



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**REATIVIDADE DE LINFÓCITOS T DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 CONTRA EPITOPOS
GAG E NEF DE DIFERENTES SUBTIPOS HIV -1**

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Salvador – Bahia -Brasil
2008



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**REATIVIDADE DE LINFÓCITOS T DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 CONTRA EPITOPOS
GAG E NEF DE DIFERENTES SUBTIPOS HIV -1**

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Orientadora: Dr^a MARIA FERNANDA RIOS GRASSI

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz com
objetivo de obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**Salvador – Bahia -Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C871r Coutinho Junior, Raimundo
Reatividade de linfócitos T de indivíduos infectados pelo HIV-1 contra epitopos
GAG e NEF de diferentes subtipos HIV-1. [manuscrito] / Raimundo Coutinho Junior .
- 2008.
64 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de
Pesquisas Gonçalo**

Moniz, 2008.

Orientadora: Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi. Laboratório Avançado de Saúde
Pública.

1. HIV-1. 2. Interferon Gama. 3. Vacinas contra HIV 4. Linfócitos T. I.Título.

CDU 616.98:577.27

“REATIVIDADE DE LINFÓCITOS T DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1
CONTRA EPITOPOS GAG E NEF DE DIFERENTES SUBTIPOS HIV -1”

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

Dr. Roberto Badaró
Professor Adjunto
UFBA

Dra. Claudia Brodsky
Pesquisador Titular
CPqGM/ FIOCRUZ

“Do whatever you want, the way you want, so do it best !”

AGRADECIMENTOS

À Fernanda Grassi, minha querida orientadora, pela oportunidade, pela confiança, pelo aprendizado científico, obrigado por tudo.

A Dra. Brigitte Autran pela colaboração internacional.

A Dra. Mariza Morgado, Dr. Edecio Cunha Neto, Dr Luís Brígido e Dr. Carlos Brite pela generosa colaboração.

Ao Dr. Bernardo Galvão, pela oportunidade de trabalhar no LASP.

Ao Dr. Mitermayer pela ajuda e atenção desprendida.

Aos membros do colegiado de Biotecnologia: Dra. Milena, Dra. Angelina, Dr. Edson, Dr. Mitermayer, Dr. Geraldo, Dr. Marcos e à Taise Coutinho pelo excelente trabalho realizado.

À Tuma de mestrandos de Biotecnologia pela confiança por terem me escolhido representante para o colegiado de Biotecnologia.

À coordenação de ensino pela excelente trabalho, especialmente D. Rosália e Taíse.

Aos pacientes do HUPES, objeto principal da execução deste trabalho.

À Viviana Olavarria pelo companheirismo e amizade.

A Rita Elizabeth pelo carinho, atenção e por sua mesa que foi tão útil para desenvolver esta disseertação.

Aos colegas e verdadeiros amigos do LASP: Filipe, Amália, Giseli, Taís, Taíse, Aline, Tica, Ana Claudia e todos os outros.

As minhas eternas companheiras de trabalho do P2 Luciana Maron e Ana Beatriz, que me acolheram quando cheguei perdido.

Aos meus amigos do LPBI Ricardo Fraga, Patrícia Meira, Lenita Ramirez, Andréa, Virginia, Tainá, Luciana, Luciano e Micely pela coragem e obstinação em busca da pesquisa.

À Matheus Sá, pela solicitude nas horas difíceis, pelas conversas, pelos risos, obrigado.

À D. Fiscina pela de ajuda na biblioteca do CPqGM.

A Dra Maria de Lourdes Nascimento, a aquela que primeiro acreditou em mim, que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica.

A Prof. Regina Carneiro, minha Dinda, pelo carinho e por ter me ensinado tudo que eu sei sobre parasitologia Humana.

Ao meu irmão Fábio pelos momentos de vida em conjunto, pelo companheirismo, pelos conselhos e por toda minha vida, muito obrigado .

Aos meus pais Raimundo Coutinho e Waldina Alves Coutinho, molas-mestras de minha vida, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, por tudo mesmo, obrigado.

À Adriana Oliveira minha companheira da ciência, do amor e de todos os momentos, obrigado por toda a atenção e ao carinho por mim.

