Desoxinucleósidos

RT: Transcriptase Reversa

LBP-1: Ligand-binding protein 1

YY1: Ying Yang 1

TAR: Transactivation Responsive Region

RRE: Rev Response Element

Crm-1: Nuclear Export Factor Exportin 1

NNRTIs: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos dos Nucleosídeos

NRTIs: Inibidores da Transcriptase Reversa análogos dos Nucleosídeos

APOBEC3: Apolipoprotein B Editing Catalytic Polypeptide

MDMs: Monocyte-derived Macrophages

IN: Integrase viral

RNA Pol II: RNA Polimerase II

CRFs: Chromatin Reassembly Factors

HATs: Histonas Acetiltransferases

HDAC1: Histona Deacetilase 1

CycT1: Cyclin T1

CDK9: Cyclin-dependent kinase 9

NF-90: Nuclear factor 90

7SK snRNP: 7SK small nuclear ribonucleoprotein

7SK snRNA: 7SK small nuclear RNA

HEXIM1: Hexamethylene bisacetamide (HMBA)-inducible protein 1

siRNA: small interfering RNA

LSF: Late Simian vírus 40 transcription Factor

VPA: Valproic Acid

CBF-1: C-promoter binding factor-1

H3K9: Histona 3 na lisina 9

HMTs: Histone methyltransferases

LSD1: Lysine-specific Demethylase

CTIP2: COUP-TF Interacting Protein 2

IL-2: Interleucina 2

IL-7: Interleucina 7

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

VCCs: Virus-Containing Compartments

VSS: Sinapses Viroológicas

DCs: Células Dendríticas

iDCs: Células Dendríticas imaturas

Células T_{CM}: Central memory T-cells

Células T_{TM}: Transitional memory T-cells

LCs: Langerhans Cells

GALT: Gut-associated lymphoid tissue

SNC: Sistema Nervoso Central

HPCs: Hematopoietic Progenitor Cells

SAHA: Suberoylanilide hydroxamic acid

HMTis: Histone Methyltransferases inhibitors

DNMTis: DNA Methyltransferase inhibitors

HMBA: Hexamethylbisacetamide

Agradecimentos

Na realização da presente monografia, contei com o apoio de várias pessoas às quais estou imensamente grata. Correndo o risco de, injustamente, não mencionar alguém igualmente importante, quero apenas deixar aqui algumas palavras que de algum modo expressem os meus profundos agradecimentos.

Ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, orientador desta monografia, agradeço todo o apoio, disponibilidade e paciência demonstrados ao longo do desenvolvimento desta. Agradeço o saber científico que comigo partilhou, as opiniões e críticas, bem como todas as palavras de incentivo e a incansável colaboração no esclarecimento de dúvidas e resolução de problemas.

Aos meus colegas de faculdade, pelo enorme apoio ao longo do desenvolvimento desta monografia, mas principalmente pela marca que deixaram ao longo destes cinco anos.

À minha colega de quarto, por todos os dias me fazer sentir em casa.

Aos meus amigos, que direta ou indiretamente foram um grande apoio ao longo destes últimos meses. Um agradecimento especial a todos aquele que por várias vezes me disseram que eu era capaz e todos os que me fizeram rir quando não me apetecia assim tanto.

Ao Gonçalo, pela paciência e compreensão ao longo destes últimos anos. Um agradecimento muito especial por tudo.

O meu maior agradecimento à minha família, aos meus avós, tios e primos, pelos sorrisos e abraços, e pelo apoio incondicional que só estes me podiam dar. Um agradecimento particular ao meu irmão que sempre me fez sentir um exemplo a seguir. Por fim, quero aqui demonstrar a minha especial gratidão à minha mãe, por ter sido o melhor modelo de coragem, força e resiliência ao longo destes anos, e por nunca ter deixado de estar a meu lado ao longo de todo o meu percurso.

Índice

Abstract	I
Resumo	II
Abreviaturas	III
Agradecimentos	VII
Índice	IX
Índice de Figuras	XI
Objetivos	XIII
Materiais e Métodos	XIV
1 Introdução	1
2 Resultados:	3
2.1 Ciclo Replicativo	3
2.2 Fases da Infecção por HIV-1	6
2.3 Terapêutica antirretroviral e suas limitações	7
2.4 Mecanismos de latência:	10
2.4.1 Latência pré-integração	11
2.4.2 Local de integração e Interferência Transcricional	12
2.4.3 Fatores que regulam o início da transcrição	13
2.4.4 Fatores de Elongação	14
2.4.5 Remodelação da cromatina	15

2.4.6	Proliferação Celular.....	19
2.4.7	Atividade de Tat.....	20
2.4.8	MicroRNAs (miRNAs)	21
2.5	Tropismo celular do HIV	22
2.5.1	Linhagem macrófagos/ monócitos.....	22
2.5.2	Células T.....	24
2.5.3	Outros reservatórios celulares.....	25
2.6	Estratégias de eliminação dos reservatórios virais	29
2.6.1	Reversão da Latência.....	29
2.6.2	Terapias imunológicas.....	33
2.6.3	O caso do Paciente Berlim.....	33
3	Conclusão.....	34
	Referências Bibliográficas.....	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura do vírus	3
Figura 2- Genoma do HIV-1	4
Figura 3 – Ciclo Replicativo do HIV-1	5
Figura 4 – Níveis de linfócitos CD4 e cópias de RNA viral durante a infecção não tratada.....	6
Figura 5 – Níveis de linfócitos CD4 e RNA viral após início de HAART	10
Figura 6 – Esquema da interferência transcricional	13
Figura 7 – Esquema da Remodelção da Cromatina	16
Figura 8 – Mecanismos que envolvem a latência do HIV-1 e sua Reversão.....	21
Figura 9 – Reservatórios anatómicos do HIV	28
Figura 10 – Indução e eliminação das células latentes.....	32

Objetivos

O objetivo é a criação de uma monografia na qual se pretende rever os mecanismos que levam ao desenvolvimento e à manutenção da latência nas células infetadas pelo HIV-1, bem como os reservatórios celulares e anatómicos onde esta latência se verifica e ainda rever as alternativas terapêuticas que têm como objetivo a reversão deste estado latente.

Materiais e Métodos

A elaboração da presente monografia baseou-se na análise, interpretação e síntese de artigos científicos originais e de revisão, bem como a consulta de algumas páginas na *internet*.

Os artigos referidos foram obtidos a partir de plataformas eletrónicas como o PubMed e o Google Scholar, usando como principais palavras chaves: HIV; AIDS; latency; mechanisms.

Foram também utilizados artigos científicos encontrados nas referencias bibliográfica de artigos seleccionados da pesquisa anterior que foram considerados relevantes para o desenvolvimento desta monografia.

A pesquisa referida foi realizada no período de 22 de Fevereiro a 15 de Novembro de 2017.

1 Introdução

O HIV (Human Immunodeficiency Virus), foi isolado pela primeira vez em 1983 por investigadores franceses (1), e a sua relação com a SIDA (Síndrome de imunodeficiência adquirida) começou a ser estudada na mesma década (2–5). O HIV-1 é um retrovírus do género *Lentivirus* (6) que teve origem numa transmissão entre espécies do SIV (Simian Immunodeficiency virus) que naturalmente infecta primatas em África (7).

A SIDA leva ao desenvolvimento de uma infeção pelo HIV, que é caracterizada pela destruição do sistema imunitário e pelo aumento da ocorrência de infeções oportunistas (8). Esta é a consequência direta da contínua e elevada replicação do HIV-1 nos indivíduos infetados, levando à destruição e desregulação dos linfócitos T CD4 (9).

Segundo dados da WHO (World Health Organization), 36,7 milhões de pessoas estavam infetadas pelo HIV em 2015 e houve cerca de 2,1 milhões de novos infetados no mesmo ano, demonstrando o grande problema de saúde pública que este vírus representa (10). Nos últimos anos registou-se um aumento da prevalência de doentes com SIDA devido à diminuição da mortalidade e da incidência, consequência também da menor transmissão (11,12), no entanto a mortalidade associada a esta doença ainda é elevada nos países subdesenvolvidos, tendo sido registadas cerca de 1,1 milhões de mortes em 2015 (10).

Por volta do ano de 1996 foi desenvolvido um tratamento de maior eficácia para a infeção pelo HIV: HAART (high active antirretroviral therapy), esta terapia veio diminuir a mortalidade e morbilidade (13,14), bem como as infeções oportunistas mais relacionadas com a infeção por HIV (15), principalmente em doentes com baixas contagens celulares CD4 (16). Apesar do enorme sucesso de HAART em suprimir a replicação viral, permitindo aos doentes uma redução dos níveis virais plasmáticos para valores inferiores a 50 cópias/mL (12–18), esta terapia requer tratamento ao longo de toda a vida do indivíduo infetado, não permitindo o controlo total da replicação (24–27). Mesmo em doentes sujeitos a HAART durante vários

anos, foi detetado HIV-1 integrado com competência replicativa em células T (28–30), e assim que este tratamento é retirado ocorre um *rebound* viral (29,31).

O HIV remanescente durante HAART tem três origens possíveis: (i) ciclos contínuos de replicação viral, (ii) produção viral em santuários onde o tratamento antirretroviral não consegue atuar devidamente ou (iii) células latentemente infetadas que funcionam como reservatório viral (32–36). Estas são caracterizadas por possuírem o genoma proviral integrado no genoma celular mas sem produção ativa de vírus (37,38). A formação de células latentes, embora ocorra em todos os indivíduos infetados, é um processo pouco frequente (21,39), não se relacionando com a contagem de células T CD4+ atuais, com o RNA plasmático ou com o tratamento (40). No entanto, quanto menores são as contagens das células CD4+ iniciais maior será o reservatório de células latentes (41). Em doentes submetidos a HAART, com níveis plasmáticos virais controlados e suprimidos, foi detetada a presença de células T CD4+ latentemente infetadas pelo HIV com capacidade replicativa (23,34). Este reservatório celular tem uma longa semivida (42) e reflete uma população “arquivada” diversificada (25,43).

A latência viral nas células infetadas é atualmente o maior obstáculo na cura da infeção por HIV-1 (26,44–51), tendo sido extrapolado que demoraria pelo menos 60 anos de tratamento para a erradicação do vírus nos compartimentos com células latentes (52).

2 Resultados:

2.1 Ciclo Replicativo

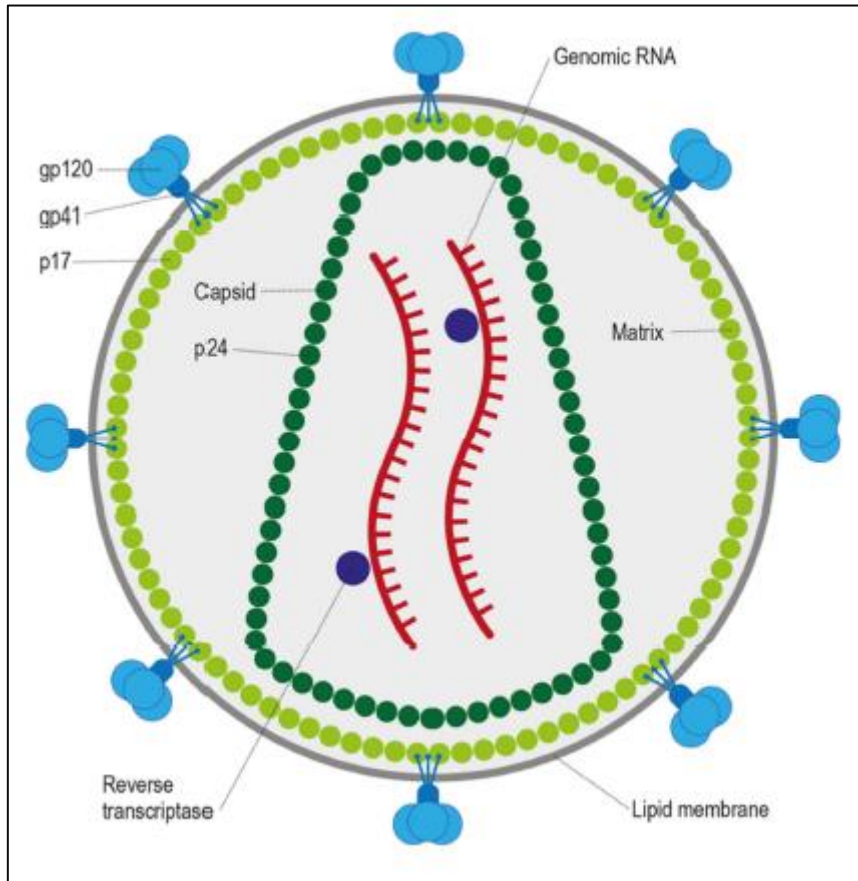


Figura 1 – Estrutura do vírus. O vírus tem um diâmetro aproximadamente de 90 – 120 nm e o seu invólucro deriva da membrana plasmática do hospedeiro. As glicoproteínas gp120/41 atravessam a membrana e ficam à superfície da partícula viral. A glicoproteína 41 (gp14) interage com a proteína da matriz p17. A proteína p24 é responsável pela forma da cápside, que contém duas cópias positivas de RNA (genoma do HIV-1), a proteína transcriptase reversa e outras proteínas hospedeiras importantes para o ciclo replicativo do vírus (retirado de (6))

O HIV-1 é um retrovírus do género *Lentivírus*, da família *Retroviridae*, e o seu genoma contém três genes de grandes dimensões: *gag*, *pol* e *env* que codificam as principais proteínas estruturais e enzimas necessárias para o ciclo replicativo (Figura 1 e Figura 2). O gene *gag* codifica as proteínas da cápside (53), o gene *pol* algumas das enzimas necessárias à replicação e o gene *env* a glicoproteína de superfície gp160. O genoma viral vai ainda codificar as proteínas Tat e Rev, responsáveis pela ativação da transcrição, *splicing* e exportação nuclear. Outros genes vão codificar proteínas acessórias como Vif, Vpr, Vpu e Nef (Figura 2).

O genoma viral começa e termina nos LTR (Long Terminal Repeats) que são necessários à transcrição, transcrição reversa e integração (6).

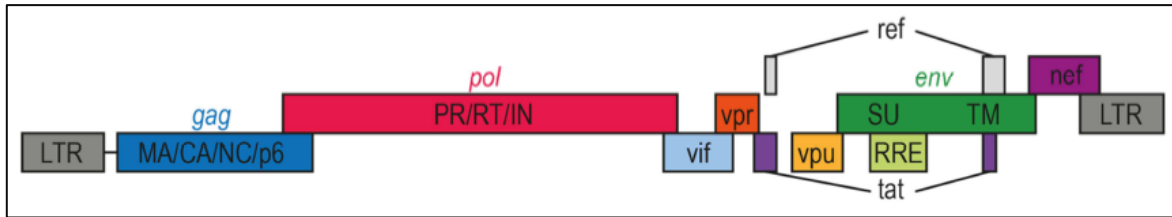


Figura 2- Genoma do HIV-1 (retirado de (6))

O HIV-1 usa como principal recetor a molécula CD4 e os coreceptores CCR5 e CXCR4, entre outros, o que modela o seu tropismo (54). O HIV-1 pode infectar vários tipos de células imunitárias, tendo os macrófagos e os linfócitos T CD4+ como principais alvos (55–57). Ao contrário das células T ativadas, as células T CD4+ quiescentes são resistentes à infeção pelo HIV. Estas caracterizam-se por estar na fase $G_{0/1a}$ e por resistirem à entrada viral, bem como à iniciação e continuação da transcrição reversa (58). No entanto, o HIV-1 demonstra ser capaz de infectar e integrar um número pequeno de células T em repouso na ausência de estímulos (59,60). A adição de dN (desoxinucleósidos) aumenta a integração em células T em repouso embora a cinética seja lenta em comparação com as células T ativadas (61). Dentro das células T em repouso, as de memória são mais suscetíveis à infeção que as naïve (62), em parte devido à maior resistência à fusão nas células naïve (60), no entanto estas últimas são produtivas *in vivo* (63).

O HIV-1 infecta as células T e os monócitos/ macrófagos através da interação da gp120 com o recetor CD4 e os coreceptores CXCR4 ou CCR5 (64,65). A fusão entre o invólucro do HIV e a membrana da célula hospedeira é um passo crítico na entrada viral (Figura 3).

Após a entrada na célula, o HIV usa a enzima RT (transcriptase reversa) para converter o seu RNA em DNA de dupla cadeia, que pode ser incorporado no genoma da célula hospedeira. Uma vez integrado, o DNA proviral vai ser replicado com o DNA celular durante a divisão celular normal da célula hospedeira (revisto em (6) e (66)) (Figura 3). Após entrada na célula,

o vírus pode induzir a apoptose nas células T em repouso ou ficar suscetível para degradação celular durante a transcrição reversa inicial (67). Esta integração no genoma humano não ocorre de modo aleatório, tendo preferência por regiões contendo genes ativamente expressos (47,68), como explicado mais à frente neste documento. LEDGF/p75 é um fator do hospedeiro que se liga à integrase viral favorecendo a frequência de integração do HIV-1 (69), na ausência deste a integração ocorre em menor número e com menor seletividade no local de integração.

