

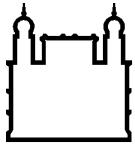
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T FRENTE AOS PEPTÍDEOS DE  
GAG E NEF DO HIV-1 E DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS  
ASSOCIADOS AO CONTROLE DA REPLICAÇÃO VIRAL**

**FERNANDA HELOISE CÔRTEZ**

Rio de Janeiro  
Junho de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***FERNANDA HELOISE CÔRTEZ***

*AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T FRENTE AOS PEPTÍDEOS DE GAG E NEF DO HIV-1 E DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS ASSOCIADOS AO CONTROLE DA REPLICAÇÃO VIRAL*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Biologia Parasitária

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C828 Côrtes, Fernanda Heloise

Avaliação da resposta de células T frente aos peptídeos de GAG e NEF do HIV-1 e de parâmetros imunológicos e genéticos associados ao controle da replicação viral / Fernanda Heloise Côrtes. – Rio de Janeiro, 2014.

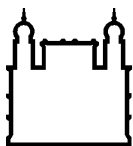
xiii, 111 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 87-109

1. HIV-1. 2. Células T CD8+. 3. Reatividade cruzada. 4. Subtipo. 5. Controladores de elite. 6. Ativação imune. 7. Replicação persistente. 8. Resposta imune. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: FERNANDA HELOISE CÔRTEZ***

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T FRENTE AOS PEPTÍDEOS DE  
GAG E NEF DO HIV-1 E DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS  
ASSOCIADOS AO CONTROLE DA REPLICAÇÃO VIRAL**

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado**

**Aprovada em: 26/06/2014**

**EXAMINADORES:**

Dr. Alda Maria da Cruz (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Dr. Edecio Cunha Neto (Universidade de São Paulo)

Dr. Cleonice Alves de Melo Bento (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro)

Dr. Myrna Cristina Bonaldo (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Dr. Josué da Costa Lima Junior (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 26 de junho de 2014.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa da tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Fernanda Heloise Côrtes**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado. Ao Vigésimo sexto dia do mês de junho de dois mil e quatorze, realizou-se às quatorze horas, na sala 14B do Pavilhão Helio e Peggy Pereira/Fiocruz, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Avaliação da Resposta de Células T Frente aos Peptídeos de Gag e Nef do HIV-1 e de Parâmetros Imunológicos e Genéticos associados ao Controle da Replicação Viral**" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz – IOC/Fiocruz (presidente), Dr. Edecio Cunha Neto – USP/SP e Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento – UNIRIO/RJ; e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Myrna Cristina Bonaldo – IOC/Fiocruz e Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/Fiocruz. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de **Doutora em Ciências** está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 26 de junho de 2014.

Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz (Presidente da Banca):

Dr. Edecio Cunha Neto (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenação do Programa):

**Dedico este trabalho à minha querida  
“vó Luiza”, sem a qual não chegaria  
nem mesmo perto de ser quem sou  
hoje.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter iluminado meu caminho, por caminhar ao meu lado e me dizer que posso ir além porque nunca estarei só.

À Dr<sup>a</sup> Mariza Morgado, minha orientadora, pela enorme confiança, orientação, ensinamentos e conselhos, não só científicos. Por me fazer compreender um pouco mais o que é fazer pesquisa.

Ao Gonzalo, colaborador deste trabalho, pela paciência, conselhos, transmissão de conhecimento e todo tempo dedicado a me fazer entender um pouco mais de biologia molecular.

À minha “vó Luiza”, que me protegeu, me mimou, cuidou de mim com muita dedicação e força.

À minha mãe, que sempre acreditou em mim, que nunca me deixou pensar que não sou capaz de fazer algo, que nesses últimos anos foi mais que minha mãe, a qual tem sido como uma super-heroína, muito obrigada e desculpe pelos momentos de ausência.

Aos meus dois pais, Fernando e Jorge, que sei que torcem por mim todos os dias, se preocupam e se orgulham do caminho que eu escolhi.

Ao meu marido Thiago, por todo apoio e compreensão, por me ensinar a ser mais paciente e confiar mais em mim, pelos conselhos e dicas.

A todos meus familiares, obrigada pela torcida, pela companhia, pelo apoio.

À Dr<sup>a</sup> Carla Vorsatz e ao Dr José Henrique Pilotto por toda cooperação científica e recrutamento dos voluntários desse estudo. E a toda equipe dos Ensaios Clínicos do IPEC que deu apoio à condução deste projeto.

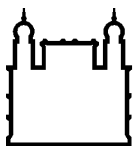
Aos amigos do LabAids, que compartilharam essa caminhada, pelos diálogos do P2, pela divisão dos problemas e soluções, conversas divertidas e momentos de descontração, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho, conselhos e tudo mais.

Aos voluntários que aceitaram participar desse estudo.

Enfim, a todos aqueles que fizeram parte dessa caminhada muito **OBRIGADA**.

**“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

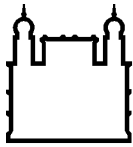
### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T FRENTE AOS PEPTÍDEOS DE GAG E NEF DO HIV-1 E DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E GENÉTICOS ASSOCIADOS AO CONTROLE DA REPLICAÇÃO VIRAL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda Heloíse Côrtes

A pandemia do HIV-1 é a infecção emergente mais importante das últimas décadas. O desenvolvimento de uma vacina é colocado como a melhor estratégia para o controle da pandemia. No entanto, entre os candidatos vacinais que evoluíram para testes clínicos de eficácia, apenas um mostrou resultados positivos, mas com uma modesta eficácia (31,2%). Além da busca por uma vacina eficiente contra a infecção pelo HIV-1, o desenvolvimento de estratégias para se atingir a cura também é essencial. Considerando esses dois objetivos principais, diversos fatores são colocados como obstáculos, sendo a enorme diversidade genética do HIV-1 e a falta de correlatos de proteção contra a doença ou a infecção, os pontos centrais e nos quais focamos nossa atenção. No primeiro trabalho, foi avaliada a resposta de células T frente a peptídeos derivados de sequências consenso e sequências de isolados virais mais próximos ao consenso (CVI) dos três subtipos prevalentes no Brasil, B, C e F1 e do grupo M. O estudo incluiu 32 indivíduos infectados com o HIV-1, subtipo B (n = 13), subtipo C (n = 11) e subtipo F1 (n = 8). As respostas específicas frente a Gag e Nef foram avaliadas usando o ensaio de ELISpot IFN- $\gamma$ . Peptídeos baseados nas sequências CVI apresentaram capacidade de redução da distância genética e de detecção da resposta de células T similar ao observado para as sequências consenso. Em geral, o nível de reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 foi maior do que entre os subtipos B e C ou entre os subtipos C e F1. Esses resultados sugerem que o obstáculo imposto pela diversidade genética no desenho de vacinas é dependente dos subtipos envolvidos. No segundo trabalho foi avaliada a resposta de células T de indivíduos controladores da replicação viral frente aos peptídeos consenso, derivados do primeiro estudo. Além disso, foi feita uma avaliação de fatores genéticos e imunológicos nesse grupo de controladores. O estudo incluiu três grupos de controladores: 1) Controladores de Elite (EC, n=7) com carga viral (CV) <80 cópias/mL em todos os pontos; 2) Controladores de Elite com *Blips* (EEC, n=5) com CV >80 cópias/mL em apenas 30% dos pontos e 3) Controladores Virêmicos (VC, n=7) com CV <5.000 cópias/mL e >80 cópias/mL em mais de 30% dos pontos. Indivíduos infectados pelo HIV-1 não tratados (NC) ou em tratamento antirretroviral (HAART) e indivíduos não infectados pelo HIV-1 foram analisados como controles. A coorte de controladores foi enriquecida em alelos protetores HLA-B, B\*27 e B\*57, mas não foi observada diferenças significativas entre os três grupos de controladores. O DNA viral circular (2-LTR) foi detectado nos EEC (3/5) e nos VC (6/7), mas não nos EC. Uma frequência maior de células T CD8<sup>+</sup> ativadas foi observada em EEC e VC quando comparada a indivíduos não infectados. Os EC demonstraram uma resposta de células T de menor magnitude frente a Gag/Nef e uma proporção de anticorpos IgG anti-HIV significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que os grupos de EEC, VC e NC. Esses resultados demonstram que EEC e VC são capazes de montar uma resposta imune específica mais forte frente a estímulos do HIV-1, mas paralelamente, apresentam maiores níveis de ativação imune, translocação microbiana e maior reservatório viral, quando comparados aos EC. Esses resultados destacam a heterogeneidade dos indivíduos capazes de controlar a replicação viral e reforçam a necessidade de uma classificação mais precisa de indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes níveis de controle.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EVALUATION OF T CELLS RESPONSES AGAINST HIV-1 GAG AND NEF PEPTIDES AND IMMUNOLOGICAL AND GENETIC PARAMETERS ASSOCIATED TO CONTROL OF VIRAL REPLICATION

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITOLOGY

Fernanda Heloíse Côrtes

The HIV-1 pandemic has been the most relevant infection that has emerged in the last decades. Vaccine development has been considered as the best strategy to control this pandemic, however, the candidate vaccines that have evolved to the stage of efficacy clinical trials, only one presented positive results and even that with very modest efficacy (31,2%). As such, strategies to find a cure is essential though has been hindered by several obstacles such as the enormous genetic diversity of HIV-1 and lack of correlates of protection against disease or infection. These two obstacles were investigated in the present study by evaluating the T cell response against peptides based on consensus and closest viral isolate sequences (CVI) from the three prevalent subtypes in Brazil, B, C and F1 and from group M consensus. The study included 32 subjects infected with HIV-1 subtype B (n = 13), C (n = 11), and F1 (n = 8). Gag and Nef-specific T cell responses were evaluated by IFN- $\gamma$ -ELISpot assay. Peptides based on CVI sequences were similar to consensus in both reducing genetic distance and detecting T cell responses. Overall, the level of cross-subtype response between subtypes B and F1 was higher than between subtype C and B or C and F1. Our results suggest that the barrier of genetic diversity in HIV-1 group M for vaccine design may be dependent on the subtypes involved. The second study evaluated the T cell response from controllers against peptides derived from the first study. In addition, we performed an evaluation of the genetics and immunologic patterns in this cohort of controllers. The study included three controller groups: 1) Elite Controllers (EC, n = 7) with VL <80 copies/mL in all determinations; 2) Ebbing Elite Controllers (EEC, n = 5) with transient viremia (blips); and 3) Viremic Controllers (VC, n = 7) with plasma viremia <5,000 copies/mL. HIV-1 infected subjects untreated non-controllers (NC), patients under suppressive HAART and HIV-1 negative healthy individuals were also analyzed as controls. This cohort was enriched by the protective HLA-B alleles B\*27 and B\*57, but no significant differences were observed among distinct groups of controllers. 2-LTR circles were detected in EEC (3/5) and VC (6/7), but not in EC. A higher frequency of activated CD8<sup>+</sup> T cells was observed in EEC and VC than in HIV negative subjects. EC displayed a weaker Gag/Nef IFN- $\gamma$  T cell response and a significantly lower proportion (p < 0.05) of anti-HIV IgG antibodies than EEC, VC and NC groups. These data showed that EEC and VC are able to mount a stronger HIV-specific immune response, but experience increases in the level of immune activation, microbial translocation and size of the HIV-1 DNA reservoir compared to EC. These results highlight the heterogeneity of the HIV controllers and reinforce the needs for a precise classification of patients with different levels of viral suppression.

## ÍNDICE

	Índice de Figuras .....	xi
	Lista de Tabelas .....	xii
	Lista de Siglas e Abreviaturas .....	xiii
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia do HIV-1 .....	1
1.2	Epidemiologia molecular do HIV .....	3
1.3	Desenvolvimento de Vacinas anti HIV/Aids .....	6
1.3.1	Testes clínicos de eficácia .....	7
1.3.2	Estratégias para a redução da diversidade genética do HIV-1 em desenhos vacinais .....	9
1.4	Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 .....	13
1.5	Controladores da replicação viral e evolução para a aids .....	19
1.6	Justificativa .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
2.1	Objetivo Geral .....	26
2.2	Objetivos Específicos .....	26
<b>3</b>	<b>DOCUMENTOS</b>	<b>28</b>
3.1	Documento 1 – “Higher cross-subtype IFN- $\gamma$ ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1 subtype B- and F1- than in C-infected subjects” .....	29
3.2	Documento 2 – “HIV controllers patients with different viral load cut-off levels have distinct virologic and immunologic profiles” .....	43
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>110</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estimativa do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 em 2012. ....	2
Figura 2 Taxa de mortalidade (padronizada*) por aids segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2003 a 2012. ....	3
Figura 3 Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes. ...	4
Figura 4 Distribuição dos subtipos mais prevalentes de HIV-1, por região, no Brasil. ....	6
Figura 5 Esquema demonstrando sequências centrais.....	11
Figura 6 Desenho esquemático do epitélio intestinal na ausência (a) e presença do HIV-1 (b). ....	18
Figura 7 História Natural da infecção pelo HIV-1. ....	20

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 Principais características e resultados dos ensaios clínicos de fase IIb/III realizados.....</b>	<b>7</b>
--	----------

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CRF	Forma Recombinante Circulante
CVI	Isolado Viral Mais Próximo ao Consenso
EC	Controlador de Elite
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSH	Homem que faz sexo com homem
LBP	Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo
LILR	Receptor Leucocitário Semelhante a Imunoglobulinas
LPS	Lipopolissacarídeo
LTNP	Não Progressor de Longo Termo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
sCD14	CD14 solúvel
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SNP	Polimorfismo de Base Única
TARV	Terapia Antirretroviral
UNAIDS	Programa das Nações Unidas para o combate ao HIV/aids
URF	Forma Recombinante Única
VC	Controlador Virêmico



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia do HIV-1

Em 30 anos de pandemia o número de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) já ultrapassou 60 milhões e aproximadamente metade desse número foi a óbito de causas relacionadas à síndrome da imunodeficiência humana (aids) (1). Apesar do progresso significativo alcançado no combate a HIV/aids, não se pode esquecer que, embora a taxa de novas infecções tenha diminuído, a transmissão continua alta em populações específicas e o número de pessoas infectadas ainda é extremamente elevado (2).

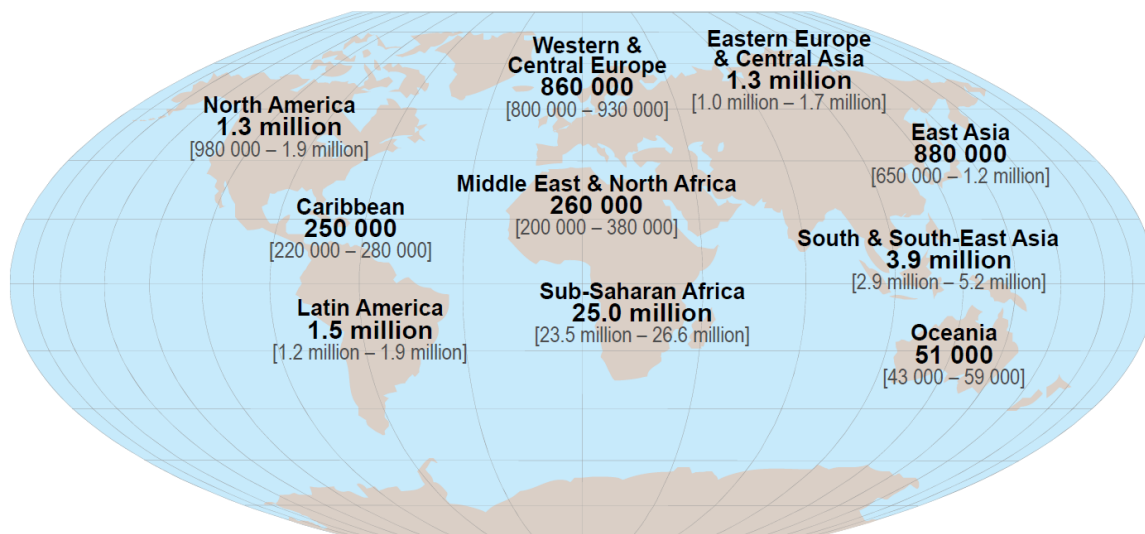
Segundo estimativas da UNAIDS (1), aproximadamente 35 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV em 2012 (Figura 1) incluindo três milhões de crianças (menores de 15 anos). A maioria dos casos está localizada na África Subsaariana, com aproximadamente 25 milhões de casos, seguida pelo Sul e Sudeste Asiático com 3,9 milhões de infecções. Na América Latina a estimativa é de 1,5 milhão de pessoas infectadas (3).

No ano de 2012 estima-se que ocorreram 2,3 milhões de novas infecções e 1,6 milhão de mortes por causas relacionadas à aids. Embora esses números sejam bastante elevados, essa é a menor taxa de novos casos registrada desde a segunda metade da década de 1990, quando anualmente 3,5 milhões de pessoas eram infectadas. Foi observada uma queda de 33% de novas infecções comparada a 2001 e de 29% em mortes relacionadas à aids desde 2005. Em crianças, essa redução da transmissão foi ainda maior, 52% em relação a 2001. Apesar dessa redução global na taxa de transmissão, a incidência entre homens que fazem sexo com homem tem aumentado em diversos locais, incluindo a Ásia, onde essa via de transmissão é a maior contribuinte para a epidemia de HIV em diferentes países. Globalmente, é estimada uma probabilidade de estar infectado 13 vezes maior para esse grupo do que para a população geral (2).

Além disso, o número de pessoas infectadas com acesso a terapia subiu 40 vezes na última década. No entanto, segundo as diretrizes de tratamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2013, a cobertura do tratamento em



países com baixa e média-renda representa apenas 34% (32-37%) das 28,6 milhões de pessoas elegíveis (2).

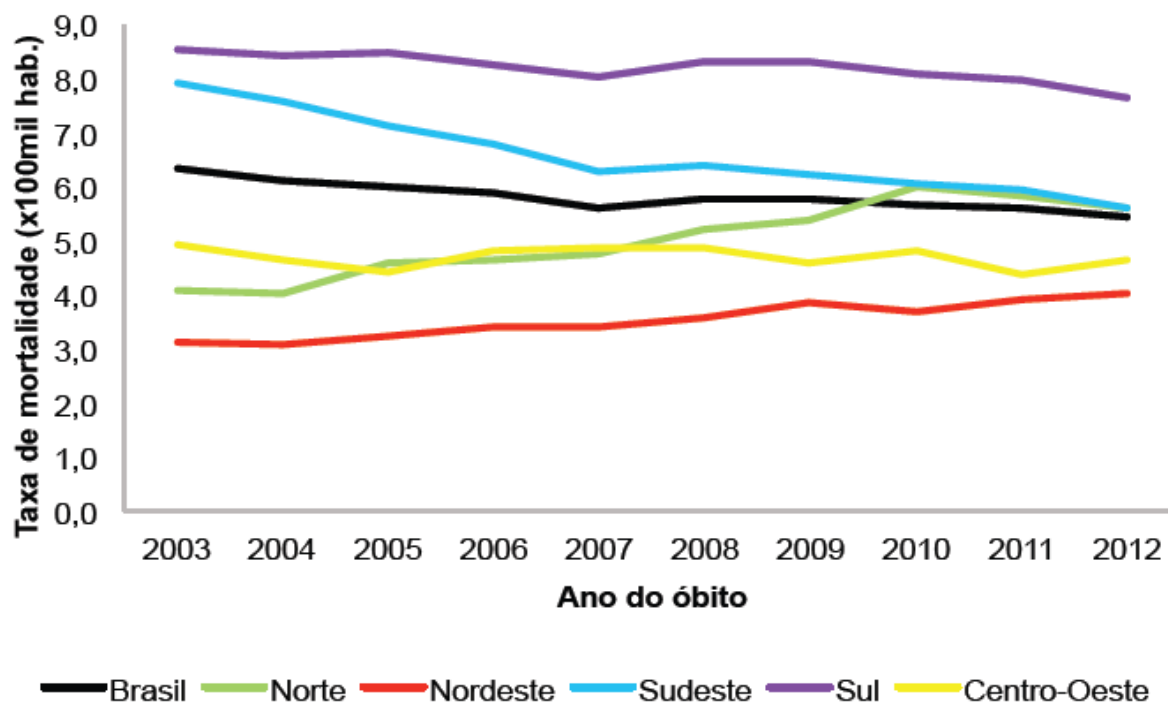


**Figura 1 Estimativa do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 em 2012.**

Fonte: Epidemic Slides UNAIDS 2013. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourepidemic/epidemiologypublications/>

No Brasil estima-se que 718 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV-1, o que representa uma taxa de prevalência de 0,4%. Na população jovem, essa taxa apresenta tendência de aumento. Segundo pesquisas realizadas com recrutas do exército brasileiro de 17 a 21 anos, a prevalência da infecção passou de 0,09% em 2002 para 0,12% em 2007, sendo que o aumento significativo ocorreu na população de HSH (homem que faz sexo com homem) jovens, cuja prevalência subiu de 0,56% em 2002 para 1,2% em 2007 (3).

No ano de 2012, foram declarados em torno de 12 mil mortes relacionadas a aids (coeficiente de mortalidade de 5,5 por 100.000 habitantes). O maior coeficiente de mortalidade foi observado na região Sul (7,7), seguida pela Norte e Sudeste (5,6), Centro-Oeste (4,7) e Nordeste (4,0). Nos últimos dez anos observou-se uma queda na taxa de mortalidade em torno de 14% no Brasil. No entanto, discrepâncias são observadas entre as regiões, tais como: elevação nas regiões Norte (60,0%), Nordeste (33,3%) e Centro-Oeste (4,4%) e redução nas regiões Sudeste (31,7%) e Sul (7,2%) (Figura 2) (3).



**Figura 2 Taxa de mortalidade (padronizada\*) por aids segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2003 a 2012.**

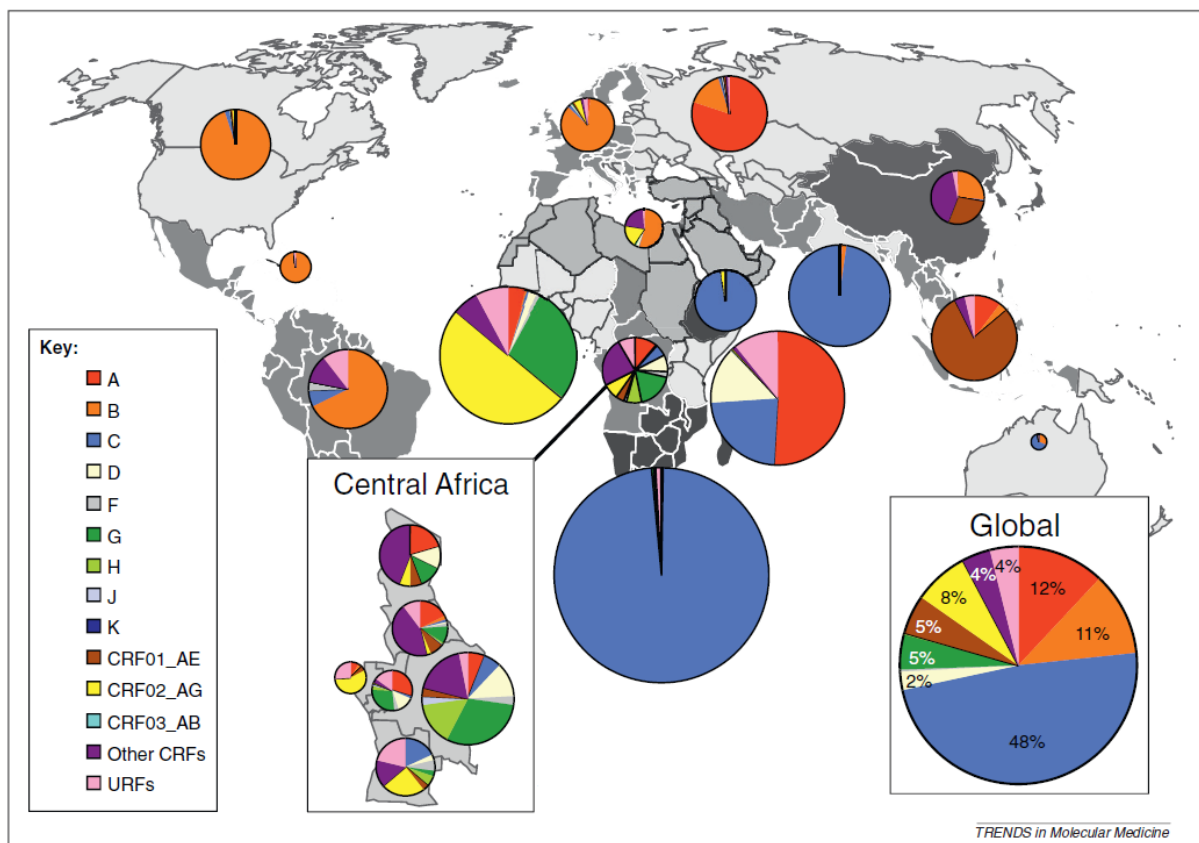
Fonte: MS/SVS/DASIS/Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Nota: (\*) Coeficiente padronizado pelo método direto, utilizando como base a população do censo do Brasil em 2000. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2013>

Em relação ao tratamento, em 2012, 313 mil indivíduos estavam em terapia antirretroviral (TARV). Esse número mais que dobrou nos últimos 10 anos, em 2002, 125 mil indivíduos infectados estavam em TARV. Apesar do aumento, o número de pessoas com indicação para a TARV, que não estão em tratamento, ainda é elevado. Em 2012, 65% dos indivíduos com a contagem de células T CD4<sup>+</sup> inferior a 350 células/mm<sup>3</sup> estavam em tratamento, ou seja, 70 mil de 108 mil, o que indica uma falta de cobertura terapêutica de 38 mil indivíduos. Considerando o ponto de corte do consenso lançado em setembro de 2012, de 500 células/mm<sup>3</sup>, esse número aumentaria para 63 mil indivíduos (3). Atualmente o Ministério da Saúde recomenda o tratamento de todos os indivíduos infectados pelo HIV-1, independente da contagem de células T CD4<sup>+</sup>, na perspectiva da redução da transmissibilidade do HIV (4).

## 1.2 Epidemiologia molecular do HIV

O HIV é um retrovírus pertencente à família Retroviridae, a qual é caracterizada pela presença da enzima transcriptase reversa, e ao gênero

*Lentivirus*. O vírus é classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é subdividido em quatro grupos, M, N, O e P, sendo o grupo M o principal responsável pela pandemia. Dentro do grupo M são descritos nove subtipos, que são designados pelas letras A–D, F–H, J e K, além de formas recombinantes circulantes (CRF), até o momento já foram descritas 61 CRF (5), e formas recombinantes únicas (URF). Dados de 2004-2007 demonstraram uma alta prevalência do subtipo C, responsável por quase metade das infecções no mundo (48%), seguido pelos subtipos A (12%) e B (11%), CRF02\_AG (8%), CRF01\_AE (5%), subtipo G (5%) e D (2%). Os subtipos F, H, J e K foram encontrados em menos de 1% dos indivíduos infectados, enquanto outros CRF e URF representavam, cada um, 4% das infecções globais (6).



**Figura 3 Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes.**

Na figura maior, os gráficos de pizza representam a distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 no período de 2004-2007 em cada região. A superfície relativa de cada gráfico corresponde ao número de pessoas infectadas nessas regiões. Em destaque, estão a distribuição dos subtipos do HIV-1 nos países da África Central e a distribuição global dos subtipos, CRFs e URFs globalmente. Fonte: Hemelaar *et al.*, 2012 (7).

Na Figura 3 está representada a distribuição global dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1. É possível observar que a dispersão dos subtipos ocorreu de maneira heterogênea no globo. A maior diversidade é encontrada na região da

África Central, onde todos os subtipos e alguns CRF possuem representação. Nos seis países componentes dessa região, essa enorme diversidade está presente, no entanto, com variações dos subtipos prevalentes, como observado em destaque na Figura 3. No Oeste Africano, também é possível encontrar todos os subtipos, com dominância do CRF02\_AG e subtipo G. No Leste Africano, a maioria das infecções é devida ao subtipo A, seguida pelo subtipo C, D e URF. No extremo Sul Africano, Etiópia e Índia, a epidemia é quase exclusivamente causada pelo subtipo C. O subtipo B é dominante na América do Norte, Caribe, América Latina, Europa Central e Ocidental e Austrália. Na Europa Oriental e Ásia Central, os subtipos A e B são dominantes (6).

No Brasil, o subtipo B é predominante, seguido pelos subtipos F1, C, além de recombinantes BF1 e BC (8). A distribuição desses três subtipos não ocorreu de forma homogênea no país, com a existência de uma concentração do subtipo C na região Sul (Figura 4). Na região Sudeste, onde é observada a maior incidência dos casos de aids, o subtipo B é prevalente (63-84%), seguido pelo subtipo F1 (9-17%), recombinantes BF1 (5-11%), o subtipo C aparece em uma porcentagem baixa dos casos (<3%) (9-14). Nessa região já foram descritos quatro CRF, CRF28\_BF e CRF29\_BF em São Paulo (15), e CRF39\_BF e CRF40\_BF no Rio de Janeiro (16). Na região Sul, no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, o subtipo C é responsável por mais de 50% das infecções, seguido pelo subtipo B (20-30%), recombinantes BC (20-30%), incluindo o CRF31\_BC (17) e formas relacionadas, e subtipo F1 (2-9%) (18-21). Em contraste com os outros dois estados da região Sul, no Paraná o subtipo B apresenta-se como o mais prevalente (50-60%), seguido pelo subtipo C (20-30%), subtipo F1 (4-10%) e formas recombinantes BF1 ou BC (10%) (22-24).

Na região Nordeste, o subtipo B também é o mais frequente (77-91%), seguido por recombinantes BF1 (3-21%) e pelo subtipo F1 (0,5-5%) (25-27). No Centro-Oeste a frequência do subtipo B varia entre 70-90% dos casos, recombinantes BF representam aproximadamente 10% e o subtipo F1 ou C representam menos de 2% dos casos (28-30). Na região Norte, o subtipo B é o dominante (88%), seguido pelo subtipo F1 (8-9%) e recombinantes BF (3%) (31). É importante destacar que a presença do CRF02\_AG já foi descrita em diferentes regiões do Brasil, tais como Sudeste (12, 32), Nordeste (19) e Norte (31).

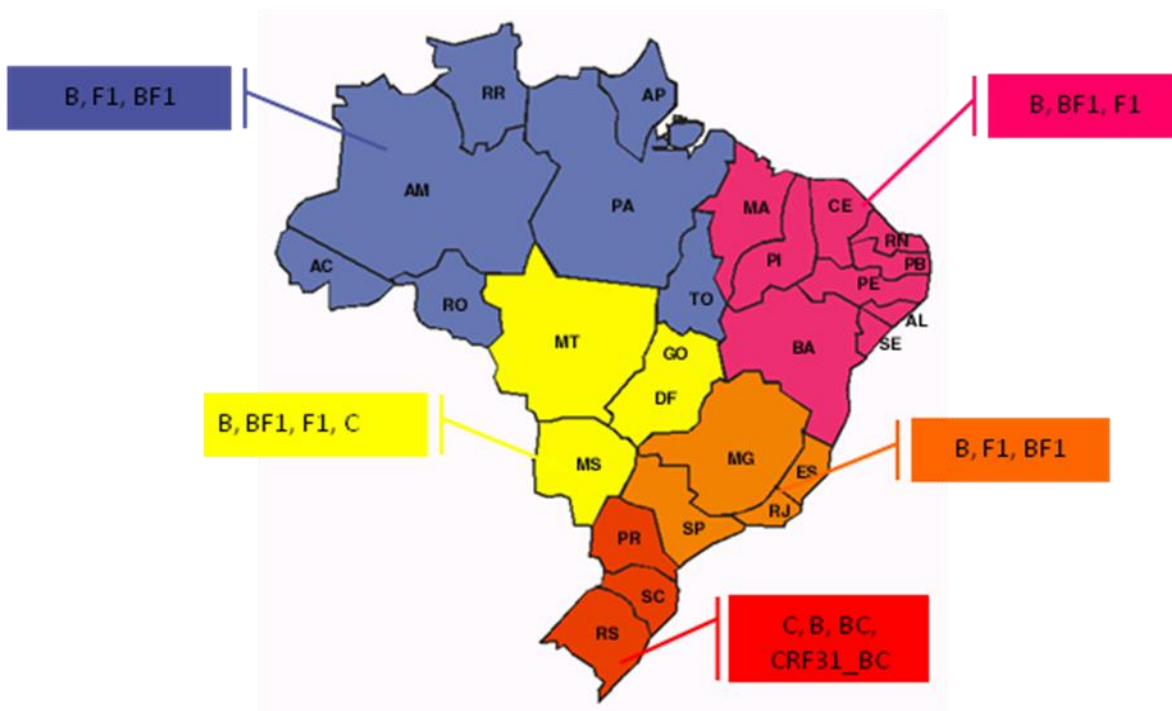


Figura 4 Distribuição dos subtipos mais prevalentes de HIV-1, por região, no Brasil.