À Dra. Fernanda Grassi,

Hoje, depois de dois anos de trabalho, posso lhe dizer algo que ficou calado por todo este tempo. Tudo que aprendi e construí neste laboratório dia-a-dia de trabalho foi fruto de sua atenção, de seu cuidado e de sua postura profissional. Neste pouco tempo de trabalho em conjunto o que mais me marcou foi sua a sua forma de agir. Em nenhum momento a vi nervosa, sem paciência e sem tempo para me escutar, ou a qualquer outra pessoa. Tenho certeza de que nosso encontro foi um evento indispensável para o meu crescimento científico, moral e ético. Espero que eu tenha aprendido e levado comigo estes fundamentos básicos para minha vida pessoal e profissional. A primeira vez que lhe disse obrigado, naquela tarde do dia 14 de fevereiro de 2006, você me pediu para agradecer somente no final de tudo. Agora, no final, ou melhor, quem sabe, no início de mais uma jornada, o Doutorado, agradeço-lhe veementemente:”- Obrigado!!”.

Sinceramente,

Raimundo Coutinho Junior

RESUMO

O Vírus da imunodeficiência humana é o agente causador da AIDS. Apesar de existir tratamento para a infecção do HIV-1, este não leva a cura dos pacientes. A identificação de epitopos de proteínas virais do HIV-1 reconhecidos por linfócitos T pode ser eficiente para o desenvolvimento de uma vacina. Neste trabalho foi avaliado o padrão da resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV -1 frente às proteínas GAG e NEF de diferentes subtipos do HIV-1. Foi utilizado PBMC de pacientes infectados pelo HIV-1 sob o uso de terapia antiretroviral. Foram utilizados 23 *pools* de peptídeos do HIV-1 na concentração de 2µg/mL derivados dos subtipos brasileiros B^{BR}, C, F e do isolado de referencia B (HXB2), em ensaio de ELISPOT. Todos os pacientes responderam a pelo menos um dos *pools* de peptídeos. Destes, 41% responderam para os *pools* de proteínas do isolado HXB2 e 49% para os *pools* de proteínas do subtipo brasileiro B^{BR}, C e F. Isoladamente, as maiores freqüências de respondedores foram para os *pools* de proteínas do isolado HXB2 NEF 3 (68%) e HXB2 NEF 2 (63%). Da mesma forma, os *pools* de peptídeos das seqüências brasileiras B^{BR}, C e F que apresentaram as maiores freqüências de respondedores foram NEF F (87%), NEF C (62%), GAG F1 (62%). A magnitude da resposta foi em média de 2174 SFCX10⁶ PBMC para os *pools* do isolado HXB2 e de 1331 SFCX10⁶ PBMC para os *pools* dos subtipos brasileiros. O pool que apresentou a maior magnitude da resposta foi GAG p24-1 do isolado HXB2 com 3290 SFCX10⁶ PBMC. Estes resultados demonstram que os pacientes infectados pelo HIV-1 respondem aos *pools* de peptídeos das proteínas GAG e NEF do isolado HXB2 e dos subtipos brasileiros B^{BR}, C e F.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus is the etiological agent of AIDS. The antiretroviral treatment is efficient, however the cure is not reach. The identification of T cell epitopes from HIV-1 proteins could be an efficient approach for development of an HIV-1 vaccine. In this work, we evaluated the immune responses of HIV-1 infected individuals to GAG and NEF HIV-1 proteins from different virus subtypes. *Pools* of peptides of proteins from Brazilians HIV-1 subtypes B^{BR}, C, F sequences and from HIV-1 subtype B isolate (HXB2) were tested by ELISPOT assay. All tested *pools* were recognized. PBMC of 41% of patients recognized subtype HXB2 *pools* and 49% recognized the *pools* from Brazilians subtypes. The most frequently recognized *pools* were NEF3 (68%) and NEF2 (63%) from HXB2 isolated. The most frequently recognized pool from Brazilians subtypes were NEF F (87%), NEF C (62%), GAG F1 (62%). On average, the magnitude of responses to HXB2 isolate *pools* were 2174 SFCX10⁶ PBMC and 1331 SFCX10⁶ PBMC for Brazilians *pools*. The highest magnitude of response was directed to GAG p24-1 from HXB2 subtype with 3290 SFCX10⁶ PBMC. These results indicated that peptides from NEF and GAG proteins from HXB2 isolated or Brazilians subtypes B^{BR}, C and F sequences are recognized by HIV-1 infected patients and may have the potential for inclusion in a vaccine against HIV-1.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1.0 INTRODUÇÃO	16
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ESTRUTURA DO HIV	17
2.2 CICLO DE INFECÇÃO E REPLICAÇÃO DO HIV-1	18
2.3 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1	19
2.4 IMUNOPATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE CONTRA O HIV-1	21
2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1	25
3.0 JUSTIFICATIVA	32
4.0 OBJETIVO	33
4.1 GERAL	33
4.2 ESPECÍFICO	33
5.0 PACIENTES e MÉTODOS	34
5.1 ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO	34
5.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	34
5.3 PEPTÍDEOS DE PROTEÍNAS DO HIV-1	35
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE IFN- γ POR ELISPOT	36
5.5 DETERMINAÇÃO DO SUBTIPO VIRAL DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1	36
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6.0 RESULTADOS	38
6.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 ENVOLVIDOS NO ESTUDO	38
6.2 MAGNITUDE DA RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE IFN- Γ DOS PACIENTES INFECTADOS POR HIV-1	39
6.3 FREQUÊNCIA DE PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 RESPONDEDORES AOS POOLS DO ISOLADO HXB2 E DOS SUBTIPOS B ^{BR} , C E F	40