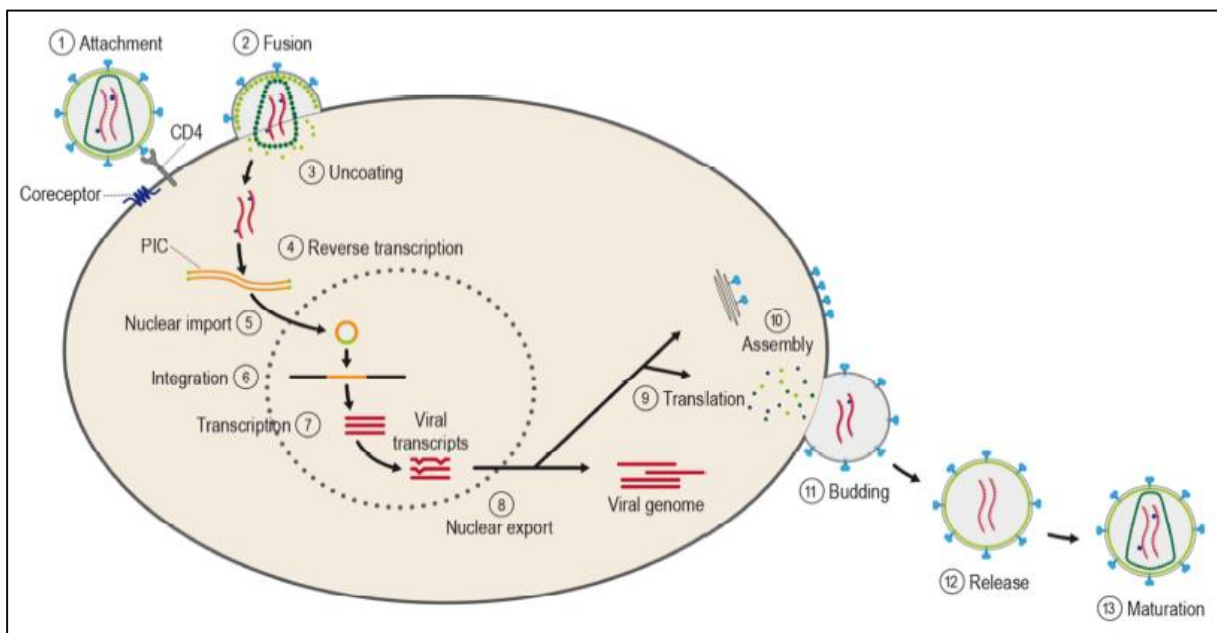


Figura 3 – Ciclo Replicativo do HIV-1. A infecção inicia-se com a ligação das glicoproteínas do involucro viral aos recetores CD4 e coreceptores presentes (passo 1), levando à fusão das membranas e entrada da partícula viral na célula (passo 2). Ocorre a descapsidação (passo 3) e permitindo a atividade da transcrição reversa (passo 4) que por sua vez vai permitir a formação do complexo de pré-integração (PIC). Ocorre então a importação para o núcleo da célula (passo 5) e integração do provírus (passo 6). A transcrição proviral (passo 7) leva a produção de RNAs mensageiros (mRNAs) e a sua posterior exportação (passo 8). Estes mRNAs servem de molde a produção de proteínas virais essenciais (passo 9), e o RNA genómico viral é incorporado em partículas virais (passo 10). Gemulação da partícula viral (passo 11) é seguido de libertação (passo 12) e finalmente maturação mediada por proteases (passo 13) (retirado de (6)).

O promotor viral LTR contém três regiões funcionais: (i) elemento de regulação negativo, (ii) região ativadora e (iii) região de promoção basal onde a transcrição se inicia (70). O promotor viral contém vários elementos necessários para a transcrição, como dois locais de ligação NF- κ B, três locais de ligação SP1, a TATA box e o local de ligação LBP-1/YY1 (Ligand-binding protein 1/Ying Yang 1) (70–72). Tat é uma proteína trans-ativadora do HIV que interage com

o LTR viral através de TAR (transactivation responsive region) (73). A presença de Tat permite o recrutamento do complexo de elongação p-TEFb. Assim que os elementos Tat, TAR e p-TEFb interagem, ocorre a hiperfosforilação de RNA Pol II e a transcrição inicia-se (66,70).

Após transcrição no núcleo é necessário a exportação dos RNAs de maiores dimensões (single-spliced e unspliced), que ocorre após associação de Rev (uma proteína viral essencial) ao RRE (Rev response element) por interação com a Crm-1 (nuclear export factor Exportin 1), levando à translocação do complexo Rev/RNA para o citoplasma onde é libertado por hidrólise (66). A morfogénese e gemulação das partículas virais parece ocorrer na membrana plasmática (74), associada a um processo proteolítico da proteína Gag (53).

2.2 Fases da Infecção por HIV-1

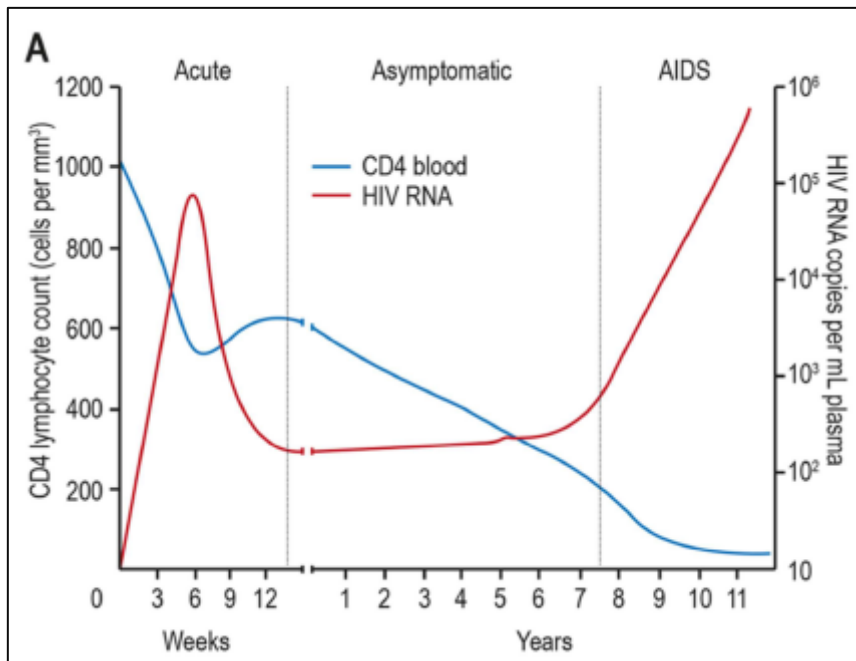


Figura 4 – Níveis de linfócitos CD4 e cópias de RNA viral durante a infecção não tratada. (retirado de (6))

A infecção pelo HIV-1 tem várias fases: fase aguda, fase assintomática e fase sintomática/ SIDA (Figura 4). O vírus replica-se ativamente durante todas estas fases (75). A infecção por HIV-1 vai modular os níveis de transcrição de vários genes celulares ao longo das diferentes

fases da infecção (76) (Figura 4), favorecendo a disseminação do vírus e a apoptose das células infectadas.

Na fase aguda (que dura até à 4ª semana) verificam-se níveis consideravelmente elevados de vírus em circulação e há já uma larga porção de células T CD4+ infectadas no sangue e nos nódulos linfáticos (Figura 4). O rápido aumento da replicação viral leva a indução de citocinas pró-inflamatórias (revisto em (6) e (67)).

Quando é atingido o pico da virémia, começam a aparecer respostas imunitárias humorais (anticorpos específicos para os antígenos virais) e respostas celulares (via células T CD8+) (revisto em (6)). Estes anticorpos exercem uma pressão seletiva que vai favorecer a sobrevivência dos mutantes não neutralizados, existindo uma grande variabilidade de resposta aos anticorpos que vão aparecendo como consequência da infecção viral (6,77). Estes aparecem dois meses após a infecção, no entanto o HIV-1 consegue escapar aos efeitos destes num curto espaço de tempo, quando o título destes anticorpos ainda é baixo (78).

A infecção crónica/ fase assintomática, tem início após a seroconversão e é caracterizada por um aumento gradual da virémia e por uma diminuição lenta dos níveis de células T CD4+, devido a níveis constantemente elevados de infecção das mesmas. O decaimento destas células acaba por desencadear uma situação de imunodeficiência e conseqüentemente começa o aparecimento de infeções oportunistas de microrganismos como *Pneumocystis jirovecii*, micobactérias, citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, entre outros. Na fase sintomática (Figura 4 - AIDS), verifica-se uma imunodeficiência grave da qual resulta a incapacidade do hospedeiro de controlar a infecção e proliferação de agentes infecciosos que acabam por levar à morte cerca de 95% dos doentes não tratados (revisto em (6)).

2.3 Terapêutica antirretroviral e suas limitações

A terapia antirretroviral combinada permitiu uma redução dos níveis virais plasmáticos para valores inferior a 50 cópias/mL (18–22,79), mas mesmo após anos de tratamento contínuo, é

detetado HIV-1 com competência replicativa, em células T e noutros reservatórios celulares (23,28–30,37,80). A terapia contínua com níveis virais inferiores a 50 cópias/mL vai impedir o aparecimento de estirpes resistentes (19,21,81–84), permitindo um tratamento prolongado sem risco de elevadas resistências virais.

Os fármacos antirretrovirais são agrupados nas seguintes classes: (i) NNRTIs (inibidores da transcriptase reversa não-análogos dos nucleosídeos), (ii) NRTIs (inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos), (iii) inibidores da protease, (iv) inibidores de fusão, (v) inibidores de entrada e (vi) inibidores da integrase. Em doentes não sujeitos anteriormente a terapias antirretroviral, o regime terapêutico é atualmente baseado em dois NRTIs e um inibidor da protease, um (NNRTIs) ou um inibidor da integrase (revisto em (6)).

O aparecimento de células com provírus latentemente integrados ocorre numa fase precoce da infeção (85,86), portanto quanto mais cedo for iniciada a terapêutica antirretroviral, menor será a dimensão do reservatório latente (9,14,86–96). Esta terapêutica deve ser iniciada preferencialmente durante a infeção primária/aguda, de modo a permitir uma limitada destruição do sistema imunológico e uma melhor recuperação imunológica ao nível das contagens de células T CD4+ pós-HAART (97–99), permitindo ainda a redução da transmissão (11,90,91,100). O início de HAART às 30 horas de idade num recém-nascido diagnosticado com HIV levou à ausência de deteção do vírus após paragem do tratamento antirretroviral aos 15 meses (101), no entanto este caso foi apenas temporário, tendo sido detetado HIV plasmático aos 3 anos (102).

Durante o tratamento, picos (“blips”) de virémia podem ocorrer. Trata-se de variações biológicas e aleatórias dos níveis de RNA viral (103), sendo que a duração destes “blips” é curta e de baixa magnitude, não sendo registadas estirpes resistentes antes, durante ou depois destes ocorrerem.

A origem da virémia durante HAART e após a sua suspensão é controversa. Alguns estudos defendem que o vírus *rebound* é semelhante ao vírus presente na fase de pré-tratamento (32), e por isso terá a sua origem nas células latentes que foram infetadas no início da infeção;

outros demonstraram que HIV em circulação durante HAART é geneticamente distinto do encontrado nas células T em repouso (104), defendendo outra origem para o vírus libertado. Outros, à semelhança dos primeiros, afirmam que o HIV plasmático presente durante HAART é na sua maioria *wild-type* e sensível aos antirretrovirais (21,81,82,105,106), sem haver seleção de mutantes resistentes aos fármacos ao longo dos anos de tratamento, sugerindo que a origem do HIV no plasma pode resultar da libertação intermitente de vírus das células latentes ou replicação em santuários. A não emergência de estirpes mutantes deve-se ao uso de HAART, que devido à potente supressão da replicação viral limita significativamente a evolução do HIV (32,84,99,107–109).

A intensificação de HAART (com uso de outros antirretrovirais ou doses mais elevadas) não parece diminuir o nível residual de HIV-1 em doentes com RNA viral inferior a 50 cópias/mL (95,110–112), o que é consistente com a hipótese de que os níveis de virémia residual têm outra origem para além da replicação ativa e contínua (95,113), não excluindo a hipótese de replicação noutros compartimentos onde a penetração dos antirretrovirais é inferior. A intensificação da terapêutica antirretroviral também não consegue diminuir o reservatório de células latente (114), demonstrando a incapacidade da terapêutica atual de atuar neste tipo de células.

A atual eficácia de HAART assegura a diminuição da replicação viral (113), permitindo um controlo prolongado da infeção (42), no entanto, o fenómeno de latência torna a infeção por HIV-1 incurável com recurso apenas a terapia antirretroviral atual (26,42,44–46,109,115,116), levando à investigação de terapêuticas capazes de atuar sobre estas células latentes.

DINÂMICA VIRAL DURANTE HAART

Os níveis de RNA e DNA viral, após uns meses de tratamento, chegam a um *plateau* sem diminuição significativa dos níveis virais (Figura 5), mantendo-se assim ao longo dos anos (20), definindo o nível viral residual dos doentes durante HAART, podendo ser previsto pelos nível de DNA viral na fase de pré-tratamento (18,117).

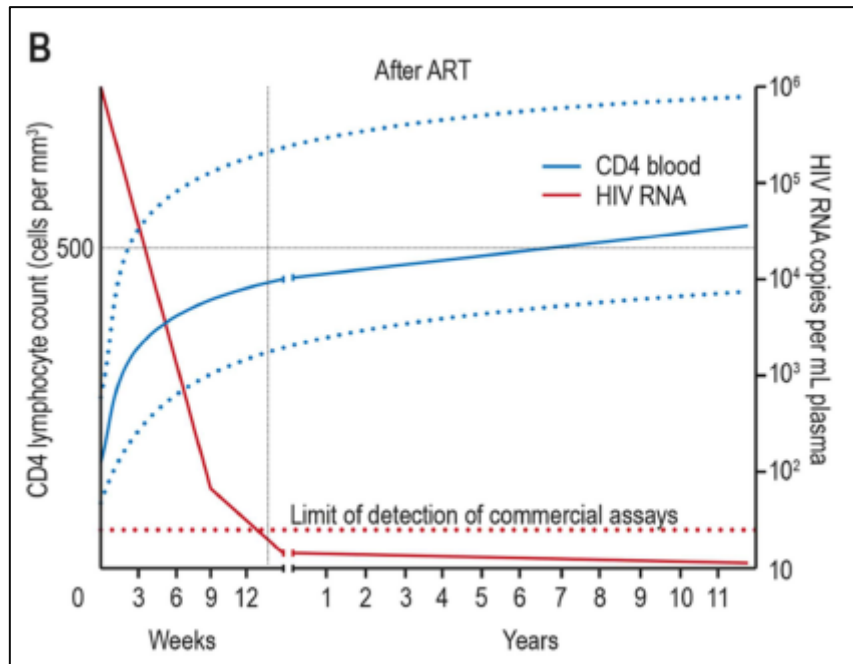


Figura 5 – Níveis de linfócitos CD4 e RNA viral após início de HAART. Há um declínio significativo da virêmia viral, seguido de uma recuperação das células CD4

Após início de HAART a virêmia decaí em quatro fases distintas (Figura 5): na primeira fase há um decaimento rápido dos vírus provenientes de um compartimento celular com curta semivida e em replicação ativa; na segunda fase há um decaimento menos acentuado dos vírus provenientes de células infectadas com maior semivida (24,117–121). O primeiro compartimento corresponde aos linfócitos T infectados e ativados (24), o segundo compartimento pensa-se ser constituído pelos macrófagos (24,119). A terceira fase coincide com o tempo de semivida das células T latentes e a quarta fase com uma grande estabilidade e sem decaimento significativo ao longo dos anos de tratamento (24,89). A persistência do HIV-1 apesar de anos de HAART é consistente com a hipótese da existência de um reservatório bastante estável que não diminui ao longo do tempo (42,105,122).

2.4 Mecanismos de latência:

A formação de células infectadas latentes ocorre em todos os indivíduos infectados mas a frequência deste fenómeno é baixa (21,39), tanto em células T (inferior a 0,05 % da população

total de T CD4+ em repouso) como em macrófagos (40). Os mecanismos que levam ao estabelecimento e manutenção da latência viral são múltiplos e dependem do tipo de célula em que a latência se estabelece (revisto em (36,38,44,57,123–128)) (Figura 8). O entendimento destes complexos mecanismos permite estudar e desenvolver terapias para a erradicação dos reservatórios latentes.

2.4.1 Latência pré-integração

Esta forma de latência é caracterizada por uma ineficaz integração do provírus ou incompleta transcrição reversa. Esta persistência de formas virais não integradas no genoma celular tem maior importância nos macrófagos devido ao seu maior tempo de vida (129,130). Nas células T a sua importância é muito reduzida devido à sua maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos do vírus (127,131).

Um dos fatores que contribui para a persistência de formas virais não integradas é a APOBEC3 (apolipoprotein B editing catalytic polypeptide), um fator de restrição da infeção por HIV-1, que leva a uma incompleta transcrição reversa (132–136), com acumulação de DNA com elevadas mutações no citoplasma. Esta atividade anti-HIV foi detetada em diferentes células infetadas pelo vírus (133,135,137). Estimulação com IFN- α vai aumentar os níveis de APOBEC3, diminuindo a probabilidade de uma infeção viral eficaz (137). Por outro lado, a proteína viral Vif altera estruturalmente a APOBEC3, regulando negativamente a sua integração em novas partículas virais (135).

O proteína viral Vpr é essencial para uma eficiente replicação viral em macrófagos visto atuar na translocação do complexo de pré-integração pelo núcleo poroso (138,139). A sua deleção leva a um aumento significativo do DNA viral não integrado.

A proteína SAMHD1 vai restringir a infeção pelo HIV em células T CD4+ quiescentes (140) e em MDMs (monocyte-derived macrophages) (141–144), por diminuição da *pool* intracelular de dNTP e bloqueando a transcrição reversa (145,146). Quando há mutações em SAMHD1, regista-se uma permissão intrínseca à infeção pelo HIV-1 (146). Vpx é uma proteína acessória

presente no HIV-2 que é responsável pela degradação de SAMHD1 (141,144), levando ao aumento da *pool* de dNTP (142,145,146). HIV-1 não tem o gene Vpx, logo o SAMHD1 vai restringir a formação do provírus (145,146). A adição de Vpx resulta no aumento da eficácia da infecção por HIV-1 em células T e MDMs em repouso por aumento da transcriptase reversa (142,146). Estes resultados demonstram que, apesar da eficaz transcrição reversa, o HIV é sensível a níveis baixos de dNTP nas células alvo (61,145). Os macrófagos por terem menores níveis de dNTP que as células T, são mais afetados por este fenómeno (147).