### 1.3 Desenvolvimento de Vacinas anti HIV/Aids

Estudos demonstraram grande sucesso do uso da terapia antirretroviral (TARV) na redução das taxas de transmissão do HIV-1 (33, 34). No entanto, apesar da terapia ser capaz de induzir uma profunda supressão viral, a replicação viral persiste e a intensificação do esquema terapêutico não resulta na eliminação residual do vírus. A inflamação e ativação de células T permanecem elevadas e a contagem de células T CD4<sup>+</sup> frequentemente não atinge os níveis de normalidade (35-38). Além disso, o surgimento de resistência aos antirretrovirais, os efeitos colaterais cumulativos e os problemas de adesão ao tratamento, aliados ao alto custo da TARV, são fatores limitantes, apontando para a necessidade de outras estratégias no combate à pandemia. Uma das estratégias mais eficientes de combate às doenças infecciosas é a vacinação, no entanto, ainda não existe uma vacina capaz de prevenir a infecção pelo HIV-1, ou mesmo de impactar na progressão para a aids. Dentre as diversas dificuldades observadas, destacam-se a grande diversidade do HIV-1 e a falta de correlatos de imunidade que permitam orientar melhor o desenvolvimento de vacinas eficazes.

### 1.3.1 Testes clínicos de eficácia

Diferentes candidatas a vacinas contra o HIV-1 já foram testadas em primatas não humanos (NHP) e em humanos, em ensaios pré-clínicos e de fase I/II, respectivamente, mas apenas quatro destas evoluíram para testes clínicos de eficácia (fases IIb ou III), testando quatro estratégias vacinais (Tabela 1). Os dois primeiros testes, denominados VAX 003 e VAX 004, foram feitos com a proteína recombinante monomérica gp120 do envelope viral (39). O protocolo VAX 003 testou uma vacina bivalente usando a gp120 recombinante, derivada de isolados virais dos subtipos B e E (isolado virais MN e A244 CFR1\_AE), em usuários de drogas injetáveis na Tailândia. A vacina não foi capaz de prevenir a infecção ou afetar a progressão para a aids (40). Já o VAX 004 era composto apenas por proteínas derivadas do subtipo B (isolados virais GN08 e MN) e foi testado em grupos de homens que fazem sexo com homens (HSH) e mulheres com alto risco para transmissão heterossexual nos Estados Unidos, Canadá e Holanda. De forma semelhante, esse teste também não demonstrou proteção contra a infecção ou influenciou no controle da progressão para a doença (41).

**Tabela 1 Principais características e resultados dos ensaios clínicos de fase IIb/III realizados.**

Fonte: Adaptado de Excler *et al.*, 2014 (39).

Teste de vacina	Vacinas candidatas	Fase	Núm. de voluntários	Resposta imune alvo	Resultado
VAX 003	Proteína: rgp120	III	2500	Anticorpos	Sem eficácia
VAX 004	Proteína: rgp120	III	5400	Anticorpos	Sem eficácia
HVTN 502/Merck 023 (Step Trial)	Adenovírus tipo 5 (Ad5) gag/pol/nef	IIb	3000	Células T CD4 <sup>+</sup> e células T CD8 <sup>+</sup>	Sem eficácia
HVTN 503 (Phambili Trial)	Ad5 gag/pol/nef	IIb	3000	Células T CD4 <sup>+</sup> e células T CD8 <sup>+</sup>	Sem eficácia
RV144	Pox/proteína ALVAC/rgp120	III	16403	Anticorpos e células T CD4 <sup>+</sup> e células T CD8 <sup>+</sup>	31% de eficácia
HVTN 505	DNA-Ad5 gag/pol/nef/env	IIb	2504	Anticorpos e células T CD4 <sup>+</sup> e células T CD8 <sup>+</sup>	Sem eficácia

A falta de eficácia dos dois primeiros testes com proteínas recombinantes do envelope viral, aliada a estudos que apontavam para um papel importante de células T CD8<sup>+</sup> na resposta imune frente ao vírus (42-44), levou ao desenvolvimento de

desenhos vacinais com o objetivo de estimular a resposta de células T. Os primeiros testes de eficácia conduzidos, usando essa abordagem foram o HVTN 502/Merck (*Step Trial*) e o HVTN 503 (*Phambili Trial*). Ambos os testes foram conduzidos com a vacina candidata MRKAd5 HIV-1 da Merck, que era uma mistura de partes iguais de três vetores de Ad5 com replicação defectiva, MRKAd5gag, MRKAd5pol, e MRKAd5nef, expressando o gene *gag* do isolado CAM-1, o gene *pol* do isolado IIB e o gene *nef* do isolado JR-FL, respectivamente, sendo todos do subtipo B (45, 46). O *Step Trial* foi conduzido principalmente em populações de alto risco de infecção, incluindo HSH e homens e mulheres heterossexuais, em regiões onde o subtipo B é prevalente (América do Norte, Caribe, América do Sul e Austrália), enquanto o *Phambili Trial* foi conduzido na África do Sul, onde o subtipo C é o mais frequente e incluiu homens e mulheres heterossexuais. O *Step Trial* foi interrompido em 2007, quando análises preliminares demonstraram que a vacina não foi capaz de impedir a infecção ou reduzir a carga viral nos indivíduos infectados e a observação de um número maior de infecções no grupo vacinado do que no grupo placebo. Esse efeito foi limitado ao grupo de homens não circuncidados e/ou soropositivos para o Ad5 em análises multivariadas, sendo observada uma redução na taxa de risco associada à vacina após 18 meses de acompanhamento (45, 47). Esses resultados levaram a interrupção do *Phambili Trial*, onde os grupos de vacinados e placebos foram revelados e as análises de eficácia subsequentes também não encontraram nenhum efeito protetor da vacina (46). Apesar da vacina não ser capaz de induzir proteção contra a infecção, análises posteriores do *Step Trial* demonstraram que indivíduos que apresentavam uma resposta de célula T, induzida pela vacina, contra três ou mais peptídeos de Gag tinham carga viral menor que indivíduos que não apresentavam respostas frente à Gag (48).

Em 2009 foram divulgados os resultados do teste clínico de fase III RV144 (*Thai Trial*), que tinha como objetivo induzir tanto a produção de anticorpos como a resposta de células T. Apesar da baixa eficácia demonstrada, 31,2%, essa foi a primeira evidência que uma vacina pode proteger contra a infecção pelo HIV-1. O teste consistiu em um regime de *prime-boost*, usando como *prime* um vetor recombinante de canarypox, ALVAC-HIV (vCP1521, expressando *gag*, *protease* subtipo B [isolado viral LAI] e gp120 CRF01\_AE, subtipo E [isolado viral 92TH023] ligada a gp41 subtipo B [isolado viral LAI]) e como *boost* uma vacina bivalente, AIDSVAX (gp120 CRF01\_AE, subtipo E [isolado viral A244] e subtipo B [isolado viral

MNJ]. Para este ensaio foram recrutados 16.402 indivíduos, incluindo homens e mulheres entre 18 e 30 anos, com risco principalmente de transmissão heterossexual em duas províncias da Tailândia (49). As análises de correlatos de imunidade encontraram que a ligação de anticorpos IgG específicos para as regiões variáveis 1 e 2 (V1V2) de Env correlacionava-se inversamente com a taxa de infecção pelo HIV-1, enquanto a ligação de anticorpos IgA a Env estava diretamente correlacionada com a taxa de infecção (50). Posteriormente, foi observado que a taxa IgA/IgG específica para Env estava diretamente correlacionada com o risco de infecção e que anticorpos IgA anti-Env, produzidos em resposta a vacina, inibiam a ligação e bloqueavam a função ADCC de anticorpos IgG induzidos pela vacina, que compartilhavam o mesmo epítipo (51).

O último teste clínico de vacina anti-HIV-1 de fase IIb com resultados divulgados foi o HVTN 505 com a vacina DNA/ rAd5. Esse teste também foi baseado em um regime de *prime-boost*. O teste usou como *prime* uma vacina de DNA que consistia de seis plasmídeos circulares cada um expressando individualmente *gag*, *pol* e *nef* subtipo B (isolado viral HXB2 ou NL4-3) e Env subtipo A (isolado viral 92rw020), B (isolado viral HXB2) e C (isolado viral 97ZA012) e *boost* com uma combinação de quatro vetores de rAd5 expressando *gag-pol* subtipo B (isolado viral HXB2 e NL4-3) e *env* subtipo A (isolado viral 92rw020), B (isolado viral HXB2) e C (isolado viral 97ZA012). Em 2013 o teste foi interrompido por falta de eficácia, pois a vacina não foi capaz de diminuir a taxa de infecção pelo HIV-1 ou a carga viral dos indivíduos infectados. Apesar de não induzir proteção, análises de imunogenicidade demonstraram que a vacina foi capaz de estimular uma resposta de células T e a produção de anticorpos. No entanto, a resposta IgG específica frente a V1-V2 foi baixa quando comparada aos resultados obtidos no teste clínico RV144 (52).

### **1.3.2 Estratégias para a redução da diversidade genética do HIV-1 em desenhos vacinais**

A falta de eficácia dos testes clínicos de vacinas anti-HIV/aids, destacada acima, é reflexo de diferentes fatores que atuam como obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina. Entre esses fatores, pode-se citar: a extraordinária diversidade genética do HIV-1, a capacidade do vírus evadir a resposta imune, a incapacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes com ampla

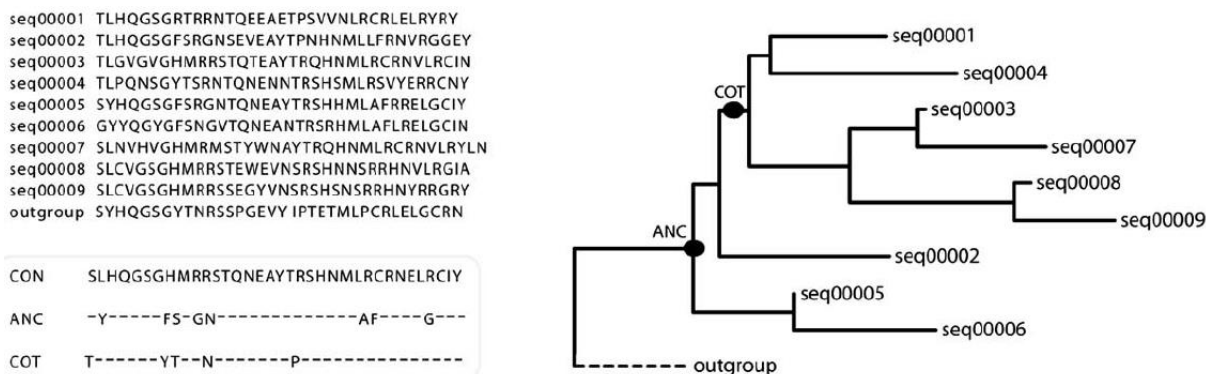


reatividade e a falta de correlatos de proteção imune bem definidos que possam guiar um desenho mais racional de vacinas (53). A diversidade genética tem sido apontada como um dos maiores desafios. Em um mesmo subtipo a diferença pode ser na ordem de 15–20%, enquanto a variação entre subtipos é aproximadamente 25–35%, dependendo da região genômica analisada (54).

Diante da enorme variabilidade do HIV-1, diferentes estratégias têm sido utilizadas com objetivo de diminuir o impacto da diversidade genética na formulação de uma vacina capaz de estimular uma resposta protetora contra diferentes variantes virais. Entre essas estratégias, pode-se citar: sequências centrais (consenso, ancestral e centro-da-árvore) (55), mosaicos (56) e sequências conservadas (57). As sequências centrais (Figura 5) são sequências artificiais desenhadas para reduzir a distância genética entre o imunógeno e os vírus circulantes. Esse conceito é baseado no fato de que essas sequências apresentam aproximadamente metade da distância genética que é observada entre duas sequências circulantes, podendo assim estimular uma resposta imune com reatividade cruzada maior do que imunógenos derivados de um isolado viral. A forma mais comum de obtenção de sequências centrais é o uso de uma sequência consenso (CON), a qual é baseada no aminoácido ou nucleotídeo mais frequente em cada posição de um alinhamento de sequências. Outras duas estratégias para obtenção de sequências centrais utilizam modelos evolutivos: sequência ancestral (MRCA- *Most Recent Common Ancestor*), que representa o ancestral comum mais recente, definido por um nó na base de um grupo em uma árvore filogenética; sequência centro da árvore (COT), que é o ponto da menor média da distância genética para outras sequências na árvore (55, 58). A biologia do HIV-1 origina uma filogenia com formato similar a uma estrela e como consequência as três estratégias para geração de sequências centrais geram sequências similares, no entanto, elas podem diferir de 1% a 5% e são influenciadas pelo conjunto de sequências que é utilizado para sua construção (58).

Os antígenos mosaicos são construídos baseados em algoritmos que fazem uma recombinação homóloga *in silico* de sequências naturais e são otimizados para incluir potenciais epítomos mais frequentes e excluir epítomos raros, aumentando assim a cobertura imunogênica (56). O uso de sequências conservadas consiste no desenho de imunógenos baseados em regiões que são altamente conservadas em diferentes subtipos do HIV-1, gerando proteínas quiméricas que tem como objetivo

estimular a resposta contra regiões onde mutações de escape possuem alto custo adaptativo (57).



**Figura 5 Esquema demonstrando seqüências centrais.** Consenso (CON), Ancestral (ANC) e Centro-da-árvore (COT). Fonte: Arenas *et al.*, 2010 (59).

As seqüências centrais, principalmente seqüências consenso, têm sido amplamente utilizadas para o desenho de antígenos vacinais e estudos de avaliação da resposta imune. No entanto, essas seqüências são artificiais, ou seja, não correspondem a um vírus existente, desta foram diferentes estudos têm sido conduzidos para caracterizar melhor o seu potencial imunogênico em diferentes populações, bem como a sua expressão e funções biológicas em modelos animais. A estratégia consenso foi inicialmente testada em um trabalho de Gao e col. (60), no qual foram construídos plasmídeos do gene *env* baseado no consenso do grupo M, denominado CON6. Foi observado que proteínas derivadas de CON6 preservavam epítomos conformacionais, que eram reconhecidos por anticorpos do soro de indivíduos infectados pelo HIV-1, com diferentes subtipos. O CON6 conferiu infectividade ao HIV-1/SG3Δenv, quando cotransfectados em células 293T. O CON6 também foi usado em uma vacina de DNA, seguida por um *boost* com vírus vaccínia recombinante, expressando CON6, em camundongos BALB/c e estimulou uma resposta de células T capaz de responder contra epítomos derivados tanto do CON6, como do isolado MN (subtipo B) e Chn19 (subtipo C).

Um estudo posterior comparou uma vacina derivada de CON6 com vacinas derivadas de isolados primários dos subtipos A, B e C em camundongos de diferentes linhagens. Na avaliação da resposta de células T frente a peptídeos derivados do mesmo subtipo usado na vacina, a resposta estimulada por CON6 foi similar a observada para os isolados, no entanto, quando foi avaliada a resposta intersubtipo, a resposta a CON6 foi significativamente maior do que para os isolados

virais (61). A estratégia de sequência consenso do grupo M também foi utilizada para construir outro gene *env*, denominado CONS, que demonstrou ser funcional. O CONS foi utilizado para imunizar porquinhos da Índia (*guinea pigs*) e macacos rhesus e foi capaz de estimular uma resposta de anticorpos neutralizantes de amplitude similar ou maior do que a observada para vacina baseada em isolados virais dos subtipos A, B e C e com títulos de neutralização, em geral, maiores do que o observado para os isolados virais (62, 63). Além do consenso do grupo M, diferentes sequências consenso referentes a um subtipo específico já foram testadas e demonstraram um potencial imunogênico maior que o observado para vacinas derivadas de isolados virais (64, 65), esses consensos específicos para um determinado subtipo podem ser úteis para regiões onde apenas um subtipo circula ou é altamente prevalente, como o subtipo B nos Estados Unidos e no Canadá e o subtipo C na África do Sul (7). No entanto, é importante destacar que em algumas regiões a diversidade de subtipos circulantes de HIV-1 é alta, como na África Central (7), além da mobilidade da população que pode levar a introdução de novos subtipos virais em diferentes regiões.

No contexto do desenho de reagentes para avaliação de respostas induzidas por uma vacina, espera-se que reagentes baseados em sequências centrais sejam capazes de detectar repostas estimuladas por protótipos vacinais de diferentes subtipos do HIV-1. Além disso, essas sequências têm sido amplamente utilizadas para o estudo da resposta imune em diferentes populações, uma vez que uma melhor caracterização de regiões do genoma viral altamente imunogênicas também é necessária para a formulação de vacinas. Nessa linha, diversos estudos têm avaliado a resposta imune frente a peptídeos baseados em sequências centrais, usando coortes de indivíduos infectados com diferentes subtipos do HIV-1 em diferentes regiões e, enquanto em alguns casos foi demonstrada uma alta reatividade cruzada, em outros esse perfil de resposta não foi observado. Indivíduos infectados pelo subtipo B (Estados Unidos) foram capazes de responder de forma similar ao CON A, CON B e CON C (66). Outro estudo avaliando a resposta frente ao CON B, ANC B, COT B e CON C também encontrou níveis similares de reatividade, no entanto, a resposta frente ao CON A e CON M foi menor (67, 68). A reatividade frente ao consenso C em indivíduos infectados pelo subtipo B também foi observada em uma coorte de chineses (69).

Uma menor reatividade ao grupo M também foi observada, no mesmo estudo, em indivíduos do Peru infectados pelo subtipo B, mas não de Barbados. Por outro lado, indivíduos infectados pelo subtipo C (África do Sul e Zâmbia) apresentaram níveis similares de respostas de células T frente a peptídeos derivados do consenso C e do grupo M, mas a resposta frente ao consenso B foi reduzida (68, 70). Essa reatividade ao consenso do grupo M também foi encontrada em indivíduos infectados pelo subtipo A ou D (Uganda) (71), subtipo B e recombinantes BF (Brasil) (72). Outro estudo reforçou a baixa reatividade de células T de indivíduos infectados pelo subtipo C (África do Sul) frente ao consenso B (30%), essa reatividade também foi baixa frente ao consenso A (34%) e uma maior reatividade foi observada frente ao consenso D (48%) (73).

Ao contrário do observado para indivíduos do subtipo C, japoneses infectados por formas recombinantes A/E apresentaram resposta frente a peptídeos do consenso B de magnitude similar ao observado em japoneses infectados com subtipo B (74). A reatividade cruzada entre os subtipos A e D também foi avaliada, um estudo conduzido com amostras de Uganda, principalmente em indivíduos infectados pelo subtipo A ou D demonstrou aproximadamente 50% das respostas detectadas frente à Gag foram detectadas usando peptídeos baseados tanto no consenso A como no consenso D (75).

Além das limitações associadas à diversidade viral para o desenvolvimento de vacinas, a falta de parâmetros associados à cura é também um fator limitante na definição dos aspectos imunológicos que possam estar associados à proteção. Assim, a busca de conhecimento através da análise detalhada da patogênese da infecção pelo HIV em indivíduos com diferentes perfis de evolução para a aids, incluindo aqueles capazes de controlar a replicação viral e/ou a evolução para doença, é de grande relevância e tem sido amplamente explorada na literatura.

## **1.4 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1**

A molécula CD4 é o receptor principal usado pelo HIV-1 para infectar células alvos, além dessa molécula, o vírus também necessita de se ligar a coreceptores na superfície celular, sendo os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 os mais comuns. A ligação a essa molécula permite a infecção não só de células T CD4+

como também outras células que desempenham um papel central no processo de apresentação de antígenos, como os macrófagos e células dendríticas (76).

Uma das principais características da infecção pelo HIV-1 é a depleção das células T CD4<sup>+</sup>. Essa depleção foi inicialmente descrita como um processo gradual que culminava no surgimento da aids em indivíduos infectados, sem tratamento, dentro de oito a dez anos após a infecção (77). Experimentos iniciais com vírus isolados de amostras de tecidos demonstraram o tropismo do HIV por células T CD4<sup>+</sup>, com um extenso efeito citopático (78). Junto a essa observação, pacientes infectados com o HIV apresentavam uma profunda linfopenia (79), levando a hipótese de que ocorreria uma destruição massiva de células T CD4<sup>+</sup> *in vivo* por ação direta do vírus. Essa hipótese foi reforçada por experimentos que demonstravam uma produção diária de  $10 \times 10^9$  vírions (80-82) e a observação de que o tratamento de pacientes, em estágio avançado da doença, com inibidores de protease levava a uma queda na carga viral e um aumento na contagem de células T CD4<sup>+</sup> (83). Considerando que a terapia não alterava a produção de células T CD4<sup>+</sup>, chegou-se a conclusão de que rodadas contínuas de novas infecções sustentavam a carga viral e que  $2 \times 10^9$  células T CD4<sup>+</sup> infectadas eram destruídas por dia (84).

Além disso, os estudos demonstraram que em indivíduos infectados a fração de células T CD4<sup>+</sup> se dividindo era 2-3 vezes maior que em indivíduos não infectados, com a maioria da proliferação concentrada na população de células T de memória efetora CD45RO<sup>+</sup> (85, 86). Uma vez que a divisão celular deve ser balanceada pela morte celular, considerando um estágio de equilíbrio, esses resultados reforçaram a ideia de que a infecção levava a um processo constante de produção e destruição de células alvo. Dessa forma, a doença foi caracterizada por apresentar uma produção elevada de novos vírions que levava a uma expressiva destruição de células T CD4<sup>+</sup> e consequente exaustão do sistema imune (84).

No entanto, algumas observações apontavam para inconsistências nesse modelo. O número de células se dividindo e morrendo é bem maior que o número de células infectadas (87, 88). O HIV infecta preferencialmente células T CD4<sup>+</sup> ativadas, sendo que a maioria dessas células está destinada a morrer, independente da infecção, como consequência inerente do processo de ativação (89, 90), as taxas de divisão e a morte de células T CD8<sup>+</sup> também são elevadas (85, 91). Além disso, a infecção natural do vírus da imunodeficiência Símia (SIV) em sooty mangabey não

resulta no desenvolvimento da aids, mesmo na presença de uma carga viral elevada (92). Dessa forma, o conceito que a progressão da doença resulta da destruição progressiva de células T CD4<sup>+</sup>, mediada por ação direta do vírus foi colocado em questão, apontando para uma interação mais complexa entre o sistema imune e os efeitos diretos e indiretos da replicação viral (93).

Diferentes observações levaram a hipótese de um papel central da ativação imune na depleção de células T CD4<sup>+</sup> e na progressão da doença. Foi observada concentrações maiores de marcadores sorológicos de ativação,  $\beta$ 2-microglobulina e neopterin, TNFR2, entre outros, e maior expressão de marcadores de ativação celular, como CD38 e HLA-DR, em indivíduos infectados pelo HIV em comparação a indivíduos não infectados. Além disso, esses marcadores se correlacionavam diretamente com o tempo de progressão para doença, sobrevivência e depleção de células T CD4<sup>+</sup> (94-99). A importância da ativação imune na patologia da doença foi reforçada pela demonstração de um nível baixo de ativação imune em *Sooty mangabeys* (SM), hospedeiros naturais do SIV, que apesar de apresentarem uma carga viral elevada, não progridem para aids (92).

Durante a infecção crônica pelo HIV, a ativação imune é observada como um conjunto de estados alterados do sistema imune, incluindo o aumento do *turnover* celular, o aumento de linfócitos T e B com perfil fenotípico de célula ativada e o aumento da concentração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no soro (100). Entre os diferentes marcadores de ativação, o mais amplamente caracterizado é a expressão de CD38 e/ou HLA-DR em células T, a qual é apontada como um importante fator prognóstico na infecção pelo HIV-1 (36, 101). Um estudo inicial, demonstrou que o aumento células T CD8<sup>+</sup> expressando CD38 e/ou HLA-DR em indivíduos infectados pelo HIV em comparação com indivíduos não infectados e o aumento da expressão desses marcadores foi associado com a queda de células T CD4<sup>+</sup> e o desenvolvimento da aids (102). Outros estudos reforçaram a associação desses marcadores com o desenvolvimento, gravidade da doença e mortalidade (103-107). Além disso, uma elevada expressão dessas moléculas foi observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 com baixo ganho de células T CD4<sup>+</sup> em resposta a terapia antirretroviral (36) e associado ao desenvolvimento de morbidades não relacionadas a aids, como doença arterial coronariana (101, 108).

Os mecanismos que culminam na elevada ativação imune durante a infecção pelo HIV-1 ainda não são claros, é provável que fatores específicos contribuam de

forma distinta para esse fenômeno em diferentes grupos de indivíduos infectados (109). No entanto, diversas evidências sugerem que processos-chaves, que levam a elevada ativação imune associada ao HIV-1, iniciem logo nos primeiros dias de infecção (110). A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre por contato sexual, através da exposição da mucosa genital e/ou mucosa retal. Após transpor a barreira epitelial, o principal sítio de replicação do HIV-1 é a mucosa gastrointestinal (111). Na mucosa gastrointestinal está localizada a maioria dos linfócitos do corpo, enquanto o sangue periférico contém apenas 2-5% dessas células (112). Além disso, certas características desse compartimento criam um ambiente extremamente adequado para infecção e replicação do HIV-1: grande parte das células T CD4<sup>+</sup> na mucosa são células de memória efectoras que expressam o coreceptor de quimiocina CCR5 (113); a mucosa é mantida em um estado fisiológico de inflamação caracterizado por uma alta produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (114).

Estudos com macacos rhesus demonstraram que logo nas primeiras semanas de infecção pelo SIV, as células T CD4<sup>+</sup> da mucosa gastrointestinal são quase completamente depletadas (115-117). A extensa perda de células T CD4<sup>+</sup> na mucosa gastrointestinal também foi observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 (111, 118, 119). Além disso, foi observado que a extensão da depleção dessas células na mucosa gastrointestinal, em macacos rhesus infectados com SIV patogênico, determinava a velocidade de progressão para aids (120). Isso levou a hipótese de que a injúria ao tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal (GALT), junto com o dano ao microambiente epitelial intestinal poderia resultar na ativação imune sistêmica observada na infecção pelo HIV-1, através do aumento da translocação de produtos microbianos do lúmen para a circulação (121).

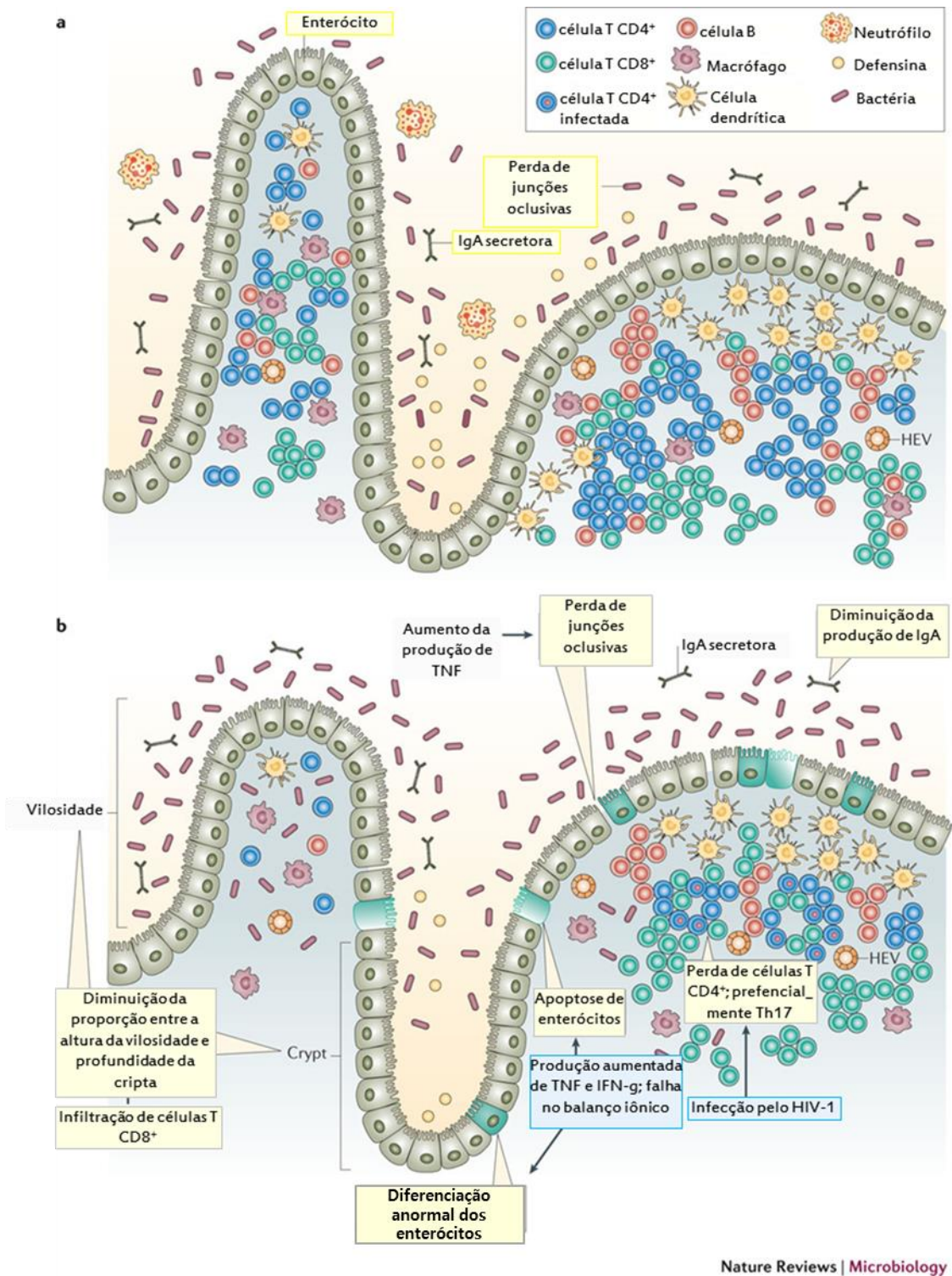
A primeira evidência dessa relação foi feita em um estudo comparando os níveis de LPS no plasma de indivíduos não infectados pelo HIV-1 com indivíduos infectados, em diferentes estágios da infecção, e os níveis de LPS em macacos rhesus antes e após a infecção pelo SIV. Indivíduos na fase crônica e na fase de aids apresentaram níveis mais altos de LPS que indivíduos não infectados ou indivíduos na fase aguda. O aumento da concentração de LPS no plasma também foi observado em macacos rhesus após a infecção pelo SIV. Para comprovar que o aumento do LPS no plasma era devido à translocação de produtos microbianos provenientes do trato gastrointestinal, esses animais foram submetidos a um regime de antibióticos para induzir “esterilização intestinal”. O tratamento foi capaz de

reduzir os níveis de LPS no plasma e paralelamente a quantidade de bactérias gram-negativas nas fezes, sugerindo que a origem do LPS no plasma de macacos infectados pelo SIV e por inferência, de humanos infectados pelo HIV-1 era a translocação de produtos microbianos do trato gastrointestinal. Além disso, foi demonstrada uma correlação positiva entre a concentração de LPS no plasma com a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> e a concentração de IFN- $\alpha$  no plasma, confirmando o efeito da translocação microbiana na indução da ativação imune (121). Diversos estudos subsequentes reforçaram o papel da translocação microbiana na indução da ativação imune e evidenciaram o elevado dano a mucosa gastrointestinal (Figura 6), com massiva depleção de células T CD4<sup>+</sup>, depleção preferencial de células Th17, apoptose de enterócitos, diminuição da produção de IgA, perda de junções oclusivas, entre outros (110).