6.4 PRODUÇÃO DE IFN- γ ENTRE OS RESPONDEDORES DAS SEQÜÊNCIAS B ^{BR} , C E F E DO ISOLADO HXB2 _____	42
6.5 CORRELAÇÃO ENTRE SUBTIPOS VIRAIS E RESPOSTA AOS POOLS DE PEPTÍDEOS DAS SEQÜÊNCIAS B ^{BR} , C E F E DO ISOLADO HXB2 DO HIV-1 _____	43
6.6 RESPOSTA AOS POOLS DE PEPTÍDEOS DE GAG DAS SEQÜÊNCIAS DO HIV-1 DOS SUBTIPOS B ^{BR} , C E F E DO ISOLADO HXB2 DOS INDIVÍDUOS COM SUBTIPOS EM RELAÇÃO A GAG _____	44
6.7 RESPOSTA AOS POOLS DE PEPTÍDEOS DE NEF DAS SEQÜÊNCIAS DO HIV-1 DOS SUBTIPOS B ^{BR} , C E F E DO ISOLADO HXB2 DOS INDIVÍDUOS COM SUBTIPO VIRAL EM RELAÇÃO A NEF _____	46
7.0 DISCUSSÃO _____	48
8.0 CONCLUSÕES _____	52
9.0 PERSPECTIVAS _____	53
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	54
ANEXOS _____	61

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AZT	Azathioprine
CCR5	Receptor de citocina
CD	Marcador de membrana celular (Cluster of differentiation)
CV	Carga viral
CRF	Forma recombinante
CTL	Linfócitos T citolíticos (cytolytic T lymphocytes)
CXCR4	Receptor alfa citocina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Sódico
ELISPOT	Técnica de ensaio imunoenzimático de spot (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot)
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Complexo gênico de antígenos leucocitários humanos
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos de classe II, DR
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
LTNP	<i>Long Term no Progressor</i> (pacientes lentos progressores)
LTR	Seqüências terminais repetitivas (long terminal repeats)
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
pb	Pares de Base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
RNA	Ácido Ribonucléico
SIV	Vírus da imunodeficiência Símia
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Estrutura Morfológica do vírus do HIV-1.	17
Figura II. Genoma do HIV-1.	18
Figura III. História natural do HIV-1.	20
Figura IV. Resposta imune contra HIV-1.	22
Figura V. Distribuição geográfica dos subtipos e modos de transmissão do HIV-1.	27
Quadro 1. Vacinas contra o HIV-1.	31
Figura 1. Produção de IFN- γ dos pacientes infectados pelo HIV-1 em resposta aos pools de peptídeos do isolado HXB2 e dos subtipos B ^{BR} , C e F de pacientes infectados pelo HIV-1	39
Figura 2. Frequências dos respondedores aos peptídeos do isolado HXB2 e das seqüências brasileiras.	41
Figura 3. Representação da média de produção de IFN- γ entre os respondedores aos pools de peptídeos das seqüências do HIV-1 B ^{BR} , C e F e do isolado HxB2.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1.	38
Tabela 2. Subtipagem dos pacientes.	43
Tabela 3. Número de <i>pools</i> de peptídeos reconhecidos e magnitude da resposta aos <i>pools</i> de GAG dos subtipos B ^{BR} , C e F e do isolado HxB2 dos pacientes com subtipo viral determinado em GAG	45
Tabela 4. Número de <i>pools</i> peptídeos reconhecidos e magnitude da resposta aos <i>pools</i> de NEF dos subtipos B ^{BR} , C e F e do isolado HxB2 dos pacientes com subtipo viral em relação a NEF	48

1.0 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) do tipo 1 é o agente etiológico da imunodeficiência humana adquirida (AIDS). O HIV-1 foi primeiramente isolado no ano de 1983, após inúmeros casos registrados de infecções oportunistas fatais e de neoplasias de progressão rápida em número elevado de homossexuais do sexo masculino.