2.4.2 Local de integração e Interferência Transcricional

O local e a orientação da integração do provírus vão influenciar a sua transcrição. A proteína LEDGF/p75 interage com a IN (integrase viral) e leva ao aumento da sua atividade (148,149), influenciando também o local onde a integração ocorre (149–151). A interação destas proteínas é essencial para que integração viral ocorra e conseqüentemente a produção viral.

Como referido anteriormente, o DNA viral não sofre integração no genoma humano de modo aleatório, tendo preferência por regiões contendo genes ativamente expressos (47,68,152–157). Este fenómeno suporta a ideia de que a latência pode ser mantida por interferências transcricionais (158–160). Esta integração ocorre em ambas as orientações (152,161) e não impede a expressão de nenhum dos genes (hospedeiro e HIV-1), podendo qualquer um ser ativado e transcrito posteriormente (162).

Quando a integração viral ocorre na mesma orientação que o gene hospedeiro (Figura 6), pode ocorrer ativação do gene da célula a montante, resultando num fenómeno de *read through* do promotor viral e inibição da sua transcrição através da remoção dos fatores de transcrição do promotor do HIV-1 ou impedindo que o complexo de pré-iniciação se forme (152,161,163).

Quando o gene viral é integrado na orientação oposta (Figura 6), o promotor do hospedeiro e o promotor viral vão interferir diretamente (152,161), levando à colisão dos dois complexos RNA Pol II (RNA Polimerase II) durante a alongação. Os CRFs (chromatin reassembly factors)

são recrutados após a RNA polimerase II e vão regular esta interferência transcricional em genes ativamente expressos (162,163).

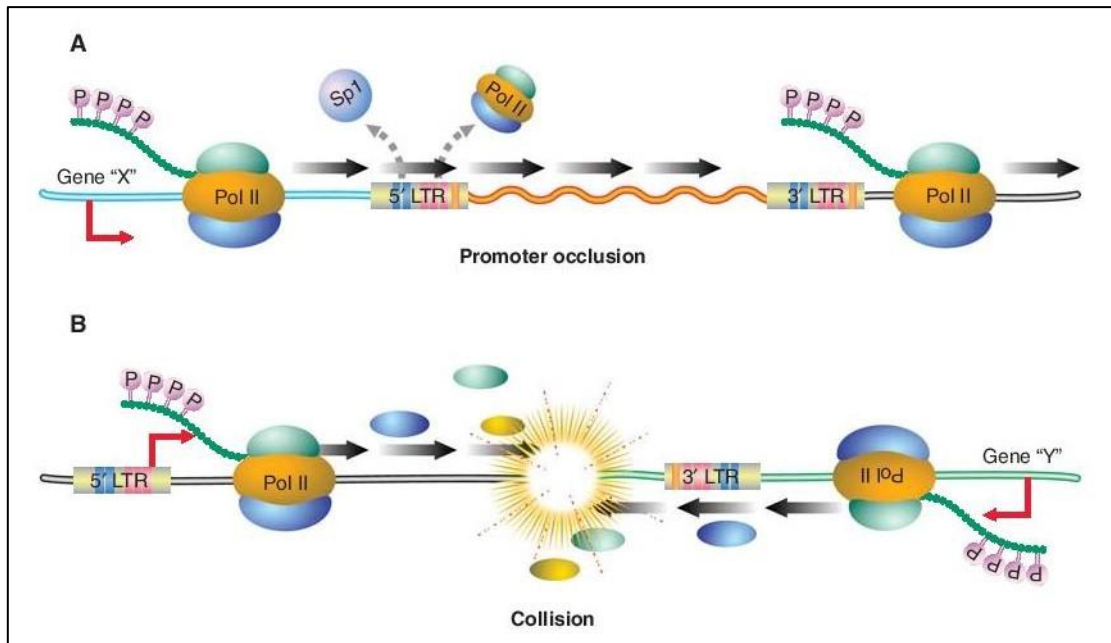


Figura 6 – Esquema da interferência transcricional. A interferência transcricional pode promover a latência viral de duas maneiras. Oclusão do promotor: provírus do HIV-1 é integrado na mesma polaridade que o gene a montante, inserindo-se num intrão deste gene. Ocorre read through pela RNA Pol II, com oclusão do LTR e remoção dos fatores de transcrição, promovendo a latência viral. Colisão: quando o provírus do HIV-1 e o gene celular estão em polaridades opostas, as polimerases vão colidir, levando à diminuição da expressão de ambas as unidades transcricionais (retirado de (44))

2.4.3 Fatores que regulam o início da transcrição

A transcrição do genoma viral está dependente da quantidade de NF- κ B disponível na célula para se ligar ao promotor e iniciar a transcrição (158,164,165). Nas células T em repouso o heterodímero p50/p65 (ou p50/RelA) encontra-se sequestrado no citoplasma através de interação com I κ B- α (71,166). Após ativação celular por Tat ou TNF- α , o I κ B- α degrada-se e dissocia-se do heterodímero de NF- κ B, permitindo a sua translocação para o κ B site I no núcleo, onde vai atuar na ativação da expressão genética do HIV-1 (164,166–168), por recrutamento de HATs (histonas acetiltransferases) como CBP e p300 (169).

Por outro lado, nas células em repouso é o homodímero p50/p50 repressor que se liga ao κ B site II (167), favorecendo o recrutamento de HDAC1 (Histona Deacetilase 1) (ver secção 2.4.5.1) (170), levando à deacetilação das caudas das histonas, resultando em mudanças na

cromatina e limitando o acesso de RNA Pol II (167,168,171). Após ativação, este homodímero é dissociado e o heterodímero vai promover o recrutamento de p300, levando à acetilação das histonas e à iniciação da transcrição do promotor viral. Vpr e Murr1 são fatores de restrição que vão inibir a atividade de NF- κ B, pela indução de I κ B (139,172).

Sp1 é um local de ligação no promotor viral que tem um papel importante na ativação e repressão dos genes virais, via recrutamento de fatores repressores ou ativadores do promotor, como o HDAC1 (167,169). Sp1 coopera com NF- κ B, Tat e P-TEFb para uma eficaz ativação e alongação da transcrição.

Os locais de ligação AP-1 são reguladores positivos da transcrição viral em macrófagos e linfócitos T (173,174). Mutações nestes locais levam a um menor recrutamento de RNA Pol II e, conseqüentemente, menor transcrição.

2.4.4 Fatores de Elongação

Nem todas as barreiras à transcrição estão relacionadas com o início desta, alguns fatores vão influenciar a alongação da transcrição viral (175). P-TEFb é um fator de alongação composto por CycT1 (Cyclin T1) e CDK9 (cyclin-dependent kinase 9) (176–179), e a sua ativação é crítica para a indução da transcrição e da alongação (128,165). Este encontra-se sequestrado no citoplasma em células em repouso (71), favorecendo a manutenção da latência. Após ativação, este é recrutado ao LTR pelo RelA, onde é responsável pela fosforilação da RNA Pol II, que é necessária para uma eficaz alongação da transcrição (73,164,166). Os níveis de cyclin T1 estão diminuídos em células T quiescentes e a sua regulação permite uma modelação da transcrição nestas células (178,180). A ativação celular vai diminuir a supressão de cyclin T1, levando a um aumento da sua expressão (181). Este fator é essencial para a atividade anti-apoptótica de NF- κ B (182). Após ativação com TNF- α , NF- κ B vai recrutar P-TEFb favorecendo a transcrição do provírus enquanto a atividade quinase do P-TEFb vai proteger a célula da apoptose (182).

O P-TEFb é regulado negativamente por 7SK snRNP e por NF-90 (nuclear factor 90) (180), NF-90 é uma proteína celular que vai bloquear a tradução do mRNA de CycT1. Quando em repouso, o P-TEFb encontra-se ligado ao complexo 7SK snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) (181). Este complexo contém o 7SK snRNA (small nuclear RNA) e o HEXIM1 (hexamethylene bisacetamide (HMBA)-inducible protein 1) (159). 7SK snRNA é onde se vai ligar HEXIM1 e P-TEFb, inibindo Cdk9 e inativando o complexo de alongação. Após ativação por Tat este é dissociado e mobilizado para o núcleo para a estimulação da transcrição viral. Tat parece competir diretamente com HEXIM1 pela ligação a Cyclin T1 (183). Na ausência de Tat, a alongação não é eficaz devido à associação de fatores como NELF e DSIF. Estes são fatores de alongação negativos que vão pausar o complexo da polimerase II, inibindo a alongação e a transcrição (184). Esta paragem na alongação ocorre antes da completa transcrição do elemento TAR. Na presença de Tat, há o recrutamento de P-TEFb, favorecendo a fosforilação de RNA Pol II com remoção de NELF e DSIF do complexo de alongação e permitindo a continuação da transcrição (179,184,185).

Brd4 é uma proteína da família BET que vai interagir com P-TEFb e reprimir a sua atividade de promoção da alongação viral (186). Brd4 compete com Tat durante a ativação da transcrição, interferindo com o recrutamento de P-TEFb (179,186).

2.4.5 Remodelação da cromatina

A eucromatina é menos compacta que a heterocromatina, logo é mais acessível aos fatores de transcrição, favorecendo maiores níveis de replicação viral. A remodelação desta é portanto essencial para uma transcrição eficaz de HIV-1 (36,57,70,126,159,181,187,188). Dois nucleossomas, nuc-0 e nuc-1, estão posicionados no promotor viral e podem alterar a acessibilidade dos fatores de transcrição/alongação ao mesmo (Figura 7). Um dos nucleossomas, nuc-1, encontra-se a jusante do local de iniciação e impede a atividade do LTR por bloqueio da iniciação de RNA Pol II (170,187,189). O posicionamento deste é crítico para a manutenção da latência viral e é modelado pela atividade de Tat (ver na secção 2.4.7). A

remodelação de nuc-1 ocorre rapidamente após ativação celular mas não é suficiente para a completa ativação da transcrição (190).

A transcrição dos provirus é reprimida pela presença de HDACs, histonas deacetiladas, histonas metiladas e DNA metilado (126,188).

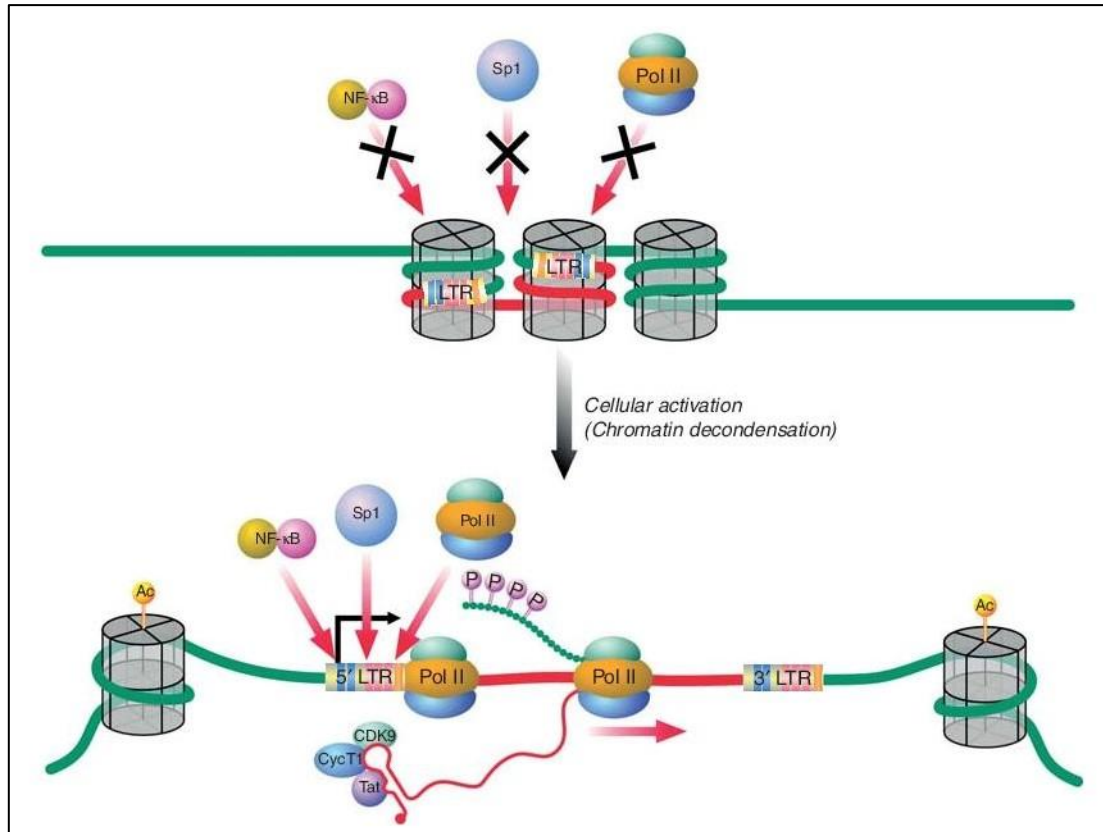


Figura 7 – Esquema da Remodelação da Cromatina. A compactação da cromatina na zona onde o provírus HIV-1 integrado vai restringir o acesso dos fatores de transcrição ao LTR. Este estado compactado da cromatina é reversível quando as células são ativadas. Esta ativação permite o acesso aos fatores de transcrição e uma efetiva elongação da RNA Pol II, levando a uma elevada produção viral quando Tat é produzida (retirado de (44))

2.4.5.1 Modificações nas Histonas

Alterações nas histonas (acetilação, metilação, fosforilação, entre outros) vão influenciar a integração e expressão genética (150,159,188,191). A hiperacetilação das histonas por HATs resulta numa cromatina acessível e favorecendo a ativação da transcrição. Pelo contrário, a remoção dos grupos acetil via HDACs resulta na repressão da transcrição (70). HDACs são responsáveis pela modelação da conformação das histonas, interferindo com a transcrição genética. HDAC1, HDAC2 e HDAC3 são expressas nos linfócitos T CD4+ latentemente

infetados e são recrutados para o promotor viral (192). A inibição destes por siRNA (small interfering RNA) leva a um aumento da expressão dos genes virais por reativação do LTR. Estes dados sugerem a utilização de inibidores de HDACs, como TSA, como meio para ativação das células latentemente infetadas (192), levando a alterações estruturais na cromatina, favorecendo a iniciação da transcrição do HIV (164,170,171).

Estes HDACs não conseguem ligar-se diretamente ao provirus mas são recrutados ao LTR por complexos co-repressores como NF- κ B (homodímero repressor), LSF1, Sp1, YY1 e c-Myc (127).

O LSF (late simian vírus 40 transcription factor) é necessário e limitativo para o recrutamento de YY1 ao LTR, formando o complexo YY1-LSF. O LSF é então responsável pelo recrutamento de HDAC1 e consequentemente por regular a expressão genética (193,194). O recrutamento de HDACs vai levar à acetilação do nucleossoma, permitindo a remodelação da cromatina e inibindo a expressão genética (193). A presença de Tat leva ao recrutamento do complexo SWI/SNF (ver na secção 2.4.7), restringindo a expressão de YY1 (193). Em células latentemente infetadas o YY1 encontra-se ligado ao LTR (194), estando ausente quando ativadas.

c-Myc é um fator de transcrição celular que é recrutado ao LTR viral pelo Sp1. c-Myc vai recrutar HDAC1 e diminuir a expressão do promotor viral (195). A utilização de inibidores de HDACs como o VPA (valproic acid) leva a quebra de ligações entre c-Myc e o promotor viral, ocorrendo a indução da transcrição (195).

CBF-1 (C-promoter binding factor-1) é um fator celular específico das células T que se liga ao NF- κ B e consegue silenciar a transcrição de HIV-1 através do recrutamento de HDACs ao promotor viral, reduzindo o acesso de RNA Pol II e diminuindo a acetilação das histonas em nuc-1 (165,196). O bloqueio do CBF-1 endógeno por shRNA resulta numa reativação parcial dos provírus latentes com recrutamento da RNA Pol II ao promotor e acetilação das histonas (196).

Um exemplo de alteração de histonas é a metilação em H3K9 (histona 3 na lisina 9) que é mediada por Suv39H1 e G9a (197,198). Esta alteração vai levar ao recrutamento de HP1 γ , e consequentemente, à formação de heterocromatina e inibição da transcrição. G9a e Suv39H1 são HMTs (histone methyltransferases) responsáveis pela remodelação das histonas e latência viral (198). Durante a latência, o Suv39H1 e HP1 γ estão associados ao promotor e H3 está trimetilada em K9. A transativação com Tat é acompanhada de perda de Suv39H1 e HP1 γ , com recrutamento dos coativadores (197). Quando as células são tratadas com BIX01294 (um inibidor específico da G9a) ocorre uma diminuição da metilação em H3K9 com reativação da transcrição viral (198).

LSD1 (Lysine-specific demethylase) e CTIP2 (COUP-TF interacting protein 2) cooperam no silenciamento da transcrição do promotor viral (199). LSD1 é um fator de restrição da transcrição, que está envolvido no estabelecimento e manutenção da latência do HIV-1 em células microgliais, favorecendo a metilação da lisina das histonas (199). CTIP2 parece atuar como promotor da latência viral em células microgliais, recrutando fatores que vão favorecer a formação de heterocromatina no promotor viral e desfavorecer a apoptose (200). CTIP2 liga-se a 7SK snRNA do complexo repressor HEXIM1/7SK/P-TEFb, inibindo CDK9 de P-TEFb (201).

2.4.5.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA é importante na regulação epigenética, mas o seu papel na regulação da latência do HIV-1 é ainda controverso (159). Esta metilação do DNA ocorre principalmente em ilhas CpG (dinucleotídeos de citosina seguida de guanina) (70), onde foram detetados vários níveis de metilação (202–204). TNF- α é responsável por uma desmetilação parcial mas específica para as ilhas CpG, tendo um papel importante na ativação do promotor LTR do HIV-1 (203). Alguns estudos demonstram que o LTR do HIV-1 tem níveis baixos de metilação em CpG (47,204,205), mas que estes não sofriam alteração após reativação, sugerindo que não há correlação entre o estado de latência e o nível de metilação.