A determinação da concentração de LPS no plasma para avaliar a translocação microbiana é amplamente utilizada, no entanto, alguns estudos não foram capazes de demonstrar uma associação entre os níveis altos de LPS e a infecção pelo HIV-1, a discrepância desses resultados pode ser explicada por diferentes fatores: número de amostras, diferenças no tipo de amostra (plasma *versus* soro), coleta e processamento, diferentes técnicas de quantificação, inibição ou degradação do LPS por proteínas e enzimas circulantes, entre outros. Ao contrário, todos estudos encontraram níveis aumentados de CD14 solúvel (sCD14) em indivíduos infectados pelo HIV-1 (110).

O sCD14 é secretado por células da imunidade inata como monócitos e macrófagos em resposta ao LPS. Ele se liga ao complexo LPS/proteína ligadora de LPS (LBP), servindo assim como um marcador da ativação de monócitos e/ou macrófagos (122). Além disso, um recente estudo, avaliando a associação entre marcadores de translocação microbiana (LPS, sCD14, I-FABP, EndoCAb, 16S rDNA) e diferentes desfechos clínicos, demonstrou que a concentração de sCD14 é um marcador prognóstico independente de mortalidade na infecção pelo HIV-1 (123), reforçando assim o uso dessa molécula como um marcador importante na progressão para a aids.





**Figura 6** Desenho esquemático do epitélio intestinal na ausência (a) e presença do HIV-1 (b).  
 Fonte: Sandler e Douek, 2012 (110).

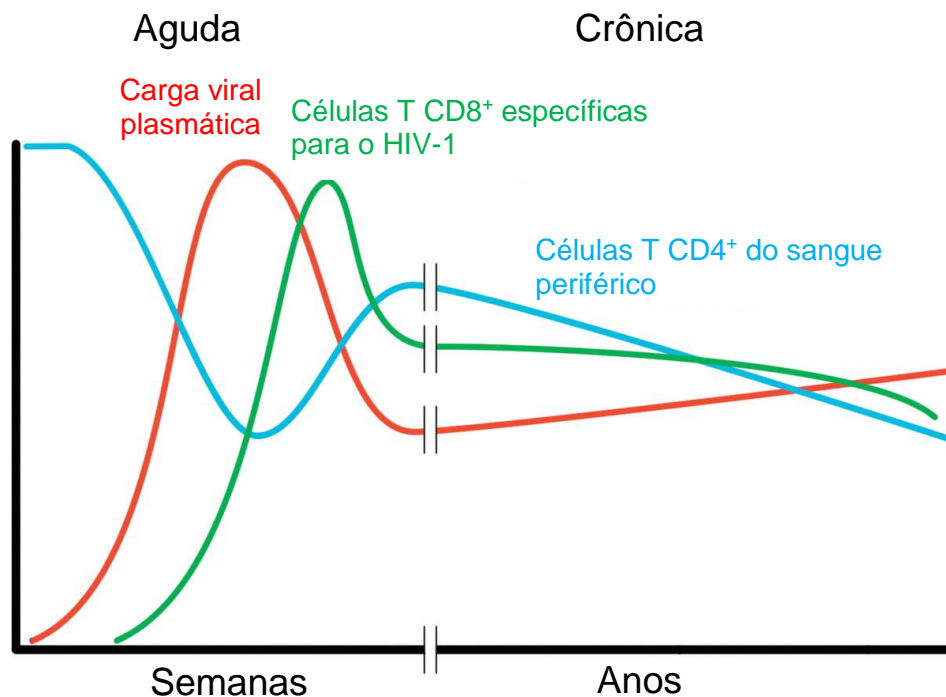
## 1.5 Controladores da replicação viral e evolução para a aids

A patogênese da infecção pelo HIV-1 é determinada por um balanço entre fatores virais e do hospedeiro. A capacidade replicativa do vírus e seu tropismo celular podem ter impacto na velocidade de progressão para a doença. Além disso, o vírus necessita de diversos fatores celulares para completar seu ciclo replicativo, o que o coloca diante do desafio de se evadir de fatores celulares intrínsecos capazes de inibir a replicação viral. Ao mesmo tempo, no hospedeiro a resposta imune contra o vírus é ativada, envolvendo tanto componentes da imunidade inata quanto adaptativa, na tentativa de deter a infecção. Um melhor entendimento de como esse processo funciona é essencial para o desenho de uma vacina e o desenvolvimento de estratégias para a cura funcional. Nesse contexto, a definição dos fatores associados à proteção contra a infecção e/ou doença é essencial e um raro grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1, que naturalmente controla a replicação viral, denominado controladores de elite (EC) e controladores virêmicos (VC), têm sido alvo de diversos estudos na busca de correlatos de proteção (124).

Na maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1, que não recebe tratamento antirretroviral, a infecção segue o padrão ilustrado na Figura 7. A infecção aguda tem duração de poucas semanas e em geral é assintomática ou com sintomas não específicos, similares a uma gripe. Essa fase é associada com uma elevada carga viral plasmática e uma queda acentuada de células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico, ocorrendo o surgimento de uma resposta imune específica para o HIV-1, que é seguida por uma queda na carga viral plasmática até um valor denominado *set point* viral. Essa queda na carga viral é acompanhada por um aumento parcial na contagem de células T CD4<sup>+</sup>, marcando assim o início da fase crônica da infecção, também denominada de fase de latência clínica, que dura em média 7-10 anos e é caracterizada por uma queda lenta e progressiva na contagem de células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico e um aumento lento da viremia plasmática, na ausência de terapia antirretroviral. Com o declínio das células T CD4<sup>+</sup> até níveis menores que 200 células/ $\mu$ L, surgem tumores e infecções oportunistas que caracterizam a fase de aids, que é acompanhada por um aumento acentuado da carga viral plasmática (90).

Esse perfil de progressão para a doença é observado em aproximadamente 80% dos indivíduos infectados pelo HIV-1, chamados de progressores típicos. Outro

grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 (10-15%) progridem para a aids em dois a três anos após a infecção aguda, sendo denominados progressores rápidos, por outro lado, em torno de 5%-10% dos indivíduos HIV-1 positivos apresentam mais de dez anos de infecção e não evoluem para a doença e são conhecidos como não progressores de longo termo (LTNP) (125).



**Figura 7 História Natural da infecção pelo HIV-1.**  
Fonte: Adaptado de Douek *et al.*, 2003 (90).

Os indivíduos LTNP foram identificados inicialmente pela ausência de sintomas associados a aids, após 10 anos ou mais de infecção em ausência de terapia antirretroviral, e pela contagem de células T CD4+ maior que 400 células/ $\mu$ L. Com o advento dos testes de quantificação da carga viral foi observado que uma parcela desses indivíduos era capaz de manter a carga viral em níveis baixos ou mesmo indetectáveis pelos testes laboratoriais disponíveis. Atualmente, indivíduos que apresentam a capacidade de controlar a replicação viral são divididos em dois grupos, já mencionados anteriormente: (1) controladores de elite, que representam menos de 1% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e são capazes de manter a carga viral indetectável pelos testes clínicos disponíveis e (2) controladores virêmicos, que representam aproximadamente 7% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e são

capazes de manter a carga viral menor que 2000 cópias de RNA viral/mL (126). No entanto, diferentes critérios de classificação são utilizados para definição de coortes de indivíduos controladores em estudos distintos, com variações quanto ao tempo de infecção ou diagnóstico, frequência de carga viral detectável (*blips*), valor de corte para carga viral nos controladores virêmicos, quantidade de medidas de carga viral disponível, entre outros, o que certamente tem impacto nos resultados observados com diferentes coortes de controladores.

Os fatores responsáveis pelo controle da infecção ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, as informações atualmente disponíveis indicam que esse fenômeno não é devido a presença ou ausência de um fator único e que, em geral, controladores de elite ou virêmicos são heterogêneos e possuem múltiplos mecanismos subjacentes que podem estar associados ao controle da replicação viral (127). Estudos iniciais apontaram para a presença de vírus defectivos em indivíduos que não evoluíram para a doença, sugerindo que deleções, particularmente em *nef* seriam responsáveis pela ausência de progressão para aids observada nesses pacientes (128-130). O caso mais conhecido é de uma coorte de seis indivíduos, *Sydney Blood Bank Cohort*, que receberam sangue de um doador infectado com um vírus que apresentava uma grande deleção (150 ou mais pares de bases) na região de *nef*-LTR (131) e permaneceram assintomáticos mesmo após 14-18 anos de infecção (132).

No entanto, estudos mais recentes com vírus isolados de EC não demonstraram alterações importantes nas sequências virais avaliadas (133) e o controle da infecção foi observado em indivíduos infectados com vírus de indivíduos que apresentavam progressão para a doença (134). Resultados controversos são apresentados em relação à capacidade replicativa de vírus isolados de controladores, enquanto em alguns estudos, os vírus isolados de EC de diferentes coortes apresentaram capacidade de replicação similar a demonstrada por isolados virais de referência, apesar de maior dificuldade de isolamento (135-137), outros estudos demonstram uma capacidade replicativa reduzida em quimeras ou clones de vírus isolados do plasma de controladores. No entanto, é importante ressaltar que alguns desses estudos encontraram correlação entre a capacidade replicativa reduzida e mutações em epítomos restritos por alelos protetores do HLA, o que leva a questão se a infecção com vírus apresentando mutações que tem impacto na

replicação viral é causa do controle observado nesses indivíduos ou consequência de uma resposta imune eficiente (138-142).

A presença de mutações nos genes dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 também é associada ao controle da replicação viral. A deleção de 32 pares de bases no gene *CCR5* (*CCR5*  $\Delta$ 32) é significativamente associada com a resistência à infecção e menor velocidade de progressão para a doença. Heterozigose para essa mutação é encontrada em aproximadamente 30% dos EC ou LTNP caucasianos e polimorfismos nesses receptores também foram estatisticamente associados ao controle da infecção pelo HIV-1 em um estudo de associação genômica ampla (GWAS) (143-146). Em um caso recente, que chamou grande atenção da comunidade científica e da mídia, um paciente com aids que recebeu um transplante de medula de um doador apresentando a mutação  $\Delta$ 32 para tratamento de um linfoma, foi posteriormente considerado “curado”, posto que não apresentava mais carga viral plasmática na ausência de terapia antirretroviral. Este caso ainda está sendo acompanhado, mas reforça a importância da molécula CCR5 como alvo de entrada do vírus na célula e seu papel para estratégias terapêuticas que possam levar à cura da aids (147).

Determinados alelos HLA são encontrados em maior frequência em indivíduos controladores do que em progressores. Um dos primeiros estudos a fornecer evidências dessa relação foi feito com um grupo de HSH, no qual se observou associação entre a presença de determinados alelos HLA - incluindo HLA-B\*27, HLA-B\*57, HLA-B\*35 - com a velocidade de progressão para a aids (148). Estudos posteriores confirmaram essa relação, demonstrando que existe uma maior frequência de determinados alelos, chamados “alelos protetores” (HLA-B\*57, HLA-B\*27 e HLA-B\*58:01) em grupos de indivíduos infectados pelo HIV-1 controladores do que em progressores (149-151). Em contraste, grupos de indivíduos que apresentam uma rápida progressão para a aids apresentam um enriquecimento de outros grupos de alelos, particularmente HLA-B\*35:02 e HLA-B\*35:03 (152, 153).

Análises de GWAS têm auxiliado na melhor definição do papel dos alelos HLA no controle da infecção pelo hospedeiro. Em uma análise envolvendo 3622 indivíduos infectados pelo HIV-1, incluindo 974 indivíduos com a carga viral abaixo de 2000 cópias de RNA viral/mL por pelo menos um ano, os polimorfismos de base única (SNP) associados ao controle foram localizados dentro do complexo principal

de histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6 (146), corroborando os resultados de um estudo anterior que também apontava para associação entre polimorfismos nessa região e o controle da infecção pelo HIV-1 (154). Quando foram testadas associações genéticas relacionadas ao controle da infecção descritas na literatura, apenas variantes no *locus* CCR5-CCR2 – nomeadas CCR5  $\Delta$ 32, C927T in em CCR5 e Val64→Ile64 em CCR2 – apresentaram significância estatística. Esse estudo confirmou o papel protetor dos alelos B\*57:01, B\*27:05, B\*14/Cw\*08:02, B\*52 e A\*25 e também reforçou a relação dos alelos B\*35 e Cw\*07 com o maior risco de desenvolvimento da doença.

Além disso, foram demonstradas associações entre aminoácidos em determinadas posições dentro da fenda de ligação ao peptídeo e diferentes perfis de evolução da doença, como exemplo Val<sup>97</sup> está presente nos haplótipos protetores B\*57:01, B\*27:05 e B\*14, enquanto Arg<sup>97</sup> está presente em B\*35. Esses resultados sugerem que a base estrutural para a associação entre o HLA de classe I e a progressão para a doença é provavelmente mediada pela conformação do peptídeo dentro da fenda de ligação, indicando um papel importante das células T CD8<sup>+</sup> no controle da replicação viral. No entanto, é importante destacar que polimorfismos localizados no MHC de classe I podem ter impacto na função de células do sistema imune inato que interagem com o HLA, como células NK e células dendríticas. A expressão do receptor de ativação KIR3DS1 junto com seu ligante HLA-Bw4-80I, ou combinações específicas de KIR3DL1 e HLA-Bw4-80I são associadas com diferentes desfechos clínicos (155, 156), mas uma maior frequência de combinações de KIR-HLA associadas à proteção não tem sido observada em EC (157).

As moléculas HLA também se ligam a membros da família de receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas (LILRs), que estão presentes na superfície de células dendríticas e regulam propriedades funcionais dessas células (158, 159). Foi demonstrada uma forte interação entre LILRB2 e HLA-B\*35-Px, associada com uma disfunção da atividade de células dendríticas em ensaios *in vitro*, sugerindo que esta interação pode contribuir para a maior velocidade de progressão observada em indivíduos portando o alelo HLA-B\*35-Px (158). Um recente estudo confirmou que a intensidade de ligação de LILRB2 com HLA-B tem impacto no controle da infecção, sendo observada uma correlação entre a ligação mais fraca de LILRB2 com determinados alelos HLA-B e a maior proteção contra a

doença associada a este alelo, possivelmente devido a uma maior atividade de células dendríticas (160).

A importância das células T CD8<sup>+</sup> no controle da replicação viral tem sido observada em diversos estudos e os resultados obtidos com coortes de controladores têm confirmado o papel central dessa população celular no controle da infecção. Foi observada uma associação temporal entre o declínio da carga viral na fase aguda da infecção pelo HIV-1 e o surgimento de uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> específica para o vírus (44, 161). Além disso, a depleção dessas células, usando anticorpos anti-CD8, em macacos rhesus infectados pelo SIV, levou a um aumento da carga viral e progressão mais rápida para a aids quando comparado a animais que receberam apenas o anticorpo controle (42). Diferentes estudos demonstram que células T CD8<sup>+</sup> de EC possuem uma capacidade funcional superior a observada em indivíduos progressores (162). As células T CD8<sup>+</sup> de EC possuem maior capacidade de proliferação frente ao estímulo com células T CD4<sup>+</sup> infectadas ou peptídeos do HIV-1, especialmente peptídeos derivados de Gag, quando comparadas com progressores, sendo observada também uma associação entre essa maior capacidade de replicação e a secreção de perforina (163-166).

Além da maior capacidade de proliferação, foi observado um perfil polifuncional nessa população celular em pacientes EC/LTNP, com maior frequência de células produzindo diferentes citocinas e quimiocinas – IL-2, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  – junto com uma maior capacidade de degranulação, avaliada pela expressão de CD107a na superfície celular (167, 168). Essa resposta polifuncional frente a Gag também foi observada em células T CD8<sup>+</sup> da mucosa retal de indivíduos EC, com uma associação mais forte com o controle da infecção do que o observado com células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, sugerindo que essa resposta superior de células T CD8<sup>+</sup> na mucosa pode contribuir para limitar a depleção de células T CD4<sup>+</sup> e auxiliar na manutenção da integridade de mucosa (169, 170). As células T CD8<sup>+</sup> de EC também apresentaram maior concentração de perforina e granzima B, quando estimuladas com peptídeos de Gag, comparado com progressores, e essa maior concentração de proteínas líticas era traduzida na maior capacidade de lise de células alvo infectadas (171).

Um aspecto da resposta de células T CD8<sup>+</sup> que tem sido fortemente associado ao controle da replicação em EC é a capacidade de supressão da replicação viral *in vitro* sem a necessidade de estímulos exógenos (164, 172). Assim

como em outros perfis funcionais de células T CD8<sup>+</sup> de EC, a capacidade de supressão viral também foi correlacionada com a resposta frente à Gag (172, 173). Um estudo prospectivo com indivíduos recentemente infectados pelo HIV-1 demonstrou que indivíduos com carga viral mais baixa apresentavam uma maior capacidade de supressão da replicação viral, além disso, a supressão viral era preditiva da taxa de declínio das células T CD4<sup>+</sup> durante os três primeiros anos de infecção e inversamente correlacionada com a viremia no *set point* viral (174).

## 1.6 Justificativa

Apesar do grande sucesso da terapia antirretroviral, o vírus ainda persiste no organismo e a interrupção do tratamento culmina no aumento imediato da carga viral. Além disso, o tratamento prolongado é acompanhado por diversos efeitos colaterais, problemas de adesão, surgimento de resistência aos medicamentos e alto custo. Nesse cenário, a obtenção de uma vacina que seja capaz de inibir a infecção ou a progressão para a doença é de extrema importância. Entre os principais obstáculos para obtenção da vacina estão a alta diversidade viral e a falta de correlatos de proteção.

Uma vacina global deve ser capaz de proteger contra os diferentes subtipos virais circulantes, ou seja, ela deve apresentar alta reatividade cruzada, além de ser capaz de estimular uma resposta imune protetora persistente. No entanto, exatamente o que é uma resposta imune protetora frente ao HIV-1 ainda não é claro. As maiores pistas sobre que tipo de resposta seria eficiente no combate ao vírus vêm de estudos com indivíduos capazes de controlar a infecção naturalmente, chamados controladores de elite. Esses estudos apontam principalmente para um papel essencial de células T CD8<sup>+</sup> na supressão da replicação viral.

Diante deste cenário, este trabalho procurou contribuir na geração de conhecimento para a identificação de imunógenos que sejam capazes de estimular uma resposta com alta reatividade cruzada, tendo como foco o artigo 1, como também em analisar diferentes aspectos imunológicos e moleculares associados ao controle da replicação viral e evolução para a aids, abordado no artigo 2.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir para a identificação de epítomos de diferentes subtipos de HIV-1, prevalentes no Brasil, capazes de estimular uma resposta imune cruzada de alta frequência e magnitude e avaliar parâmetros imunológicos e genéticos associados com o controle da replicação viral na busca de marcadores que possam ser de relevância no desenvolvimento de vacinas e estratégias para a indução da cura funcional.

### 2.2 Objetivos Específicos

Documento 1:

- Determinar as sequências consenso brasileiras e identificar o isolado viral mais próximo a sequência consenso (CVI) do subtipo C no gene *nef* e dos subtipos B, F1 e C no gene *gag*;
- Avaliar a resposta Nef específica usando peptídeos derivados do consenso e do CVI do subtipo C em indivíduos infectados pelos subtipos B, F1 e C;
- Avaliar a resposta Gag específica frente a peptídeos derivados do consenso e do CVI do subtipo B, F1 e C em indivíduos infectados por estes subtipos;
- Verificar se existe reatividade cruzada entre os subtipos B, F1 e C;

Documento 2:

- Avaliar se indivíduos controladores da carga viral apresentam uma resposta diferencial frente aos peptídeos analisados;
- Determinar se os indivíduos controladores da nossa coorte possuem alelos HLA-B classicamente associados ao controle da replicação viral e progressão lenta para a doença;

- Avaliar se os diferentes níveis de controle da replicação viral estão relacionados com diferentes perfis de resposta imune, ativação de células T CD8<sup>+</sup> e translocação microbiana e tamanho do reservatório viral.

### **3 DOCUMENTOS**

### **3.1 Documento 1 – “Higher cross-subtype IFN- $\gamma$ ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1 subtype B- and F1- than in C-infected subjects”**

**Autores:** Fernanda Heloise Côrtes, Gonzalo Bello, Carla Vorsatz, José Henrique Pilotto, Monick Lindenmeyer Guimarães, Beatriz Grinsztejn, Valdilea Gonçalves Veloso, Aguinaldo Roberto Pinto, Mariza Gonçalves Morgado.

**Periódico:** Vaccine. 2013 Feb 4; 31(7):1106-12

A diversidade do HIV-1 tem sido considerada o maior obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina. Para superar esse obstáculo, imunógenos baseados em sequências centrais, como o consenso, têm sido testados. No Brasil, a cocirculação de três subtipos virais oferece um cenário adequado para avaliar a reatividade cruzada de células T frente a sequências consenso. Além dos consensos do subtipo B, C, F1 e grupo M, foram incluídos nas análises peptídeos baseados na sequência de um isolado viral referente a cada subtipo que apresentava menor distância genética ao consenso, denominado isolado viral mais próximo (CVI). O estudo incluiu 32 indivíduos infectados com o HIV-1, subtipo B (n = 13), subtipo C (n = 11) e subtipo F1 (n = 8). A resposta de células T específica para Gag e Nef foi avaliada pelo ensaio de ELISpot IFN- $\gamma$ . Os peptídeos baseados nas sequências CVI apresentaram capacidade de redução da distância genética e de detecção da resposta de células T similar ao observado para as sequências consenso. Uma alta reatividade cruzada entre os subtipos B e F1, em ambas as regiões avaliadas, foi observada tanto em indivíduos infectados com o subtipo B como nos indivíduos infectados com o subtipo F1. Também não foi observada diferença significativa na resposta frente ao consenso do subtipo B e C em indivíduos infectados pelo subtipo B. Em contraste, a magnitude da resposta de células T frente a peptídeos do consenso C referentes a Gag foi maior do que a observada para os peptídeos do consenso B, em indivíduos infectados pelo subtipo C. Na avaliação da resposta frente a Nef, indivíduos infectados pelo subtipo C apresentaram valores mais altos de resposta para peptídeos do consenso C do que para o consenso F1. Além disso, indivíduos infectados pelo subtipo F1 apresentaram uma resposta mais baixa para peptídeos do subtipo C do que para o subtipo B e F1. Um nível similar de resposta foi detectado para peptídeos baseados no grupo M em indivíduos infectados com o

subtipo B ou F1. No entanto, em indivíduos infectados pelo subtipo C, esse conjunto de peptídeos apresentou um menor nível de resposta quando comparado ao observado para o consenso C. Em geral, o nível de reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 foi maior do que entre os subtipos B e C ou entre os subtipos C e F1. Esses resultados sugerem que o obstáculo imposto pela diversidade genética no desenho de vacinas é dependente dos subtipos envolvidos.



## Higher cross-subtype IFN- $\gamma$ ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1 subtype B- and F1- than in C-infected subjects

Fernanda Heloïse Côrtes<sup>a</sup>, Gonzalo Bello<sup>a</sup>, Carla Vorsatz<sup>b</sup>, José Henrique Pilotto<sup>a,c</sup>,  
Monick Lindenmeyer Guimarães<sup>a</sup>, Beatriz Grinsztejn<sup>b</sup>, Valdiléa Gonçalves Veloso<sup>b</sup>,  
Aguinaldo Roberto Pinto<sup>d</sup>, Mariza Gonçalves Morgado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

<sup>c</sup> Hospital Geral de Nova Iguaçu, Nova Iguaçu, RJ 26030-380, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 August 2012

Received in revised form

19 November 2012

Accepted 8 December 2012

Available online 20 December 2012

#### Keywords:

T-cell response

Gag

Nef

Consensus versus isolate sequences

Cross-reactivity

HIV-1 subtypes

### ABSTRACT

HIV-1 diversity has been considered a huge challenge for the HIV-1 vaccine development. To overcome it, immunogens based on centralized sequences, as consensus, have been tested. In Brazil, the co-circulation of three subtypes offers a suitable scenario to test T cell cross-subtype responses to consensus sequences. Furthermore, we included peptides based on closest viral isolates (CVI) from each subtype analyzed to compare with T cell responses detected against the consensus sequences. The study included 32 subjects infected with HIV-1 subtype B ( $n=13$ ), C ( $n=11$ ), and F1 ( $n=8$ ). Gag and Nef-specific T cell responses were evaluated by IFN- $\gamma$ -ELISpot assay. Peptides based on CVI sequences were similar to consensus in both reducing genetic distance and detecting T cell responses. A high cross-subtype response between B and F1 in both regions was observed in HIV-1 subtype B and F1-infected subjects. We also found no significant difference in responses to subtype B and C consensus peptides among subtype B-infected subjects. In contrast, the magnitude of T cell responses to consensus C peptides in the Gag region was higher than to consensus B peptides among HIV-1 subtype C-infected subjects. Regarding Nef, subtype C-infected subjects showed higher values to consensus C than to consensus F1 peptides. Moreover, subtype F1-infected subjects presented lower responses to subtype C peptides than to subtype F1 and B. A similar level of responses was detected with group M based peptides in subtype B and F1 infected subjects. However, among subtype C infected subjects, this set of peptides detected lower levels of response than consensus C. Overall, the level of cross-subtype response between subtypes B and F1 was higher than between subtype C and B or C and F1. Our data suggests that the barrier of genetic diversity in HIV-1 group M for vaccine design may be dependent on the subtypes involved.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The development of safe and effective HIV vaccines offers the best hope for the prevention of new infections. However, HIV-1 vaccine efforts have not yet proven successful [1]. Among the four vaccine efficacy trials in human volunteers, only the recent RV144, conducted in Thailand, showed statistically significant rate of protection, despite the fact that vaccine efficacy was 31.2% [2].

The high mutation rate of HIV-1 allows the virus to rapidly evade immune responses [3]. In fact, the genetic variability of

HIV-1 is considered one of the major challenges for the design of effective vaccines that could protect from heterologous viral infection [4] and for the development of reagents to evaluate vaccine immunogenicity. Even within the same HIV-1 subtype the amino acid sequence can diverge by >15%, whereas genetic distances between isolates of distinct subtypes can exceed 30% depending on the genomic region analyzed [5].

In areas where different HIV-1 subtypes co-circulate, this diversity is reflected in the emergence of unique recombinant forms and CRFs. In Brazil, the subtype B is prevalent in most geographic regions, followed by BF1 recombinants, and subtype F1 [6–9]. This scenario is different in the Southern Brazilian region, where subtype C and BC recombinants are highly prevalent [10]. The co-circulation of subtype B and BF1 recombinants is also found in other South American countries, such as Argentina, Chile, Uruguay and Paraguay [11–13].

\* Corresponding author at: Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. Tel.: +55 21 38658154; fax: +55 21 38658173.

E-mail address: [mmorgado@ioc.fiocruz.br](mailto:mmorgado@ioc.fiocruz.br) (M.G. Morgado).

A globally effective vaccine should protect against a variety of HIV-1 genetic forms. To overcome this diversity, several strategies of immunogen design have been proposed, as inclusion of distinct HIV subtype target antigens [2] engineered antigens, such as polyvalent mosaic [14] and centralized [15–18] sequences. The goal of these strategies is to reduce the amino acid sequence distance between immunogens and circulating viruses. Since HIV-1 phylogeny present a star-like configuration, the use of a “central sequence” should diminish the amino acid difference between immunogens and circulating virus [16]. Among centralized sequences, consensus sequences have been commonly used to evaluate immune responses in HIV-1-infected subjects [19–22]. Vaccines based on consensus sequences stimulated cross-subtype responses in animal models [23–25], and cross-reactivity was detected using peptides based on the consensus of target regions in cohorts from different ethnicities infected with diverse subtypes [26–28].

Evaluation of cross-reactivity responses among HIV-1 subtypes prevalent in South America are scarce, and the high miscegenation of the Brazilian population offers a heterogeneous HLA background to study T cell responses in HIV-1 infected subjects [29]. The objective of this study was to evaluate the potential usage of consensus sequences for the definition of viral immunogens, and to analyze the cross-subtype responses in a cohort of HIV-1 subtype B-, C-, and F1-infected Brazilian subjects. An additional strategy of immunogen design, here called closest viral isolate (CVI), which was based on the identification of the circulating virus with the lowest genetic distance to the consensus in a given population, was also evaluated in this study.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

The study included 32 Brazilian subjects infected with HIV-1 subtypes B ( $n=13$ ), C ( $n=11$ ), and F1 ( $n=8$ ), followed at Hospital Evandro Chagas (Rio de Janeiro, RJ), Hospital Geral de Nova Iguaçu (Nova Iguaçu, RJ), and Hospital Homero de Miranda Gomes (São José, SC). All subjects have detectable viral load and lymphocytes TCD4<sup>+</sup> counts > 200 cells/ $\mu$ L. The study was approved by the respective Institutional Review Committees and all participants gave written informed consent.

### 2.2. Cells

Blood was collected by sterile venipuncture, and samples were processed on the day of collection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation using Histopaque 1077 (Sigma–Aldrich, USA), and cryopreserved in 90% fetal bovine serum (FBS–Gibco, Invitrogen, USA), and 10% dimethyl sulfoxide (Sigma–Aldrich, USA).

### 2.3. Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> counts and viral load

Absolute TCD4<sup>+</sup> cells counts were measured using the MultiTest TruCount-kit and the MultiSet software on a FACSCalibur (BD Biosciences, USA). Plasma HIV-1 viral loads were measured using the Versant HIV-1 3.0 RNA assay (bDNA, Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

### 2.4. Extraction, PCR amplification, and sequencing of HIV-1 DNA

DNA samples were extracted from whole blood using QIAamp viral DNA Kit (QIAGEN Inc., USA), according to the manufacture's protocol, and PCR-amplified using nested primers. Amplification of *gag* region was performed using SCAOSD [30] and G17 [31] as

outer primers, and SCANSND [30] and p24-1 [32] as inner primers. Amplification of the *nef* fragment was carried out using NEF-1 [33] and SCDOAD [30] as outer primers, and NEF-3 [34] and SCDNAD [30] as inner primers. PCR conditions were performed as described elsewhere [6].

PCR products were purified with Illustra GFX PCR DNA Kit (GE Healthcare, USA), and sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystem, USA). Sequencing reactions were analyzed with an ABI 3100 automated sequencer. Sequences were edited with Seqman v7.0 program (DNASTAR; Lasergene, USA).