A maior parte das infecções de indivíduos no mundo pelo HIV está associada ao HIV-1 do grupo M (HIV-1 M). Estudos filogenéticos demonstraram que o grupo M apresenta uma grande variabilidade genética com linhagens, ou melhor, subtipos divergentes classificados do subtipo A ao J. Além disso, o grupo M apresenta formas virais em mosaico genético, formados por dois ou subtipos virais diferentes, denominado formas recombinantes circulantes (CRF). Estudos moleculares apontam que a infecção no Brasil, em expansão, é caracterizada por isolados do subtipo B^{BR}, próximos de isolados B ocidentais e de isolados C e F de frequência crescente no Norte e Sul do país. Embora exista uma quantidade significativa de informações sobre a variabilidade viral no Brasil, pouco é conhecido sobre o reconhecimento de epitopos virais por células T.

Até o momento não existem tratamentos que levem a cura dos indivíduos infectados. O tratamento é realizado com anti-retrovirais. Estas drogas agem em diversos estágios do ciclo do vírus. Apesar de seu uso melhorar a qualidade de vida, diminuir a mortalidade e morbidade e apresentam problemas devido a resistência viral aos medicamentos e efeitos colaterais importantes. Possivelmente, a melhor opção para o controle da pandemia e a crescente incidência do HIV-1 seja o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o vírus.

Levando-se em consideração que as principais vacinas experimentais atualmente baseiam-se na indução de respostas de células T contra epitopos do HIV do tipo B ocidental, isto impõe que se definam os epitopos reconhecidos pelas células T de pacientes brasileiros e que se estude a reatividade cruzada entre epitopos de diferentes subtipos de HIV-1 sobre o reconhecimento de epitopos do vírus por linfócitos T.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DO HIV

O HIV-1 é um retrovírus com 110nm de diâmetro que pertence à família Lentiviridae. O envelope viral do virion é formado pela membrana da célula do hospedeiro, apresentando uma organização externa formada por uma proteína de porção hidrofóbica a gp41 que se ancora na membrana e a gp120 que a recobre externamente. Internamente, o HIV-1 (**Figura I**) apresenta o capsídeo que é formado pela proteína p24, imerso na proteína da matriz p17. O nucleocapsídeo, a estrutura mais interna, é formado pelas proteínas p7/p9 que delimita o interior do capsídeo. O interior do nucleocapsídeo é formado por duas fitas simples de RNA, pelas integrases e pela transcriptase reversa. (BARRE-SINOUSI, 1996; CHAN and KIM, 1998).