Apesar de alguns estudos defenderem a importância da metilação em CpG durante a latência (202,203), outros autores não detetaram metilação do DNA em células latentemente infetadas (158,190), pelo que a sua importância na regulação da latência no HIV-1 é questionável.

2.4.6 Proliferação Celular

A replicação viral ativa não parece ocorrer nas células onde persiste o HIV-1, sugerindo a proliferação celular como um mecanismo para a persistência das células latentes (206).

A estabilidade do reservatório de células T CD4⁺ de memória é naturalmente mantido pelo sistema imunitário por sobrevivência celular via proliferação homeostática e regulado por antigénios, permitindo ao provírus do HIV-1 persistir sem replicação viral ativa (revisto em (62)). A proliferação mediada por antigénios ocorre após estimulação dos recetores celulares por antigénios específicos que vão estimular a expansão, enquanto a proliferação homeostática ocorre por estimulação com IL-2 (interleucina 2) quando os níveis de linfócitos em circulação diminuem. Por sua vez, a citocina IL-7 vai induzir a proliferação homeostática e sobrevivência em células T CD4⁺ *in vitro*, assegurando a persistência do DNA viral integrado (206).

Um número considerável de células T CD4⁺ de memória, incluindo células com DNA viral integrado, são mantidas através da contínua proliferação celular e apoptose a baixos níveis durante HAART (206). A apoptose é mediada em parte por Vpr que é uma proteína viral importante para a replicação em células como macrófagos (64,139,207), onde é responsável pela transativação do promotor viral.

Vpr vai diminuir a síntese e secreção de β -quimiocinas em macrófagos e linfócitos. Esta modulação da resposta imunitária parece estar envolvida na *upregulation* da replicação viral nas células alvo (138,139). Vpr está presente nas fases precoces e tardias do ciclo replicativo e tem as seguintes funções: (i) promoção da replicação por translocação do complexo de pré-integração e (ii) modular a transcrição celular para aumentar a replicação viral (138).

NF- κ B e Nef está envolvido na resistência à apoptose induzida por TNF- α , resultando numa menor ativação crónica do sistema imunitário (129,208) e num maior tempo de semivida das células infetadas. Nef tem um papel central na proteção dos macrófagos contra a apoptose através de mecanismos diversificados (209–211).

2.4.7 Atividade de Tat

Tat é uma proteína transativadora do HIV-1 que tem atividade na iniciação e alongação da transcrição viral (179). A presença de Tat promove a transcrição em todas as células (64,70,128,170,190,212). Na ausência desta a transcrição é iniciada mas termina precocemente pois a alongação não é eficaz (73,170,171). A diminuição da atividade de Tat promove o estabelecimento da latência viral (188,213).

Como referido anteriormente, Tat interage com o promotor viral através de TAR, que está a jusante do local de iniciação, e vai levar ao recrutamento de P-TEFb e NF- κ B que se encontram retidos no citoplasma até esta ativação (73,185). Esta ativação depende de dois mecanismos (i) acetilação de histonas e acetilação de Tat mediada por p300/CBP e pCAF, ou (ii) interação com P-TEFb que leva à fosforilação de RNA Pol II com início da transcrição no promotor viral (73,179,187,197). O primeiro mecanismo baseia-se na complexação de Tat com CBP/p300 e p/CAF (197), favorecendo a acetilação das histonas H3 e H4, induzindo a ativação do LTR do provirus. A acetilação da Tat, referida anteriormente, vai recrutar o complexo SWI/SNF que é responsável pela remodelação da cromatina, especificamente a remodelação de nuc-1 (187,189,214,215). Desenvolvendo-se um ambiente permissivo à ligação dos fatores necessários à transcrição basal (70,187).

A administração da proteína Tat exógena ativa os provirus latentes em PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) (175), apontando para a possibilidade de administração sistémica de Tat como adjuvante de HAART para a eliminação do reservatório de células latentes

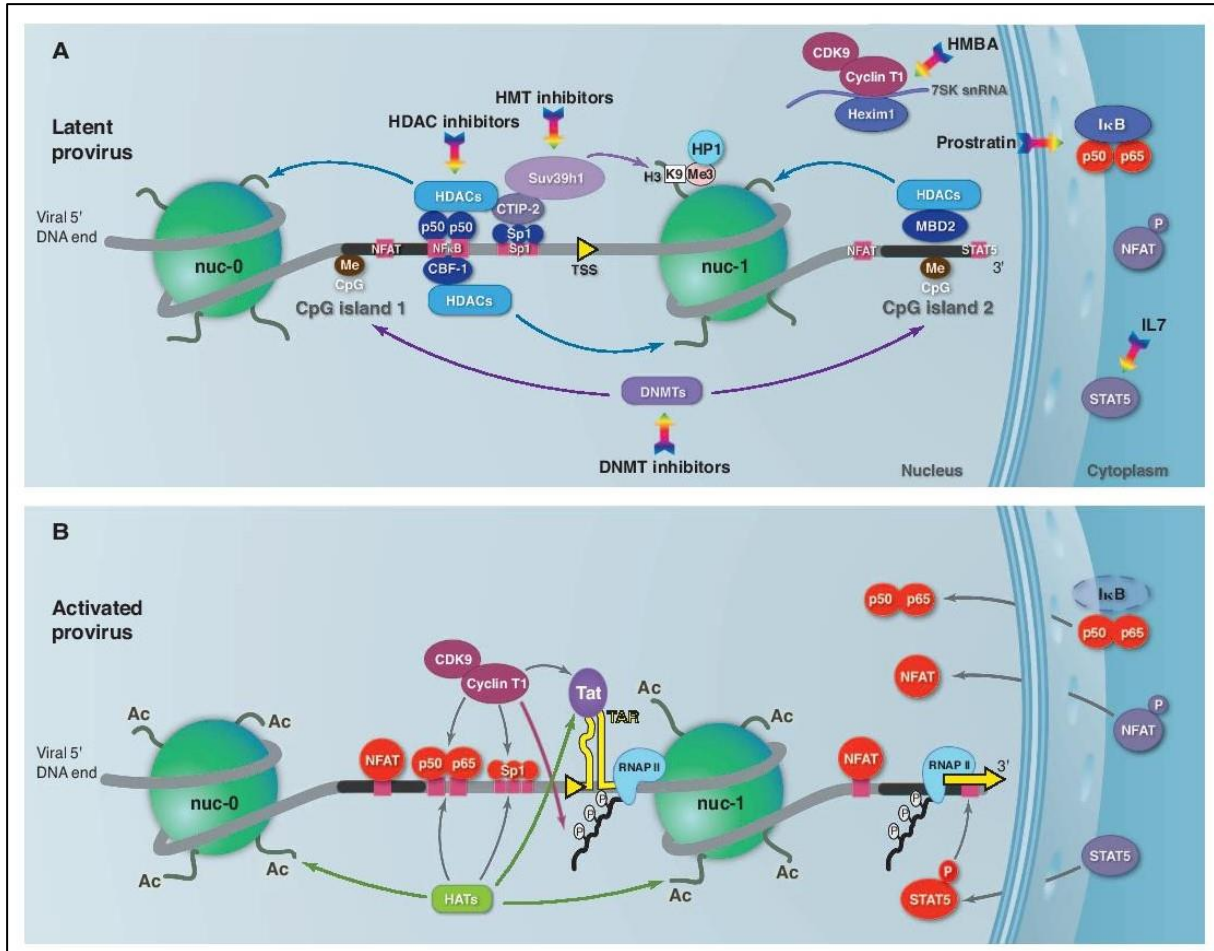


Figura 8 – Mecanismos que envolvem a latência do HIV-1 e sua reversão. O DNA viral terminal 5' está representado como uma fita cinzenta envolvida a volta dos nucleossomas *nuc-0* e *nuc-2*, com as ilhas CpG destacadas a preto; os locais de ligação dos fatores NFAT, NF-κB, Sp1 e STAT5 são ilustradas como caixas rosa; o local de início da transcrição (TSS – “transcriptional start site) como um triângulo amarelo. As setas cinzentas representam movimentos de proteínas; setas coloridas ligam as enzimas aos seus alvos; setas arco-íris apontam para potenciais intervenções farmacêuticas para a ativação da transcrição. **(A)** Em células em repouso HDACs e Suv39h1 são recrutados ao promotor pelo homodímero p50 e CBF-1 ligados aos locais de ligação de NF-κB e via ligação de Sp1 e CTIP-2 e via a proteína metilada de ligação ao DNA (MBD2). Deacetilação e metilação histônica em Nuc 0 e Nuc 1 nduzem um ambiente de heterocromatina. Metilação de duas ilhas CpG por metiltransferases do DNA (DNMTs) vai também reprimir a transcrição. O complexo cyclin T1/CDK9 contendo pTEFb é sequestrado pelo complexo Hexim1/75 RNA; a forma ativa de NF-κB (heterodímero p50-p65) é mantida no citoplasma por IκB e onde as formas não ativas de NFAT e STAT5 estão retidas também. **(B)** Em células ativadas, HATs e o complexo cyclin T1/CDK9 são recrutados ao pormotor viral por NF-κB p50-p65 e Sp1 ligados aos seus locais de ligação e pela ligação de Tat a TAR. A acetilação histônica ocorre perto dos nucleossomas, favorecendo uma estrutura da cromatina acessível; e a fosforilação do domínio C-terminal da RNAPII, que leva ao aumento a elongação da transcrição. A expressão genética é posteriormente estimulada pela ligação de NFAT e STAT5 fosforilado aos seus respectivos locais de ligação (retirado de (26))

2.4.8 MicroRNAs (miRNAs)

Micro-RNAs são RNAs de pequenas dimensões não-codificantes simples que vão funcionar como reguladores pós-transcrição (216,217). Estes podem ser produzidos pelo DNA do hospedeiro ou do vírus e vão regular a replicação viral (216–221), podendo ser responsáveis

pela degradação de Tat. A infecção pelo HIV-1 leva a alteração dos miRNAs produzidos pelas células. Alguns miRNAs parecem estar aumentados nas células em repouso em comparação com as células ativadas (216). No entanto a atividade destes microRNAs pode ser inibida por Tat (222).

O miRNA de TAR no HIV-1 causa resistência à apoptose e este efeito é dependente da expressão de Dicer (ribonuclease) (223,224). Estes miRNAs são capazes de regular negativamente a expressão genética da célula e alterar o fenótipo celular (223,224). O mecanismo de ação sugere que a transcrição basal de LTR do HIV-1 leva à produção de shRNA contendo TAR onde vai atuar a Dicer (223). Os efeitos na supressão da transcrição do provírus são dependentes de Dicer, uma vez que este vai permitir o processamento destes miRNAs (223,224).

miRNA hsa-miR29a é responsável pela *downregulation* da expressão da proteína Nef, interferindo com o ciclo replicativo (225). Durante a infecção por HIV ocorre a *downregulation* destes microRNA, resultando na *upregulation* de Nef que favorece a apoptose das células T CD4+ infetadas (226). Outros microRNAs reguladores da transcrição vão modular os níveis de cyclin T1 (referido na secção 2.4.4), estes vão depender da célula infetada e do seu estado de ativação (178,227).

2.5 Tropismo celular do HIV

2.5.1 Linhagem macrófagos/ monócitos

No geral as células desta linhagem celular têm as características necessárias para a entrada do vírus e têm um papel muito importante na infecção e propagação do HIV (revisto em (64,228–230)). Como referido anteriormente, são um dos principais alvos do vírus (55–57,129). Estas células não são tão suscetíveis à terapia antirretroviral como as células T (129,231,232), contribuindo para a sua persistência no organismo.

Os monócitos encontram-se em circulação e podem migrar para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos. A expressão do coreceptor CXCR4 está aumentada nestas células (233), sendo uma das características que faz destas células um importante reservatório do HIV-1 em doentes sujeitos a HAART (revisto em (234)), demonstrando replicação ativa e contínua, com registo de maior transcrição e evolução de HIV-1 nestas células do que nas células T em repouso (235–237). Este fenómeno deve-se em parte à maior resistência destas células aos efeitos citotóxicos do vírus, contribuindo para a persistência e disseminação deste (238). Os monócitos CD14⁺ são infetados pelo HIV-1 *in vivo* (236,239), podendo também atuar como fonte indireta do vírus, levando-o até aos tecidos onde se diferenciam em macrófagos tecidulares (235). Estas células, já infetadas pelo o HIV-1, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e diferenciar-se em macrófagos no tecido cerebral, contribuindo para a disseminação do HIV-1 neste santuário (129,240). Esta hipótese é chamada de “Cavalo de Tróia”. Os monócitos CD16⁺ são mais permissivos à infeção pelo HIV-1, por aumento da entrada do vírus e aumento da sua replicação (233), sendo uma das células que permite a persistência viral durante HAART, apesar de serem menos de 1% dos monócitos em circulação. O tempo de semivida dos monócitos no sangue é relativamente curto, o que sugere uma replicação ativa e contínua noutra compartimento que renova a *pool* de monócitos infetados pelo HIV-1 (235,236).

Os macrófagos derivam dos monócitos e são células importantes para a transmissão e desenvolvimento da infeção viral na fase aguda e crónica (241,242). Os vírus existem nos macrófagos em VCCs (virus-containing compartments), onde se vão acumulando partículas virais ao longo do tempo, contribuindo para a resistência dos macrófagos à infeção (242–246). A morfogénese e o armazenamento das partículas virais nos macrófagos tem lugar nestes compartimentos (246–248). Estas células por sua vez têm tempos de semivida longos e são resistentes aos efeitos citotóxicos do HIV-1 (129,229,231,232). Os macrófagos são capazes de transmitir, por contacto direto, a infeção às células T através de VSs (Sinapses Viroológicas) (242,243,249), sendo veículos importantes na disseminação viral. Existem três estados de

polarização em macrófagos (M1, M2 e dM) e cada um tem um papel diferente na infecção por HIV-1 (revisto em (250–252)). A polarização de macrófagos em M1 e M2 leva a uma significativa restrição da capacidade das células suportarem a infecção do HIV-1 R5 (252). M1 produz IL-1 β , IL-12, IL-23 e TNF- α , demonstrando maior supressão da transcrição, com bloqueio nas fases de pré-integração (252). M2 por sua vez vai produzir IL-10 e demonstra uma menor supressão mas mais sustentada, com bloqueio das fases mais tardias do ciclo replicativo do HIV (252).

As DCs (células dendríticas) têm múltiplos papéis na infecção e transmissão do HIV-1 (revisto em (229,234,253)), embora sejam resistentes à infecção por este vírus (254), contribuindo também para a disseminação viral no organismo através de sinapses infecciosas com as células T (229,253–255). O HIV-1 entra maioritariamente por endocitose nas DCs (256), pois os baixos níveis de CD4 e CCR5 não permitem uma fusão eficaz, no entanto, a entrada por endocitose não permite uma infecção produtiva. Apesar da captura eficaz do vírus em iDCs (Células Dendríticas imaturas) e sua quase imediata transmissão a outras células, a transcrição reversa só ocorre quando o vírus entra na célula por fusão (255,256). Quando a infecção produtiva é iniciada, mesmo a baixos níveis, a célula perde a capacidade de transferência de partículas virais a células alvo (255).

2.5.2 Células T

Como referido anteriormente, estas células são o principal alvo da infecção por HIV (55–57,63,229), pois expressam altos níveis de CD4+ que é um recetor primário para a ligação ao HIV-1 (revisto em (62)). O HIV-1 integra-se em linfócitos T em proliferação ativa (257), onde fica silenciosamente integrado sem produção de proteínas ou partículas virais. No entanto, nas células T CD4+ em repouso (naïve ou de memória) vai ter um papel importante na fase aguda da infecção, mantendo uma replicação elevada (63,258). Alguns autores sugerem que as células T são infetadas quando transitam do fenótipo ativo para o de repouso (116), permitindo a persistência viral durante anos até reativação. As células T naïve têm menor importância devido ao menor tempo de semivida.

Foram identificados dois tipos de reservatórios celulares dentro do grupo das células T CD4⁺: células T_{CM} (central memory T-cells) que constituem o maior reservatório nos doentes com níveis de carga viral suprimida por HAART; e células T_{TM} (transitional memory T-cells) que constituem o maior reservatório nos doentes com baixas contagens de linfócitos T CD4⁺ (206). O primeiro grupo de células tem uma multiplicação celular muito baixa, sobrevivendo durante anos, enquanto as células T_{TM} persistem por proliferação homeostática, assegurando a estabilidade deste reservatório em tamanho e em variação genética (62,206).

2.5.3 Outros reservatórios celulares

Apesar das células T CD4⁺ serem o reservatório celular mais estudado, outras células foram descritas como possíveis reservatórios virais (35,56,259,260) (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). Os reservatórios virais são células ou locais anatómicos infetados onde há persistência de formas virais com competência replicativa, integradas no genoma das células hospedeiras (37,62,261). Estes reservatórios parecem ser estabelecidos logo no início da infeção e permitem a persistência viral durante HAART. O HIV-1 usa estes reservatórios para escapar ao sistema imunitário e ao tratamento antirretroviral (revisto em (262,263)).

Deve ainda ser feita a distinção entre os santuários virais e os compartimentos. Os primeiros são locais com limitada penetração pelos fármacos antirretrovirais, permitindo uma replicação persistente. Os compartimentos são locais anatómicos onde o vírus está presente e tem uma limitada troca de partículas virais com o sangue periférico ao longo do tempo (37,45).

2.5.3.1 Trato Genital

Este local anatómico tem especial interesse visto o seu papel na transmissão sexual do HIV-1, onde as células dendríticas e os macrófagos são os principais alvos (253,259,264–266), embora o HIV-1 também seja capaz de infetar células T CD4⁺ e LCs (Langerhans Cells). Os níveis virais nos fluidos genitais diminuí significativamente com o início de HAART (17,267,268), o que coincide com a rápida diminuição da transmissão sexual. Esta supressão viral causada por HAART não é completa, logo a transmissão mantém-se possível (267,268).