### 2.5. Consensus and closest viral isolate (CVI) sequences

A total of 220 Brazilian sequences were retrieved from the Los Alamos HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov>), and from the sequence database from our laboratory (subtype B [*gag*=21, *nef*=51], subtype C [*gag*=34, *nef*=45], and subtype F1 [*gag*=31, *nef*=38]). They were used to infer the subtype B, C, and F1 Brazilian consensus sequences of *gag* and *nef* regions employing the software Dambe v.5.0.10. Group M-consensus sequence was retrieved from the Los Alamos HIV database. The subtype B, C, and F1 Brazilian sequences, with the lowest genetic distance to the corresponding subtype consensus in both *gag* and *nef* regions, were defined as the closest viral isolates (CVI). Nucleotide distance between sequences and subtype consensus sequences were calculated using the Tamura–Nei model as implemented in MEGA v40 [35]. Amino acid sequences were obtained by translating consensus and CVI nucleotide sequences.

### 2.6. Synthetic peptides

Sets of peptides (15-mers with 11-aa overlaps) based on the Brazilian consensus and CVI subtype B, C, and F1 covering Gag (amino acids 17–43, and 64–103 related to the HXB2 Gag protein), and Nef (amino acids 68–160 related to the HXB2 Nef protein) fragments were produced by polypeptide (USA). These regions were chosen based on a previous study from our group [36], that showed high frequencies of responses to these positions in Gag p17 and the Nef central region. Overlapping peptides were divided into two pools for Gag p17 and four pools for Nef, according to the position in protein. The final concentration of each peptide within a peptide pool was 4  $\mu$ g/mL.

### 2.7. IFN- $\gamma$ ELISpot

The ELISPOT IFN- $\gamma$  assay was performed as described previously [37]. Briefly, 96-well plates (Millipore, USA) were coated with anti-human IFN- $\gamma$  mAb (Diacclone, France). HIV-1 peptide pools were diluted in complete culture medium [RPMI 1640 (Sigma, USA) supplemented with 10% of FBS, Penicillin–Streptomycin (10,000 U–10,000  $\mu$ g/mL), L-glutamine 200 mM, non-essential amino acids 10 mM, and sodium pyruvate 100 mM (all purchased from invitrogen, USA)]. PBMCs were added at an input cell number of  $1 \times 10^5$  cells/well. Phytohemagglutinin-5  $\mu$ g/ml (Sigma, USA) was used as a positive control, and cells suspended only in culture medium served as a negative control. The spots were counted using an automated ELISPOT reader (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology, USA). The results were expressed as spot-forming cells (SFC)/million PBMCs. The response was considered positive if  $\geq 50$  SFC/ $10^6$  PBMCs were detected.

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad 5.0 (Prism Software, USA). The Wilcoxon test was used to compare genetic distance between infecting viral sequences and consensus or CVI

**Table 1**  
Summary of viral load and CD4<sup>+</sup> T cell counts according to the HIV-1 subtype infection.

Laboratory data, median (IQRs)	HIV-1 subtypes (number of participants)			
	Subtype B (13)	Subtype C (11)	Subtype F1 (8)	Overall (32)
Plasma HIV RNA level, copies/mL <sup>a</sup>	3,483 (375–12,521)	12,663 (920–16,200)	12,915 (3,738–32,396)	8,543 (911–15,711)
CD4 <sup>+</sup> T cell count cells/ $\mu$ L <sup>a</sup>	736 (565–1,014)	519 (431–654)	648 (353–842)	617 (485–790)

<sup>a</sup> No significant differences were observed among the CD4<sup>+</sup> T cell count and viral load. All *p* values > 0.05.

sequences, and the magnitude of responses against consensus and CVI peptides. The Friedman test was performed to compare genetic distances and the magnitude of HIV-1 cross-subtype responses, followed by a Dunn's post-test for multiple comparisons. Correlations were determined using Spearman's rank test. All tests were considered significant if the *p* value was below 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Study population

The summary of laboratory data for subjects included in this study, distributed according to the subtype of the HIV-1-infecting virus, is presented in Table 1. Overall, the median of absolute lymphocyte T CD4<sup>+</sup> cell count was 617 cells/ $\mu$ L (IQR = 485–790), and the median of plasma RNA viral load (VL) was 8,543 copies/mL (IQR = 911–15,711). No statistically significant differences were found for VL and CD4T cell counts among the groups.

#### 3.2. Genetic distance to consensus and CVI of HIV-1 subtypes B, C, and F1

The mean genetic distances between the Brazilian sequences, used to derive consensus, and the corresponding subtype consensus for *gag* and *nef* regions were: 3.9% and 5.3% for subtype B; 3.0% and 3.2% for subtype F1; and 3.7% and 4.1% for subtype C, respectively. The genetic distances between the CVI sequences and the corresponding subtype set of sequences were: 5.8% (*gag*) and 6.8% (*nef*) for subtype B; 4.9% (*gag*) and 5.2% (*nef*) for subtype F1; and 5.8% (*gag*) and 4.2% (*nef*) for subtype C. Phylogenetic trees of *gag* and *nef* genes showing the positions of both consensus and CVI sequences are presented in Supplemental File (Fig. S1).

Next, we determined the mean genetic distance between consensus and CVI overlapping peptide sequences for each target used for the ELISpot IFN- $\gamma$  assays and the viral amino acid sequence of each study subject. The mean genetic distances to consensus and CVI were similar for all subtypes on both regions analyzed, with exception of subtype B infected subjects that displayed significantly (*p* = 0.0015) lower mean genetic distance to consensus (8.6%) than to CVI (13.8%) in the Gag region (Fig. 1A and B). These results suggest that the capacity of both consensus and CVI sequences to minimize the genetic distance to Brazilian circulating viruses was roughly similar, although they might vary according to the genetic region and subtype considered.

#### 3.3. Immune response to consensus and CVI of HIV-1 subtypes B, C, and F1

To compare the capacity of peptide pools corresponding to CVI and consensus sequences of HIV-1 subtypes B, C, and F1 to elicit T cell responses, the median of the magnitude of responses was calculated based on the sum of the number of IFN- $\gamma$ -secreting cells/ $10^6$  PBMCs for each Gag or Nef peptide set. Consensus and CVI peptides showed similar median of magnitude of responses, independently

of subtype evaluated (Fig. 1C and D) for both regions. The overall magnitude of response to Nef was higher than to Gag peptide pools. It is important to indicate that F1 subtype-infected subjects showed higher responses to Gag peptides than those infected with subtypes B or C.

#### 3.4. Cross-reactivity responses among subtype B, C, F1 and group M

Intra and inter pairwise distances were calculated based on the amino acid sequence of each sample against consensus peptides used as ELISpot reagent (Fig. 2A and B). The mean intra-subtype genetic distances were significantly lower than the mean inter-subtype, except for the subtype F1-infected patients that displayed a mean genetic distance to consensus F1 (8%) similar to consensus B (7.2%) in Nef region. Mean genetic distances to M consensus ranged from 14 to 24% for Gag and 10–13% for Nef.

The degree of cross-reactivity to each subtype consensus and group M peptides was evaluated in Gag and Nef. Positive response to at least one consensus peptide set was detected for 93% of the patients. In contrast with what was observed in genetic distances, the mean magnitude of responses, expressed as SFC/ $10^6$  PBMCs, in subtype B-infected individuals, showed no significant differences against the four peptides sets tested in both Gag and Nef. In subtype C-infected subjects, the mean magnitude of responses to consensus C (Gag = 190; Nef = 628) were significantly higher than to consensus B (Gag = 24; Nef = 463), consensus M (Gag = 35; Nef = 421), and consensus F1 (Nef = 368). In subtype F1-infected subjects, similar to observed in subtype B-infected subjects, a high cross-reactivity was demonstrated to consensus B and M. However, the magnitude of responses to consensus C, in Gag, was significantly lower (Fig. 2C and D).

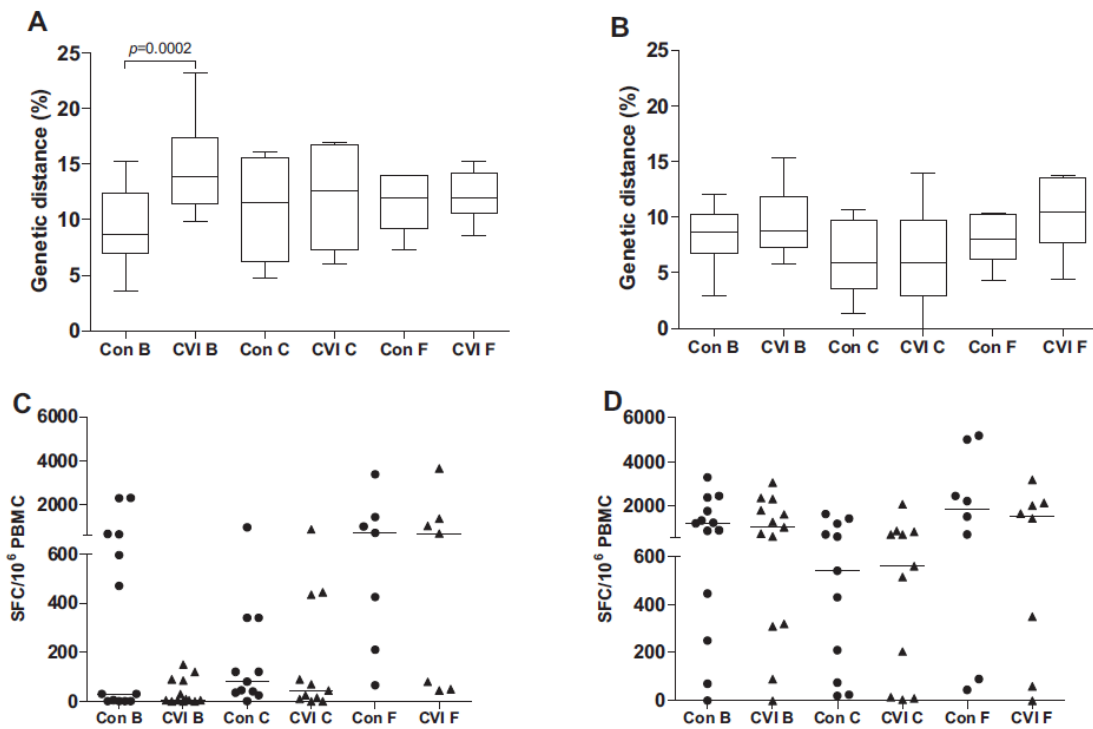
#### 3.5. Correlation between genetic distance and magnitude of T cell responses to Gag and Nef peptides

The genetic distance between the viral infecting sequences from the three groups and consensus B, C, F1, and group M peptides had a significant impact on the anti-Gag T cell responses, demonstrated by a negative correlation (Spearman's *r* = -0.2227; *p* = 0.0145) (Fig. 3A), while no significant correlation was observed for Nef (Fig. 3B).

### 4. Discussion

The genetic diversity of HIV-1 is considered one of the major challenges for the design of effective vaccines. One of the most popular strategies of immunogen design proposed to overcome this problem is the use of centralized sequences, such as consensus, that are also frequently used to derive reagents to assess immune responses in HIV-infected subjects. In the present study, we compared the capacity of consensus sequences, and primary isolate sequences that most closely resemble consensus (CVI), to both reduce the genetic distance and maximize the immune response





**Fig. 1.** Comparison between consensus and CVI peptides. Amino acid distances between infecting viral sequences and peptides derived from consensus and CVI sequences from subtype B, C, and F1 in Gag (A) and Nef (B). Magnitude of T cell responses from HIV-1 subtype B-, C-, and F1-infected subjects, stimulated with Gag (C) or Nef (D) peptides pools based on consensus and CVI sequences from subtype B, C, and F1. Responses  $\geq 50$  SFC/ $10^6$  PBMCs were considered positive. *P* values were calculated using the Wilcoxon test.

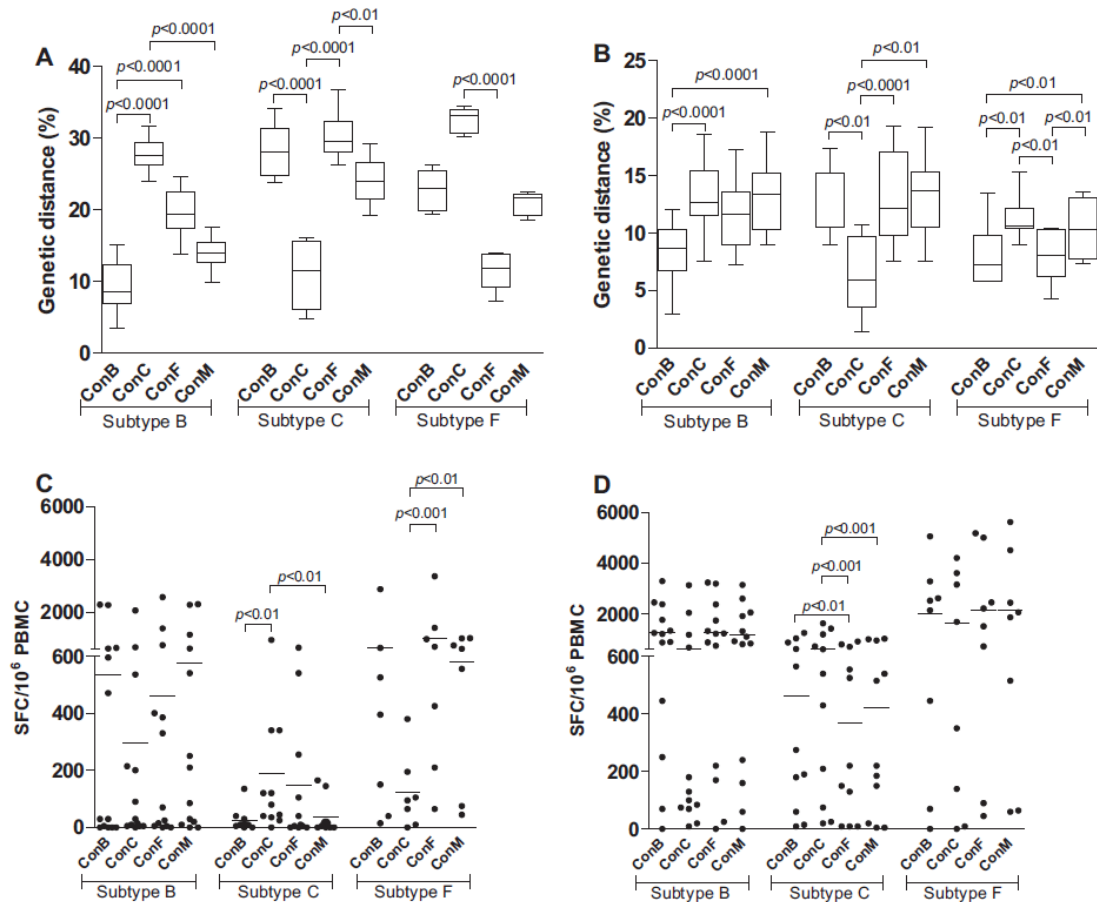
against the three prevalent HIV-1 subtypes circulating in Brazil: B, C, and F1.

Previous studies demonstrated a high similarity between consensus and isolate sequences most similar to consensus (>80% in Gag and >70% in Nef), and also a high percentage of positive responses in IFN- $\gamma$  ELISpot assays against peptides derived from isolate sequences [38–40]. However, no comparison has been performed between consensus and isolate sequences in context of T cell immune response. Here we demonstrate that the CVI sequence is similarly powerful for both reducing the genetic distance to circulating viruses, and for the detection of HIV-specific T cell responses to Gag and Nef when compared to consensus for all three subtypes analyzed.

For vaccine design, it is of paramount importance the identification of cross-reactive HIV antigens to cover the high HIV diversity. Several studies indicate that Gag and Nef highly conserved epitope regions are commonly recognized, and give rise to high inter-subtype cross-reactive T-cell responses [26,28,41–43]; although the overall frequency and magnitude of inter-subtype T-cell responses is typically lower than that of the intra-subtype [26,28,44]. We found a high cross-subtype response between subtype B and F1 for both Gag and Nef regions, comparable to the frequency and/or magnitude of intra-subtype T-cell responses. This data is in agreement with a previous study that also described a high T-cell cross-reactivity between subtypes B and F1 among HIV positive individuals from Argentina using Nef peptides [45]. High cross-reactivity between subtypes B and F1 have also been observed for neutralizing antibodies [46]. These results open a good perspective for vaccine design for countries where these two subtypes are predominating, as in South America.

No significant difference in the magnitude of the responses to subtype B and C Gag and Nef consensus peptides was found among subtype B-infected subjects, consistent with other studies demonstrating a similar magnitude or breadth of T cell responses to subtype B and C peptides in populations infected mainly with subtype B [38,43]. In contrast, the magnitude of T cell responses to consensus C peptides in the Gag region was significantly higher than to consensus B peptides among HIV-1 subtype C-infected subjects. Previous studies with subtype C-infected subjects also demonstrated a lower magnitude of response to subtype B consensus when compared with intra-subtype responses [26,28]. Significant differences in the level of cross-subtype responses were also observed between subtype C and F1. Among subtype C-infected subjects, the median magnitude of responses to consensus C was higher than to consensus F1 peptides in Nef, whereas among subtype F1-infected subjects the median magnitude of responses to consensus F1 peptides in Gag was higher than to consensus C peptides.

Consensus group M based immunogens have been proposed as an alternative to vaccine design in regions where different subtypes co-circulate [27,47]. Peptide pools based on group M consensus sequences detected responses of similar breadth and magnitude as did consensus B or consensus C peptides in subtype B- and C-infected patients, respectively [27]. Gag and Nef peptides derived from HIV-1 consensus group M also detected responses in subtype A1 and D infected subjects [47] demonstrating that this strategy is useful for different subtypes. Our results confirm that group M consensus peptides were as efficient as subtype-specific consensus peptides for subtype B- and F1-infected subjects, but not for subtype C-infected patients. Among subtype C-infected patients, group M consensus peptides elicited a significant lower magnitude

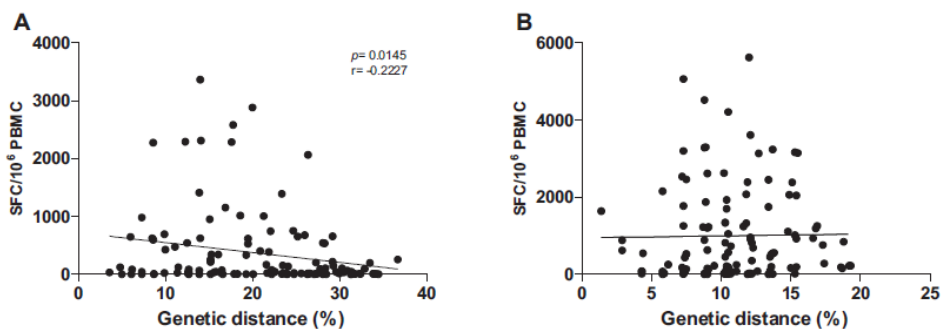


**Fig. 2.** Evaluation of cross-reactivity. Amino acid distances between infecting viral sequences and peptides derived from subtype B, C, F1, and group M consensus sequences in Gag (A) and Nef (B). Magnitude of T cell responses from HIV-1 subtype B-, C-, and F1-infected subjects, stimulated with Gag (C) and Nef (D) peptides pools based on subtype B, C, F1, and group M consensus sequences. Responses  $\geq 50$  SFC/10<sup>6</sup> PBMCs were considered positive. *P* values were calculated using Friedman's test followed by a Dunn's post-test for multiple comparisons.

of response than subtype C consensus peptides. This difference in T cell response to peptides derived from group M and subtype C consensus was not observed in a study of Bansal et al. [27], that found a similar level of responses against group M and subtype C consensus in Zambians subtype C HIV-1 infected subjects.

The extensive genetic diversity of the HIV-1 group M isolates and its implications for vaccine design have long been debated. While

some studies point to an influence of genetic distance on T cell responses, others were unable to detect a correlation between these variables [18,26,43,48]. We found a significant negative correlation between amino acid genetic distance and ELISpot IFN- $\gamma$  responses in Gag, but no correlation was demonstrated in Nef. Although the genetic distances to the homologous consensus peptides in Nef were significantly lower than to heterologous consensus ones, the



**Fig. 3.** Correlation between genetic distance and T cell response. Association between the magnitude of IFN- $\gamma$  ELISpot response to Gag (A) and Nef (B) and the amino acid distance between autologous viral sequences and consensus sequence. *P* values were determined by the Spearman rank test.

magnitude of intra-subtype and inter-subtype responses was quite homogenous for most comparisons in this region. Finally, although the mean genetic distance among prevalent Brazilian subtypes was roughly similar, we observed that the level of cross-subtype response between subtypes B and F1 was higher than between subtype C and B or between subtype C and F1. These data demonstrate that associations between T cell responses and phylogenetic proximity are complex.

Our data demonstrate that peptide pools based on natural CVI strains are able to minimize the genetic distance to circulating viruses and to detect responses of similar breadth and magnitude as peptides based on artificial consensus sequences. They also indicate that the significance of the HIV-1 group M genetic diversity for vaccine design may be dependent of the subtypes involved and the genomic region considered. We also point out that the negative impact of genetic distance on T cell recognition could be more important for Gag than Nef. Overall, these results emphasize that it is probably necessary to use a multi-subtype immunogen to match the predominant HIV-1 subtypes that circulate in the Brazilian population, especially if peptides based on Gag are included in the vaccine formulation.

### Acknowledgements

This work was supported by Department of STD, AIDS and Viral Hepatitis/Brazilian Ministry of Health. Fernanda Heloíse Côrtes is recipient of a CNPq Fellowship. We thank all the patients that participated in this study, the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities and Vera Bongertz for critical reviewing of the manuscript.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.023>.

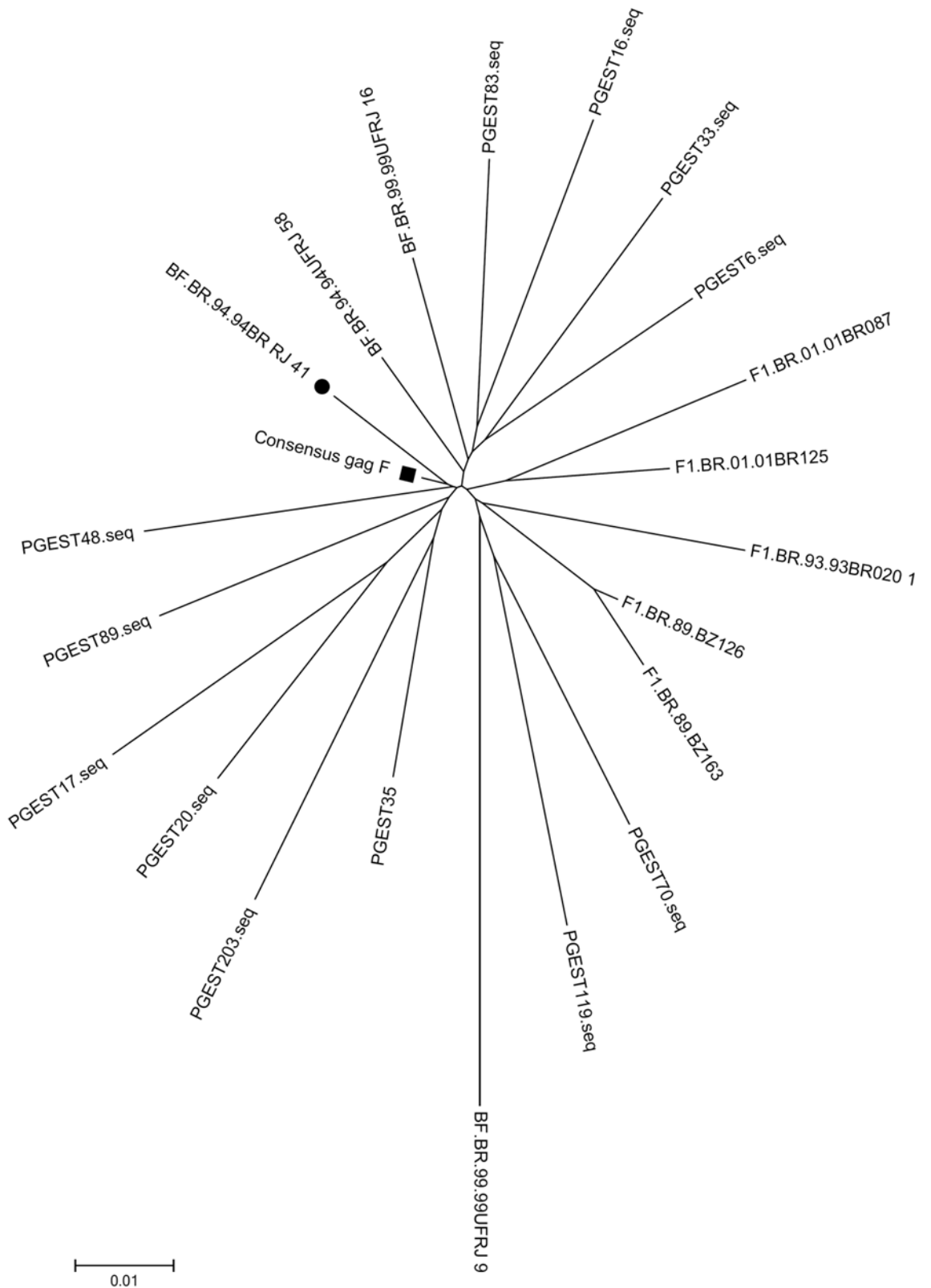
### References

- Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kiény MP. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. *Vaccine* 2011;29(37):6191–218.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009;361(23):2209–20.
- Boutwell CL, Rolland MM, Herbeck JT, Mullins JJ, Allen TM. Viral evolution and escape during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2010;202(October (Suppl 2)):S309–14.
- Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis* 2004;4(7):397–413.
- Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 2001;58:19–42.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves Jr I, Veloso VG, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1998;18(August (5)):488–94.
- Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, et al. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2000;275(September (1)):107–15.
- Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir* 2009;25(October (10)):961–6.
- Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol* 2011;83(August (8)):1301–7.
- Gräf T, Passaes CP, Ferreira LG, Grisard EC, Morgado MG, Bello G, et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. *J Clin Virol* 2011;51(July (3)):186–91.
- Montano SM, Sanchez JL, Laguna-Torres A, Cuchi P, Avila MM, Weissenbacher M, et al. Prevalences, genotypes, and risk factors for HIV transmission in South America. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40(September (1)):57–64.
- Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, et al. Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries. *AIDS Res Hum Retrovir* 2006;22(11):1186–91.
- Aguayo N, Laguna-Torres VA, Villafane M, Barboza A, Sosa L, Chauca G, et al. Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(May–June (3)):225–31.
- Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, et al. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* 2007;13(1):100–6.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* 2002;296(5577):2354–60.
- Nickle DC, Jensen MA, Gottlieb GS, Shriner D, Learn GH, Rodrigo AG, et al. Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science* 2003;299(March (5612)):1515–7.
- Gao F, Korber BT, Weaver E, Liao HX, Hahn BH, Haynes BF. Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity. *Expert Rev Vaccines* 2004;3(August (Suppl. 4)):S161–8.
- Kesturu GS, Colleton BA, Liu Y, Heath L, Shaikh OS, Rinaldo CR, et al. Minimization of genetic distances by the consensus, ancestral, and center-of-tree (COT) sequences for HIV-1 variants within an infected individual and the design of reagents to test immune reactivity. *Virology* 2006;348(May (2)):437–48.
- Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, et al. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 2004;78(March (5)):2187–200.
- Gao F, Weaver EA, Lu Z, Li Y, Liao HX, Ma B, et al. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group M consensus envelope glycoprotein. *J Virol* 2005;79(2):1154–63.
- Santra S, Korber BT, Muldoon M, Barouch DH, Nabel GJ, Gao F, et al. A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10489–94.
- Serwanga J, Mugaba S, Pimego E, Nanteza B, Lyagoba F, Nakubulwa S, et al. Profile of T cell recognition of HIV Type 1 consensus group M Gag and Nef peptides in a clade A1- and D-infected Ugandan population. *AIDS Res Hum Retrovir* 2012;28(4):384–92.
- Kothe DL, Li YY, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Zammit KP, Salazar MG, et al. Ancestral and consensus envelope immunogens for HIV-1 subtype C. *Virology* 2006;352(September (2)):438–49.
- Santra S, Korber BT, Muldoon M, Barouch DH, Nabel GJ, Gao F, et al. A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(July (30)):10489–94.
- Yan J, Corbitt N, Pankhong P, Shin T, Khan A, Sardesai NY, et al. Immunogenicity of a novel engineered HIV-1 clade C synthetic consensus-based envelope DNA vaccine. *Vaccine* 2011;29(September (41)):7173–81.
- Frahm N, Nickle DC, Linde CH, Roach T, Walker BD, Allen TM, et al. Increased detection of HIV-specific T cell responses by combination of central sequences with comparable immunogenicity. *AIDS* 2008;22(February (4)):447–56.
- Bansal A, Gough E, Ritter D, Wilson C, Mulenga J, Allen S, et al. Group M-based HIV-1 Gag peptides are frequently targeted by T cells in chronically infected US and Zambian patients. *AIDS* 2006;20(February (3)):353–60.
- Zembe L, Burgers WA, Jaspán HB, Bekker LG, Bredell H, Stevens G, et al. Intra- and inter-clade cross-reactivity by HIV-1 Gag specific T-cells reveals exclusive and commonly targeted regions: implications for current vaccine trials. *PLoS One* 2011;6(10):e26096.
- Williams F, Meenagh A, Darke C, Acosta A, Daar AS, Gorodezky C, et al. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2001;62(June (6)):645–50.
- Sierra M, Thomson M, Ríos M, Casado G, Castro R, Delgado E, et al. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12\_BF. *Infect Genet Evol* 2005;5(April (3)):209–17.
- Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study group on heterogeneity of HIV epidemics in African cities. *J Virol* 2000;74(January (1)):363–70.
- Lee CN, Chen MY, Lin HS, Lee MC, Luo CC, Twu SJ, et al. HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan. *AIDS Res Hum Retrovir* 1998;14(June (9)):807–9.
- Artenstein A, Hegerich P, Beyrer C, Rungreunthanakit K, Michael N, Natpratan C. Sequences and phylogenetic analysis of the nef gene from Thai subjects harboring subtype E HIV-1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996;12(April (6)):557–60.
- Salvi R, Garbuglia AR, Di Caro A, Pulciani S, Montella F, Benedetto A. Grossly defective Nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* 1998;72(May (5)):3646–57.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24(August (8)):1596–9.
- Cunha-Neto E, Felgueiras C, Manuel M, Samri A, Coutinho R, Côrtes F, et al. T cell crossreactivity of Gag and Nef epitopes derived from Brazilian and European HIV-1 strains among Brazilian and French HIV-1-infected patients. *Aids Res Hum Retrovir* 2008;24(Suppl. 1). S124–S124.