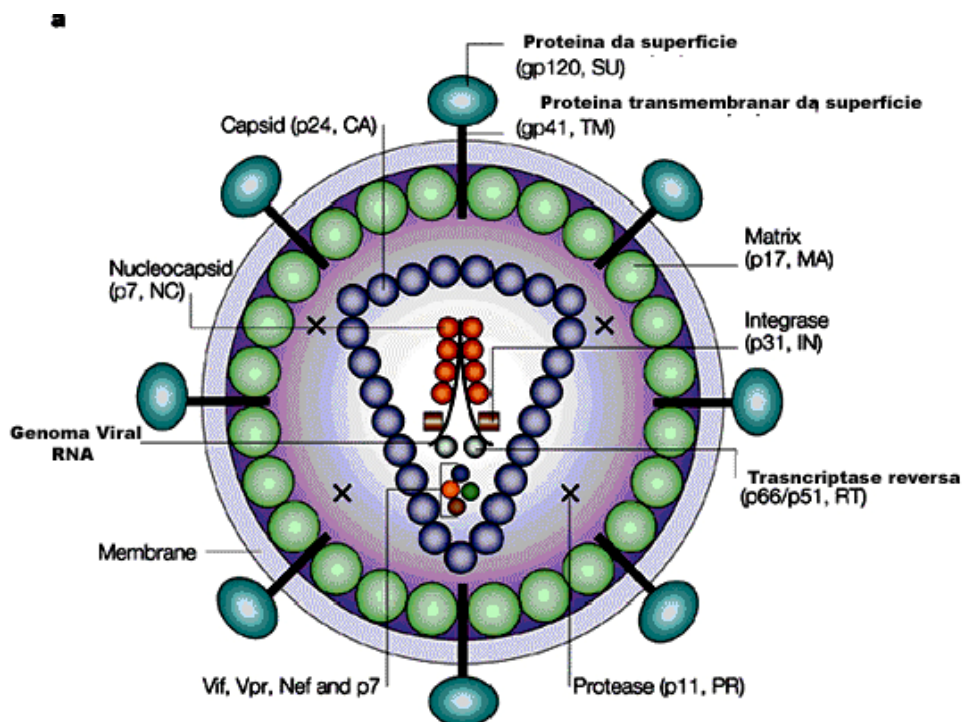


Figura I. Estrutura Morfológica do vírus do HIV-1

p7- proteína p7; **NC**- nucleocapsídeo; **p24**- proteína p24; **CA**- capsídeo viral; **gp120**-proteína gp120; **SU**- superfície; **gp41**- proteína gp41; **p17**- proteína p17; **MA**- matriz; **p31**- proteína p31; **IN**- integrase; **p66/p55**- proteínas p66 e p55; **RT**- transcriptase reversa; **p11**- proteína p11; **PR**-protease; **Vif, Vpr, Nef**- proteínas regulatórias.

Disponível em: (Fonte: www.nature.com/nri/journal/v2/n4/slideshow/nri776_F1.html)

O genoma do HIV-1 está delimitado por regiões denominadas LTR5' e LTR3' (*long terminal repeats*), estas regiões codificam 3 gens constitutivos, os genes *env*, *pol*, *gag* e seis

genes regulatórios: *tat*, *nef*, *ver*, *vpr*, *vpu* e *vif* (**Figura II**) (COHEN, PAOLUCCI *et al.*, 1998; SINGH, 2006).

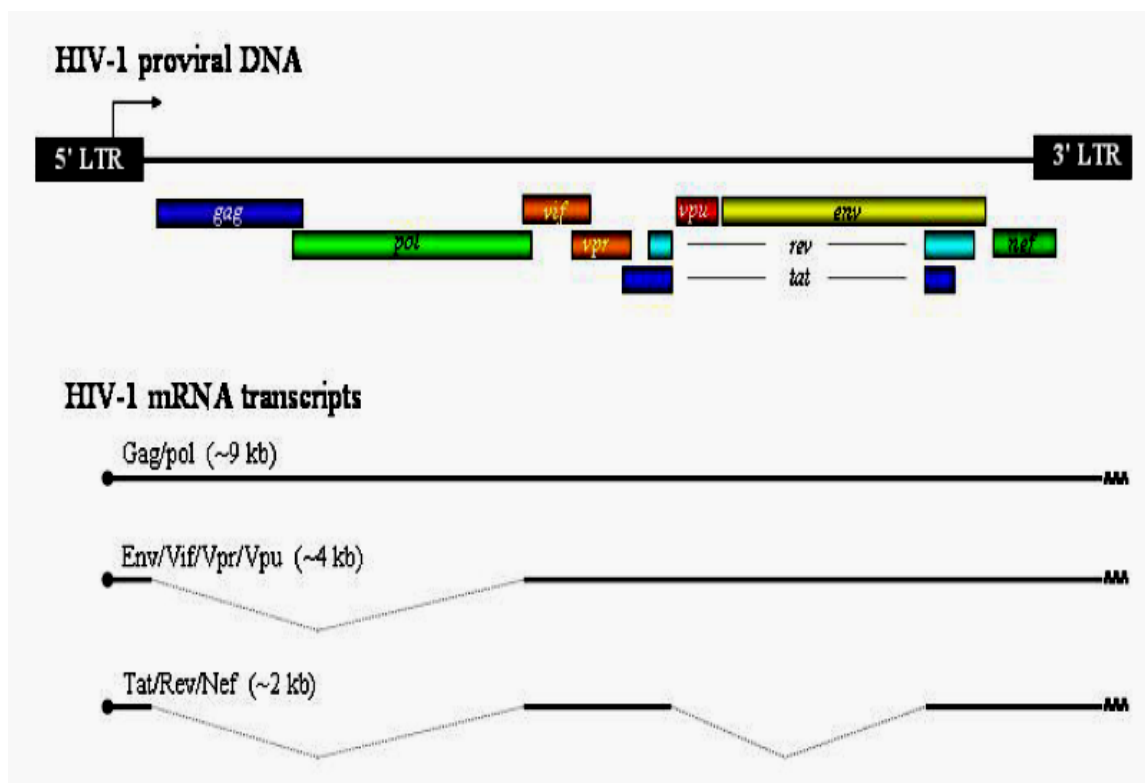


Figura II. Genoma do HIV-1
Adaptado de (SINGH, 2006)