2.5.3.2 GALT (gut-associated lymphoid tissue)

O GALT é o maior tecido linfático do corpo humano e neste estão a maioria das células T CD4+, o que faz deste um dos maiores reservatórios do HIV-1. Este tecido tem uma elevada importância na infecção viral (37,269), e neste ocorrem alterações patológicas logo aquando a infecção aguda (93,270), bem como uma depleção acentuada. Esta depleção mantém-se na infecção crónica devido à baixa reconstituição do sistema imunitário (270–273). Mesmo durante HAART foi detetado DNA viral nas células T CD4+ no GALT de indivíduos com níveis sanguíneos indetetáveis e a maioria tem uma significativa depleção de células T CD4+ (270,271,273,274). Por isso, o início de HAART durante a infecção aguda vai permitir uma melhor recuperação das células T CD4+ no sangue e em GALT (93,94,272,275). A reposição das células T neste reservatório é mais lenta que no sangue, devido a incompleta supressão da replicação viral, persistência da inflamação e ativação imunitária (93,271–274). A passagem das partículas virais entre os compartimentos sanguíneo e GALT durante tratamento antirretroviral leva a persistência do HIV em células T CD4+ no sangue (276,277). Apesar da incompleta supressão viral registada em HAART, não foi detetada evolução viral em indivíduos tratados, tanto no sangue periférico como em GALT (275,277,278).

Durante a infecção aguda, os macrófagos intestinais, ao contrário dos vaginais (259), têm baixa capacidade para suportar a replicação pelo HIV-1 (264,279), sendo a replicação inicial quase exclusiva em células T CD4. No entanto, os macrófagos residentes no GALT são um reservatório celular do HIV-1 (280).

2.5.3.3 SNC (Sistema Nervoso Central)

A passagem do HIV para o SNC é importante na persistência viral e é responsável por doenças nervosas associadas ao HIV (229,281–286). O vírus invade o cérebro logo na fase aguda da infecção e persiste durante o tempo de vida do indivíduo, qualificando este órgão como um compartimento e santuário do HIV-1 durante HAART (37,240,284,287–289). Os macrófagos e as células microgliais são os principais alvos do HIV-1 no cérebro e têm um papel muito importante no desenvolvimento de demência associada a esta infecção viral

(218,241,281,283,285,289,290), ainda frequentemente observada apesar de HAART. Os astrócitos são a célula mais abundante do SNC, no entanto o seu papel na infecção pelo HIV é ainda desconhecido devido à sua questionável capacidade de produção viral (283). Alguns fármacos não penetram o SNC tão eficazmente (286,291,292), não permitindo uma supressão total da replicação do HIV.

2.5.3.4 Trato Respiratório

HIV-1 é detetável e quantificável em macrófagos alveolares. A presença de HIV-1 nestas células foi relacionada com uma diminuída função imunológica dos pulmões e baixa capacidade de fagocitose (293,294), o que leva a um maior risco de infecções respiratórias, em particular as infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (6), apesar da eficácia de HAART neste órgão (295,296). Estes resultados são consistentes com a ideia de que os pulmões podem constituir um bom reservatório para o HIV-1. A existência de compartimentalização do DNA e RNA viral entre os macrófagos alveolares e o sangue é controversa (293,297).

2.5.3.5 Fígado

O HIV foi detetado em hepatócitos de doentes nas diferentes fases da infecção (298,299). Foi também detetada evidência genética de compartimentalização no fígado em relação ao HIV em circulação (298). Este fenómeno ocorre mesmo na ausência de coinfeção com HCV (vírus da hepatite C).

2.5.3.6 Rim

As células epiteliais do rins suportam infecção pelo HIV-1 (300), sugerindo que o rim é um potencial reservatório onde se verifica a transferência viral de células T para células epiteliais (300).

2.5.3.7 HPCs (Hematopoietic progenitor cells)

Células hematopoiéticas precursoras suportam infecção viral e podem ainda ser reservatórios do HIV, contribuindo para a persistência deste (301–303). A infecção por HIV leva a alterações

na produção destas células, bem como alterações ao nível migratório e ao nível da sua suscetibilidade (301).

2.5.3.8 Timo

Durante a infeção pelo HIV há timopoiese ativa, com uma menor extensão de produção de CD4+ e maior expressão de CD8+ (304), podendo causar danos no timo a longo prazo. Ocorre simultaneamente uma maior ativação e proliferação de células T, envolvendo os timócitos precoces e maduros (304). A depleção registada pode dever-se à apoptose e/ou destruição das células progenitoras por infeção direta.

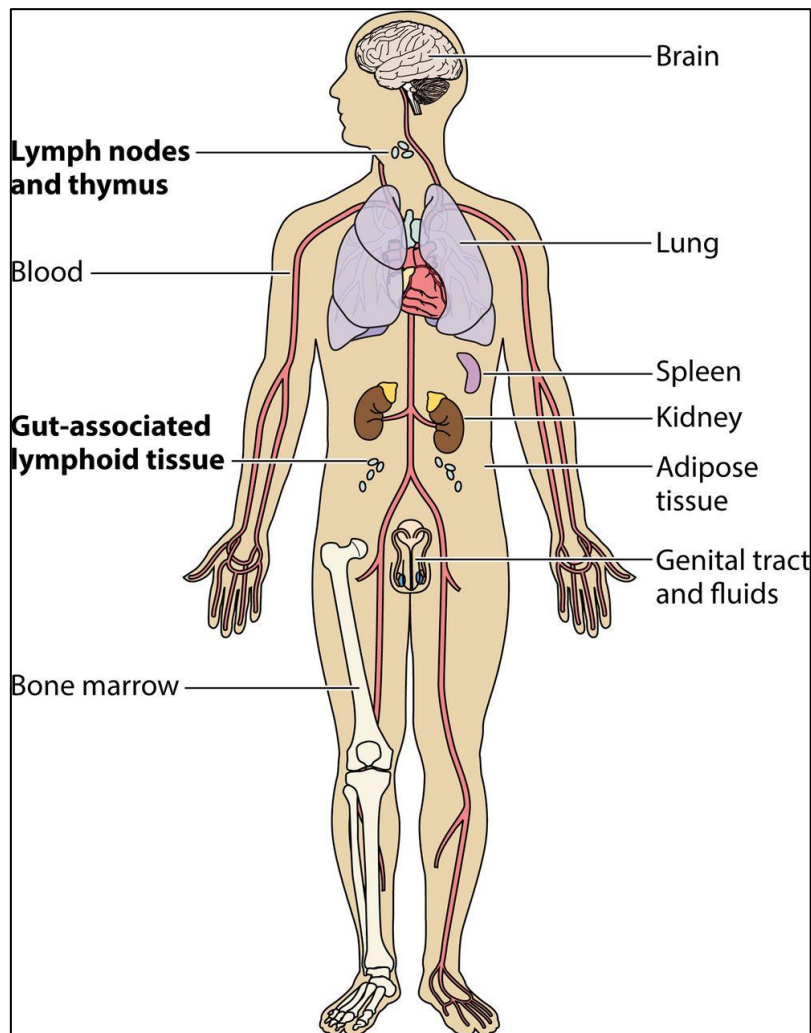


Figura 9 – Reservatórios anatómicos do HIV. (retirado de (305))

2.6 Estratégias de eliminação dos reservatórios virais

Foram definidas duas possíveis curas para a infeção pelo HIV-1: a cura esterilizante que pressupõe a total erradicação das partículas virais e a cura funcional que se baseia num controlo da replicação viral na ausência de HAART (27,37,50,306). Uma cura esterilizante parece estar longe, mas uma cura funcional, onde a resposta imunitária é capaz de eliminar as partículas virais após descontinuação de HAART, parece cada vez mais possível (92,125,306).

2.6.1 Reversão da Latência

O desenvolvimento de fármacos com capacidade de diminuir a formação e/ou persistência de provírus latentes nas células é um passo crítico na erradicação da infeção pelo HIV-1 (51,84,95,122,124,231,307,308). A atual estratégia “shock and kill” é caracterizada pela reativação dos provírus latentes (“shock”) e sua posterior eliminação através de respostas imunitárias específicas ou fármacos citotóxicos (“kill”) (38,71,96,127,306,309–311).

Como referido na secção 2.4, os mecanismos que mantêm a latência viral são complexos e diversificados, o que leva a necessidade de terapias de reativação complexas e combinadas (Figura 10), que permitam uma reativação mais completa dos reservatórios latentes (51,96,306,310,312), bem como a combinação destas com fármacos capazes de provocar a morte nas células infetadas (51,95,310,313–316).

O cérebro é um reservatório crítico quando se trata do desenvolvimento de terapias anti-latência. A reativação viral nas células cerebrais infetadas pode levar a encefalites (49,283,284). Podem ser necessárias terapias que mantenham este reservatório latente.

O fármaco ideal deverá ser administrado oralmente, não ser tóxico para outras células, económico, acessível, e, com especial relevância, não produzir imunoativação global e ser compatível com HAART (38,49–51,95,309,314,317).

2.6.1.1 Inibidores dos HDACs (HDACis)

Como referido na secção 2.4.5.1, os HDACs são críticos na remodelação da cromatina e promoção da latência viral. Consequentemente os inibidores de HDACs vão atuar na reativação da transcrição (95,96,192,307,311,318–320), embora necessitem de terapêuticas combinadas para atingir uma maior reativação celular e ainda a inclusão de fármacos capazes de eliminar as células reativadas. A utilização de inibidores de HDACs em conjunto com HAART parece uma estratégia prometedora (36). Muitos compostos foram identificados como HDACis: VPA (valproic acid), Vorinostat/SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), Givinostat e Panobinostat (321).

VPA é um fármaco aprovado como antiepilético. É um HDACi fraco e inespecífico e os seus resultados como promotor da reativação das células latentes são controversos (319,322–325), logo a sua utilização como fármaco anti latência é muito reduzida.

Vorinostat ou SAHA é um HDACi específico, aprovado no tratamento de linfoma cutâneo, que demonstra tolerância e eficácia na reativação da transcrição nas células latentemente infectadas (326–329), em doentes tratados eficazmente com HAART. O uso de HDACis mais seletivos, como SAHA, produz uma maior eficácia na reativação da transcrição viral (315).

Givinostat (ou ITF2357) tem uma eficácia superior aos HDACis anteriores e atua também na redução dos recetores e coreceptores do HIV, diminuindo a reinfeção e a disseminação viral (330,331). O HDACi em estudo com maior potencia é o Panobinostat (ou LBH-589) (331).

2.6.1.2 Inibidores da Metilação

Como referido na secção 2.4.5.1, a metilação das histonas leva a uma remodelação da cromatina e manutenção da latência viral. Logo, a inibição desta metilação, através de HMTis (Histone Methyltransferases inhibitors), leva ao aumento da transcrição do HIV (312). Este grupo de inibidores, quando combinado com HDACis, leva a uma elevada expressão viral (51,312,332,333). Os HMTis são constituídos pelos seguintes compostos: chaetocina, BIX-01294 e o HMTi de largo espectro DZNep. A metilação na histona 3 na lisina 9 é responsável

pela repressão da cromatina (333). Esta ação pode ser inibida por HMTis como chaetocina que vai reprimir a atividade de Suv39H1, reativando a transcrição viral (332). Quando as células são tratadas com BIX01294, um inibidor específico da G9a, ocorre uma diminuição da metilação em H3K9 com reativação da transcrição viral (198,312).

Apesar do papel controverso da metilação de DNA na manutenção da latência viral, a inibição desta através de DNMTis (DNA Methyltransferase inhibitors) parece ter algum efeito na reativação viral (202,333), principalmente em combinação com TNF- α e prostatina. Os dois DNMTis mais estudados são Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine, azaCdR) e o análogo Azacitidine (5-azacytidine). O TNF- α parece ter um papel na desmetilação parcial mas específica para as ilhas CpG, tendo um papel importante na ativação do promotor LTR do HIV-1 (203).

2.6.1.3 Ativadores da PkC (Proteína kinase C)

A PkC tem um papel importante na ativação de NFAT, NF- κ B e AP-1, logo a sua estimulação leva ao aumento da transcrição viral (334,335). Prostatina e briostatina são dois ativadores da PkC que vão reativar a transcrição viral via fosforilação de I κ B e ativação de NF- κ B (336–338). Estas moléculas vão ainda desregular a expressão dos recetores e coreceptores, inibindo a reinfeção e a disseminação viral após a reativação. Prostatina e Briostatina demonstraram capacidade de indução da transcrição celular (337,339–342), com baixa ativação global do sistema imunitário. A combinação destes ativadores da PkC com HDACis parece prometedora como estratégia combinada para a eliminação de reservatórios latentes (334,342,343).

2.6.1.4 Ativadores de P-TEFb

Como referido na secção 2.4.4, a restrição do fator de alongação P-TEFb contribui para a manutenção da latência. Logo, os compostos capazes de ativar este fator vão promover a reativação da transcrição. HMBA (Hexamethylbisacetamide) é um ativador de P-TEFb que estimula a transcrição do HIV-1 (344,345). O mecanismo pelo qual este atua é ainda controverso, mas relaciona-se com a libertação do fator de alongação do complexo repressor.

Dissulfiram é um fármaco aprovado no tratamento do alcoolismo que vai atuar na reativação das células latentes (346,347), sem causar ativação global de células T. O seu mecanismo de ação parece estar relacionado com a indução de P-TEFb.

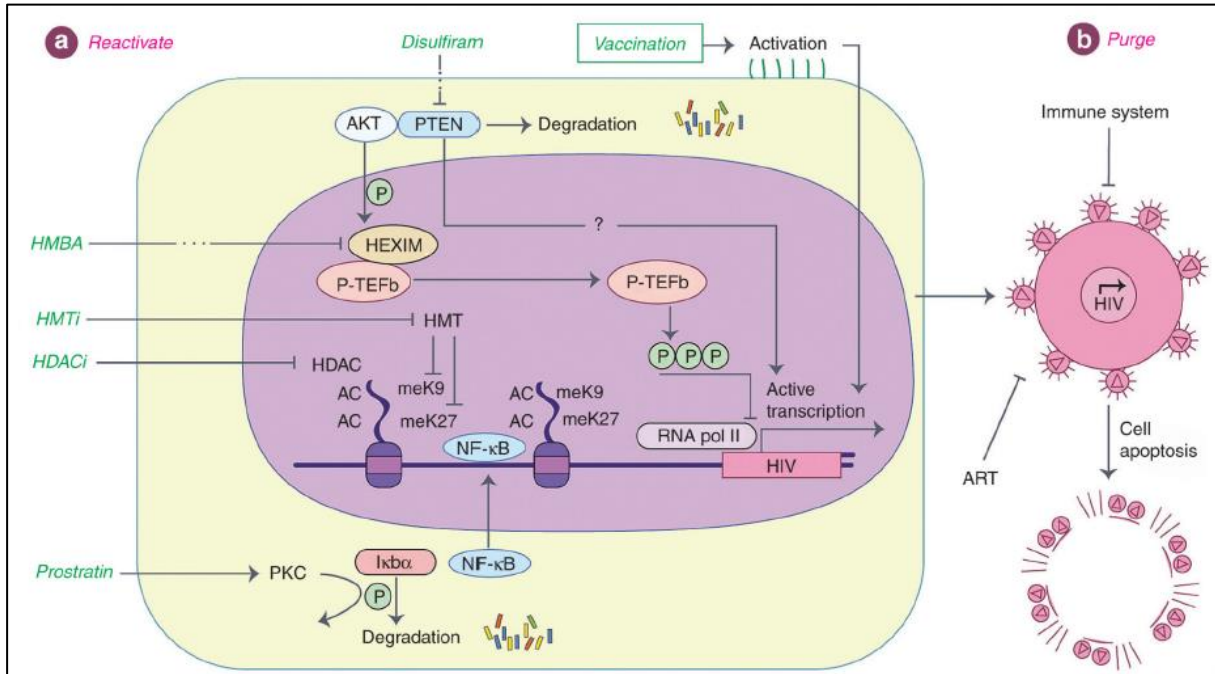


Figura 10 – Indução e eliminação das células latentes. (i) Indução – Várias moléculas são capazes de promover a reativação celular. A Prostatina e a Briostatina que são ativadores de PKC, atuando na fosforilação de IκB e posterior ativação de NF-κB. Os HDACis vão inibir diretamente os efeitos repressores dos HDACs. À semelhança dos anteriores, os HMTis vão inibir diretamente a metilação das histonas. O HMBA é responsável pela fosforilação de HEXIM1, resultando na libertação de P-TEFb. O mecanismo de ação do Dissulfiram é ainda controverso. (ii) Eliminação – Após a reativação das células latentemente infectadas, estas têm de ser eliminadas por sistema imunitário ou por HAART. (retirado de (309))

2.6.1.5 Outros

JQ1 é um agonista de Brd4 que leva ao aumento da expressão viral em células latentemente infectadas (348–351), através da dissociação de Brd4 do promotor viral, permitindo a ligação de Tat e a promoção da transcrição. Este inibidor pode ainda ser usado em conjunto com HDACs para uma maior reativação da transcrição viral.

2.6.2 Terapias imunológicas

Vários autores apoiam a estimulação da resposta imunitária específica ao HIV-1, possibilitando o controlo da transmissão e replicação viral em indivíduos tratados com HAART (38,50,92,96,308,352–354). Alguns autores referem a combinação de terapias de reativação com terapias imunológicas específicas para o controlo das células ativadas e sua posterior eliminação (49,50,96,311,317,320).

Neste contexto, refira-se a terapia com IL-2 e/ou anticorpos anti-CD3 (OKT3), a sequência da qual se verificou uma marcada ativação global das células T (355), com depleção destas células mas com elevada toxicidade.

Por outro lado, estudos demonstraram que a administração de IL-7 leva ao aumento da expressão genética (357–359). A IL-7 é essencial para a manutenção da proliferação homeostática nas células T e permite a indução da expressão do HIV nas células quiescentes sem ativação global das células T (356).