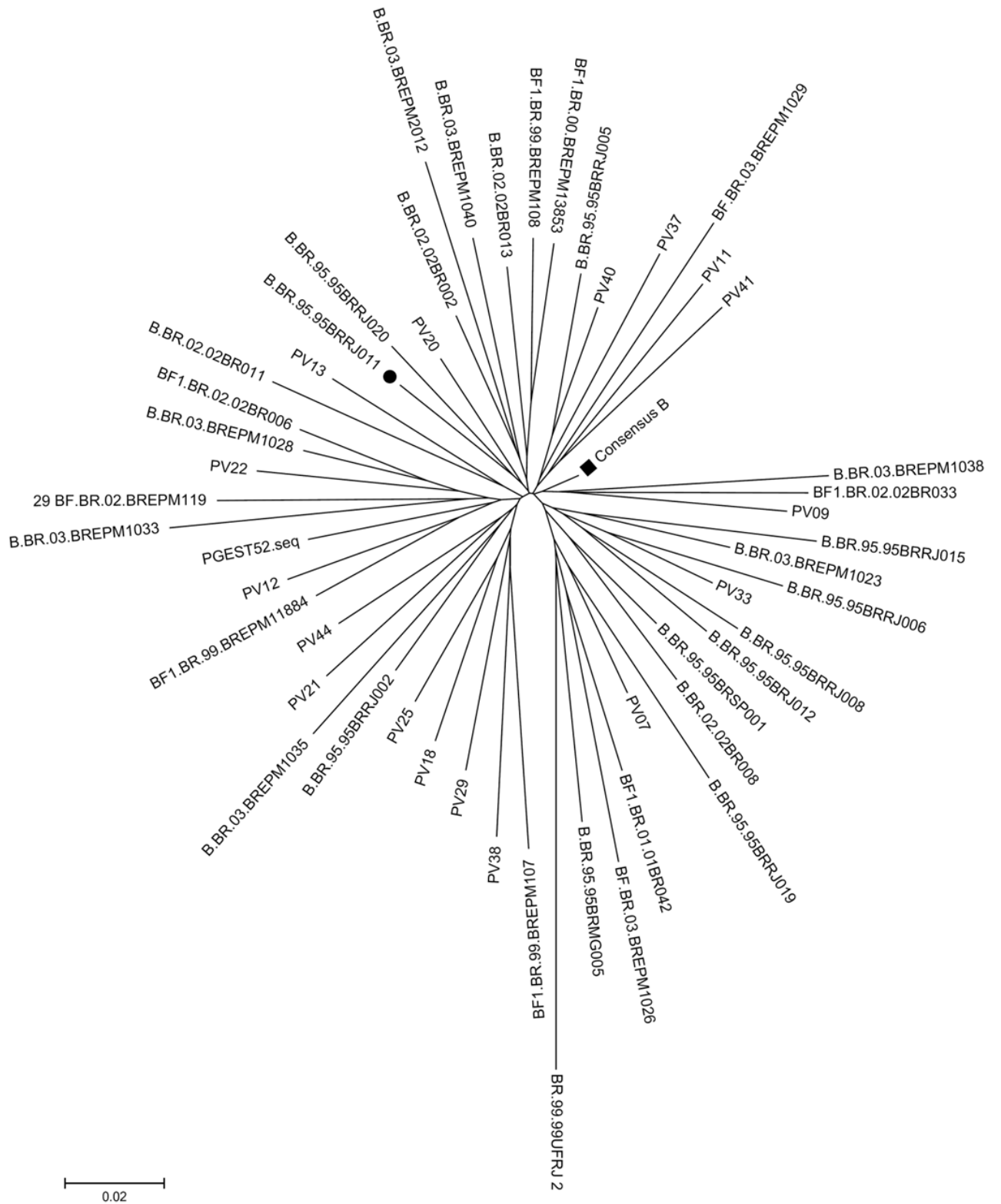
- [37] Calarota SA, Foli A, Maserati R, Baldanti F, Paolucci S, Young MA, et al. HIV-1-specific T cell precursors with high proliferative capacity correlate with low viremia and high CD4 counts in untreated individuals. *J Immunol* 2008;180(9):5907–15.
- [38] Coplan PM, Gupta SB, Dubey SA, Pitisuttithum P, Nikas A, Mbewe B, et al. Cross-reactivity of anti-HIV-1 T cell immune responses among the major HIV-1 clades in HIV-1-positive individuals from 4 continents. *J Infect Dis* 2005;191(May (9)):1427–34.
- [39] Gupta SB, Mast CT, Wolfe ND, Novitsky V, Dubey SA, Kallas EG, et al. Cross-clade reactivity of HIV-1-specific T-cell responses in HIV-1-infected individuals from Botswana and Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42(June (2)):135–9.
- [40] Geels MJ, Dubey SA, Anderson K, Baan E, Bakker M, Pollakis G, et al. Broad cross-clade T-cell responses to gag in individuals infected with human immunodeficiency virus Type 1 non-B clades (A–G): importance of HLA anchor residue conservation. *J Virol* 2005;79(September (17)):11247–58.
- [41] Betts MR, Krowka J, Santamaria C, Balsamo K, Gao F, Mulundu G, et al. Cross-clade human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in HIV-infected Zambians. *J Virol* 1997;71(November (11)):8908–11.
- [42] Thakar MR, Bhonge LS, Lakhashe SK, Shankarkumar U, Sane SS, Kulkarni SS, et al. Cytolytic T lymphocytes (CTLs) from HIV-1 subtype C-infected Indian patients recognize CTL epitopes from a conserved immunodominant region of HIV-1 Gag and Nef. *J Infect Dis* 2005;192(September (5)):749–59.
- [43] Yu XG, Lichterfeld M, Perkins B, Kalife E, Mui S, Chen J, et al. High degree of inter-clade cross-reactivity of HIV-1-specific T cell responses at the single peptide level. *AIDS* 2005;19(September (14)):1449–56.
- [44] McKinnon LR, Ball TB, Kimani J, Wachih C, Matu L, Luo M, et al. Cross-clade CD8(+) T-cell responses with a preference for the predominant circulating clade. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40(November (3)):245–9.
- [45] Turk G, Gherardi MM, Laufer N, Saracco M, Luzzi R, Cox JH, et al. Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants. *J Virol* 2008;82(6):2853–66.
- [46] Bongertz V, Teixeira S, Grinztejn B, Pilotto J, Veloso V, Morgado M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by plasma from B or F genotype infected individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(February (1)):85–9.
- [47] Serwanga J, Mugaba S, Pimego E, Nanteza B, Lyagoba F, Nakubulwa S, et al. Profile of T Cell Recognition of HIV Type 1 consensus Group M Gag and Nef Peptides in a Clade A1- and D-Infected Ugandan Population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28(4):384–92.
- [48] Brown SA, Slobod KS, Surman S, Zirkel A, Zhan X, Hurwitz JL. Individual HIV Type 1 envelope-specific T cell responses and epitopes do not segregate by virus subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22(February (2)):188–94.



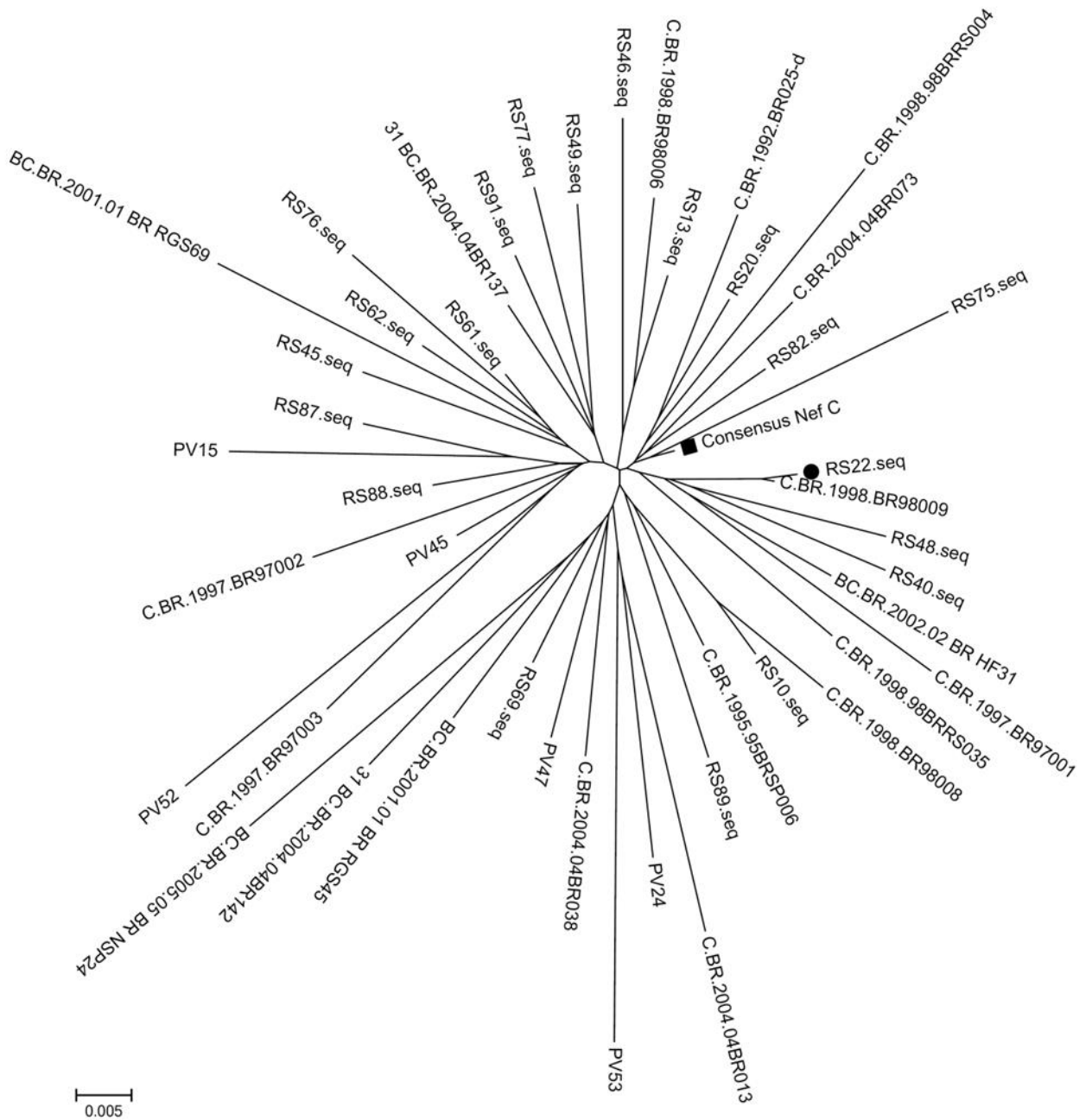
C



D

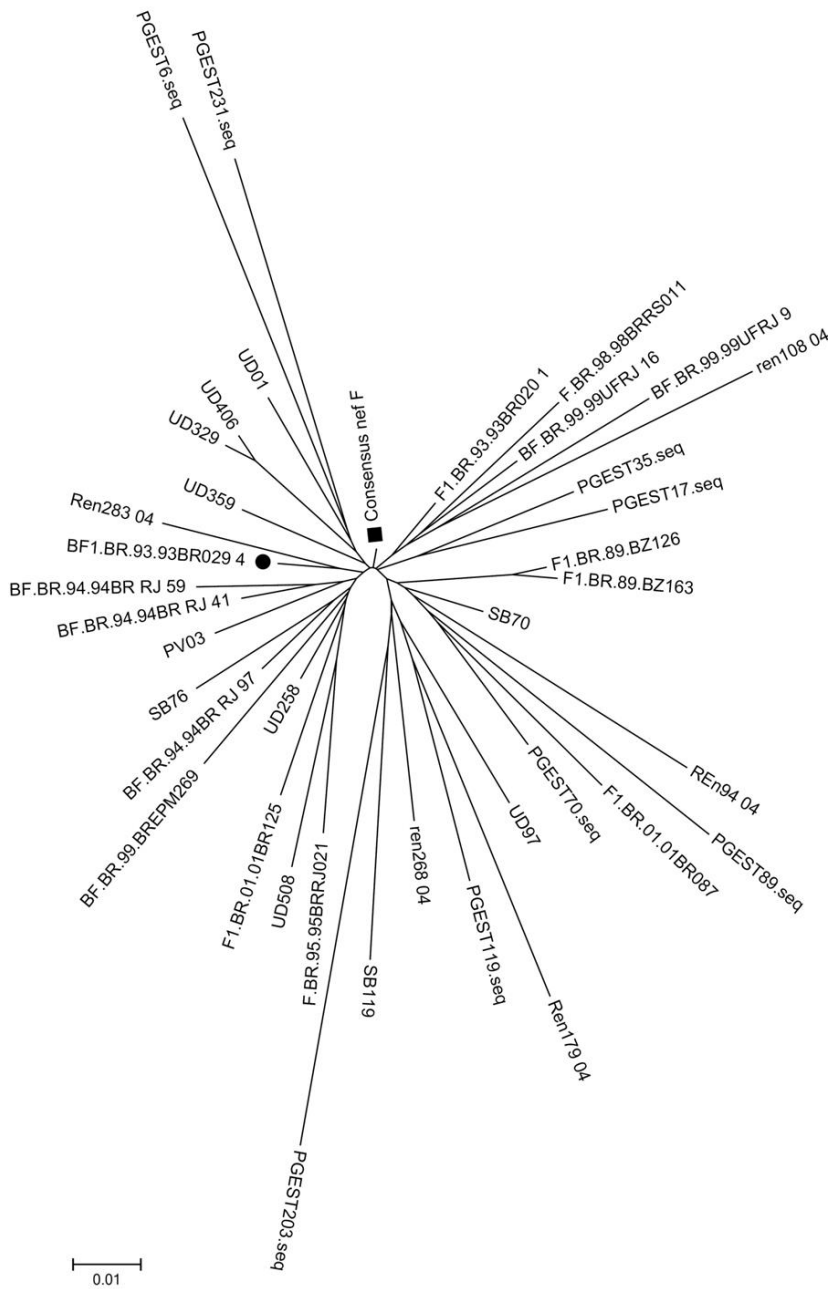


E





F



**Fig. S1. Unrooted neighbor-joining phylogenetic trees.** Phylogenetic tree of 21 Brazilian subtype B *gag* (A), 34 Brazilian subtype C *gag* (B), 31 Brazilian subtype F1 *gag* (C), 51 Brazilian subtype B *nef* (D), 45 Brazilian subtype C *nef* (E), 38 Brazilian subtype F1 *nef* (F) sequences and consensus sequences. Consensus sequences are tagged by a solid square and Closest Viral Isolates by a solid circle.

### 3.2 Documento 2 – “HIV controllers patients with different viral load cut-off levels have distinct virologic and immunologic profiles”

**Autores:** Fernanda Heloise Côrtes, Caroline Pereira Bittencourt Passaes, Gonzalo Bello, Sylvia Lopes Maia Teixeira, Carla Vorsatz, Dunja Babic, Mark Sharkey, Beatriz Grinsztejn, Valdilea Gonçalves Veloso, Mario Stevenson, Mariza Gonçalves Morgado.

**Periódico:** Trabalho em fase de submissão ao Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes

Um raro grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 é capaz de controlar a replicação viral naturalmente, e são denominados controladores de elite (EC). Esse grupo tem sido alvo de intensivos estudos, no entanto, os mecanismos responsáveis pelo controle ainda não estão totalmente elucidados. Nesse trabalho foi feita uma avaliação de parâmetros virológicos, genéticos e imunológicos em indivíduos infectados pelo HIV-1, incluindo grupos de controladores: 1) Controladores de Elite (EC, n=7) com CV <80 cópias/mL em todos os pontos; 2) Controladores de Elite com *Blips* (EEC, n=5) com CV >80 cópias/mL em apenas 30% dos pontos e 3) Controladores Virêmicos (VC, n=7) com CV <5,000 cópias/mL e >80 cópias/mL em mais de 30% dos pontos. Indivíduos infectados pelo HIV-1 não tratados (NC) ou em tratamento antirretroviral (HAART) e indivíduos não infectados pelo HIV-1 foram analisados como grupos controles. A coorte de controladores foi enriquecida em alelos protetores HLA-B, B\*27 e B\*57. O nível de DNA total e integrado do HIV-1 foi significativamente menor nos EC do que o observado nos NC e HAART. Formas circulares de 2-LTR não foram detectadas nos EC, mas foram detectadas em EEC (3/5) e em VC (6/7). Enquanto EC e EEC mantêm contagens normais de células T CD4<sup>+</sup> ao longo da infecção, alguns VC apresentam uma perda progressiva dessas células. Uma frequência maior de células T CD8<sup>+</sup> ativadas foi observada em EEC e VC quando comparada a indivíduos não infectados. Os EEC também apresentaram maior translocação microbiana, avaliada pela concentração de sCD14 no plasma, quando comparados com indivíduos não infectados. Os EC demonstraram uma resposta de células T fraca frente a Gag/Nef e uma proporção de anticorpos IgG anti-HIV menor que EEC, VC e NC. Esses resultados demonstram que EEC e VC são capazes de montar uma resposta imune específica mais forte frente a estímulos

do HIV-1, mas paralelamente apresentam maiores níveis de ativação imune, translocação microbiana e maior reservatório viral comparado aos EC. Destacando assim, a heterogeneidade dos indivíduos capazes de controlar a replicação viral e reforçando a necessidade de uma classificação mais precisa de indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes níveis de controle da replicação viral.

## **HIV controllers with different viral load cut-off levels have distinct virologic and immunologic profiles**

Fernanda H Côrtes, MSc\*<sup>1</sup>, Caroline PB Passaes, PhD\*<sup>1§</sup>, Gonzalo Bello, PhD<sup>1</sup>, Sylvia LM Teixeira, PhD<sup>1</sup>, Carla Vorsatz, MD<sup>2</sup>, Dunja Babic, PhD<sup>3</sup>, Mark Sharkey, PhD<sup>3</sup>, Beatriz Grinsztejn, MD, PhD,<sup>2</sup> Valdilea Veloso, MD, PhD<sup>2</sup>, Mario Stevenson, PhD<sup>3</sup>, Mariza G Morgado, PhD<sup>1</sup>.

\*Both authors contributed equally to this work

<sup>1</sup> Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Medicine, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, United States.

Running Title: Virologic and immunologic profiles of HIV controllers

### **Conflicts of Interest and Source of Funding**

The authors declare no conflict of interest.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq [grant number 480875/2010-33]; by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ [grant numbers E-26/103.095/2011 and E-26/100.299/2011 to C.P.B.P] and by National Institutes of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health [grant number U19 AI096109 to M.S.].

**Results presented at:**

19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA, March, 2012

(abstract: 291). 30 years of HIV science: Imagine the future, Paris, France, May, 2013

(abstract: 109).

**#Corresponding author:** Mariza Gonçalves Morgado and Fernanda Heloise Côrtes

Address: Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Av. Brasil 4365, Leonidas Deane Building, room 413.

Rio de Janeiro, Brazil. 21040-900

Email: mmorgado@ioc.fiocruz.br / fheloise@ioc.fiocruz.br

Telephone number: +55 21 38658154 / Fax number: +55 21 38658173

**§ Current affiliations:** Caroline Pereira Bittencourt Passaes

a Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Institut Pasteur, 25–28 rue du Dr Roux,

75724 Paris Cedex 15, France.

b CEA, Division of Immuno-Virology, iMETI/DSV, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

caroline.pereira-bittencourt@pasteur.fr/caroline.passaes@cea.fr

## **ABSTRACT**

**Background:** The mechanisms behind natural control of HIV replication are still unclear, and several studies pointed that elite controllers are a heterogeneous group.

**Methods:** We performed analyses of virologic, genetic and immunologic parameters of HIV-1 controllers groups: 1) Elite Controllers (EC; VL <80 copies/mL); 2) Ebbing Elite Controllers (EEC; transient viremia/blips); and Viremic Controllers (VC; detectable viremia <5,000 copies/mL). Untreated non-controllers (NC), patients under suppressive HAART and HIV-1 negative individuals were analyzed as controls.

**Results:** Total and integrated HIV-1 DNA for EC were significantly lower than for NC and HAART groups. 2-LTR circles were detected in EEC (3/5) and VC (6/7) but not in EC. While EC and EEC maintain normal T cell counts over time, some VC displayed negative CD4+ T cells slopes. VC and EEC showed a higher percentage of activated CD8+ T cells and microbial translocation than HIV-1 negative controls. EC displayed a weaker Gag/Nef IFN- $\gamma$  T cell response and a significantly lower proportion of anti-HIV IgG antibodies than EEC, VC and NC groups.

**Conclusion:** EEC and VC mount a stronger HIV-specific immune response, but experience increases in immune activation, microbial translocation and size of the HIV-1 reservoir compared to EC, highlighting the heterogeneity of the HIV controllers.

**Key words:** HIV-1, elite controllers, viral load blips, ongoing replication, immune activation, immune response.

## INTRODUCTION

A small percentage (<1%) of HIV-1 infected individuals spontaneously control viral replication to levels below the limit of detection of standard clinical assays (50-400 RNA copies/mL). They are usually called HIV controllers (HIC) or elite controllers (EC) <sup>1,2</sup>. An initial study described the EC as a homogenous group of HIV-infected patients <sup>3</sup>, but subsequent analyses revealed a more heterogeneous scenario <sup>4-6</sup>. While some EC maintain stable CD4<sup>+</sup> T cell counts within the normal range and no evidence of chronic immune activation over time when compared to HIV negative subjects, <sup>7</sup> others display higher CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation levels and a significant loss of CD4<sup>+</sup> T cell <sup>8-10</sup>. Markers of microbial translocations are higher in some EC than in HIV-negative individuals and correlate with T cell activation levels <sup>8</sup>.

The role of the HIV-specific cellular immune response as a mechanism of natural control of HIV-1 replication in EC is also controversial. The overall level and functionality of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in EC is highly variable among individuals <sup>3,4,6,11-15</sup>. Indeed, based on the capacity of CD8<sup>+</sup> T cells to suppress HIV infection *ex vivo*, the EC were classified as strong and weak responders <sup>6</sup>. In addition, while various EC cohorts are enriched by some HLA class I alleles, including B\*27 and B\*57 that have been associated with HIV control <sup>3,16-18</sup>, other EC individuals do not encode these alleles. Moreover, several HIV infected patients harboring B\*27 and B\*57 HLA alleles are not able to control viral replication at such low levels <sup>4,19</sup>.

These data suggest that the EC phenotype is probably a multifactorial phenomenon that results from the combination of several host and/or viral factors. Despite this, few studies are able to perform comprehensive analyses associating virologic, genetic and immunologic data to characterize EC. Furthermore, the criteria used to classify EC patients in different cohorts varies based on the viral load (VL) cut-offs (<50 to <400 copies/mL) and time of HIV

control (1 to >10 years), which also influence the underlying characteristics of the selected patients. Here, we performed a comprehensive analysis of virologic, genetic and immunologic profiles of a cohort of HIV-1-infected patients who naturally control viral replication at distinct levels.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

A cohort of 19 HIV controllers has been followed-up at the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Rio de Janeiro, Brazil. For the present study, these HIV controllers were classified in three categories: (1) Elite controllers (EC), including patients presenting 100% of VL measures <80 copies/mL (n=7); (2) Ebbing elite controllers (EEC), including patients with occasional episodes (<30% of frequency) of transient viremia between 81-400 copies/mL (n=5); and (3) Viremic controllers (VC), patients with consistently detectable plasma viral load in the low range (<5,000 copies/mL) (n=7). Untreated non-controller (NC) patients (n=30) with high viral load levels (>10,000 copies/mL), patients under suppressive HAART (n=13) and HIV-1 negative controls (n=10) were also included in the analysis for comparisons. The present work was approved by the IPEC Institutional Review Board (Addendum 049/2010) and the Brazilian National Committee for Research Ethics (CONEP 840/2008). All subjects gave written informed consent.

### **CD4 T cell counts and RNA viral load quantification**

Absolute CD4<sup>+</sup> T cells counts were obtained using the MultiTest TruCount-kit and the MultiSet software on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Plasma HIV-1 viral loads were measured using the nucleic acid sequence based amplification (NASBA) system (Nuclisens, Organon Teknika) and the Versant HIV-1 3.0 RNA assay (bDNA, Siemens Healthcare Diagnostics, USA).

### **HIV subtype classification**



Subtype was determined based on the *gag*, *pol* and/or *nef* HIV-1 genomic regions. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing were performed as previously described<sup>20,21</sup>. Subtype determination was inferred based on phylogenetic analysis (Neighbor-Joining with Kimura-2 parameters correction, as available in the Mega 5.1 package).

### **HLA and CCR5 genotyping**

HLA-B typing was performed as previously described<sup>22</sup>. The presence of the  $\Delta 32$  variant in CCR5 was assessed by PCR amplification/agarose gel electrophoresis. For the wild-type allele, a 239bp fragment was detected and a 207bp fragment corresponded to the mutant allele. Primers are described in Supplementary table 1.

### **HIV-1 total, integrated and 2-LTR DNA quantification**

Total and episomal DNA were extracted as previously described<sup>23</sup>. Chromosomal DNA was purified from the SDS-precipitate recovered during the purification of episomal DNA, following the same protocol described for total DNA extraction. HIV total and integrated DNA and CCR5 were measured by a single step real time PCR protocol. PCR conditions were as previously described<sup>23</sup>, primers and probes are detailed in Supplementary Table 1. Standard curves were generated using a plasmid containing two copies of HIV LTR and two copies of *CCR5* gene. The values were normalized based on cell numbers estimated by CCR5 quantification and are expressed as the number of DNA copies/ $10^6$  PBMC.

### **T-cell activation analysis**

Cryopreserved PBMCs were thawed and immediately stained for anti-CD8-FITC/CD38-PE (BD Simultest, BD Biosciences, USA), anti-CD3-APC, and anti-HLA-DR-PerCP (BD Biosciences, USA). Samples were acquired using a BD FACSCalibur flow cytometer, and analyses were performed with BD CellQuest software (BD Biosciences, USA).

### **Quantification of soluble CD14 (sCD14) plasma levels**

The microbial translocation was estimated based on the level of sCD14 in plasma. Plasma levels of sCD14 were assayed in duplicate using ELISA assay-sCD14 Quantikine (R&D Systems, USA), according to the manufacturer's protocol. The results were expressed as pg/mL.

### **Serological testing (BED-CEIA)**

The proportion of anti-HIV-1 IgG in comparison to total IgG was measured in plasma samples by a quantitative competitive capture enzyme immunoassay - Calypte HIV-1 BED Incidence EIA (Calypte Biomedical Corporation, USA) <sup>24</sup>.

### **IFN- $\gamma$ ELISpot**

The IFN- $\gamma$  ELISPOT assay was performed as previously described <sup>25</sup> Peptides were derived from HIV-1 Gag and Nef consensus subtype B, C and F1, previously described <sup>25</sup>, and for each patient, was used a subtype homologue consensus peptides. Phytohemagglutinin-5 $\mu$ g/mL (Sigma, USA) was used as a positive control, and cells resuspended only in culture medium served as a negative control. The spots were counted using an automated ELISPOT reader (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology, USA). The results were expressed as spot-forming cells (SFC)/million PBMC. The response was considered positive if  $\geq 50$  SFC/ $10^6$  PBMC were detected.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad 5.0 (Prism Software, USA) and Epi Info Version 6 <sup>26</sup>. DNA quantification analysis, CD4 slope, CD8 T cell activation, sCD14 and ELISPOT IFN- $\gamma$  data were analyzed using Mann-Whitney test to compare variables between two subjects groups. Chi-square tests (or Fisher's exact tests, when appropriate) were used for HLA-B allelic frequencies and 2-LTR positive PCR percentages comparisons among groups. Correlations were performed using the Spearman test. All tests were considered significant if the *P* value was  $\leq 0.05$ .

## RESULTS

### **Clinical, epidemiological, and genetic characteristics of HIV controllers**

The clinical, epidemiological and genetic data of the 19 HIV controllers included in the present study are displayed in Table 1. The median time of follow-up (estimated time of HIV control) was nine years (IQR: 7-12 years). The median age for the HIV controllers cohort was 44 years old (IQR: 42.5-44.0 years old), and females (58%) were more frequent than males. The distribution of subtype B, F1, C and BF recombinants among HIV controllers, is in accordance with the overall HIV-1 molecular epidemiologic scenario in Rio de Janeiro state<sup>27</sup>.

The HLA-B alleles B\*27 and B\*57, classically associated with HIV-1 control, were found among our cohort of HIV controllers. Three individuals - all VC - presented HLA-B\*27 (allelic frequency= 7.9%); and four individuals – two EC and two VC – presented HLA-B\*57 (allelic frequency= 10.5%). Three out of 19 patients (one EC, one EEC and one VC) were heterozygous for the CCR5 $\Delta$ 32, but we did not identify any patient homozygous for this mutation. No statistical difference was observed in the comparison of the host genetic markers among the three HIV controllers groups.

### **HIV controllers have a limited HIV-1 reservoir**

The level of total and integrated HIV-1 DNA was determined for the three groups of HIV controllers as well as for NC and HAART groups (Figure 1A and 1B). Total and integrated HIV-1 DNA were significantly lower for the EC group in comparison to both NC ( $P= 0.0003$  and  $P= 0.0005$ ) and HAART ( $P= 0.0005$  and  $P= 0.0004$ ) groups. The levels of total and integrated HIV-1 DNA for the EEC were higher than the observed for EC, but also significantly lower in comparison to NC ( $P= 0.0028$  and  $P= 0.0052$ ). VC displayed HIV DNA levels in a mean range between EC/EEC and HAART/NC, significantly lower than NC ( $P= 0.0078$  and  $P= 0.0492$ , respectively). Plasma HIV-1 RNA viral load correlated positively

with both total and integrated HIV DNA for the patients analyzed here ( $r = 0.78$ ) (Figure 1D and 1E).

### **2-LTR circles are detected in EEC and VC but not in EC**

In order to assess whether residual HIV replication occurs in these HIV controllers, we quantified the 2-LTR circles (Figure 1C). The 2-LTR circles were not detected in EC patients, but were detected in three out of five EEC ( $P = 0.0455$ ) and six out of seven VC ( $P = 0.0047$ ). The levels of 2-LTR circles were significantly lower for EEC and VC in comparison to NC ( $P = 0.0104$  and  $P = 0.0192$ , respectively). Of note, nine out of 13 patients under HAART had detectable 2-LTR circles and in higher levels than the HIV controller groups. The levels of 2-LTR HIV DNA correlated positively with HIV-1 RNA viral load (Figure 1F), and with total and integrated HIV DNA (data not shown).

### **HIV replication at a low level may induce a loss of CD4<sup>+</sup> T cells**

The median of CD4<sup>+</sup> T cells counts in the peripheral compartment of EC was significantly higher than that of EEC, VC, and NC patients ( $P = 0.0480$ ,  $0.0175$  and  $0.0005$ , respectively) (Figure 2A). EEC patients also displayed significantly higher CD4<sup>+</sup> T cells counts than NC patients ( $P = 0.0032$ ) (Figure 2A). All groups of HIV controllers displayed CD8<sup>+</sup> T cells counts significantly lower than the NC group ( $P < 0.01$ ) (Figure 2B). All EC and EEC displayed nearly flat or positive CD4<sup>+</sup> T cells slopes over time; whereas two VC and most NC displayed negative CD4<sup>+</sup> T cells slopes (Figure 2C). The CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio in all EC (except one) and EEC was  $\geq 1$ ; while three VC and all NC displayed a CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio  $< 1$  (Figure 2D).

### **Transient and persistent low viral replication induce activation and microbial translocation**

The level of activated CD8<sup>+</sup> T cells in EC was comparable to the level observed in HIV-uninfected participants (Figure 3A). However, a higher activation was observed in EEC than in HIV-uninfected individuals ( $P = 0.0027$ ), but lower than in NC ( $P = 0.0414$ ) (Figure 3A).

Despite of the high dispersion, the median of CD8<sup>+</sup> T cell activation in VC was higher than in HIV-uninfected participants ( $P = 0.0020$ ) and similar to NC (Figure 3A). The median of sCD14 concentration in plasma of HIV-infected individuals was higher than in HIV uninfected, although differences were only significant for EEC and NC groups (Figure 3B).