2.2 CICLO DE INFECÇÃO E REPLICAÇÃO DO HIV-1

A infecção pelo HIV-1 inicia-se com a ligação da partícula viral à molécula CD4 e a receptores presentes na membrana celular. Primeiramente, a proteína gp120 interage com a molécula CD4. Uma vez unidas, ocorrem mudanças tridimensionais em ambas proteínas com a exposição de novos sítios de ligação (COHEN, PAOLUCCI *et al.*, 1998). O próximo evento é a formação de um complexo ternário ocasionado pela ligação da gp120 com os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (O'BRIEN and MOORE, 2000; GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006). O receptor CCR5 é utilizado pelos vírus de tropismo para macrófagos (M-trópicos), enquanto que o receptor CXCR4 é utilizado pelos vírus de tropismo de linfócitos (T-trópicos). Com a formação deste complexo, ocorre uma

alteração conformacional no vírion através da mudança conformacional da gp41. Isto permite a junção dos sítios hidrofóbicos com a membrana celular permitindo o acesso do capsídeo ao citosol e a liberação do envelope viral, das enzimas e do genoma viral (GAO, YUE *et al.*, 1994; COHEN, 1997). No citosol da célula alvo a transcriptase reversa é ativada e age transcrevendo o genoma viral formado pelas fitas de RNA em DNA complementar (cDNA). A fusão do cDNA ao genoma celular ocorre através da ação da integrase que transporta o cDNA viral ao núcleo celular recebendo, então, a denominação de provírus. (BARRE-SINOUSI, 1996; FAUCI, 2007a)

A maior parte das proteínas virais é formada a partir de poliproteínas. As poliproteínas sofrem ação de proteases virais que as transformam em proteínas ativas e funcionais. A protease do HIV-1 reconhece e cliva nove seqüências de proteínas, produzindo assim: a matriz, o capsídeo, o nucleocapsídeo, a p6 (poliproteína Gag), a transcriptase reversa, a protease e a integrase (poliproteína Gag). As proteínas virais migram em seguida para os sítios de maturação, localizadas próximas à membrana plasmática de onde vírions de RNA e as proteínas virais são montadas formando o nucleocapsídeo, que brota da célula utilizando porções da membrana plasmática (BARRE-SINOUSI, 1996; COHEN, PAOLUCCI *et al.*, 1998)

2.3 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1

O HIV comumente é transmitido através do contato sexual, matérias perfurocortante infectados, transfusões sanguíneas, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas, por transmissão vertical e aleitamento materno. A via sexual é atualmente a forma mais comum de transmissão do HIV-1, ocorre em 85% dos casos(UNAIDS, 2007).

As células dendríticas, residentes na mucosa genital, têm um papel importante na disseminação da infecção (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996; FAUCI, 2008). A partícula viral pode ter acesso ao organismo através de microfissuras no epitélio da genitália ou através da captura das partículas virais pelas células dendríticas. As células dendríticas carregam a partícula viral para o linfonodo drenante mais próximo onde ocorre infecção de novas células, formação de novas partículas virais que se disseminam por todo o organismo (JOHNSTON and FAUCI, 2007).

Podem-se destacar três períodos bem definidos durante a infecção pelo HIV-1: infecção primária, fase de latência clínica e a fase de AIDS (**Figura III**). A natureza complexa da infecção pelo HIV-1 é resultado de vários fatos sobrepostos como a persistência da infecção viral, ativação contínua do sistema imune, a desregulação da secreção de citocinas e deterioração progressiva do sistema imune (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996; COHEN, 1997)

A fase primária de infecção corresponde ao período de alguns dias após a infecção inicial. Nesta, pode ser detectada uma alta viremia ($>1.000.000$ cópias/ml) e uma variedade de sintomas inespecíficos, semelhantes aos de uma infecção gripal em cerca de 50% a 70% dos indivíduos. Esta fase pode persistir por uma a três semanas (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996; COHEN, 1997). A fase de latência corresponde ao período de latência clínica que pode durar meses ou anos, no qual ocorre uma replicação viral persistente nos gânglios linfáticos que aos poucos exaure as funções do sistema imune (COFFIN, 1995a). A fase que corresponde a AIDS ocorre após um período médio de 3 a 10 anos após a infecção inicial, caracteriza-se pela diminuição acentuada da proporção de linfócitos T CD4+, aumento da carga viral e ao conseqüente aparecimento de imunossupressão, manifestando-se através de doenças oportunistas e de neoplasias (COHEN, PAOLUCCI *et al.*, 1998).