2.6.3 O caso do Paciente Berlim

O desenvolvimento de uma cura esterilizante seria o mais desejado, no entanto esta realidade parece estar longe. Foi registado apenas um caso de um doente curado com total erradicação do vírus (360–363). Este, conhecido como o paciente Berlim, estava infetado com o HIV e respondia bem à terapia com HAART. Quando desenvolveu leucemia mieloide aguda, foi escolhido um dador de medula óssea com uma mutação no gene *ccr5* (*CCR5Δ32*), que consiste numa deleção de 32 pares de bases. Os indivíduos com esta mutação são naturalmente resistentes à infeção pelo HIV-1. A HAART foi descontinuada no paciente Berlim para efetuar a transplantação, o que levou a uma carga viral indetetável até à data.

3 Conclusão

Apesar do enorme sucesso de HAART na supressão da replicação viral, a infecção pelo HIV-1 necessita de tratamento contínuo, durante toda a vida do indivíduo, sendo ainda associada a algumas comorbidades. Devido a esta eficácia na supressão da replicação viral, é importante que esta terapia antirretroviral seja começada o mais precocemente possível, reduzindo assim o número de células latentes formadas e diminuindo a depleção do sistema imunitário. O estudo dos mecanismos que levam ao estabelecimento e manutenção da latência viral é importantes para que possam desenvolver-se terapêuticas dirigidas a estes reservatórios virais, que envolvam a sua reativação e eliminação. O desenvolvimento de uma cura esterilizante para a infecção pelo HIV-1 parece estar longe, mas uma cura funcional parece um futuro cada vez mais perto. Podemos então concluir, em concordância com muitos estudos referidos ao longo da monografia, que a persistência viral em células latentemente infetadas é atualmente o maior obstáculo à erradicação do vírus do organismo. Logo, o desenvolvimento de terapias específicas para a eliminação deste reservatório latente são parte de um futuro próximo no desenvolvimento de uma cura funcional para a infecção pelo HIV-1.

Referências Bibliográficas

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W ML. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80-). 1983;220:868–871.
2. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 1984;224(4648):497–500.
3. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):500–3.
4. Schüpbach J, Popovic M, Gilden R V, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):503–5.
5. Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schüpbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*. 1984;224(4648):506–8.
6. Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell*. 2016;3(9):450–74.
7. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. 2011;1–22.
8. What is HIV/AIDS? [Internet]. Khan Academy. 2017 [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/what-is-hiv-aids/>
9. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Vol. 373, *Nature*. 1995. p. 123–6.

10. World Health Organization. WHO | World Health Organization [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [cited 2017 May 5]. Available from: <http://www.who.int/hiv/en/>
11. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014;384(9939):258–71.
12. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943–54.
13. Braitstein P, Brinkhof MWG, Dabis F, Schechter M, Boulle A, Miotti P, et al. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet*. 2006;367(9513):817–24.
14. Ray M, Logan R, Sterne JAC, Hernández-Díaz S, Robins JM, Sabin C, et al. The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals. *AIDS*. 2010 Jan 2;24(1):123–37.
15. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med*. 1998 Mar 26;338(13):853–60.
16. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, D'Arminio Monforte A, et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: An observational study. *Lancet*. 2003;362(9377):22–9.
17. Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Natkin J WJ et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA*. 1999;282:1627–32.
18. Goujard C, Girault I, Rouzioux C, Lécroux C, Deveau C, Chaix ML, et al. HIV-1 control after transient antiretroviral treatment initiated in primary infection: Role of patient characteristics and effect of therapy. *Antivir Ther*. 2012;17(6):1001–9.
19. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, et al. Treatment with Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine in Adults with Human Immunodeficiency

- Virus Infection and Prior Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 1997 Sep 11;337(11):734–9.
20. Maldarelli F, Palmer S, King MS, Wiegand A, Polis MA, Mican J, et al. ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog.* 2007;3(4):484–8.
 21. Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K, Cao Y, Binley JM, Talal A, et al. The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J Infect Dis.* 1999;179(3):527–37.
 22. Natarajan V, Bosche M, Metcalf JA, Ward DJ, Lane HC, Kovacs JA. HIV-1 replication in patients with undetectable plasma virus receiving HAART. *Lancet.* 1999;353(9147):119–20.
 23. Patterson BK, McCallister S, Schutz M, Siegel JN, Shults K, Flener Z, et al. Persistence of intracellular HIV-1 mRNA correlates with HIV-1-specific immune responses in infected subjects on stable HAART. *AIDS.* 2001;15(13):1635–41.
 24. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(10):3879–84.
 25. Siliciano JD, Siliciano RF. A long-term latent reservoir for HIV-1: Discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(1):6–9.
 26. Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, Verdin E, Barre-Sinoussi F, Chun T-W, et al. HIV Persistence and the Prospect of Long-Term Drug-Free Remissions for HIV-Infected Individuals. *Science (80-).* 2010;329(5988):174–80.
 27. Dieffenbach CW, Fauci AS. Thirty Years of HIV and AIDS: Future Challenges and Opportunities. *Ann Intern Med.* 2011;154(11):766–72.
 28. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, et al. HIV-

- infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3250–5.
29. Davey Jr. RT, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26):15109–14.
 30. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir D V, Ignacio CC, Spina C a, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 1997;278(5341):1291–5.
 31. Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med*. 2001 Feb 15;344(7):472–80.
 32. Joos B, Fischer M, Kuster H, Pillai SK, Wong JK, Böni J, et al. HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16725–30.
 33. Zhang L, Chung C, Hu BS, He T, Guo Y, Kim AJ, et al. Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest*. 2000;106(7):839–45.
 34. Chun T-W, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Nov 25;94(24):13193–7.
 35. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, et al. Residual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia in Some Patients on Antiretroviral Therapy Is Dominated by a Small Number of Invariant Clones Rarely Found in Circulating CD4+ T Cells. *J Virol*. 2006;80(13):6441–57.

36. Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*. 2006;3:7.
37. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*. 2012;37(3):377–88.
38. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology*. 2013;10(1):67.
39. Crooks AM, Bateson R, Cope AB, Dahl NP, Griggs MK, Kuruc JAD, et al. Precise quantitation of the latent HIV-1 reservoir: Implications for eradication strategies. *J Infect Dis*. 2015;212(9):1361–5.
40. Chun T-W, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997 May 8;387(6629):183–8.
41. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* (80-). 1996;272(5265):1167–70.
42. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003;9(6):727–8.
43. Noë A, Plum J, Verhofstede C. The latent HIV-1 reservoir in patients undergoing HAART: An archive of pre-HAART drug resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(4):410–2.
44. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):1–20.
45. Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, et al. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol*. 2003;77(9):5540–6.

46. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science* (80-). 2009;323(5919):1304–7.
47. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013;155(3):540–51.
48. Redel L, Le Douce V, Cherrier T, Marban C, Janossy A, Aunis D, et al. HIV-1 regulation of latency in the monocyte-macrophage lineage and in CD4+ T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2010;87(4):575–88.
49. Battistini A, Sgarbanti M. HIV-1 latency: An update of molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Viruses*. 2014;6(4):1715–58.
50. Deeks SG, Autran B, Berkhout B, Benkirane M, Cairns S, Chomont N, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):607–14.
51. Xing S, Siliciano RF. Targeting HIV latency: Pharmacologic strategies toward eradication. Vol. 18, *Drug Discovery Today*. 2013. p. 541–51.
52. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. 1999;5(5):512–7.
53. Meng B, Lever AM. Wrapping up the bad news – HIV assembly and release. *Retrovirology*. 2013;10(1):5.
54. Pollakis G, Paxton W a. Use of (alternative) coreceptors for HIV entry. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012;7(5):440–9.
55. Iordanskiy S, Santos S, Bukrinsky M. Nature, nurture and HIV: The effect of producer cell on viral physiology. Vol. 443, *Virology*. 2013. p. 208–13.
56. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 Pathogenesis : The Virus. 2012;1–18.
57. Abbas W, Herbein G. Molecular understanding of HIV-1 latency. *Adv Virol*. 2012;2012.

58. Vatakis DN, Bristol G, Wilkinson TA, Chow SA, Zack JA. Immediate Activation Fails To Rescue Efficient Human Immunodeficiency Virus Replication in Quiescent CD4+ T Cells. *J Virol.* 2007;81(7):3574–82.
59. Swiggard WJ, Baytop C, Yu JJ, Li C, Schretzenmair R, Doherty UO, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4 + T Cells in the Absence of Activating Stimuli. *J Virol.* 2005;79(22):14179–88.
60. Dai J, Agosto LM, Baytop C, Yu JJ, Pace MJ, Liszewski MK, et al. Human Immunodeficiency Virus Integrates Directly into Naive Resting CD4+ T Cells but Enters Naive Cells Less Efficiently than Memory Cells. *J Virol.* 2009;83(9):4528–37.
61. Plesa G, Dai J, Baytop C, Riley JL, June CH, O 'doherty U. Addition of Deoxynucleosides Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integration and 2LTR Formation in Resting CD4+ T Cells. *J Virol.* 2007;81(24):13938–42.
62. Barton K, Winckelmann A, Palmer S. HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. Vol. 24, *Trends in Microbiology.* 2016. p. 345–55.
63. Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard K, Zhang ZQ, Krieger J, et al. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2001;183(4):555–62.
64. Herbein G, Gras G, Khan K, Abbas W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2010;7(1):34.
65. Melikyan GB. HIV entry: A game of hide-and-fuse? *Curr Opin Virol.* 2014;4(2):1–7.
66. Kula A, Marcello A. Dynamic Post-Transcriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Biology (Basel).* 2012;1(3):116–33.
67. Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF. Kinetics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Decay following Entry into Resting CD4+ T Cells. *Microbiology.* 2005;79(4):2199–210.

68. Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110(4):521–9.
69. Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog*. 2008;4(3).
70. Easley R, Van Duyn R, Coley W, Guendel I, Dadgar S, Kehn-Hall K, et al. Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription. Vol. 1799, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2010. p. 275–85.
71. Karn J. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(1):4–11.
72. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(3):663–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
73. Marcello A, Zoppé M, Giacca M. Multiple Modes of Transcriptional Regulation by the HIV-1 Tat Transactivator. *IUBMB Life*. 2001;51:175–81.
74. Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, et al. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol*. 2006;4(12):2296–310.
75. Piatak M, Saag M, Yang L, Clark S, Kappes J, Luk K, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* (80-). 1993;259(5102):1749–54.
76. Corbeil J, Sheeter D, Genini D, Rought S, Leoni L, Du P, et al. Temporal Gene Regulation During HIV-1 Infection of Human CD4 + T Cells. 2001;1198–204.
77. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing

- antibody response to HIV type 1 infection. *Pnas*. 2003;100(7):4144–9.
78. Bailey J, Blankson JN, Wind-Rotolo M, Siliciano RF. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(4):470–6.
79. Strain MC, Gunthard HF, Havlir D V, Ignacio CC, Smith DM, Leigh-Brown AJ, et al. Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: Intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(8):4819–24.
80. Esté JA, Cihlar T. Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res*. 2010;85(1):25–33.
81. Kieffer TL, Finucane MM, Nettles RE, Quinn TC, Broman KW, Ray SC, et al. Genotypic Analysis of HIV-1 Drug Resistance at the Limit of Detection: Virus Production without Evolution in Treated Adults with Undetectable HIV Loads. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1452–65.
82. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT, et al. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *Jama*. 2001;286(2):196–207.
83. Neumann AU, Tubiana R, Calvez V, Robert C, Li T-S, Agut H, et al. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. *Aids*. 1999;13(6):677–83.
84. Kearney MF, Spindler J, Shao W, Yu S, Anderson EM, O'Shea A, et al. Lack of Detectable HIV-1 Molecular Evolution during Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog*. 2014;10(3).
85. Dahabieh MS, Ooms M, Simon V, Sadowski I. A doubly fluorescent HIV-1 reporter shows that the majority of integrated HIV-1 is latent shortly after infection. *J Virol*. 2013 Apr 15;87(8):4716–27.
86. Archin NM, Vaidya NK, Kuruc JD, Liberty AL, Wiegand A, Kearney MF, et al. Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without

- accelerating the decay of latent infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(24):9523–8.
87. Strain MC, Little SJ, Daar ES, Havlir D V, Gunthard HF, Lam RY, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis.* 2005;191(9):1410–8.
88. Schmid A, Gianella S, von Wyl V, Metzner KJ, Scherrer AU, Niederöst B, et al. Profound depletion of HIV-1 transcription in patients initiating antiretroviral therapy during acute infection. *PLoS One.* 2010;5(10).
89. Chun T-W, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, et al. Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1762–4.
90. Cohen MS, Gay CL. Treatment to Prevent Transmission of HIV-1. *Clin Infect Dis.* 2010;50(s3):S85–95.
91. Kulkarni SP, Shah KR, Sarma K V., Mahajan AP. Clinical uncertainties, health service challenges, and ethical complexities of hiv “test-and-treat”: A systematic review. *Am J Public Health.* 2013;103(6).
92. Chun T-W, Fauci AS. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *Aids.* 2012;26(10):1261–8.
93. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, et al. Viral Suppression and Immune Restoration in the Gastrointestinal Mucosa of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Initiating Therapy during Primary or Chronic Infection. *J Virol.* 2006;80(16):8236–47.
94. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, Souza Mark D, Rerknimitr R, et al. Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on Gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PLoS One.* 2012;7(3).
95. Passaes CP, Sáez-Cirión A. HIV cure research: Advances and prospects. *Virology.* 2014;454–455(1):340–52.

96. Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(1):29–35.
97. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1998;339(1):33–9.
98. Hocqueloux L, Avettand-fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1169–78.
99. Berrey MM, Schacker T, Collier a C, Shea T, Brodie SJ, Mayers D, et al. Treatment of primary human immunodeficiency virus type 1 infection with potent antiretroviral therapy reduces frequency of rapid progression to AIDS. *J Infect Dis.* 2001;183(10):1466–75.
100. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(6):493–505.
101. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, Chun T-W, et al. Absence of Detectable HIV-1 Viremia after Treatment Cessation in an Infant. *N Engl J Med.* 2013;369(19):1828–35.
102. Ledford H. HIV rebound dashes hope of cure. *Nature.* 2014 Jul 10;
103. Nettles RE. Intermittent HIV-1 Viremia (Blips) and Drug Resistance in Patients Receiving HAART. *JAMA.* 2005;293(7):817.
104. Brennan TP, Woods JO, Sedaghat AR, Siliciano JD, Siliciano RF, Wilke CO. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia and Provirus in Resting CD4+ T Cells Reveals a Novel Source of Residual Viremia in Patients on Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2009;83(17):8470–81.
105. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy.

- Science (80-). 1997;278(November):1295–300.
106. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, et al. Evidence that Low-Level Viremias during Effective Highly Active Antiretroviral Therapy Result from Two Processes: Expression of Archival Virus and Replication of Virus. *J Virol*. 2005;79(15):9625–34.
 107. Mens H, Pedersen AG, Jørgensen LB, Hue S, Yang Y, Gerstoft J, et al. Investigating signs of recent evolution in the pool of proviral HIV type 1 DNA during years of successful HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(1):107–15.
 108. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, He Y, Vesanen M, Lewin S, et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 1999;340(21):1605–13.
 109. Sedaghat AR, Siliciano JD, Brennan TP, Wilke CO, Siliciano RF. Limits on replenishment of the resting CD4+ T cell reservoir for HIV in patients on HAART. *PLoS Pathog*. 2007;3(8):1165–74.
 110. Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, Palmer SE, Gange SJ, Cranmer L, et al. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9403–8.
 111. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, et al. The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. *PLoS Med*. 2010;7(8).
 112. McMahon D, Jones J, Wiegand A, Gange SJ, Kearney M, Palmer S, et al. Short-Course Raltegravir Intensification Does Not Reduce Persistent Low-Level Viremia in Patients with HIV-1 Suppression during Receipt of Combination Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2010;50(6):912–9.
 113. Shen L, Siliciano RF. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):22–

- 8.
114. Gandhi R, Bosch R, Aga E, Albrecht M, Demeter L, Dykes C, et al. No Evidence for Decay of the Latent Reservoir in HIV-1–Infected Patients Receiving Intensive Enfuvirtide-Containing Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2010 Jan 15;201(2):293–6.
115. Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, Siliciano RF. MINIREVIEW Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection : No Easy Answers. *Society.* 2003;77(3):1659–65.
116. Palmer S, Josefsson L, Coffin JM. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med.* 2011;270(6):550–60.
117. Havlir D V., Strain MC, Clerici M, Ignacio C, Trabattoni D, Ferrante P, et al. Productive Infection Maintains a Dynamic Steady State of Residual Viremia in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Persons Treated with Suppressive Antiretroviral Therapy for Five Years. *J Virol.* 2003;77(20):11212–9.
118. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1999 May 27;340(21):1614–22.
119. 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 May 8;387(6629):188–91.
120. Persaud D, Pierson T, Ruff C, Finzi D, Chadwick KR, Margolick JB, et al. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest.* 2000;105(7):995–1003.
121. Spivak AM, Rabi SA, McMahon MA, Shan L, Sedaghat AR, Wilke CO, et al. Short Communication: Dynamic Constraints on the Second Phase Compartment of HIV-Infected Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(7):759–61.
122. Kim H, Perelson AS. Viral and latent reservoir persistence in HIV-1-infected patients on

- therapy. *PLoS Comput Biol.* 2006;2(10):1232–47.
123. Van Der Sluis RM, Jeeninga RE, Berkhout B. Establishment and molecular mechanisms of HIV-1 latency in T cells. *Curr Opin Virol.* 2013;3(6):700–6.
 124. Donahue DA, Wainberg MA. Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. *Retrovirology.* 2013;10(1):11.
 125. Ruelas DS, Greene WC. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell.* 2013;155(3):519–29.
 126. Margolis DM. Mechanisms of HIV latency: An emerging picture of complexity. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010;7(1):37–43.
 127. Williams SA, Greene WC. Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. Vol. 39, *Cytokine.* 2007. p. 63–74.
 128. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):1–17.
 129. Le Douce V, Herbein G, Rohr O, Schwartz C. Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology.* 2010;7(1):32.
 130. Kelly J, Beddall MH, Yu D, Iyer SR, Marsh JW, Wu Y. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology.* 2008;372(2):300–12.
 131. Pierson TC, Zhou Y, Kieffer TL, Christian T, Buck C, Siliciano RF, et al. Molecular Characterization of Preintegration Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 2002;76(17):8518–31.
 132. Strebel K, Luban J, Jeang K-T. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.* 2009;7(1):48.
 133. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, Steinman RM, et al. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2006;203(13):2887–93.

134. Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* 2008;4(12):13–20.
135. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology.* 2008;5(1):51.
136. Iwatani Y, Chan DSB, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, et al. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7096–108.
137. Peng G, Ke JL, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Cell Biol.* 2006;172(3):41–6.
138. Muthumani K, Kudchodkar S, Papasavvas E, Montaner LJ, Weiner DB, Ayyavoo V. HIV-1 Vpr regulates expression of beta chemokines in human primary lymphocytes and macrophages. *J Leukoc Biol.* 2000;68(3):366–72.
139. Zhao RY, Bukrinsky M, Elder RT. HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian J Med Res.* 2005;121(4):270–86.
140. Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells. *Retrovirology.* 2012;9(1):87.
141. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature.* 2011;
142. Kim B, Nguyen LA, Daddacha W, Hollenbaugh JA. Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 2012;287(26):21570–4.
143. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature.*

2013;474(7353):654–7.

144. Berger A, Sommer AFR, Zwarg J, Hamdorf M, Welzel K, Esly N, et al. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):1–12.
145. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Eric C, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 by reducing the intracellular pool of deoxynucleotide triphosphates. *Nat Immunol.* 2013;13(3):223–8.
146. Baldauf H-M, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med.* 2012;18(11):1682–7.
147. Gavegnano C, Kennedy EM, Kim B, Schinazi RF. The Impact of Macrophage Nucleotide Pools on HIV-1 Reverse Transcription, Viral Replication, and the Development of Novel Antiviral Agents. *Mol Biol Int.* 2012;2012:625983.
148. Michel F, Crucifix C, Granger F, Eiler S, Mouscadet J-F, Korolev S, et al. Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *EMBO J.* 2009;28(7):980–91.
149. Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N, Daigle JE, Hughes S, Kellam P, et al. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev.* 2007;21(14):1767–78.
150. Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD. HIV integration site selection : Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. 2007;1186–94.
151. Meehan AM, Saenz DT, Morrison JH, Garcia-Rivera JA, Peretz M, Llano M, et al. LEDGF/p75 proteins with alternative chromatin tethers are functional HIV-1 cofactors. *PLoS Pathog.* 2009;5(7).
152. Liang Shan □, Yang H-C, Alireza Rabi S, Bravo HC, Shroff NS, Irizarry RA, et al. Influence of Host Gene Transcription Level and Orientation on HIV-1 Latency in a

- Primary-Cell Model. *J Virol.* 2011;85(11):5384–93.
153. Han Y, Lassen K, Monie D, Ahmad R, Shimoji S, Liu X, et al. Resting CD4 + T Cells from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) -Infected Individuals Carry Integrated HIV-1 Genomes within Actively Transcribed Host Genes. *J Virol.* 2004;78(12):6122.
 154. Barr SD, Ciuffi A, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman FD. HIV Integration Site Selection: Targeting in Macrophages and the Effects of Different Routes of Viral Entry. *Mol Ther.* 2006;14(2):218–25.
 155. Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O’Doherty U, Bushman F. HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *AIDS.* 2009;23(12):1461–71.
 156. Vatakis DN, Kim S, Kim N, Chow SA, Zack JA. Human immunodeficiency virus integration efficiency and site selection in quiescent CD4+ T cells. *J Virol.* 2009;83(12):6222–33.
 157. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, et al. Retroviral DNA integration: Viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):0611–22.
 158. Duverger A, Jones J, May J, Bibollet-Ruche F, Wagner FA, Cron RQ, et al. Determinants of the Establishment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Latency. *J Virol.* 2009;83(7):3078–93.
 159. Taube R, Peterlin BM. Lost in transcription: Molecular mechanisms that control HIV latency. *Viruses.* 2013;5(3):902–27.
 160. Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional Interference Antagonizes Proviral Gene Expression to Promote HIV Latency. *Cell Host Microbe.* 2008;4(2):123–33.
 161. Mazo A, Hodgson JW, Petruk S, Sedkov Y, Brock HW. Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 16):2755–

- 61.
162. Gallastegui E, Millan-Zambrano G, Terme J-M, Chavez S, Jordan A. Chromatin Reassembly Factors Are Involved in Transcriptional Interference Promoting HIV Latency. *J Virol.* 2011;85(7):3187–202.
163. Han Y, Lin YB, An W, Xu J, Yang HC, O’Connell K, et al. Orientation-Dependent Regulation of Integrated HIV-1 Expression by Host Gene Transcriptional Readthrough. *Cell Host Microbe.* 2008;4(2):134–46.
164. West MJ, Lowe AD, Karn J. Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol.* 2001;75(18):8524–37.
165. Tyagi M, Pearson RJ, Karn J. Establishment of HIV Latency in Primary CD4+ Cells Is due to Epigenetic Transcriptional Silencing and P-TEFb Restriction. *J Virol.* 2010;84(13):6425–37.
166. Williams SA, Kwon H, Chen L-F, Greene WC. Sustained Induction of NF- B Is Required for Efficient Expression of Latent Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 2007;81(11):6043–56.
167. Burnett JC, Miller-Jensen K, Shah PS, Arkin AP, Schaffer D V. Control of stochastic gene expression by host factors at the HIV promoter. *PLoS Pathog.* 2009;5(1).
168. Coiras M, López-Huertas MR, Rullas J, Mittelbrunn M, Alcamí J. Basal shuttle of NF-kappaB/I kappaB alpha in resting T lymphocytes regulates HIV-1 LTR dependent expression. *Retrovirology.* 2007;4(1):56.
169. Rohr O, Marban C, Aunis D, Schaeffer E. Regulation of HIV-1 gene transcription : from lymphocytes to microglial cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74(July 2017):736–49.
170. Karn J. Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency. *HIV Seq Compend.* 2000;(1990):2–18.

171. Williams SA, Chen L-F, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J.* 2006;25(1):139–49.
172. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LWJ, et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature.* 2003;426(6968):853–7.
173. Colin L, Vandenhoudt N, de Walque S, van Driessche B, Bergamaschi A, Martinelli V, et al. The AP-1 binding sites located in the pol gene intragenic regulatory region of HIV-1 are important for viral replication. *PLoS One.* 2011;6(4).
174. Duverger A, Wolschendorf F, Zhang M, Wagner F, Hatcher B, Jones J, et al. An AP-1 binding site in the enhancer/core element of the HIV-1 promoter controls the ability of HIV-1 to establish latent infection. *J Virol.* 2013;87(4):2264–77.
175. Lin X, Irwin D, Kanazawa S, Huang L, Romeo J, Yen TSB, et al. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol.* 2003;77(15):8227–36.
176. Dong C, Kwas C, Wu L. Transcriptional restriction of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in undifferentiated primary monocytes. *J Virol.* 2009;83(8):3518–27.
177. Peterlin BM, Price DH. Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb. *Mol Cell.* 2006;23(3):297–305.
178. Budhiraja S, Famiglietti M, Bosque A, Planelles V, Rice AP. Cyclin T1 and CDK9 T-Loop Phosphorylation Are Downregulated during Establishment of HIV-1 Latency in Primary Resting Memory CD4+ T Cells. *J Virol.* 2013;87(2):1211–20.
179. Ott M, Geyer M, Zhou Q. The control of HIV transcription: Keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe.* 2011;10(5):426–35.
180. Hoque M, Shamanna RA, Guan D, Pe'ery T, Mathews MB. HIV-1 replication and latency

- are regulated by translational control of cyclin T1. *J Mol Biol.* 2011;410(5):917–32.
181. Mbonye U, Karn J. Control of HIV Latency by Epigenetic and Non-Epigenetic Mechanisms. *Curr HIV Res.* 2011;9(8):554–67.
182. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-ferrat N, Peterlin BM, Francisco S. NF- κ B Binds P-TEFb to Stimulate Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II. 2001;8:327–37.
183. Barboric M, Yik JHN, Czudnochowski N, Yang Z, Chen R, Contreras X, et al. Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):2003–12.
184. Zhang Z, Klatt A, Gilmour DS, Henderson AJ. Negative elongation factor NELF represses human immunodeficiency virus transcription by pausing the RNA polymerase II complex. *J Biol Chem.* 2007;282(23):16981–8.
185. Molle D, Maiuri P, Boireau S, Bertrand E, Knezevich A, Marcello A, et al. A real-time view of the TAR:Tat:P-TEFb complex at HIV-1 transcription sites. *Retrovirology.* 2007;4:36.
186. Bisgrove D, Mahmoudi T, Henklein P, Verdin E. Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13690–5.
187. Agbottah E, Deng L, Dannenberg LO, Pumfery A, Kashanchi F. Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription. *Retrovirology.* 2006;3(1):48.
188. Pearson R, Kim YK, Hokello J, Lassen K, Friedman J, Tyagi M, et al. Epigenetic Silencing of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Transcription by Formation of Restrictive Chromatin Structures at the Viral Long Terminal Repeat Drives the Progressive Entry of HIV into Latency. *J Virol.* 2008;82(24):12291–303.
189. Mahmoudi T, Parra M, Vries RGJ, Kauder SE, Verrijzer CP, Ott M, et al. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter.

- J Biol Chem. 2006;281(29):19960–8.
190. Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* 2001;20(7):1726–38.
 191. Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J.* 2003;22(24):6550–61.
 192. Keedy KS, Archin NM, Gates AT, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. A Limited Group of Class I Histone Deacetylases Acts To Repress Human Immunodeficiency Virus Type 1 Expression. *J Virol.* 2009;83(10):4749–56.
 193. Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, Davie JR, et al. The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol.* 2000;74(15):6790–9.
 194. Bernhard W, Barreto K, Raithatha S, Sadowski I. An Upstream YY1 Binding Site on the HIV-1 LTR Contributes to Latent Infection. *PLoS One.* 2013;8(10):1–14.
 195. Jiang G, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. c-Myc and Sp1 Contribute to Proviral Latency by Recruiting Histone Deacetylase 1 to the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promoter. *J Virol.* 2007;81(20):10914–23.
 196. Tyagi M, Karn J. CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *EMBO J.* 2007;26(24):4985–95.
 197. Chéné I du, Basyuk E, Lin Y-L, Triboulet R, Knezevich A, Chable-Bessia C, et al. Suv39H1 and HP1 γ are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J.* 2007;26(2):424–35.
 198. Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16538–45.

199. Le Douce V, Colin L, Redel L, Cherrier T, Herbein G, Aunis D, et al. LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(5):1904–15.
200. Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, et al. Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 2007;26(2):412–23.
201. Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, Dequiedt F, et al. CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(31):12655–60.
202. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog.* 2009;5(6).
203. Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T. 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology.* 2006;3:69.
204. Blazkova J, Murray D, Justement JS, Funk EK, Nelson AK, Moir S, et al. Paucity of HIV DNA Methylation in Latently Infected, Resting CD4+ T Cells from Infected Individuals Receiving Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2012;86(9):5390–2.
205. Pion M, Jordan A, Biancotto A, Dequiedt F, Gondois-Rey F, Rondeau S, et al. Transcriptional Suppression of In Vitro-Integrated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Does Not Correlate with Proviral DNA Methylation. *J Virol.* 2003;77(7):4025–32.
206. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893–900.
207. Jacquot G, Le Rouzic E, David A, Mazzolini J, Bouchet J, Bouaziz S, et al. Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology.* 2007;4:84.
208. Olivetta E, Percario Z, Fiorucci G, Mattia G, Schiavoni I, Dennis C, et al. HIV-1 Nef

- induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J Immunol.* 2003;170(4):1716–27.
209. Abbas W, Khan KA, Kumar A, Tripathy MK, Dichamp I, Keita M, et al. Blockade of BFA-mediated apoptosis in macrophages by the HIV-1 Nef protein. *Cell Death Dis.* 2014;5(2):e1080.
210. Lamers SL, Fogel GB, Singer EJ, Salemi M, Nolan DJ, Huysentruyt LC, et al. HIV-1 Nef in macrophage-mediated disease pathogenesis. *Int Rev Immunol.* 2012;31(6):432–50.
211. Foster JL, Garcia JV. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology.* 2008;5(1):84.
212. Weinberger LS, Burnett JC, Toettcher JE, Arkin AP, Schaffer D V. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell.* 2005;122(2):169–82.
213. Yukl S, Pillai S, Li P, Chang K, Pasutti W, Ahlgren C, et al. Latently-infected CD4+ T cells are enriched for HIV-1 Tat variants with impaired transactivation activity. *Virology.* 2009;387(1):98–108.
214. Bukrinsky M. SNFing HIV transcription. *Retrovirology.* 2006;3:49.
215. Tréand C, du Chéné I, Brès V, Kiernan R, Benarous R, Benkirane M, et al. Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *EMBO J.* 2006;25(8):1690–9.
216. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2007;13(10):1241–7.
217. Chiang K, Rice AP. MicroRNA-mediated restriction of HIV-1 in resting CD4+ T cells and monocytes. *Viruses.* 2012;4(9):1390–409.
218. Cobos-Jiménez V, Booiman T, Hamann J, Kootstra NA. Macrophages and HIV-1. *Curr*

- Opin HIV AIDS. 2011;6(5):385–90.
219. Provost P, Barat C, Plante I, Tremblay MJ. HIV-1 and the microRNA-guided silencing pathway: An intricate and multifaceted encounter. Vol. 121, *Virus Research*. 2006. p. 107–15.
220. Chable-Bessia C, Meziane O, Latreille D, Robinson R, Zamborlini A, Wagschal A, et al. Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. *Retrovirology*. 2009;6(1):26.
221. Sun G, Rossi JJ. MicroRNAs and their potential involvement in HIV infection. Vol. 32, *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011. p. 675–81.
222. Hayes AM, Qian S, Yu L, Boris-Lawrie K. Tat RNA silencing suppressor activity contributes to perturbation of lymphocyte miRNA by HIV-1. *Retrovirology*. 2011;8(1):36.
223. Klase Z, Winograd R, Davis J, Carpio L, Hildreth R, Heydarian M, et al. HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology*. 2009;6:18.
224. Ouellet DL, Plante I, Landry P, Barat C, Janelle MÈ, Flamand L, et al. Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(7):2353–65.
225. Ahluwalia JK, Khan S, Soni K, Rawat P, Gupta A, Hariharan M, et al. Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2008;5(1):117.
226. Sun G, Li H, Wu X, Covarrubias M, Scherer L, Meinking K, et al. Interplay between HIV-1 infection and host microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(5):2181–96.
227. Sung TL, Rice AP. miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1. *PLoS Pathog*. 2009;5(1).
228. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Ma G, Orenstein JM, Vazquez N. Viral and host

- cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2003;74(5):726–35.
229. Crowe S, Zhu T, Muller W a. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol.* 2003;74(5):635–41.
230. Campbell JH, Hearps AC, Martin GE, Williams KC, Crowe SM. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *Aids.* 2014;28(15):2175–87.
231. Kumar A, Abbas W, Herbein G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses.* 2014;6(4):1837–60.
232. Abbas W, Tariq M, Iqbal M, Kumar A, Herbein G. Eradication of HIV-1 from the macrophage reservoir: An uncertain goal? *Viruses.* 2015;7(4):1578–98.
233. Ellery PJ, Tippett E, Chiu Y-L, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, et al. The CD16+ Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors HIV-1 In Vivo. *J Immunol.* 2007;178(10):6581–9.
234. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology.* 2009;6(1):51.
235. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2002;76(2):707–16.
236. Zhu T. HIV-1 in peripheral blood monocytes: an underrated viral source. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:309–11.
237. Fulcher JA, Hwangbo Y, Zioni R, Nickle D, Lin X, Heath L, et al. Compartmentalization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 between Blood Monocytes and CD4⁺ T Cells during Infection. 2004;78(15):7883–93.

238. Carter CA, Ehrlich LS. Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62(1):425–43.
239. Arfi V, Riviere L, Jarrosson-Wuilleme L, Goujon C, Rigal D, Darlix J-L, et al. Characterization of the Early Steps of Infection of Primary Blood Monocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 2008;82(13):6557–65.
240. Thompson KA, Cherry CL, Bell JE, McLean CA. Brain cell reservoirs of latent virus in presymptomatic HIV-infected individuals. *Am J Pathol.* 2011;179(4):1623–9.
241. Koppensteiner H, Wu L. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology.* 2012;9(1):82.
242. Sharova N, Swingler C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* 2005;24(13):2481–9.
243. Mahlkecht U, Deng C, Lu MC, Greenough TC, Sullivan JL, O'Brien W a, et al. Resistance to apoptosis in HIV-infected CD4+ T lymphocytes is mediated by macrophages: role for Nef and immune activation in viral persistence. *J Immunol.* 2000;165(11):6437–46.
244. Welsch S, Groot F, Krausslich H-G, Keppler OT, Sattentau QJ. Architecture and Regulation of the HIV-1 Assembly and Holding Compartment in Macrophages. *J Virol.* 2011;85(15):7922–7.
245. Gaudin R, Berre S, Cunha de Alencar B, Decalf J, Schindler M, Gobert FX, et al. Dynamics of HIV-Containing Compartments in Macrophages Reveal Sequestration of Virions and Transient Surface Connections. *PLoS One.* 2013;8(7).
246. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JEK. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(19):10592–7.
247. Marsh M, Theusner K, Pelchen-Matthews A. HIV assembly and budding in macrophages. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:185–9.

248. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology*. 2010;7(1):29.
249. Groot F, Welsch S, Sattentau QJ, Dc W. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood*. 2008;111(9):4660–3.
250. Herbein G, Varin A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology*. 2010;7:33.
251. Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G. Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. 2010;87(4):599–608.
252. Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a Polarization of Human Monocyte-Derived Macrophages Inhibits HIV-1 Replication by Distinct Mechanisms. *J Immunol*. 2009;182(10):6237–46.
253. Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V. The Role of Human Dendritic Cells in HIV-1 Infection. *J Invest Dermatol*. 2015;135(5):1225–33.
254. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. Vol. 35, *Trends in Immunology*. 2014. p. 114–22.
255. Nobile C, Petit C, Moris A, Abastado J, Mammano F, Schwartz O, et al. Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes. 2005;79(9):5386–99.
256. Janas AM, Dong C, Wang J-H, Wu L. Productive infection of human immunodeficiency virus type 1 in dendritic cells requires fusion-mediated viral entry. *Virology*. 2008;375:442–51.
257. van der Sluis RM, van Montfort T, Pollakis G, Sanders RW, Speijer D, Berkhout B, et al. Dendritic Cell-induced Activation of Latent HIV-1 Provirus in Actively Proliferating Primary T Lymphocytes. *PLoS Pathog*. 2013;9(3).
258. Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B, Aikaterini Alexaki, Yujie Liu and BW. Cellular Reservoirs

- of HIV-1 and their Role in Viral Persistence. *Curr HIV Res.* 2009;6(5):388–400.
259. Gavegnano C, Schinazi RF. Antiretroviral therapy in macrophages: Implication for HIV eradication. Vol. 20, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* 2009. p. 63–78.
260. Sahu GKG, Paar D, Frost SSDW, Smith MM, Weaver S, Cloyd MW. Low-level plasma HIVs in patients on prolonged suppressive highly active antiretroviral therapy are produced mostly by cells other than CD4 T-cells. *J Med* 2009;81(1):9–15.
261. Chun TW, Justement JS, Lempicki RA, Yang J, Dennis Jr. G, Hallahan CW, et al. Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2003;100(0027–8424 (Print)):1908–13.
262. Mzingwane ML, Tiemessen CT. Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Rev Med Virol.* 2017;27(2):1–12.
263. Kandathil AJ, Sugawara S, Balagopal A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology.* 2016;13(1):86.
264. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, et al. Macrophages in Vaginal but Not Intestinal Mucosa Are Monocyte-Like and Permissive to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 2009;83(7):3258–67.
265. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, et al. Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity.* 2007;26(2):257–70.
266. Shen R, Kappes JC, Smythies LE, Richter HE, Novak L, Smith PD. Vaginal Myeloid Dendritic Cells Transmit Founder HIV-1. *J Virol.* 2014;88(13):7683–8.
267. Graham SM, Holte SE, Peshu NM, Richardson B a, Panteleeff DD, Jaoko WG, et al. Initiation of antiretroviral therapy leads to a rapid decline in cervical and vaginal HIV-1 shedding. *AIDS.* 2007;21(4):501–7.

268. Cu-Uvin S, DeLong AK, Venkatesh KK, Hogan JW, Ingersoll J, Kurpewski J, et al. Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. *Aids*. 2010;24(16):2489–97.
269. Cavarelli M, Scarlatti G. HIV-1 Infection: The Role of the Gastrointestinal Tract. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(6):537–42.
270. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Manuelli V, Jean-Pierre P, Lopez P, et al. Mechanisms of Gastrointestinal CD4+ T-Cell Depletion during Acute and Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 2007;81(2):599–612.
271. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4 + T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):749–59.
272. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003;77(21):11708–17.
273. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4 + T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):761–70.
274. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006;3(12):2335–48.
275. Lerner P, Guadalupe M, Donovan R, Hung J, Flamm J, Prindiville T, et al. The Gut Mucosal Viral Reservoir in HIV-Infected Patients Is Not the Major Source of Rebound Plasma Viremia following Interruption of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2011;85(10):4772–82.
276. Chun T, Nickle DC, Justement JS, Iusic

- JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in Gut-Associated Lymphoid Tissue despite Long-Term Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(5):714–20.
277. Imamichi H, DeGray G, Dewar RL, Mannon P, Yao M, Chairez C, et al. Lack of compartmentalization of HIV-1 quasispecies between the gut and peripheral blood compartments. *J Infect Dis.* 2011;204(2):309–14.
278. Evering TH, Mehandru S, Racz P, Tenner-Racz K, Poles MA, Figueroa A, et al. Absence of HIV-1 evolution in the gut-associated lymphoid tissue from patients on combination antiviral therapy initiated during primary infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(2).
279. Shen R, Meng G, Ochsenbauer C, Clapham PR, Grams J, Novak L, et al. Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF- κ B activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages. *PLoS Pathog.* 2011;7(5).
280. Brown D, Mattapallil JJ. Gastrointestinal tract and the mucosal macrophage reservoir in HIV infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(11):1469–73.
281. Garden GA. Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia.* 2002;40(2):240–51.
282. Bednar MM, Sturdevant CB, Tompkins LA, Arrildt KT, Dukhovlinova E, Kincer LP, et al. Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS. Vol. 12, *Current HIV/AIDS Reports.* 2015. p. 262–71.
283. Churchill M, Nath A. Where does HIV hide? A focus on the central nervous system. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(3):165–9.
284. Nath A, Clements JE. Eradication of HIV from the brain: reasons for pause. *Aids.* 2011;25(5):577–80.
285. Heaton RKK, Clifford DB, Franklin Jr DR, Woods SPP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy. *Neurology.* 2010;75(23):2087–96.

286. Spudich S, González-Scarano F. HIV-1-related central nervous system disease: Current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(6):1–17.
287. Gras G, Kaul M. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2010;7(1):30.
288. Price RW, Spudich S. Antiretroviral Therapy and Central Nervous System HIV Type 1 Infection. *J Infect Dis.* 2008;197(s3):S294–306.
289. Schnell G, Joseph S, Spudich S, Price RW, Swanstrom R. HIV-1 replication in the central nervous system occurs in two distinct cell types. *PLoS Pathog.* 2011;7(10).
290. Kumar A, Herbein G. The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. *Mol Cell Ther.* 2014;2(1):10.
291. Best BM, Letendre SL, Brigid E, Clifford DB, Collier AC, Gelman BB, et al. Low atazanavir concentrations in cerebrospinal fluid. *AIDS.* 2009;23(1):83–7.
292. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol.* 2008;65(1):65–70.
293. Cribbs SK, Lennox J, Caliendo AM, Brown LA, Guidot DM. Healthy HIV-1-Infected Individuals on Highly Active Antiretroviral Therapy Harbor HIV-1 in Their Alveolar Macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015;31(1):64–70.
294. Jambo KC, Banda DH, Kankwatira a M, Sukumar N, Allain TJ, Heyderman RS, et al. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol.* 2014;7(August 2013):1–11.
295. Crothers K, Thompson BW, Burkhardt K, Morris A, Flores SC, Diaz PT, et al. HIV-Associated Lung Infections and Complications in the Era of Combination Antiretroviral Therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(3):275–81.

296. Twigg HL, Schnizlein-Bick CT, Weiden M, Valentine F, Wheat J, Day RB, et al. Measurement of antiretroviral drugs in the lungs of HIV-infected patients. *HIV Ther.* 2010;4(2):247–51.
297. Heath L, Fox A, McClure J, Diem K, van't Wout AB, Zhao H, et al. Evidence for limited genetic compartmentalization of HIV-1 between lung and blood. *PLoS One.* 2009;4(9).
298. Blackard JT, Ma G, Martin CM, Rouster SD, Shata MT, Sherman KE. HIV Variability in the Liver and Evidence of Possible Compartmentalization. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(10):1117–26.
299. Kong L, Maya W, Moreno-Fernandez ME, Ma G, Shata MT, Sherman KE, et al. Low-level HIV infection of hepatocytes. *Virology.* 2012;9(1):157.
300. Blasi M, Balakumaran B, Chen P, Negri DRM, Cara A, Chen BK, et al. Renal epithelial cells produce and spread HIV-1 via T-cell contact. *AIDS.* 2014;28(16):2345–53.
301. Alexaki A, Wigdahl B. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathog.* 2008;4(12).
302. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J, Bixby D, Savona MR, et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med.* 2010;16(4):446–51.
303. McNamara LA, Collins KL. Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(1):43–8.
304. Bandera A, Ferrario G, Saresella M, Marventano I, Soria A, Zanini F, et al. CD4+ T cell depletion, immune activation and increased production of regulatory T cells in the thymus of HIV-Infected Individuals. *PLoS One.* 2010;5(5):2–9.
305. Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, Cheret A, Frange P, Melard A, et al. Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Oct;29(4):859–80.

306. Le Douce V, Janossy A, Hallay H, Ali S, Riclet R, Rohr O, et al. Achieving a cure for HIV infection: Do we have reasons to be optimistic? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1063–74.
307. Smith SM. Valproic acid and HIV-1 latency: beyond the sound bite. *Retrovirology.* 2005;2:56.
308. Durand CM, Blankson JN, Siliciano RF. Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol.* 2012;33(11):554–62.
309. Barton KM, Burch BD, Soriano-Sarabia N, Margolis DM. Prospects for Treatment of Latent HIV. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(1):46–56.
310. Choudhary SK, Margolis DM. Curing HIV: Pharmacologic Approaches to Target HIV-1 Latency. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51(1):397–418.
311. Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol.* 2013;21(6):277–85.
312. Bouchat S, Gatot J-S, Kabeya K, Cardona C, Colin L, Herbein G, et al. Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4+ T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *Aids.* 2012;26(12):1473–82.
313. Margolis DM. How might we cure HIV? *Curr Infect Dis Rep.* 2014;16(3).
314. Shan L, Siliciano RF. From reactivation of latent HIV-1 to elimination of the latent reservoir: The presence of multiple barriers to viral eradication. *BioEssays.* 2013;35(6):544–52.
315. McManamy M, Hakre S, Verdin E, Margolis D. Therapy for latent human immunodeficiency virus type 1 infection: the role of histone deacetylase inhibitors. *Antivir Chem Chemother.* 2015;23(4):145–9.
316. 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*. 2012;36(3):491–501.
317. Fraser C, Ferguson NM, Ghani a C, Prins JM, Lange JM, Goudsmit J, et al. Reduction of the HIV-1-infected T-cell reservoir by immune activation treatment is dose-dependent and restricted by the potency of antiretroviral drugs. *AIDS*. 2000;14(6):659–69.
318. Margolis DM. Histone deacetylase inhibitors and HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(1):25–9.
319. Matalon S, Rasmussen TA, Dinarello CA. Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol Med*. 2011;17(5–6):466–72.
320. Blazkova J, Chun TW, Belay BW, Murray D, Justement JS, Funk EK, et al. Effect of histone deacetylase inhibitors on HIV production in latently infected, resting CD4+ T cells from infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2012;206(5):765–9.
321. Wightman F, Ellenberg P, Churchill M, Lewin SR. HDAC inhibitors in HIV. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(1):47–54.
322. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, et al. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: A proof-of-concept study. *Lancet*. 2005;366(9485):549–55.
323. Archin NM, Eron JJ, Palmer S, Hartmann-Duff A, Martinson JA, Wiegand A, et al. Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS*. 2008;22(10):1131–5.
324. Archin NM, Cheema M, Parker D, Wiegand A, Bosch RJ, Coffin JM, et al. Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection. *PLoS One*. 2010;5(2):3–6.
325. Siliciano JD, Lai J, Callender M, Pitt E, Zhang H, Margolick JB, et al. Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Patients Receiving Valproic Acid. *J Infect Dis*. 2007;195(6):833–6.

326. Archin NM, Espeseth A, Parker D, Cheema M, Hazuda D, Margolis DM. Expression of Latent HIV Induced by the Potent HDAC Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(2):207–12.
327. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*. 2012;489(7416):460–460.
328. Contreras X, Schweneker M, Chen C-S, McCune JM, Deeks SG, Martin J, et al. Suberoylanilide Hydroxamic Acid Reactivates HIV from Latently Infected Cells. *J Biol Chem*. 2009;284(11):6782–9.
329. Edelstein LC, Micheva-Viteva S, Phelan BD, Dougherty JP. Short Communication: Activation of Latent HIV Type 1 Gene Expression by Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), an HDAC Inhibitor Approved for Use to Treat Cutaneous T Cell Lymphoma. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(9):883–7.
330. Matalon S, Palmer BE, Nold MF, Furlan A, Kassu A, Fossati G, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 decreases surface CXCR4 and CCR5 expression on CD4(+) T-cells and monocytes and is superior to valproic acid for latent HIV-1 expression in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54(1):1–9.
331. Rasmussen TA, Søgaaard OS, Brinkmann C, Wightman F, Lewin SR, Melchjorsen J, et al. Comparison of HDAC inhibitors in clinical development: Effect on HIV production in latently infected cells and T-cell activation. *Hum Vaccines Immunother*. 2013;9(5):993–1001.
332. Bernhard W, Barreto K, Saunders A, Dahabieh MS, Johnson P, Sadowski I. The Suv39H1 methyltransferase inhibitor chaetocin causes induction of integrated HIV-1 without producing a T cell response. *FEBS Lett*. 2011;585(22):3549–54.
333. Blazkova J, Trejbalova K, Gondois-Rey F, Halfon P, Philibert P, Guiguen A, et al. CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathog*. 2009;5(8).

334. Jiang G, Dandekar S. Targeting NF- κ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(1):4–12.
335. Wolschendorf F, Bosque A, Shishido T, Duverger A, Jones J, Planelles V, et al. Kinase control prevents HIV-1 reactivation in spite of high levels of induced NF- κ B activity. *J Virol*. 2012;86(8):4548–58.
336. McKernan LN, Momjian D, Kulkosky J. Protein kinase C: One pathway towards the eradication of latent HIV-1 Reservoirs. *Adv Virol*. 2012;2012.
337. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, et al. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF- κ B. *J Biol Chem*. 2004;279(40):42008–17.
338. Wolschendorf F, Duverger A, Jones J, Wagner FH, Huff J, Benjamin WH, et al. Hit-and-Run Stimulation: a Novel Concept To Reactivate Latent HIV-1 Infection without Cytokine Gene Induction. *J Virol*. 2010;84(17):8712–20.
339. Korin YD, Brooks DG, Brown S, Korotzer A, Zack J a. Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *J Virol*. 2002;76(16):8118–23.
340. Kulkosky J, Culnan DM, Roman J, Dornadula G, Schnell M, Michael R, et al. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART Prostratin : activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Gene*. 2001;98(10):3006–15.
341. Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, Handy I, Albrecht H, Giri S, et al. Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One*. 2010;5(6).
342. Perez M, de Vinuesa A, Sanchez-Duffhues G, Marquez N, Bellido M, Munoz-Fernandez M, et al. Bryostatin-1 Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitors to Reactivate HIV-1 from Latency. *Curr HIV Res*. 2010;8(6):418–29.
343. Reuse S, Calao M, Kabeya K, Guiguen A, Gatot JS, Quivy V, et al. Synergistic activation

- of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: Implications for treatment of latent infection. *PLoS One*. 2009;4(6).
344. Choudhary SK, Archin NM, Margolis DM. Hexamethylbisacetamide and Disruption of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Latency in CD4+ T Cells. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1162–70.
345. Contreras X, Barboric M, Lenasi T, Peterlin BM. HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS Pathog*. 2007;3(10):1459–69.
346. Doyon G, Zerbato J, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Disulfiram reactivates latent HIV-1 expression through depletion of the phosphatase and tensin homolog (PTEN). *Aids*. 2012;(May):1.
347. Xing S, Bullen CK, Shroff NS, Shan L, Yang H-C, Manucci JL, et al. Disulfiram Reactivates Latent HIV-1 in a Bcl-2-Transduced Primary CD4+ T Cell Model without Inducing Global T Cell Activation. *J Virol*. 2011;85(12):6060–4.
348. Banerjee C, Archin N, Michaels D, Belkina AC, Denis G V, Bradner J, et al. BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec;92(6):1147–54.
349. Boehm D, Calvanese V, Dar RD, Xing S, Schroeder S, Martins L, et al. BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. *Cell Cycle*. 2013;12(3):452–62.
350. Li Z, Guo J, Wu Y, Zhou Q. The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):277–87.
351. Zhu J, Gaiha GD, John SP, Pertel T, Chin CR, Gao G, et al. Reactivation of Latent HIV-1 by Inhibition of BRD4. *Cell Rep*. 2012;2(4):807–16.
352. Ortiz GM, Nixon DF, Trkola A, Binley J, Jin X, Bonhoeffer S, et al. HIV-1-specific immune

- responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest.* 1999;104(6):13–8.
353. Chun TW, Fauci S. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(September):10958–61.
354. Kulkosky J, Nunnari G, Otero M, Calarota S, Dornadula G, Zhang H, et al. Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2002;186(10):1403–11.
355. Dybul M, Hidalgo B, Chun T-W, Belson M, Migueles SA, Justement JS, et al. Pilot Study of the Effects of Intermittent Interleukin-2 on Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Immune Responses in Patients Treated during Recently Acquired HIV Infection. *J Infect Dis.* 2002;185(1):61-.
356. Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard J, Goujard C, Lelièvre J, et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1 – infected adults through IL-7 treatment. *Baseline.* 2009;119(4):997–1007.
357. Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, Aga E, Proschan MA, Medvik K, et al. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood.* 2009 Jun 18;113(25):6304–14.
358. Scripture-Adams DD, Brooks DG, Korin YD, Zack J a. Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *J Virol.* 2002;76(24):13077–82.
359. Wang FX, Xu Y, Sullivan J, Souder E, Argyris EG, Acheampong EA, et al. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest.* 2005;115(1):128–37.
360. Allers K, Hu G, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, Schneider T. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5delta32/ delta32 stem cell transplantation. *Blood.*

2011;117(10):2791–9.

361. Hütter G, Ganepola S. Eradication of HIV by Transplantation of CCR5-Deficient Hematopoietic Stem Cells. *Sci World J.* 2011;11:1068–76.
362. Hutter G, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Ph D, Schneider T, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/ Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360:692–8.
363. Yukl SA, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun TW, Douek D, et al. Challenges in Detecting HIV Persistence during Potentially Curative Interventions: A Study of the Berlin Patient. *PLoS Pathog.* 2013;9(5).