#### **HIV specific immune responses were influenced by transient viral load**

The proportion of anti-HIV-1 IgG antibodies and anti-HIV-1 IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed in the different HIV-infected groups. No significant differences were observed in the proportion of anti-HIV-1 IgG among EEC, VC and NC groups, conversely, the median proportion of anti-HIV-1 IgG of EC was significantly lower than that found in the other groups ( $P = 0.0177$ ;  $0.0041$ ;  $0.0185$ ; respectively) (Figure 4A). Three EC displayed a remarkably low proportion of anti-HIV-1 IgG [normalized optical density (ODn) < 0.8 of calibrator OD], comparable to those seen in recently infected individuals. The magnitude of IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T cell responses against both Gag and Nef subtype-specific epitopes in EC also showed a trend towards lower values when compared to the other groups, although significant differences were observed only between EC and VC groups (Figure 4B and 4C).

#### **Plasma RNA viral load is associated with CD8<sup>+</sup> T cell activation and anti-HIV-1 IgG antibodies**

The percentage of activated CD8<sup>+</sup> T cells was positively correlated with both plasmatic RNA viral load (Supplementary Figure 1A) and 2-LTR DNA viral load (Supplementary Figure 1B) and negatively correlated with the CD4<sup>+</sup> T cell slope (Supplementary Figure 1C). No significant correlations were detected between the level of plasmatic sCD14 and percentage of activated CD8<sup>+</sup> T cells, plasmatic RNA viral load and 2-LTR HIV-1 DNA (Supplementary Figure 1D, 1E and 1F). A positive correlation was also observed between plasmatic RNA viral load and antibody response (Supplementary Figure 2A), but not between plasmatic RNA viral load and Gag- or Nef-specific T cell responses (Supplementary Figure 2B and 6C).

## DISCUSSION

Studies with EC offer a unique opportunity to understand the mechanisms underlying the natural control of HIV infection, giving valuable clues to the development of a therapeutic vaccine and strategies for inducing a durable viral remission in non-controllers patients. However, the EC status has been shown to be a multifactorial phenomenon, associated with virus, host genetics and immunity. Here, we show that the presence of transient viremic episodes and low level persistent HIV replication have relevance in the immune activation and specific immune responses.

Protective HLA class I alleles, mainly HLA-B\*57, are enriched in EC cohorts <sup>4,16,19</sup>. In the present study, we also noted a significant increase in HLA-B\*27 and B\*57 frequencies among HIV controllers. These frequencies were also significantly increased ( $P = 0.01$  and  $P = 0.04$ , respectively) when compared with a Brazilian cohort of 218 individuals with distinct AIDS progression profiles <sup>28</sup>. Concerning the CCR5 polymorphisms, the frequencies of the CCR5 $\Delta$ 32 mutation did not vary from that observed among the population of HIV seronegative individuals <sup>4</sup> in the present study, contrary to a previous description of a higher prevalence of CCR5 $\Delta$ 32 mutation in EC compared to that observed for the general population <sup>17</sup>. In our study, neither the HLA-B alleles nor the CCR5 $\Delta$ 32 frequencies differed significantly among different HIV controllers groups (EC, EEC and VC), although the number of patients within each group was too small to detect potential differences.

HIV reservoirs are established very early after HIV infection <sup>29</sup>. In the present study, we assessed viral reservoir by quantifying total and integrated HIV-1 DNA in PBMCs. We confirmed previous findings that HIV controllers have a smaller reservoir compared to HAART-treated and patients with a typical progression profile <sup>30,31</sup>. Although there were no significant differences in the HIV reservoir size among different HIV controller groups, the

mean of total and integrated HIV-1 DNA load in EC was lower than in EEC and VC. This is consistent with a more efficient long-term suppression of HIV replication in EC patients compared with the other groups and further suggests that the occurrence of transient and persistent replication in EEC and VC, even at low levels, contributes to replenishment of the viral reservoir over time. A small HIV reservoir is consistent with a long-term suppression of HIV replication in EC patients.

Despite the limited HIV reservoir, it has been consistently described that most EC maintain a persistent low-level viremia and that HIV continues to replicate and evolve overtime<sup>32-35</sup>. We evaluated whether ongoing viral replication was taking place in our cohort of HIV controllers. Consistently, the levels of 2-LTR circles were lower for all groups of HIV controllers than to NC. 2-LTR circles were not detected in EC patients but were detected in three out of five EEC patients and six out of seven VC. Of note, the VC patient with undetectable 2-LTR circles also had undetectable viremia at this time point. To our knowledge, this study is the first to demonstrate that 2-LTR circles can be detected in EEC, which might be used as a predictive marker of transient viremic episodes. Further studies with a larger number of patients must be conducted to validate this hypothesis.

A previous study by Graf and colleagues<sup>30</sup> described increased levels of 2-LTR circles in PBMC from EC compared to viremic non-treated and HAART treated patients. The authors raised the possibility that a pre-integration restriction mechanism could be taking place in the EC, but this hypothesis was not confirmed by ex vivo analyses in that cohort. Our findings of undetectable 2-LTR levels in EC contradict the findings of Graf and colleagues, however our results strongly correlate with our HIV controllers clinical data. Since the EC patients have well documented long-term suppression of viremia, markers of ongoing viral replication are not expected to be detected at high levels ex vivo.

Since persistent viremia can be detected by using ultrasensitive methods in the majority of HIV controllers, the continuous exposure to viral products might induce a chronic immune

activation and inflammation in these patients <sup>32</sup>. Previous studies demonstrated that some HIV controllers have a higher level of T cell activation than HIV uninfected subjects <sup>8,36</sup>, while others show similar levels <sup>7</sup>. Here, we investigated the impact of different levels of viremia on T cell activation and, despite the limited number of patients included in this study, we found a significantly higher degree of CD8<sup>+</sup> T cell activation in VC and EEC than in HIV uninfected individuals. This result indicates that even transient episodes of detectable viremia might induce chronic immune activation in HIV-infected individuals. Moreover, EEC also presented a higher level of sCD14 than EC. Chronic immune activation has been pointed as a major driving force of CD4<sup>+</sup> T cell depletion in HIV-infected patients <sup>37</sup>. In our study, CD8<sup>+</sup> T cell activation levels were positively correlated with the RNA viral load and the 2-LTR DNA viral load, and negatively correlated with the CD4<sup>+</sup> T cell slope, suggesting that ongoing viral replication accounts, at least in part, for systemic immune activation and possibly CD4<sup>+</sup> T cell depletion in our cohort patients. The EEC presented lower CD4<sup>+</sup> T cell counts than EC, although no significant decrease in CD4<sup>+</sup> T cells was observed in this group. This result is in contrast with Boufassa and colleagues <sup>38</sup> that showed an association between the presence of blips and a decrease in CD4<sup>+</sup> T cell count, although they observed a frequency of blips ( $\leq 50\%$ ) higher than in our study ( $\leq 30\%$ ).

Previous studies described the heterogeneity of CD8<sup>+</sup> T cell responses in elite controllers <sup>4,6</sup> and based on that heterogeneity EC patients were classified as “strong responders” and “weak responders” <sup>6</sup>. Here, based on IFN- $\gamma$  ELISPOT results, we found that most “weak responders” were EC, whereas EEC and VC mostly correspond to “strong responders”. This is in agreement with previous studies that also observed an association between the presence of blips and a stronger CD8<sup>+</sup> T cell response in EC <sup>6</sup> and HAART treated individuals <sup>39</sup>, pointing out the need for a transient or continuous stimulus for maintaining a detectable long-term ex vivo HIV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cell response.



No correlation between stronger CD8<sup>+</sup> T cell response and presence of HLA-B\*27 or B\*57 was observed, corroborating previous findings <sup>40</sup>. Conversely, a recent study evaluated the impact of HLA-B\*57 on the HIV-specific CD8<sup>+</sup> response in EC, confirming that this allele plays an important role in the high quality HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell response displayed by these subjects <sup>41</sup>. The association between HIV replication and immune response was also verified when HIV-specific antibodies were evaluated. The proportion of anti-HIV-1 IgG antibodies in EC was significantly lower than that observed in EEC, VC and NC. Furthermore, three EC subjects presented levels of anti-HIV-1 IgG lower than the cut-off that defines recent infection (<6 months from HIV infection), despite being measured more than 5 years after an HIV diagnosis. These results are fully consistent with those previously reported by our group <sup>7</sup> and others <sup>42,43</sup>, and support the notion that transient or persistent HIV replication is also necessary to develop and maintain a high proportion of anti-HIV-1 IgG antibodies.

Although transient or persistent viremia in the detectable range (>50 copies/mL plasma) seems to be necessary for maintaining strong HIV-specific cellular and humoral immune responses over time, we detected one EC patient that presented a strong ex vivo HIV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cell INF- $\gamma$  response and a high proportion of HIV-specific IgG antibodies. Notably, this subject also presented the highest level of CD8<sup>+</sup> T cell counts and lowest CD4/CD8 ratio among EC, while normal levels of CD8<sup>+</sup> T cell activation were observed.

Taken together, our data reinforce the heterogeneity of the elite controller population and highlight the importance of viral load “blips” in the virologic and immunologic profile of these patients. In the present study, we adopted the nomenclature “ebbing elite controllers” to define the patients with “blips” due to their ability to suppress viral loads after loss of HIV control. Based on the data presented here, investigation of patients with the same characteristics in larger cohorts of HIV controllers is warranted in order to elucidate the role of transient viremic episodes in the evaluation of virus, host genetics and immunity.

## **Acknowledgments**

We wish to thank the University of Miami – Department of International Students and Scholar Services for the support. We thank the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde -PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities. Most of all, we thank our patients. Without their participation and commitment this study would not have been possible.

## References

1. Madec Y, Boufassa F, Porter K, Meyer L. Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *AIDS*. 2005;19(17):2001-2007.
2. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis*. 2009;200(11):1714-1723.
3. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053-1056.
4. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(4):563-571.
5. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *Aids*. 2009;23(8):897-906.
6. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, et al. Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses. *Journal of Immunology*. 2009;182(12):7828-7837.
7. Bello G, Velasco-de-Castro CA, Bongertz V, et al. Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *J Med Virol*. 2009;81(10):1681-1690.
8. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008;197(1):126-133.

9. Andrade A, Bailey JR, Xu J, et al. CD4+ T cell depletion in an untreated HIV type 1-infected human leukocyte antigen-B\*5801-positive patient with an undetectable viral load. *Clin Infect Dis*. 2008;46(8):e78-82.
10. Sedaghat AR, Rastegar DA, O'Connell KA, Dinoso JB, Wilke CO, Blankson JN. T cell dynamics and the response to HAART in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1763-1766.
11. Williams LD, Bansal A, Sabbaj S, et al. Interleukin-21-producing HIV-1-specific CD8 T cells are preferentially seen in elite controllers. *J Virol*. 2011;85(5):2316-2324.
12. Betts M, Nason M, West S, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-4789.
13. Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, et al. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS*. 2010;24(8):1095-1105.
14. Hersperger AR, Pereyra F, Nason M, et al. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):e1000917.
15. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(16):6776-6781.
16. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2709-2714.
17. Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*. 2010;330(6010):1551-1557.
18. Fellay J, Shianna KV, Ge D, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007;317(5840):944-947.

19. Emu B, Sinclair E, Hatano H, et al. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol.* 2008;82(11):5398-5407.
20. Cortes FH, Bello G, Vorsatz C, et al. Higher cross-subtype IFN-gamma ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1 subtype B- and F1- than in C- infected subjects. *Vaccine.* 2013;31(7):1106-1112.
21. Passaes CP, Bello G, Lorete RS, et al. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31\_BC in Southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):474-482.
22. Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Morgado MG. Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):638-642.
23. Sharkey M, Babic DZ, Greenough T, Gulick R, Kuritzkes DR, Stevenson M. Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001303.
24. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002;18(4):295-307.
25. Calarota SA, Foli A, Maserati R, et al. HIV-1-specific T cell precursors with high proliferative capacity correlate with low viremia and high CD4 counts in untreated individuals. *J Immunol.* 2008;180(9):5907-5915.
26. *Epi Info, Version 6: A word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers* [computer program]. Atlanta, Georgia, USA: Centre for Disease Control and Prevention; 1995.

27. Velasco-de-Castro CA, Grinsztejn B, Veloso VG, et al. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2014;9(1):e87622.
28. Teixeira SL, de Sa NB, Campos DP, et al. Association of the HLA-B\*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes Immun*. 2014.
29. Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387(6629):183-188.
30. Graf EH, Mexas AM, Yu JJ, et al. Elite suppressors harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circular HIV DNA compared to HIV+ patients on and off HAART. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):e1001300.
31. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053-1056.
32. Pereyra F, Palmer S, Miura T, et al. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis*. 2009;200(6):984-990.
33. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol*. 2009;83(1):329-335.
34. Mens H, Kearney M, Wiegand A, et al. HIV-1 continues to replicate and evolve in patients with natural control of HIV infection. *J Virol*. 2010;84(24):12971-12981.
35. O'Connell KA, Brennan TP, Bailey JR, Ray SC, Siliciano RF, Blankson JN. Control of HIV-1 in elite suppressors despite ongoing replication and evolution in plasma virus. *J Virol*. 2010;84(14):7018-7028.

36. Pereyra F, Lo J, Triant VA, et al. Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *Aids*. 2012;26(18):2409-2412.
37. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev*. 2013;254(1):326-342.
38. Boufassa F, Saez-Cirion A, Lechenadec J, et al. CD4 dynamics over a 15 year-period among HIV controllers enrolled in the ANRS French observatory. *PLoS One*. 2011;6(4):e18726.
39. Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, et al. Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *Aids*. 2004;18(7):981-989.
40. Tomescu C, Duh FM, Hoh R, et al. Impact of protective killer inhibitory receptor/human leukocyte antigen genotypes on natural killer cell and T-cell function in HIV-1-infected controllers. *Aids*. 2012;26(15):1869-1878.
41. Lecuroux C, Saez-Cirion A, Girault I, et al. Both HLA-B\*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers. *J Virol*. 2014;88(1):176-187.
42. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV type 1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(3):495-498.
43. Wendel SK, Mullis CE, Eshleman SH, et al. Effect of natural and ARV-induced viral suppression and viral breakthrough on anti-HIV antibody proportion and avidity in patients with HIV-1 subtype B infection. *PLoS One*. 2013;8(2):e55525.

**Table 1. Characteristics of the cohort of HIV controllers followed-up in this study.**

Patient	Sex	Age	Year of HIV diagnosis	HIV Risk Factor	Years of Known HIV Suppression	CD4 counts Median (IQR)	VL Frequency			HLA-B alleles	CCR-5 genotype	HIV subtype
							<80cps/mL	81-400cps/mL	401-5000cps/mL			
EC02	F	49	1997	HET	10	1229 (1077-1480)	100%			B*48, B*52	WT/WT	B
EC07	F	28	2003	HET	8	2308 (1931-2444)	100%			B*48, B*81	WT/WT	BF
EC08	F	41	1996	HET	15	1207 (993.8-1355)	100%			B*45, B*57	WT/WT	B
EC17	F	62	2001	NI	8	1674 (1494-1954)	100%			B*14, B*15	WT/WT	B
EC19	M	44	2006	HET	5	972 (826.5-1093)	100%			B*44, B*58	WT/WT	B
EC26	M	40	2008	MSM	4	1531 (1409-2124)	100%			B*07, B*57	WT/WT	BF
EC28	M	46	1996	MSM	13	1163 (891.5-1358)	100%			B*51, B*58	WT/Δ32	B
EEC09	M	43	2001	MSM	10	888 (710-1054)	79%	21%		B*49, B*52	WT/WT	B
EEC11	F	45	1995	HET	10	1078 (959.5-1206)	90%	10%		B*49, B*81	WT/Δ32	B
EEC13	F	58	1993	HET	19	954 (718.3-1138)	73%	27%		B*15, B*51	WT/WT	B
EEC14	F	42	1999	HET	7	702 (652-795)	75%	25%		B*42, B*44	WT/WT	F
EEC18	F	NI	2001	HET	10	825	86%	14%		B*44, B*58	WT/WT	B



						(673-940.5)							
VC04	F	47	2007	HET	4	770		28%	72%		B*27, B*40	WT/WT	C
						(718-895.3)							
VC06	M	34	2000	MSM	7	1132		80%	20%		B*15, B*48	WT/Δ32	B
						(913-1225)							
VC10	M	48	1991	NI	18	1254	22%	52%	26%		B*15, B*52	WT/WT	B
						(1078-1460)							
VC12	M	40	2000	MSM	9	1022	23%	15%	62%		B*27, B*44	WT/WT	B
						(872.5-1131)							
VC15	F	NI	2001	HET	11	735			100%		B*56, B*57	WT/WT	B
						(677-793.8)							
VC16	M	45	1997	MSM	9	552	29%	47%	24%		B*14, B*57	WT/WT	B
						(530.5-623.3)							
VC27	F	36	1998	HET	10	895	35%	18%	47%		B*08, B*27	WT/WT	B
						(757-965.5)							
<b>Group summary</b>	<b>Frequency</b>	<b>Median</b>	<b>Median</b>	<b>Frequency</b>	<b>Median</b>	<b>Median</b>	<b>Mean</b>	<b>Mean</b>	<b>Mean</b>	<b>Frequency</b>	<b>Frequency</b>	<b>Frequency</b>	
EC	M=43% F=57%	44	2001	HET=57% MSM=29%	8	1229	100%	0%	0%	B*27/B*57= 29% Non- B*27, B*57= 71%	WT/Δ32=14% WT/WT=86%	B=71% BF=29%	
EEC	M=20% F=80%	44	1999	HET=80% MSM=20%	10	888	80%	20%	0%	B*27/B*57= 0% Non- B*27, B*57= 100%	WT/Δ32=20% WT/WT=80%	B=80% F=20%	
VC	M=57% F=43%	42.5	2000	HET=43% MSM=43%	9	895	27%	40%	49%	B*27/B*57= 43% Non- B*27, B*57= 57%	WT/Δ32=14% WT/WT=86%	B=86% C=14%	

NI: Not informed; HET: Heterosexual; MSM: Man who have sex with man; WT: wild type.

## Figure legends

**Figure 1.** Quantification of total (A) and integrated (B) viral DNA for HIV controllers, HAART and NC groups. Quantification of 2-LTR circles for Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC), Patients in HAART and Non-Controllers (NC) groups (C). Relationship between plasmatic viral load and total HIV DNA (D), integrated HIV DNA (E), and 2-LTR circles (F). The horizontal lines denote median values. *P* values for comparison between two groups were calculated using a 2-tailed Mann-Whitney test. Correlations were calculated using a nonparametric Spearman test. Data from EC, EEC, VC and NC were used to calculate correlations.

**Figure 2.** Evaluation of peripheral CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T cell populations, CD4<sup>+</sup> T cell slope (C) and CD4/CD8 ratio among Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-controllers (NC). The horizontal bars denote median values. *P* values for comparison between two groups were calculated using a 2-tailed Mann-Whitney test.

**Figure 3.** Percentages of activated (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells (A) and level of sCD14 (pg/mL) in the plasma (B) among HIV-uninfected participants, Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-Controllers (NC). The horizontal bars denote median values. *P* values for comparison between two groups were calculated using a 2-tailed Mann-Whitney test.

**Figure 4.** Evaluation of HIV-1 specific responses. Proportion of anti-HIV-1 IgG determined by BED-CEIA found in Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-Controllers (NC) (A). Gag- (B) and Nef- (C)

specific PBMC responses among Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-Controllers (NC) by IFN- $\gamma$  ELISpot (SFC/10<sup>6</sup> PBMC). Open circles represent patients with B\*57 and open squares represent patients with B\*27 alleles. Horizontal dashed line represents the conventional cut-off value (0.8) below which a sample is classified as recent infection (153-day window period) based on the low proportion of HIV-specific IgG in the serum/plasma. The horizontal bars denote median values. *P* values for comparison between two groups were calculated using a 2-tailed Mann-Whitney test.

**Supplementary Figure 1.** Relationship between CD8<sup>+</sup> T cell activation level and plasmatic viral load (*A*), 2-LTR circles (*B*), CD4<sup>+</sup> T cell slope (*C*) and sCD14 (*D*). Relationship between sCD14 and plasmatic viral load (*E*), and 2-LTR circles (*F*). Correlations were calculated using a nonparametric Spearman test. Data from Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC) and Viremic Controllers (VC) were used to calculate correlations between immunologic parameters and 2-LTR circles. For all others correlations, data from Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-Controllers (NC) were used. Not significant (ns).

**Supplementary Figure 2.** Relationship between plasmatic viral load and anti-gp41-binding antibodies (*A*), Gag- (*B*), and Nef-specific (*C*) T cell responses. Correlations were calculated using a nonparametric Spearman test. Data from Elite Controllers (EC), Ebbing Elite Controllers (EEC), Viremic Controllers (VC) and Non-Controllers (NC) were used to calculate correlations. Not significant (ns).

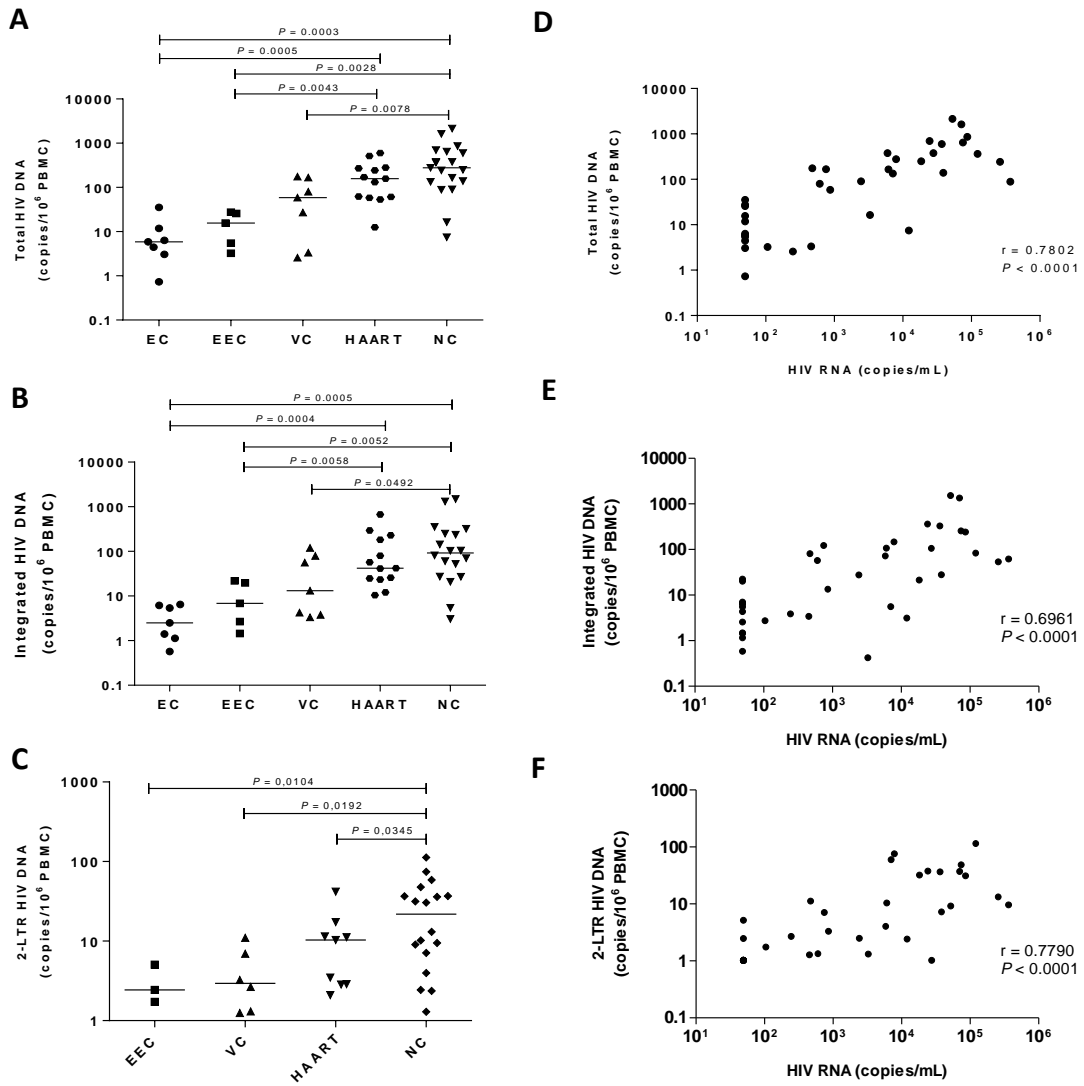
**Supplementary table 1: Description of primers and probes used in this study.**

<b>Primers and probes<sup>a</sup></b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Target</b>
M667	CTGGCTAACTAGGGAACCCACTG	Total and integrated
4nr	GTCTGAGGGATCTCTAGTTAC	Total and integrated
C1	TAGACCAGATCTGAGCCTGGGA	2-LTR
C4	GTAGTTCTGCCAATCAGGGAAG	2-LTR
CCR5/f	GCTGTCTTTGCGTCTCTCCCAGGA	CCR5
CCR5/r	CTCACAGCCCTGTGCCTCTTCTTC	CCR5
2nr4nr <sup>b</sup>	AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGC	Total, integrated and 2-LTR
CCR5 probe <sup>b</sup>	AGCAGCGGCAGGACCAGCCCAAG	CCR5

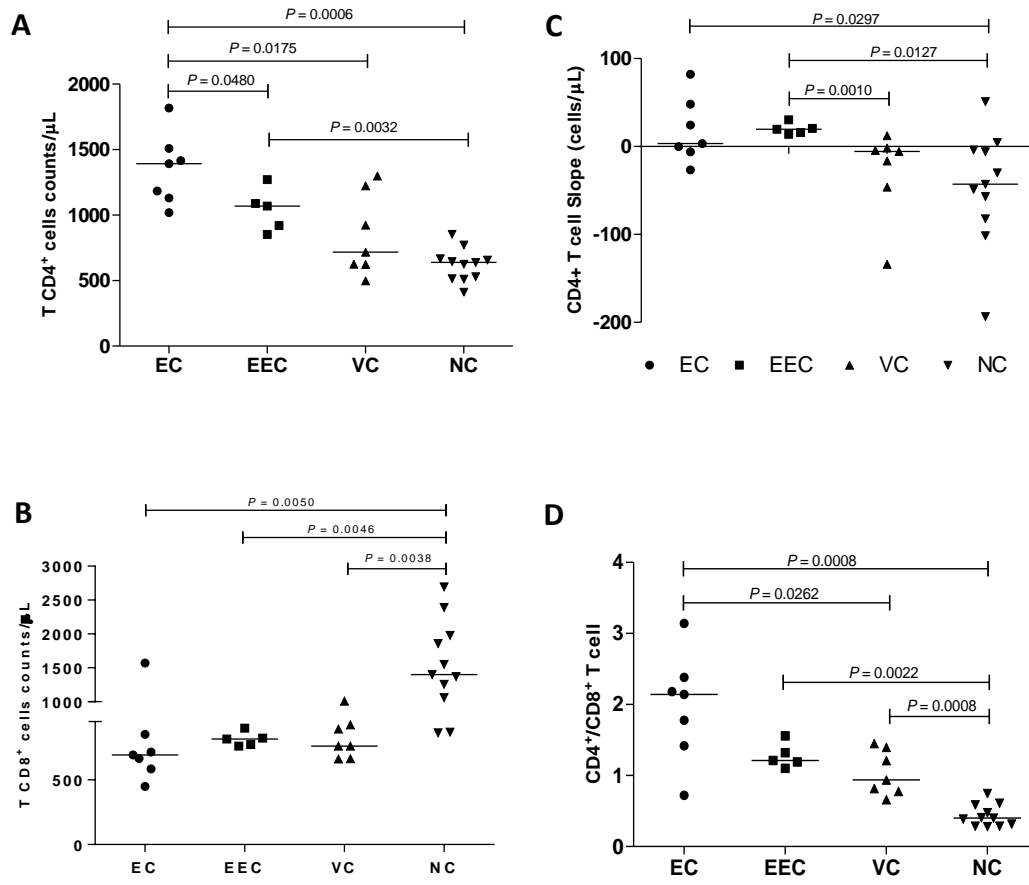
<sup>a</sup> Primers and probes were purchased from Integrated DNA Technologies-IDT.

<sup>b</sup> Probes contain the following characteristics: 5`6-FAM™/ZEN™/3`IB®FQ.