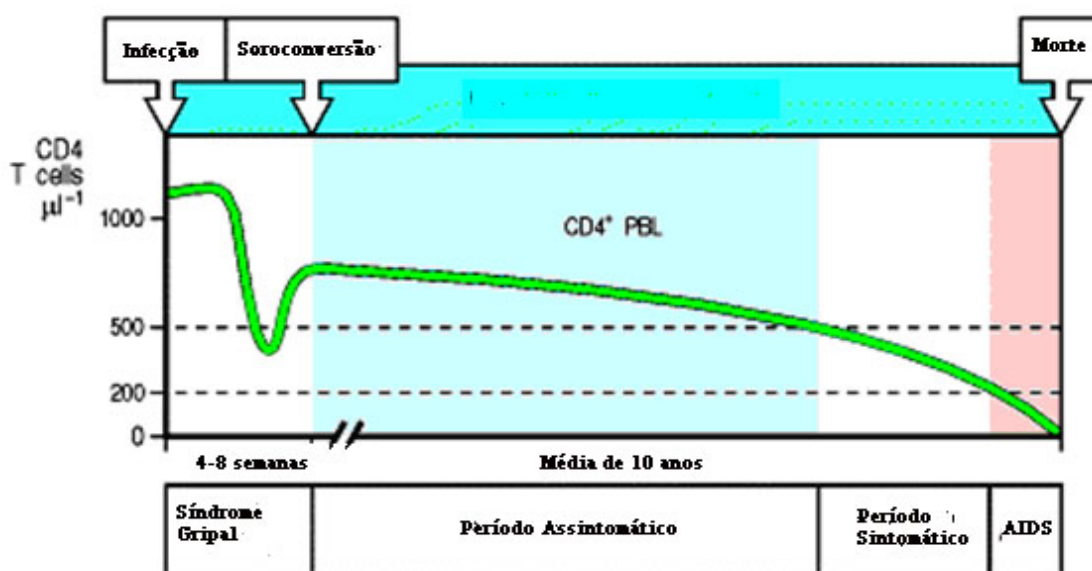


Figura III. História natural do HIV-1

Adaptado de Immunobiology, capítulo 11, 5^o edition, 2001.

Cerca de 5% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 evoluem de forma lenta para a doença. Estes indivíduos conseguem manter a proporção de células T CD4+ acima de 600

cel/ mL e a carga viral menor que 1000 cópias/mL por mais de 8 anos, esses indivíduos são classificados por progressores lentos (LTNP, Long term-non progress). Dentre os LTNP existe uma subpopulação de indivíduos que apresentam uma carga viral indetectável, proporção de células T CD4⁺ normal e são classificados por supressores ELITE (Elite suppressors). (CLERICI and SHEARER, 1996; COHEN and WALKER, 2001)

2.4 IMUNOPATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE CONTRA O HIV-1

A infecção pelo HIV-1 causa uma perda progressiva da capacidade do organismo em desenvolver uma resposta imune contra agentes infecciosos. As respostas adaptativas envolvem a interação da resposta humoral (linfócitos B) e da resposta celular (linfócitos T). Os linfócitos T CD4⁺ são uma subpopulação das células T que coordena as ações das respostas imunes adaptativas. Esta célula tem a capacidade de reconhecer antígenos não próprios e ativar as células B na produção de anticorpos específicos. Esta propriedade permite a produção de anticorpos que inativam vírus livres e previnem infecções posteriores. Estes anticorpos são importantes na citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) por recrutar células NK que lisam células infectadas por vírus. As células T CD4⁺ também participam na ativação de linfócitos T CD8⁺ (células T citotóxicas) que possuem a capacidade de induzir apoptose nas células alvo após reconhecimento do complexo MHC de classe I/ antígeno HIV-1 específico (GOEPFERT, 2003).