**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

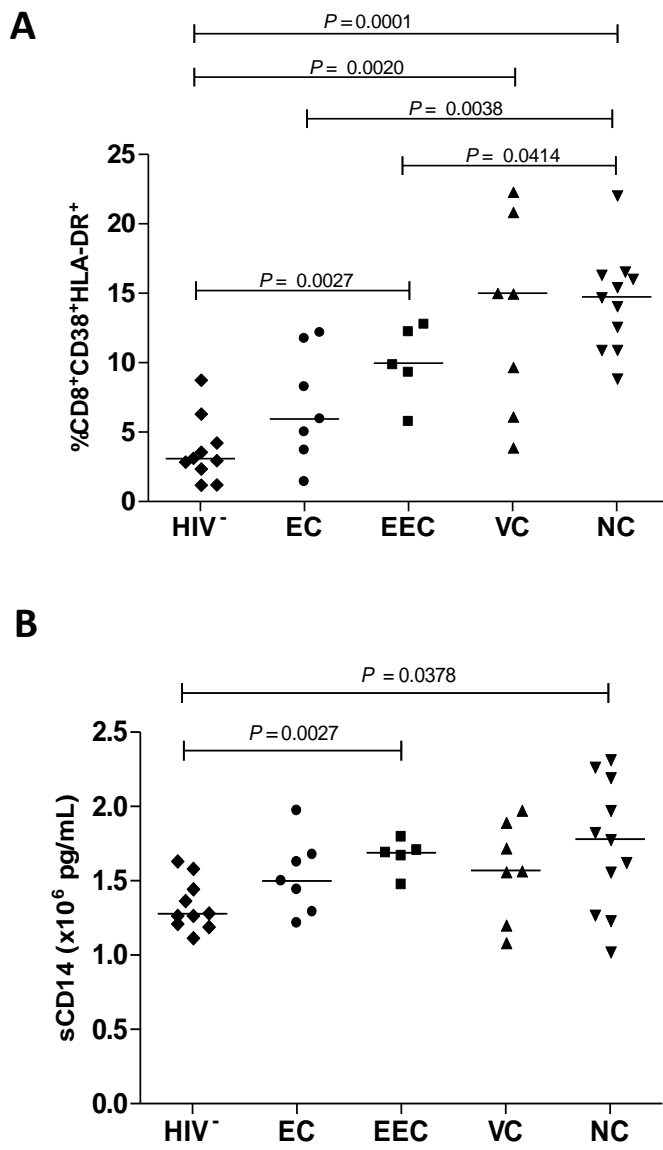
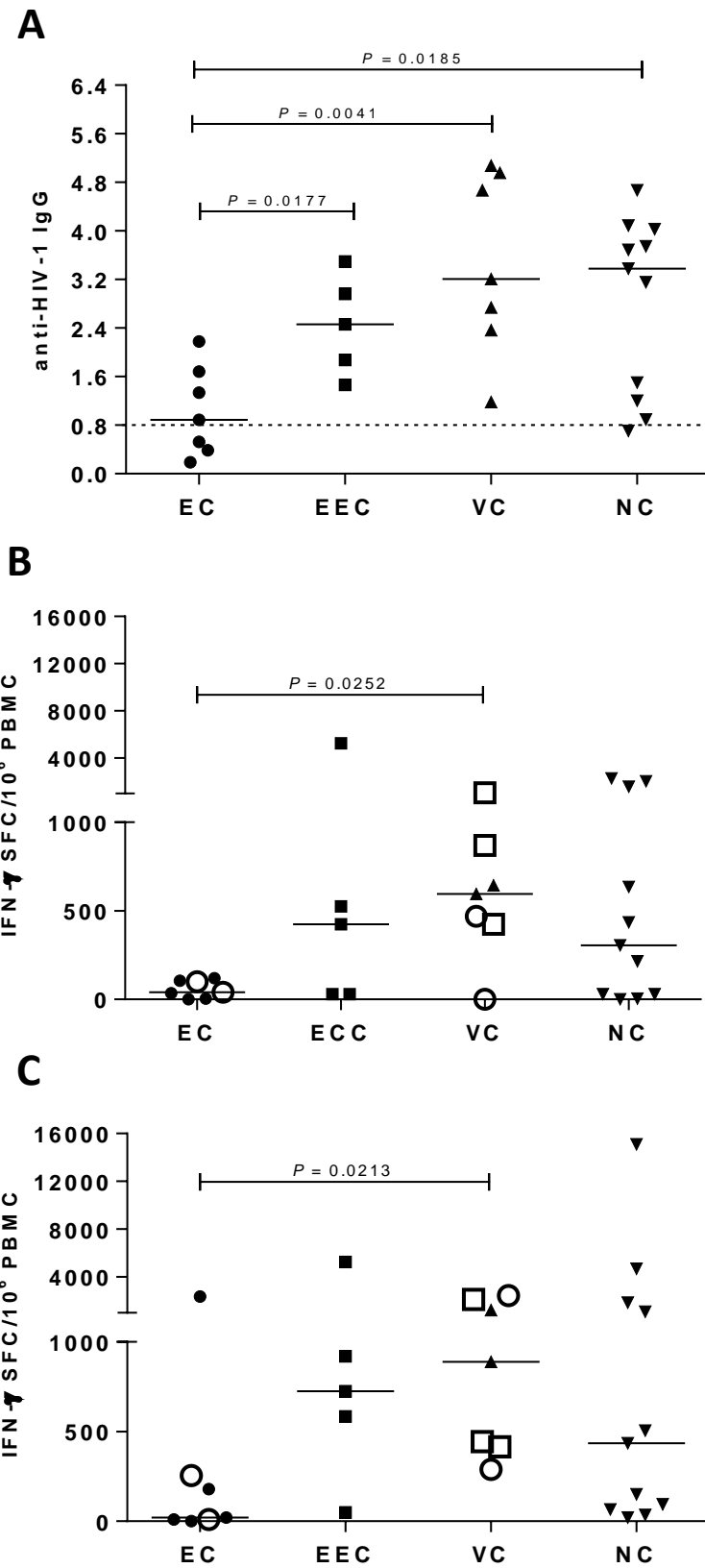
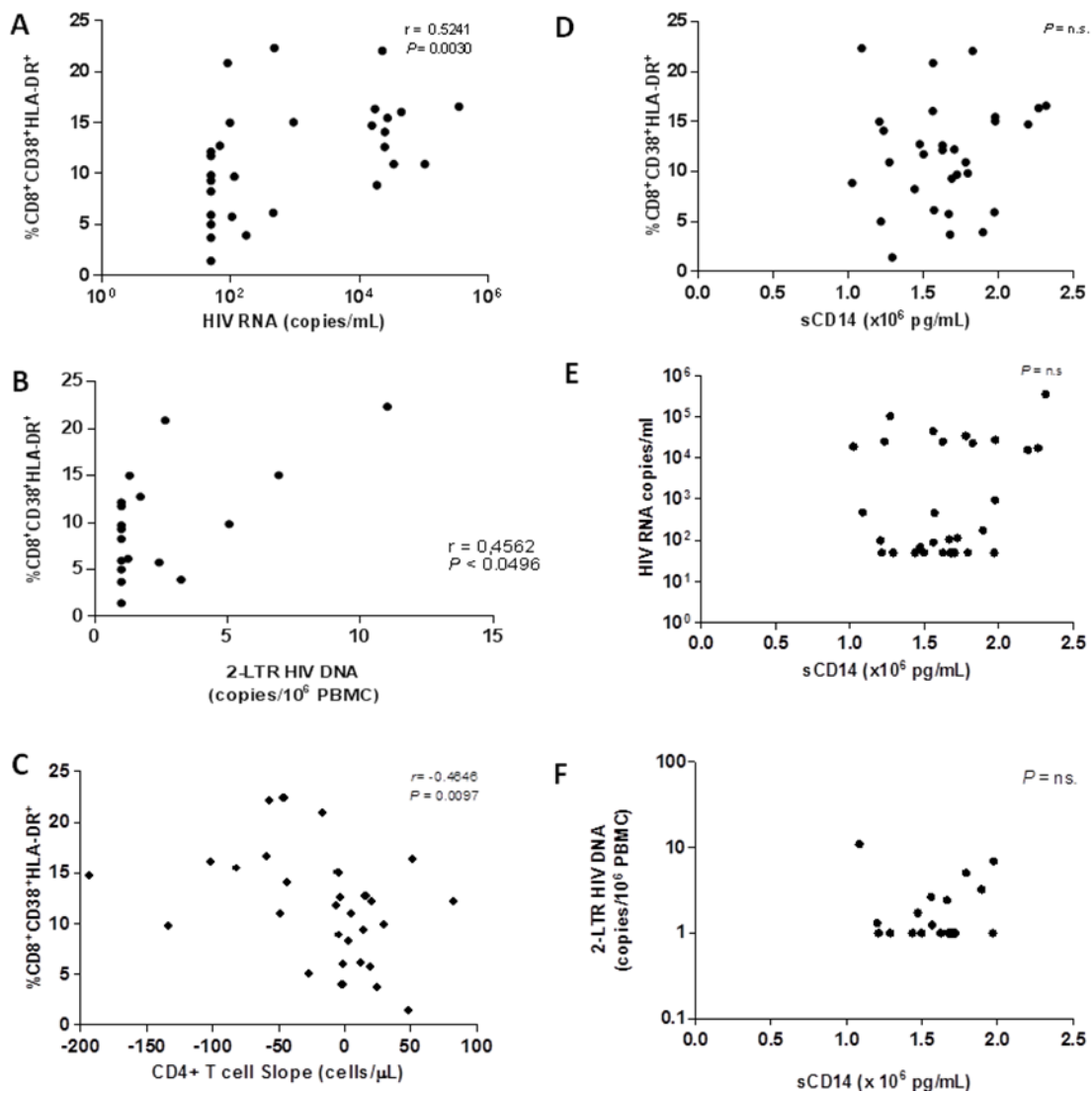


Figure 4

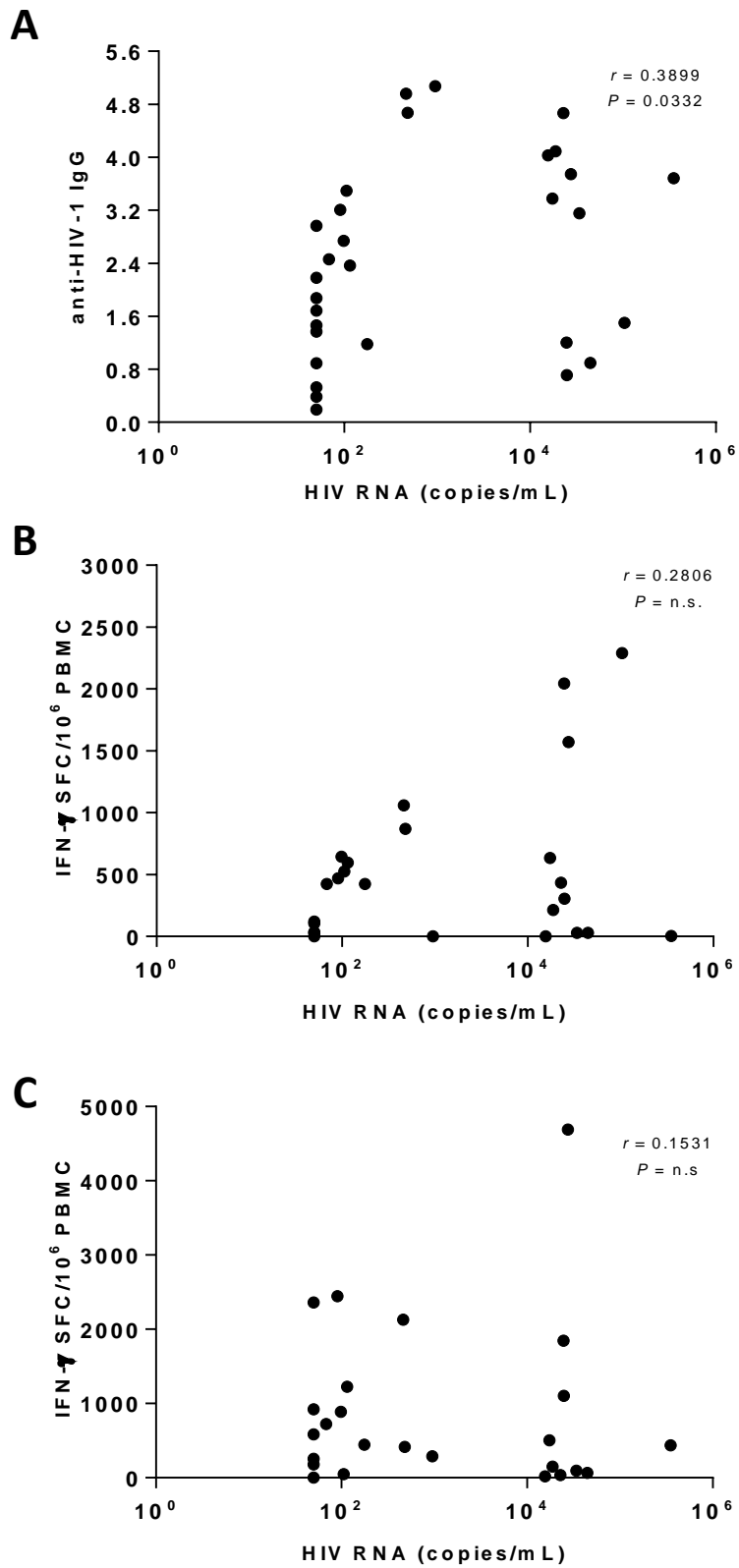




### Supplementary Figure 1



## Supplementary Figure 2



## 4 DISCUSSÃO

A pandemia do HIV-1 é a infecção emergente mais importante das últimas décadas. Embora importantes progressos tenham sido feitos na prevenção de novas infecções e na diminuição do número de mortes relacionadas à aids, ainda ocorrem aproximadamente 2 milhões de novas infecções por ano (1). O desenvolvimento de uma vacina é colocado como a melhor estratégia para o controle da pandemia. No entanto, entre as candidatas a vacina que evoluíram para testes clínicos de eficácia, apenas uma apresentou resultados positivos, mas com uma modesta eficácia (31,2%) (49). Dessa forma, é essencial o desenvolvimento de estratégias para a obtenção de uma vacina eficiente. Nesse contexto, diversos fatores têm atuado como obstáculos, entre eles, a diversidade genética do HIV-1 e a falta de correlatos de proteção contra a infecção ou progressão para a doença são elementos centrais.

Uma vez que sequências centrais são capazes de diminuir a distância genética entre o imunógeno e sequências circulantes (175), esse foi o primeiro parâmetro avaliado no presente estudo. Nas comparações entre as sequências consenso construídas para cada subtipo com as sequências CVI, as duas estratégias apresentaram uma capacidade similar de redução da distância genética, com diferença significativa apenas entre o consenso e o isolado do subtipo B em Gag. A introdução mais antiga do subtipo B no Brasil (176) em relação aos demais subtipos prevalentes, levando a uma maior divergência entre a sequência consenso construída e os isolados virais circulantes, poderia ser um dos fatores que têm impacto na maior distância observada, no entanto, é importante destacar que essa diferença não foi observada na análise de Nef no mesmo subtipo.

A diferença observada na distância genética não teve impacto significativo na resposta de células T aos peptídeos derivados do Con B ou CVI B, apesar de ser observada uma tendência para uma maior magnitude de resposta frente ao Con B. Nas comparações entre Con e CVI envolvendo o subtipo C e F1, a magnitude de resposta não diferiu entre as duas estratégias, compatível com os valores similares de distância genética. A distância genética também foi comparada entre os Con do subtipo B, C, F1 e grupo M, como esperado, a distância genética intrassubtipo foi menor que a observada interssubtipo com efeitos variáveis na magnitude de resposta. Esses efeitos divergentes da distância genética na magnitude de resposta podem ser resultantes da tolerância do HLA ou do TCR a determinadas

substituições de aminoácidos. Diferentes estudos demonstram a capacidade de ligação às variantes de um mesmo epítipo, incluindo estudos com epítopos do HIV-1, enquanto algumas mudanças de aminoácidos não tiveram impacto na magnitude de resposta, outras aboliram, diminuíram ou mesmo aumentaram a resposta (67, 177, 178).

Neste trabalho foi demonstrada uma distância genética menor em Nef do que em Gag, o que foi refletido na magnitude de resposta para essa proteína. Apesar de Gag ser uma das proteínas com maior nível de conservação do HIV-1, é importante destacar que para esse estudo usamos uma porção central de Nef que também possui uma região com alto grau de conservação (179). Além da maior distância genética, a menor resposta observada para Gag também pode ser efeito da análise ter sido realizada apenas frente a uma porção da proteína. O uso de Gag inteiro seria mais adequado, no entanto, devido ao alto custo de síntese dos peptídeos, as análises foram concentradas na proteína p17 que apresenta, em geral, uma alta frequência de resposta, principalmente pela presença do epítipo SL9 (SLYNTVATL) (180).

Diversos estudos têm avaliado a reatividade cruzada entre diferentes subtipos do HIV-1 usando sequências consenso, no entanto, a maioria envolve o subtipo B, C ou A (66-70, 181). Poucas informações são disponíveis sobre a reatividade cruzada de células T envolvendo o subtipo F1 (182). Esse subtipo, bem como formas recombinantes BF1 possuem um importante papel na epidemia de alguns países da América Latina, como Brasil, Argentina e Uruguai (183-185). Uma forte reatividade cruzada foi observada entre os subtipos B e F1 quando avaliada a resposta frente a Gag e Nef. No grupo de indivíduos infectados com o subtipo B, todos os pacientes que apresentaram resposta frente aos peptídeos do Con B também reconheceram os peptídeos do Con F1; nos indivíduos infectados com o subtipo F1, 71% das respostas foram detectadas com ambos os consensos. Além disso, as medianas de magnitudes de respostas frente aos dois conjuntos de peptídeos foram similares. Esses dados corroboram os resultados de Turk e colaboradores em 2008 (182), que também demonstraram reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 em Nef. Este estudo analisou a resposta de indivíduos infectados com recombinantes BF, principalmente CRF12\_BF, no entanto, é importante destacar que na região de *nef*, os vírus isolados desses indivíduos apresentam sequência referente ao subtipo F1, assim como os peptídeos derivados do CRF12\_BF para essa região.

Na análise da reatividade cruzada entre os subtipos B e C, foram encontrados resultados discordantes dependendo da região e do grupo de indivíduos analisados. No grupo de pacientes infectados pelo subtipo B, não foi encontrada diferença significativa tanto na frequência como na magnitude de resposta frente aos peptídeos do Con B ou Con C de Gag e Nef, enquanto que em indivíduos infectados pelo subtipo C, foi observada uma diferença significativa na magnitude de resposta frente ao Con B Gag, mas o mesmo não foi observado em Nef. A resposta de células T de indivíduos infectados com o subtipo B frente a peptídeos baseados no subtipo C também foi observada em estudos anteriores. Yu e colaboradores em 2005 (66) avaliaram a resposta frente a todas as proteínas do HIV-1 em uma coorte de indivíduos infectados pelo subtipo B, e observou níveis similares de magnitude e amplitude de resposta frente ao Con B e Con C, no entanto, em uma análise com peptídeos individuais foi observada uma redução na reatividade cruzada, com apenas 42% das respostas sendo detectadas com ambos os consensos.

Outros dois estudos, avaliando a resposta frente à Gag em indivíduos infectados pelo subtipo B também demonstraram reatividade frente a peptídeos derivados do Con C (67, 70). Uma menor reatividade de células T de indivíduos infectados pelo subtipo C a peptídeos derivados do consenso B já foi observada em estudos anteriores avaliando a resposta frente a Gag e Nef. Em uma coorte de indivíduos de Zâmbia, infectados pelo subtipo C, foi observada uma magnitude e amplitude de resposta menor ao consenso B, comparado ao consenso C (68). Resultados similares foram verificados em uma coorte de indivíduos sul-africanos comparando a resposta frente a isolados do subtipo C e ao consenso B (73).

A reatividade cruzada entre os subtipos C e F1 também apresentou resultados discordantes no nosso estudo, dependendo do alvo da resposta e do grupo de indivíduos estudado. Não foi encontrada diferença significativa entre a magnitude de resposta frente ao consenso C e ao consenso F1, em Gag, na análise das respostas de células T de indivíduos infectados com o subtipo C. Essa reatividade cruzada foi menor em Nef, com diferença significativa na magnitude de resposta entre o Con C e o Con F1. Um padrão inverso foi observado para os indivíduos infectados com o subtipo F1, no qual a magnitude de resposta foi maior para o Con F1 em Gag comparado ao valor encontrado para Con C, não havendo, no entanto, diferença entre a resposta aos dois consensos em Nef.

Para a avaliação da reatividade cruzada, além dos consensos dos subtipos B, C e F1, também foi utilizado o consenso do grupo M, uma vez que ele tem sido

proposto como uma alternativa para regiões onde diferentes subtipos circulam (70, 71). Peptídeos derivados do consenso do grupo M apresentaram magnitude similar ao observado para consenso do subtipo homólogo em indivíduos infectados pelo subtipo B ou F1. No entanto, essa estratégia detectou níveis significativamente menores de resposta nos indivíduos infectados pelo subtipo C. Uma resposta similar frente ao consenso B e ao consenso M foi observada em estudos com indivíduos infectados pelo subtipo B na avaliação da resposta específica para Gag (67, 70). Em contraste com esses dois estudos e os nossos resultados, Frahm e colaboradores (68) encontraram uma magnitude menor de resposta frente ao consenso M quando comparada às respostas detectadas com o consenso B em indivíduos infectados pelo subtipo B em duas coortes diferentes (Estados Unidos e Peru). No entanto, no mesmo estudo, essa menor reatividade ao consenso M não foi observada na coorte de Barbados. Esse estudo também avaliou a resposta frente ao consenso M, usando uma coorte de indivíduos infectados com o subtipo C e, diferente dos nossos resultados, a magnitude de resposta frente ao consenso C e ao consenso M foi similar, o que também foi observado em 2006, um estudo de Bansal e colaboradores (70).

Em geral, a resposta específica frente à Nef apresentou maior reatividade cruzada entre os subtipos do que a resposta frente à Gag. Essa maior reatividade cruzada frente à Nef também foi observada em dois estudos complementares, que avaliaram a resposta frente a peptídeos derivados da sequência de isolados virais dos subtipos A, B e C, que apresentavam maior similaridade com a sequência consenso de cada subtipo, envolvendo coortes de diferentes países, incluindo o Brasil (186, 187). É importante destacar que, apesar desses trabalhos terem incluído indivíduos infectados com o subtipo F1 ou formas recombinantes BF1, os dados apresentados não incluem análises específicas para o subtipo F1. Outra observação do nosso estudo é que, em geral, indivíduos infectados pelo subtipo C apresentaram menor magnitude de resposta. A primeira hipótese levantada foi a de que esses indivíduos apresentariam maior comprometimento do sistema imune, mas com os dados disponíveis de contagem de células T CD4<sup>+</sup>, essa não parece ser a causa. Outro fator que poderia ter impacto nessa resposta é o fato do consenso C ter sido construído com uma maior predominância de sequências originadas do Rio Grande do Sul, enquanto os indivíduos avaliados no estudo eram provenientes de Santa Catarina, no entanto na comparação da distância genética entre a sequência

consenso C e as sequências dos vírus infectantes, os valores verificados para o subtipo C foram similares aos observados para os subtipos B e F1.

Em uma análise mais direta do efeito da distância genética na magnitude de resposta de células T frente aos peptídeos dos quatro consensos avaliados, foi demonstrada uma correlação inversa entre distância genética e magnitude de resposta em Gag, mas o mesmo não foi observado em Nef. Diferentes estudos têm demonstrado resultados discordantes sobre o impacto da distância genética na magnitude de resposta. Assim, enquanto em alguns estudos é possível observar uma relação entre a distância genética e a resposta, em outros essa relação parece não existir (68, 181, 188), com alguns resultados discordantes até no mesmo estudo, dependendo da região alvo ou do grupo de indivíduos avaliados, como observado em nossos dados. É importante destacar que as sequências consenso utilizadas para o desenho dos peptídeos dos três subtipos, B, C e F1 e do grupo M apresentavam diversas regiões com alto grau de similaridade e algumas das respostas identificadas como reatividade cruzada podem ser reflexo da identidade antigênica nessas regiões. No entanto, não foi feita uma análise com peptídeos individuais para identificação precisa da resposta.

Apesar de nosso estudo ter encontrado uma alta reatividade cruzada entre os subtipos B e F1, não é possível determinar o quanto essa resposta se traduz em reatividade cruzada antiviral capaz de garantir proteção contra a infecção ou doença. Assim, a próxima etapa do nosso trabalho foi caracterizar uma coorte de indivíduos controladores da replicação viral, incluindo alguns LTNP para melhor definição do perfil associado à proteção nesses pacientes. Os peptídeos baseados nos consensos construídos no estudo anterior foram utilizados para avaliar a resposta de células T de indivíduos capazes de controlar a replicação viral e/ou a progressão para a aids, usando o consenso do subtipo homólogo para cada paciente. Inicialmente avaliamos a resposta dividindo os indivíduos em três grupos de acordo com o controle da replicação viral em EC, VC e NC. No entanto, os resultados obtidos no ensaio de ELIspot IFN- $\gamma$  frente a peptídeos homólogos Gag e Nef apontou para a existência de um subgrupo dentro dos EC, pois enquanto em alguns pacientes a resposta frente aos peptídeos era praticamente ausente ou muito baixa, outros apresentavam uma maior frequência e magnitude de resposta. Foi observado que o grupo de EC que apresentava maior resposta era composto principalmente por indivíduos que tinham alguns episódios detectáveis de viremia chamados de

*blips*, e esse grupo foi denominado EEC, que passou a constituir um novo grupo considerado nas nossas análises

A magnitude de resposta frente aos peptídeos foi mais baixa em indivíduos EC do que em VC, não sendo demonstrada diferença estatística significativa entre os grupos EC e EEC. Apesar de não ter sido observada uma resposta elevada de células T de EC frente aos peptídeos, que no nosso estudo anterior apresentaram uma forte reatividade cruzada, isso não exclui a importância desses alvos como possíveis candidatos para futuros estudos para o desenho de antígenos vacinais. Diferentes estudos têm evidenciado uma grande heterogeneidade de resposta de células T CD8<sup>+</sup> em coortes de indivíduos controladores (151, 172, 189). Baseado na capacidade de supressão da replicação viral, Sáez-Cirión 2009 (172) classificou indivíduos controladores em “respondedores fracos” e “respondedores fortes”, nesse estudo ele também avaliou a resposta de IFN- $\gamma$  por ELISpot e observou que indivíduos com baixa capacidade de supressão viral também apresentavam uma menor quantidade de células produtoras de IFN- $\gamma$ .

Baseado na ausência de uma resposta de células T observada em alguns estudos, surgiu a hipótese da existência de indivíduos controladores, nos quais células T parecem não ter um papel importante na proteção, chamados “non-T cell controllers” (189, 190). No entanto, um recente estudo demonstrou que após a estimulação de PBMC por 12 dias com peptídeos de Gag, células T CD8<sup>+</sup> de “respondedores fracos” demonstraram um número maior de respostas que eram anteriormente indetectáveis do que um grupo de não controladores (191). Esses dados refletem a existência de um repertório potencial de células T nestes indivíduos, o qual não é detectável em ensaios de curta duração devido a baixa ou ausente estimulação antigênica. É importante ressaltar que esse estudo não exclui a participação de outros fatores no controle da replicação viral, mas sim reforça a importância de células T. A relação entre a presença do estímulo e maior resposta de células T também foi observada em um estudo com indivíduos em terapia antirretroviral, no qual indivíduos que apresentavam episódios detectáveis de viremia ou viremia constantemente detectável exibiam uma maior magnitude e amplitude de resposta do que indivíduos que tinham carga viral completamente suprimida (192).

A resposta de células T também foi avaliada considerando a presença dos alelos HLA-B\*27 ou HLA-B\*57, no entanto, não foi encontrada uma maior resposta em indivíduos portadores desses alelos. Essa falta de relação entre uma resposta maior de células T com a presença de alelos protetores já foi observada em um



estudo anterior (193), evidenciando a heterogeneidade desse grupo, uma vez que diversos dados apontam para uma maior resposta de células T em indivíduos portadores de alelos relacionados à proteção (194).

Considerando a importância da melhor caracterização de indivíduos infectados pelo HIV-1 que são capazes de controlar a replicação viral naturalmente, foi feita uma avaliação de diferentes parâmetros nesses pacientes. Estudos têm destacado o enriquecimento de determinados alelos de HLA de classe I, principalmente HLA-B\*27 e B\*57, em coortes de controladores (149, 151, 189). Na nossa coorte também foi encontrada uma maior frequência desses alelos, quando comparado com os resultados de um estudo do nosso grupo que analisou 218 indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes perfis de progressão para aids (195). É importante destacar que nesse estudo foi descrita uma associação da presença do alelo HLA-B\*52 com uma progressão mais lenta para a doença e esse alelo também teve representação na nossa coorte. Outra característica genética do hospedeiro, que é associada ao controle da replicação viral ou progressão para a aids, é a presença de mutações nos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2. Nesse trabalho avaliamos apenas a presença da mutação CCR5 $\Delta$ 32, que foi identificada em heterozigose em três indivíduos controladores. Não foi demonstrada diferença na frequência de alelos HLA-B ou CCR5 $\Delta$ 32 entre os grupos de controladores avaliados, mas é importante destacar que o número de indivíduos em cada grupo é pequeno para detecção de potenciais diferenças.

Apesar do limitado reservatório viral, estudos têm demonstrado que a maioria dos EC apresentam uma viremia persistente extremamente baixa, detectada apenas com uso de testes ultrasensíveis (196, 197). No nosso trabalho a replicação persistente foi avaliada pela detecção de 2-LTR. Não foi detectado 2-LTR em nenhum do EC, mas nos EEC e VC esse marcador foi detectado. Graf e colaboradores (198) descreveram um aumento de 2-LTR em EC comparado a um grupo de pacientes não tratados com viremia detectável. Para explicar esses dados, os autores levantaram a hipótese de um mecanismo inibindo a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, mas nenhuma análise foi feita para confirmação desta hipótese. Nossos resultados estão em contraste com esses dados, no entanto são compatíveis com os dados laboratoriais apresentados pelos controladores, considerando que os EC apresentam uma supressão viral bem documentada de longa duração, a detecção de 2-LTR não é mesmo esperada.

Apesar da grande maioria dos indivíduos controladores não apresentarem declínio da contagem de células T CD4<sup>+</sup>, já foi demonstrado que em alguns EC ocorre uma queda dessa população celular (199). Entre os EC e EEC do nosso estudo não foi observada diminuição na contagem de células T CD4<sup>+</sup>, enquanto em dois indivíduos VC ocorreu uma redução ao longo do tempo de acompanhamento, o que também foi observada para a maioria dos NC. A inversão da relação CD4/CD8 é uma das características observadas em indivíduos infectados pelo HIV-1, não só pela depleção das células T CD4<sup>+</sup>, como também pelo aumento de células T CD8<sup>+</sup>. Entre os EC e EEC, apenas um EC (02) apresentou uma relação CD4/CD8 menor que um, no entanto, sem queda na contagem de células T CD4<sup>+</sup>.

A ativação imune crônica é uma das principais características da infecção pelo HIV-1 e diversas evidências sugerem um papel central desse fenômeno na patogênese da infecção. Estudos demonstraram que a elevada ativação de células T CD8<sup>+</sup> é associada com uma progressão mais rápida para aids e com a diminuição da contagem de células T CD4<sup>+</sup> (98, 103, 200). Além disso, a elevada ativação de células T não é observada em infecções não patogênicas do SIV (92), apesar da alta carga viral observada no hospedeiro. Entre os controladores da replicação viral, foi demonstrada uma maior ativação de células T CD8<sup>+</sup> – avaliada pela expressão das moléculas HLA-DR e CD38 – comparada com indivíduos não infectados, no entanto, esta foi significativamente menor do que em indivíduos NC (166, 201-203). Essa maior ativação em controladores pode ser reflexo da replicação viral, em níveis extremamente baixos, que pode ser detectada em alguns desses indivíduos com uso de testes ultrasensíveis (196).

No nosso estudo, apesar do número reduzido de indivíduos, foi observado um nível maior de ativação de células T CD8<sup>+</sup> no grupo de controladores que apresentavam episódios de viremia detectável quando comparado com indivíduos não infectados pelo HIV-1, enquanto não foi demonstrada diferença significativa entre EC e indivíduos não infectados pelo HIV-1. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e a carga viral. Um estudo anterior do nosso grupo, também encontrou níveis similares de ativação de células T CD8<sup>+</sup> em indivíduos controladores e indivíduos não infectados, em uma análise longitudinal de quatro controladores (204). A discrepância do nosso resultado para outros estudos (166, 201-203) que encontraram maior ativação em EC quando comparados com indivíduos não infectados pode ser explicada pela heterogeneidade desses grupos, considerando que não foi feita uma separação nos

outros estudos entre indivíduos com ou sem *blips*. Por outro lado nossos resultados estão de acordo com o estudo de Pereyra e colaboradores (205), que não demonstrou diferença na ativação de células T CD8<sup>+</sup> entre EC sem *blips* e indivíduos não infectados pelo HIV-1.

Como mencionado anteriormente, diversos estudos apontam para um papel central da ativação celular na depleção de células T CD4<sup>+</sup>. No nosso estudo foi observada uma correlação negativa entre a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e a queda de células T CD4<sup>+</sup>, corroborando com a hipótese do envolvimento da ativação imune na depleção dessa população celular. No entanto, é importante destacar que a avaliação da ativação de células T CD8<sup>+</sup> em nosso estudo é transversal, assim como em diversos outros estudos, o que não prova que a ativação imune observada seja causa ou consequência da queda de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Durante a infecção pelo HIV-1 no homem ou no modelo do SIV no macaco rhesus ocorre a perda da integridade da barreira epitelial do intestino, permitindo a translocação de produtos microbianos do lúmen para a circulação (206, 207). Esse fenômeno de translocação microbiana tem sido apontado como uma das principais causas da ativação imune sistêmica observada durante a infecção pelo HIV-1 (208). Nesse estudo, a translocação microbiana foi avaliada pela quantificação de sCD14 no plasma ao invés de LPS, devido a associações discrepantes desse marcador com diferentes status da infecção pelo HIV-1 já reportados (110). Para nossa surpresa, entre os controladores, apenas o grupo EEC apresentou níveis maiores de sCD14 quando comparados ao grupo de indivíduos não infectados. Níveis significativamente maiores foram também observados no grupo de NC. Devido aos resultados de ativação de células T CD8<sup>+</sup> observados anteriormente, era esperado que o grupo de VC também apresentasse um nível mais alto desse marcador. É provável que esse resultado discordante, assim como a falta de correlação da concentração de sCD14 com a ativação de células T CD8<sup>+</sup>, seja efeito do reduzido número de indivíduos avaliados, assim como da dispersão dos dados desta quantificação. Nossos resultados estão em contraste com dois estudos avaliando esse marcador em coortes de EC; Brenchley e colaboradores (121) encontraram níveis significativamente maiores de sCD14 em EC quando comparados ao grupo de indivíduos não infectados, no entanto, nesse trabalho apesar de apresentar uma coorte maior não foi feita uma separação entre indivíduos com e sem *blips*. Ao contrário, no estudo de Pereyra e colaboradores (205) foram avaliados apenas EC sem *blips* e mesmo assim foi encontrado um nível significativamente maior de

sCD14 em EC do que em indivíduos não infectados pelo HIV-1. É importante destacar que, enquanto no estudo de Pereyra os níveis de sCD14 em EC foram similares aos observados no nosso trabalho, os indivíduos não infectados apresentaram a mediana da concentração de sCD14 mais baixa (0,241 pg/mL) do que nós observamos (1,278 pg/mL), sugerindo que outros fatores, como *background* genético e composição da flora bacteriana, dentre outros, poderiam concorrer para estas diferenças observadas.

A presença de *blips* também teve impacto na proporção de IgG específica para a HIV-1, avaliada pela proporção de anticorpos anti-gp41 em relação a IgG total. A proporção de IgG anti-gp41 foi significativamente maior para EEC do que para EC, destacando que três EC (com 5 a 10 anos de infecção) apresentaram um valor de ODn abaixo de 0,8, o que é caracterizado como infecção recente por este teste, refletindo a baixa concentração de anticorpos anti-HIV observada no início da infecção. Outros estudos também demonstram uma baixa proporção de anticorpos anti-gp41 em indivíduos controladores e indivíduos com carga viral suprimida pela TARV (204, 209, 210). Além disso, a proporção de IgG-anti-gp41 apresentou uma correlação positiva com a carga viral, sugerindo a necessidade de uma carga viral constante ou mesmo intermitente para estimular a produção e a consequente detecção desses anticorpos no plasma/soro.

Em função da baixa frequência de indivíduos soropositivos para o HIV com perfil de controle da replicação e/ou da progressão para a aids, torna-se importante destacar que nesse trabalho foi avaliado um número reduzido de indivíduos em cada grupo, sendo necessários estudos com coortes maiores, possivelmente através de estudos multicêntricos, para confirmar nossos resultados. Além disso, estudos avaliando a resposta desses indivíduos na fase aguda da infecção, bem como estudos prospectivos poderiam auxiliar na melhor definição de fatores associados ao controle da replicação viral e a menor velocidade de progressão para a doença.

Nesse trabalho foi demonstrada uma alta reatividade cruzada entre os subtipos B e F1, o que não foi observado para indivíduos infectados com o subtipo C, destacando a necessidade de diferentes estratégias vacinais para atingir uma melhor cobertura imunogênica frente a diferentes subtipos. Além disso, foi evidenciada uma alta heterogeneidade entre os indivíduos capazes de controlar naturalmente a replicação viral, com ênfase na presença de episódios intermitentes de viremia detectável que leva a um aumento da ativação celular, translocação microbiana e reservatório viral.

## 5 CONCLUSÕES

- Sequências de isolados virais que apresentam menor distância genética em relação a sequência consenso demonstram capacidade similar de detecção da resposta específica para o HIV-1;
- É provável que imunógenos baseados em mais de um subtipo do HIV-1 sejam necessários para o desenho de uma vacina capaz de proteger contra os subtipos do HIV-1 circulantes no Brasil;
- Peptídeos capazes de detectar uma resposta com alta reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 não são preferencialmente reconhecidos por indivíduos controladores da carga viral;
- Não foi observada uma resposta imune importante frente aos peptídeos testados na resposta celular no grupo EC e também uma menor proporção de anticorpos anti-gp41, possivelmente refletindo a falta de estímulo antigênico;
- A presença de episódios intermitentes de carga viral (*blips*) provavelmente tem impacto na resposta de células T e de anticorpos frente ao HIV-1, no entanto estão associados também com o aumento da ativação de células T CD8<sup>+</sup> e da translocação microbiana;
- Estudos avaliando coortes de controladores devem considerar a presença ou não de episódios de viremia detectável para avaliação dos resultados encontrados;
- Observamos uma heterogeneidade na população de indivíduos considerados com controladores de elite que deve ser levada em conta em estudos com este grupo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. 2013.
2. UNAIDS. AIDS by the numbers. 2013.
3. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST AeHV. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. 2013.
4. Virais-M DdDAeH. Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para o manejo da infecção pelo HIV em adultos 2014. Available from: <http://www.aids.gov.br/pcdt/protocolo-clinico>.
5. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs) [Internet]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
6. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *Aids*. 2011;25(5):679-89.
7. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012;18(3):182-92.
8. Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):143-50.
9. Pimentel VF, Morgado MG, Bello G, Guimaraes MD, Castilho EA, Veloso VG, et al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29(12):1553-61.
10. Sanabani SS, Pastena ER, da Costa AC, Martinez VP, Kleine-Neto W, de Oliveira AC, et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(10):e25869.
11. de Castro CA, Grinsztejn B, Veloso VG, Bastos FI, Pilotto JH, Morgado MG. Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking

voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2010;10:224.

12. Velasco-de-Castro CA, Grinsztejn B, Veloso VG, Bastos FI, Pilotto JH, Fernandes N, et al. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2014;9(1):e87622.

13. Ferreira FG, Pinto JA, Kakehasi FM, Cleto S, Tupinambas U, Aleixo AW, et al. Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically Infected children in Belo Horizonte, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010;26(2):229-32.

14. Tupinambas U, Duani H, Martins AV, Aleixo AW, Greco DB. Transmitted human immunodeficiency virus-1 drug resistance in a cohort of men who have sex with men in Belo Horizonte, Brazil--1996-2012. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):470-5.

15. De Sa DJ, Sucupira MCA, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses.* 2006;22(1):1-13.

16. Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *Aids.* 2008;22(3):433-5.

17. Santos AF, Sousa TM, Soares E, Sanabani S, Martinez AMB, Sprinz E, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *Aids.* 2006;20(16):2011-9.

18. M BLF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JLP, Freitas CA, et al. HIV Type 1 Subtype C and CB Pol Recombinants Prevail at the Cities with the Highest AIDS Prevalence Rate in Brazil. *AIDS Research and Humam Retroviruses.* 2007;23(12):1579-86.

19. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MCA, Fernandez JCC, Jorge CP, Souza DF, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc.* 2009;12:20.

20. Almeida SE, de Medeiros RM, Junqueira DM, Graf T, Passaes CP, Bello G, et al. Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. *Virology*. 2012;9:306.
21. Graf T, Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*. 2013;435(1):170-8.
22. Brindeiro R, Diaz R, Sabino E, Morgado M, Pires I, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 2003;17(7):1063-9.
23. Raboni SM, de Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CEL, Rosario D, Vidal LR, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(8):1044-9.
24. Silva MM, Telles FQ, da Cunha CA, Rhame FS. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(5):495-501.
25. Monteiro JP, Alcantara LC, de Oliveira T, Oliveira AM, Melo MAG, Brites C, et al. Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes. *Journal of Medical Virology*. 2009;81(3):391-9.
26. Araujo AF, Brites C, Monteiro-Cunha J, Santos LA, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(11):1249-54.
27. Santos LA, Monteiro-Cunha JP, Araujo AF, Brites C, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in northeast Brazil. *J Med Virol*. 2011;83(12):2066-72.
28. Veras NMC, Veras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brigido MM, et al. HIV type 1 genetic variability in Central Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses*. 2007;23(12):1481-9.



29. Stefani M, Pereira G, Lins J, Alcantara K, Silveira A, Viegas A, et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol*. 2007;39(3):205-9.
30. Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol*. 2011;83(8):1301-7.
31. Machado L, Ishak M, Vallinoto A, Lemos J, Azevedo V, Moreira M, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(10):961-6.
32. Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(7):809-15.
33. Nielsen-Saines K, Watts DH, Veloso VG, Bryson YJ, Joao EC, Pilotto JH, et al. Three postpartum antiretroviral regimens to prevent intrapartum HIV infection. *N Engl J Med*. 2012;366(25):2368-79.
34. 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.
35. French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2009;200(8):1212-5.
36. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1534-43.

37. Neuhaus J, Jacobs DR, Jr., Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis.* 2010;201(12):1788-95.
38. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1217-26.
39. Excler JL, Robb ML, Kim JH. HIV-1 vaccines: Challenges and new perspectives. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(6).
40. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1661-71.
41. Flynn N, Forthal D, Harro C, Judson F, Mayer K, Para M. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2005;191(5):654-65.
42. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;283(5403):857-60.
43. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med.* 1999;189(6):991-8.
44. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68(9):6103-10.
45. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet.* 2008;372(9653):1881-93.
46. Gray GE, Allen M, Moodie Z, Churchyard G, Bekker LG, Nchabeleng M, et al. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1

vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(7):507-15.

47. Duerr A, Huang Y, Buchbinder S, Coombs RW, Sanchez J, del Rio C, et al. Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J Infect Dis.* 2012;206(2):258-66.

48. Janes H, Friedrich DP, Krambrink A, Smith RJ, Kallas EG, Horton H, et al. Vaccine-induced gag-specific T cells are associated with reduced viremia after HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2013;208(8):1231-9.

49. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2209-20.

50. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med.* 2012;366(14):1275-86.

51. Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, Alam SM, Liao HX, Pollara J, et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9019-24.

52. Hammer SM, Sobieszczyk ME, Janes H, Karuna ST, Mulligan MJ, Grove D, et al. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2083-92.

53. Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455(7213):613-9.

54. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull.* 2001;58:19-42.

55. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002;296(5577):2354-60.

56. Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, et al. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med.* 2007;13(1):100-6.
57. Létourneau S, Im E, Mashishi T, Brereton C, Bridgeman A, Yang H, et al. Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One.* 2007;2(10):e984.
58. Nickle DC, Jensen MA, Gottlieb GS, Shriner D, Learn GH, Rodrigo AG, et al. Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science.* 2003;299(5612):1515-7.
59. Arenas M, Posada D. Computational design of centralized HIV-1 genes. *Curr HIV Res.* 2010;8(8):613-21.
60. Gao F, Weaver EA, Lu Z, Li Y, Liao HX, Ma B, et al. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol.* 2005;79(2):1154-63.
61. Weaver EA, Lu ZJ, Camacho ZT, Moukdar F, Liao HX, Ma BJ, et al. Cross-subtype T-cell immune responses induced by a human immunodeficiency virus type 1 group M consensus env immunogen. *Journal of Virology.* 2006;80(14):6745-56.
62. Liao HX, Sutherland LL, Xia SM, Brock ME, Searce RM, Vanleeuwen S, et al. A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and CHIV-1 primary viruses. *Virology.* 2006;353(2):268-82.
63. Santra S, Korber BT, Muldoon M, Barouch DH, Nabel GJ, Gao F, et al. A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10489-94.
64. Kothe DL, Li YY, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Zammit KP, Salazar MG, et al. Ancestral and consensus envelope immunogens for HIV-1 subtype C. *Virology.* 2006;352(2):438-49.
65. McBurney SP, Ross TM. Human immunodeficiency virus-like particles with consensus envelopes elicited broader cell-mediated peripheral and mucosal immune responses than polyvalent and monovalent Env vaccines. *Vaccine.* 2009;27(32):4337-49.

66. Yu XG, Lichterfeld M, Perkins B, Kalife E, Mui S, Chen J, et al. High degree of inter-clade cross-reactivity of HIV-1-specific T cell responses at the single peptide level. *AIDS*. 2005;19(14):1449-56.
67. Malhotra U, Nolin J, Mullins JI, McElrath MJ. Comprehensive epitope analysis of cross-clade Gag-specific T-cell responses in individuals with early HIV-1 infection in the US epidemic. *Vaccine*. 2007;25(2):381-90.
68. Frahm N, Nickle DC, Linde CH, Roach T, Walker BD, Allen TM, et al. Increased detection of HIV-specific T cell responses by combination of central sequences with comparable immunogenicity. *Aids*. 2008;22(4):447-56.
69. Zhao S, Zhai S, Zhuang Y, Wang S, Huang D, Kang W, et al. Inter-clade cross-reactivity of HIV-1-specific T cell responses in human immunodeficiency virus type 1 infection in China. *Curr HIV Res*. 2007;5(2):251-9.
70. Bansal A, Gough E, Ritter D, Wilson C, Mulenga J, Allen S, et al. Group M-based HIV-1 Gag peptides are frequently targeted by T cells in chronically infected US and Zambian patients. *AIDS*. 2006;20(3):353-60.
71. Serwanga J, Mugaba S, Pimego E, Nanteza B, Lyagoba F, Nakubulwa S, et al. Profile of T cell recognition of HIV type 1 consensus group M Gag and Nef. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(4):384-92.
72. Almeida RR, Rosa DS, Ribeiro SP, Santana VC, Kallás EG, Sidney J, et al. Broad and cross-clade CD4+ T-cell responses elicited by a DNA vaccine encoding highly conserved and promiscuous HIV-1 M-group consensus peptides. *PLoS One*. 2012;7(9):e45267.
73. Zembe L, Burgers WA, Jaspan HB, Bekker LG, Bredell H, Stevens G, et al. Intra- and inter-clade cross-reactivity by HIV-1 Gag specific T-cells reveals exclusive and commonly targeted regions: implications for current vaccine trials. *PLoS One*. 2011;6(10):e26096.
74. Watanabe K, Murakoshi H, Tamura Y, Koyanagi M, Chikata T, Gatanaga H, et al. Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides. *Microbes Infect*. 2013;15(13):874-86.

75. Barugahare B, Baker C, K'Aluoch O, Donovan R, Elrefaei M, Eggena M, et al. Human immunodeficiency virus-specific responses in adult Ugandans: patterns of cross-clade recognition. *J Virol.* 2005;79(7):4132-9.
76. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2003;9(7):853-60.
77. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci A. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1993;328(5):327-35.
78. McDougal JS, Mawle A, Cort SP, Nicholson JK, Cross GD, Scheppler-Campbell JA, et al. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J Immunol.* 1985;135(5):3151-62.
79. Ragni MV, Lewis JH, Spero JA, Bontempo FA. Acquired-immunodeficiency-like syndrome in two haemophiliacs. *Lancet.* 1983;1(8318):213-4.
80. Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
81. Wei X, Ghosh S, Taylor M, Johnson V, Emini E, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
82. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* 1996;271(5255):1582-6.
83. Markowitz M, Saag M, Powderly WG, Hurley AM, Hsu A, Valdes JM, et al. A preliminary study of zidovudine, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1995;333(23):1534-9.
84. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature.* 2001;410(6831):974-9.
85. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* 1999;5(1):83-9.

86. Fleury S, Rizzardì GP, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E, et al. Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5393-8.
87. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(3):772-6.
88. Chun TW, 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;387(6629):183-8.
89. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med*. 2002;8(4):319-23.
90. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:265-304.
91. Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science*. 1998;279(5354):1223-7.
92. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003;18(3):441-52.
93. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev*. 2013;254(1):54-64.
94. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993;6(8):904-12.
95. Tsoukas CM, Bernard NF. Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(1):14-28.

96. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *Aids*. 1996;10(8):827-34.
97. Salazar-Gonzalez JF, Martinez-Maza O, Nishanian P, Aziz N, Shen LP, Grosser S, et al. Increased immune activation precedes the inflection point of CD4 T cells and the increased serum virus load in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1998;178(2):423-30.
98. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*. 1999;179(4):859-70.
99. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol*. 2002;169(6):3400-6.
100. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology*. 2006;7(3):235-9.
101. Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, et al. T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis*. 2011;203(4):452-63.
102. Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52(1):10-8.
103. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;16(2):83-92.
104. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidalo JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol*. 1992;90(3):376-82.



105. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids*. 2003;17(13):1881-8.
106. Eggena MP, Barugahare B, Okello M, Mutyala S, Jones N, Ma Y, et al. T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4+ T cell depletion, and coinfection. *J Infect Dis*. 2005;191(5):694-701.
107. Hunt PW, Cao HL, Muzoora C, Ssewanyana I, Bennett J, Emenyonu N, et al. Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *Aids*. 2011;25(17):2123-31.
108. Longenecker CT, Funderburg NT, Jiang Y, Debanne S, Storer N, Labbato DE, et al. Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. *HIV Med*. 2013;14(6):385-90.
109. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):2-18.
110. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(9):655-66.
111. Brenchley J, Schacker T, Ruff L, Price D, Taylor J, Beilman G, 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.
112. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol*. 1998;72(8):6646-56.
113. Poles M, Elliott J, Taing P, Anton P, Chen I. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2001;75(18):8390-9.
114. McGowan I, Elliott J, Fuerst M, Taing P, Boscardin J, Poles M, et al. Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37(2):1228-36.

115. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998;280(5362):427-31.
116. Kewenig S, Schneider T, Hohloch K, Lampe-Dreyer K, Ullrich R, Stolte N, et al. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology*. 1999;116(5):1115-23.
117. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*. 2005;434(7037):1148-52.
118. Mehandru S, Poles M, 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.
119. 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.
120. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*. 2004;200(10):1299-314.
121. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-71.
122. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996;64(5):1762-9.

123. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011;203(6):780-90.
124. Saez-Cirion A, Pancino G. HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype? *Immunol Rev.* 2013;254(1):281-94.
125. Pantaleo G, Fauci A. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:825-54.
126. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 2007;15(4):134-6.
127. Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(7):487-98.
128. Mariani R, Kirchhoff F, Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC, Skowronski J. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1996;70(11):7752-64.
129. Michael NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, Busch MP, et al. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol.* 1995;69(7):4228-36.
130. Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH, et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol.* 2000;74(9):4361-76.
131. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science.* 1995;270(5238):988-91.
132. Learmont J, Geczy A, Mills J, Ashton L, Raynes-Greenow C, Garsia R, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med.* 1999;340(22):1715-22.

133. Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, Pereyra F, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol.* 2008;82(17):8422-30.
134. Buckheit RW, 3rd, Allen TG, Alme A, Salgado M, O'Connell KA, Huculak S, et al. Host factors dictate control of viral replication in two HIV-1 controller/chronic progressor transmission pairs. *Nat Commun.* 2012;3:716.
135. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix ML, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy JF, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *Aids.* 2007;21(8):1043-5.
136. Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, Yang HC, Lassen K, Lai J, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol.* 2007;81(5):2508-18.
137. Julg B, Pereyra F, Buzon MJ, Piechocka-Trocha A, Clark MJ, Baker BM, et al. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):233-8.
138. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferott K, Leslie A, Chetty S, et al. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2006;80(7):3617-23.
139. Miura T, Brockman MA, Brumme ZL, Brumme CJ, Pereyra F, Trocha A, et al. HLA-associated alterations in replication capacity of chimeric NL4-3 viruses carrying gag-protease from elite controllers of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2009;83(1):140-9.
140. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, et al. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol.* 2009;182(12):7828-37.
141. Lassen KG, Lobritz MA, Bailey JR, Johnston S, Nguyen S, Lee B, et al. Elite suppressor-derived HIV-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000377.

142. Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ, et al. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(2):100-8.
143. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996;273(5283):1856-62.
144. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, et al. The role of *CCR5* and *CCR2* polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1997;3(10):1160-2.
145. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, French RA, Bennetts BH, Newcombe NR, et al. Increased frequency of *CCR-5* delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids*. 1997;11(15):1833-8.
146. Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, Walker BD, et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*. 2010;330(6010):1551-7.
147. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by *CCR5* Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-8.
148. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996;2(4):405-11.
149. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2709-14.

150. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005;41(7):1053-6.
151. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008;197(4):563-71.
152. Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science*. 1999;283(5408):1748-52.
153. Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med*. 2001;344(22):1668-75.
154. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007;317(5840):944-7.
155. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31(4):429-34.
156. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007;39(6):733-40.
157. O'Connell KA, Han Y, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Role of natural killer cells in a cohort of elite suppressors: low frequency of the protective KIR3DS1 allele and limited inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *J Virol*. 2009;83(10):5028-34.
158. Huang J, Goedert JJ, Sundberg EJ, Cung TD, Burke PS, Martin MP, et al. HLA-B\*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J Exp Med*. 2009;206(13):2959-66.

159. Jones DC, Kosmoliaptsis V, Apps R, Lapaque N, Smith I, Kono A, et al. HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. *J Immunol.* 2011;186(5):2990-7.
160. Bashirova AA, Martin-Gayo E, Jones DC, Qi Y, Apps R, Gao X, et al. LILRB2 interaction with HLA class I correlates with control of HIV-1 infection. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004196.
161. Koup R, Safrit J, Cao Y, Andrews C, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68(7):4650-5.
162. Hersperger AR, Migueles SA, Betts MR, Connors M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(3):169-73.
163. Migueles S, Laborico A, Shupert W, Sabbaghian M, Rabin R, Hallahan C, et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 2002;3(11):1061-8.
164. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(16):6776-81.
165. Horton H, Frank I, Baydo R, Jalbert E, Penn J, Wilson S, et al. Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection. *J Immunol.* 2006;177(10):7406-15.
166. Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, et al. HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59(5):427-37.
167. Betts M, Nason M, West S, De Rosa S, Migueles S, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006;107(12):4781-9.

168. Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, et al. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS*. 2010;24(8):1095-105.
169. Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood*. 2009;113(17):3978-89.
170. Ferre AL, Lemongello D, Hunt PW, Morris MM, Garcia JC, Pollard RB, et al. Immunodominant HIV-specific CD8+ T-cell responses are common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers. *J Virol*. 2010;84(19):10354-65.
171. Migueles S, Osborne C, Royce C, Compton A, Joshi R, Weeks K, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29(6):1009-21.
172. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, et al. Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses. *Journal of Immunology*. 2009;182(12):7828-37.
173. Julg B, Williams KL, Reddy S, Bishop K, Qi Y, Carrington M, et al. Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *J Virol*. 2010;84(11):5540-9.
174. Yang H, Wu H, Hancock G, Clutton G, Sande N, Xu X, et al. Antiviral inhibitory capacity of CD8+ T cells predicts the rate of CD4+ T-cell decline in HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2012;206(4):552-61.
175. Kesturu GS, Colleton BA, Liu Y, Heath L, Shaikh OS, Rinaldo CR, et al. Minimization of genetic distances by the consensus, ancestral, and center-of-tree (COT) sequences for HIV-1 variants within an infected individual and the design of reagents to test immune reactivity. *Virology*. 2006;348(2):437-48.
176. Bello G, Guimares ML, Morgado MG. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *Aids*. 2006;20(5):763-8.



177. McKinney DM, Skvoretz R, Livingston BD, Wilson CC, Anders M, Chesnut RW, et al. Recognition of variant HIV-1 epitopes from diverse viral subtypes by vaccine-induced CTL. *J Immunol.* 2004;173(3):1941-50.
178. Malhotra U, Nolin J, Horton H, Li F, Corey L, Mullins J, et al. Functional properties and epitope characteristics of T-cells recognizing natural HIV-1 variants. *Vaccine.* 2009;27(48):6678-87.
179. Yang OO. Candidate vaccine sequences to represent intra- and inter-clade HIV-1 variation. *PLoS One.* 2009;4(10):e7388.
180. Ogg G, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar P, Nowak M, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 1998;279(5359):2103-6.
181. Mugaba S, Nakiboneka R, Nanyonjo M, Bugembe-Lule D, Kaddu I, Nanteza B, et al. Group M consensus Gag and Nef peptides are as efficient at detecting clade A1 and D cross-subtype T-cell functions as subtype-specific consensus peptides. *Vaccine.* 2014.
182. Turk G, Gherardi MM, Laufer N, Saracco M, Luzzi R, Cox JH, et al. Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants. *J Virol.* 2008;82(6):2853-66.
183. Montano SM, Sanchez JL, Laguna-Torres A, Cuchi P, Avila MM, Weissenbacher M, et al. Prevalences, genotypes, and risk factors for HIV transmission in South America. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40(1):57-64.
184. Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, et al. Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries. *Aids Research and Human Retroviruses.* 2006;22(11):1186-91.
185. Aguayo N, Laguna-Torres VA, Villafane M, Barboza A, Sosa L, Chauca G, et al. Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(3):225-31.

186. Coplan PM, Gupta SB, Dubey SA, Pitisuttithum P, Nikas A, Mbewe B, et al. Cross-reactivity of anti-HIV-1 T cell immune responses among the major HIV-1 clades in HIV-1-positive individuals from 4 continents. *J Infect Dis.* 2005;191(9):1427-34.
187. Gupta SB, Mast CT, Wolfe ND, Novitsky V, Dubey SA, Kallas EG, et al. Cross-clade reactivity of HIV-1-specific T-cell responses in HIV-1-infected individuals from Botswana and Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;42(2):135-9.
188. Aidoo M, Sawadogo S, Bile EC, Yang C, Nkengasong JN, McNicholl JM. Viral, HLA and T cell elements in cross-reactive immune responses to HIV-1 subtype A, CRF01\_AE and CRF02\_AG vaccine sequence in Ivorian blood donors. *Vaccine.* 2008;26(37):4830-9.
189. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin J, et al. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol.* 2008;82(11):5398-407.
190. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity.* 2007;27(3):406-16.
191. Ndhlovu ZM, Proudfoot J, Cesa K, Alvino DM, McMullen A, Vine S, et al. Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses. *J Virol.* 2012;86(12):6959-69.
192. Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, Hunt PW, et al. Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *Aids.* 2004;18(7):981-9.
193. Tomescu C, Duh FM, Hoh R, Viviani A, Harvill K, Martin MP, et al. Impact of protective killer inhibitory receptor/human leukocyte antigen genotypes on natural killer cell and T-cell function in HIV-1-infected controllers. *Aids.* 2012;26(15):1869-78.
194. Lecuroux C, Saez-Cirion A, Girault I, Versmisse P, Boufassa F, Avettand-Fenoel V, et al. Both HLA-B\*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers. *J Virol.* 2014;88(1):176-87.

195. Teixeira SL, de Sa NB, Campos DP, Coelho AB, Guimaraes ML, Leite TC, et al. Association of the HLA-B\*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes Immun.* 2014.
196. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, et al. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis.* 2009;200(6):984-90.
197. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, Hunt PW, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol.* 2009;83(1):329-35.
198. Graf EH, Mexas AM, Yu JJ, Shaheen F, Liszewski MK, Di Mascio M, et al. Elite suppressors harbor low levels of integrated HIV DNA and high levels of 2-LTR circular HIV DNA compared to HIV+ patients on and off HAART. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001300.
199. Yang Y, Al-Mozaini M, Buzon MJ, Beamon J, Ferrando-Martinez S, Ruiz-Mateos E, et al. CD4 T-cell regeneration in HIV-1 elite controllers. *AIDS.* 2012;26(6):701-6.
200. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood.* 2004;104(4):942-7.
201. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008;197(1):126-33.
202. Kanya P, Tsoukas CM, Boulet S, Routy JP, Thomas R, Cote P, et al. T cell Activation does not drive CD4 decline in longitudinally followed HIV-infected Elite Controllers. *AIDS Res Ther.* 2011;8(1):20.
203. Hunt PW, Landay AL, Sinclair E, Martinson JA, Hatano H, Emu B, et al. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers. *PLoS One.* 2011;6(1):e15924.

204. Bello G, Velasco-de-Castro CA, Bongertz V, Rodrigues CA, Giacoia-Gripp CB, Pilotto JH, et al. Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *J Med Virol.* 2009;81(10):1681-90.
205. Pereyra F, Lo J, Triant VA, Wei J, Buzon MJ, Fitch KV, et al. Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *Aids.* 2012;26(18):2409-12.
206. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, et al. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001052.
207. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000852.
208. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013;21(1):6-13.
209. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV type 1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008;24(3):495-8.
210. Wendel SK, Mullis CE, Eshleman SH, Blankson JN, Moore RD, Keruly JC, et al. Effect of natural and ARV-induced viral suppression and viral breakthrough on anti-HIV antibody proportion and avidity in patients with HIV-1 subtype B infection. *PLoS One.* 2013;8(2):e55525.

## **7 ANEXOS**

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**ESTUDO DE PACIENTES HIV-POSITIVOS NÃO-PROGRESSORES DE LONGO TERMO (LTNP) -  
CONTRIBUIÇÃO DE FATORES VIROLÓGICOS, GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O (A) Sr (a) esta sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que poderá trazer informações valiosas sobre a resposta de defesa do organismo contra o vírus HIV e, em especial, proporcionará uma oportunidade de se estudar estas características em indivíduos brasileiros. Assim, solicitamos a autorização de, \_\_\_\_\_, nascido no dia \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ na cidade \_\_\_\_\_, estado \_\_\_\_\_, para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos, bem como uma de amostra adicional quadrimestral ou semestral de 60ml de seu sangue durante um período de três anos para o estudo dos fatores virológicos, genéticos e imunológicos que influenciam a susceptibilidade da aquisição da infecção pelo HIV e do curso clínico e imunológico da infecção pelo HIV. A sua participação neste estudo é voluntária, não remunerada, e em hipótese alguma está condicionada à continuidade do seu acompanhamento clínico, tratamento ou do fornecimento das medicações necessárias ou que venha a necessitar. Sua participação também não envolve qualquer despesa pessoal e o Sr (a) poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento que desejar. Dessa forma, solicitamos sua autorização para que seu sangue seja testado para detecção da presença do vírus HIV, bem como seu seqüenciamento genético, para o estudo dos anticorpos contra o vírus HIV, para avaliar a atividade das células (linfócitosT) de seu sangue em reconhecerem o vírus HIV, para a tipagem de suas características genéticas que possam aumentar ou diminuir a susceptibilidade de infecção e o curso clínico da infecção pelo HIV, dentre as quais os diversos polimorfismos do antígeno leucocitário humano (HLA), e os polimorfismos dos receptores de quimiocinas, dentre outras características genéticas que possam vir a ser importantes para a compreensão da resposta imunológica contra o HIV.

O (A) Sr (a) está sendo informado ainda que os riscos decorrentes da participação neste estudo são mínimos, e se limitam a eventuais complicações no local da coleta de sangue e que há total garantia de confidencialidade e privacidade das informações a serem geradas. Pedimos, ainda, sua autorização para que os resultados sejam divulgados em publicações biomédicas de qualidade indiscutível. Esclarecemos, ainda, que os dados a serem publicados não permitirão a identificação dos indivíduos que participarem do estudo. Pedimos que o (a) Sr (a) autorize também que parte do seu sangue seja conservada pelo Laboratório de Aids & Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, para estudos futuros, relevantes à pesquisa de HIV/AIDS, desde que estes venham a ser autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, da Fundação Oswaldo Cruz.

Caso os resultados dos exames discriminados acima apontem a necessidade de investigações adicionais ou tratamento específico, estes serão conduzidos pelo médico responsável pelo estudo, o Dr. Walter de Araújo Eyer-Silva (0xx21 99537051 [ Hospital Universitário Gaffrée Guinle – UNIRIO) ou Dra Beatriz Grinsztejn (021 38659565 ) [ Instituto de Pesquisa Evandro Chagas – FIOCRUZ].

Todos os participantes poderão contatar o médico responsável (Dr. Walter de Araújo Eyer-Silva (0xx21 99537051 [ Hospital Universitário Gaffrée Guinle – UNIRIO) ou Dra Beatriz Grinsztejn (021 38659545) [ Instituto de Pesquisa Evandro Chagas – FIOCRUZ], a pesquisadora responsável do projeto (Dra Mariza Morgado, 0xx213865 8106) ou o Comitê de Ética do IPEC-FIOCRUZ (021xx3882 9011) quando quiserem.

Local e data: \_\_\_\_\_

Assinatura de concordância em participar do estudo: \_\_\_\_\_

Assinatura do profissional responsável pela aplicação do termo: \_\_\_\_\_

**Instituições participantes:**

Instituto de Pesquisa Evandro Chagas – FIOCRUZ: recrutamento dos pacientes, acompanhamento clínico e coleta de amostras – Coordenadora: Dra. Beatriz Grinsztejn.

Hospital Universitário Gaffrée - Guinle – UNIRIO: recrutamento dos pacientes, acompanhamento clínico e coleta de amostras – Coordenador: Dr. Walter Eyer-Silva.