Após a infecção do HIV as respostas imunes geradas pela ação dos linfócitos T controlam a infecção primária e a fase de latência clínica da infecção. Contudo, este controle não é permanente, estas repostas são perdidas ao longo da progressão da doença e os indivíduos desenvolvem AIDS (AUTRAN, HADIDA *et al.*, 1996). No início da fase aguda, após alta viremia plasmática, ocorre uma queda da viremia plasmática decorrente de uma forte resposta celular representada pelos linfocitos CTL (**Figura IV**) (BORROW, LEWICKI *et al.*, 1994). Os linfocitos CTL diminuem a replicação viral por de mecanismos citotóxicos que levam a apoptose através do reconhecimento de peptídeos virais pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) (SEWELL *et al.*, 2000). Além disso, os linfócitos CTL controlam a replicação viral inicialmente através da produção de fatores anti-virais como citocinas (IL-2, IFN- γ e TNF α).(COCCHI *et al.*, 2001). Numa fase mais tardia ocorre o reconhecimento de peptídeos virais, ligados ao MHC

de classe I, levando a ativação celular o que permite a produção de citotoxinas (perforinas) e quimiocinas (RANTES, MPI-1- α e MPI-1 β) (BORROW, LEWICKI *et al.*, 1994; LEVY, 1995; ALTFELD, ALLEN *et al.*, 2002; MIGUELES and CONNORS, 2002; SAEZ-CIRION, LACABARATZ *et al.*, 2007)

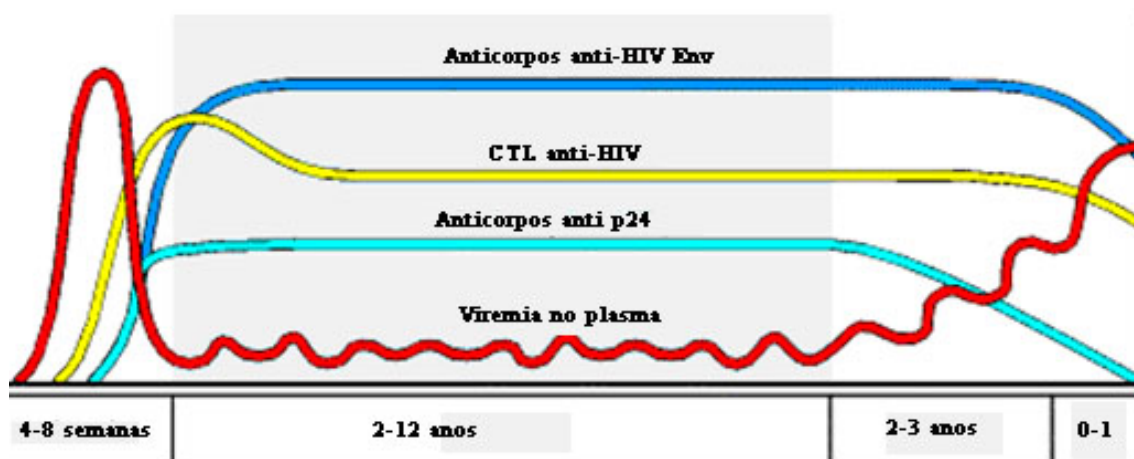


Figura IV. Resposta imune contra HIV-1
Adaptado de Janeway 2002

Os fatores imunopatogênicos envolvidos na infecção pelo HIV são variados (FAUCI, 1993; PANTALEO, GRAZIOSI and FAUCI, 1993). Após a infecção primária ocorre uma viremia aguda com disseminação do vírus. Esta fase caracteriza-se pela inexistência de uma resposta imune adaptativa com a capacidade de impedir o avanço da infecção devido à rápida disseminação viral em torno de 10^{11} cópias virais por dia, com a infecção dos tecidos linfáticos e pelo estabelecimento de reservatórios virais em células dendríticas, macrófagos e células T $CD4^+$ (FOX, TENNER-RACZ *et al.*, 1991; PANTALEO, GRAZIOSI, DEMAREST *et al.*, 1993; FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996; MUNIER and KELLEHER, 2007). O linfócito T $CD4^+$ é o principal alvo da patogenicidade representada pelo avanço da doença (STEVENSON, 2003; SIMON, HO *et al.*, 2006; FAUCI, 2008). Esta característica adaptativa permite que o HIV-1 seja encontrado em diferentes estágios de replicação e em diferentes tecidos, dificultando a ação do sistema imune para a eliminação do vírus (PANTALEO, GRAZIOSI, DEMAREST *et al.*, 1993; STEVENSON, 2003; FACKLER, ALCOVER *et al.*, 2007; FAUCI, 2007b). Após esta fase ocorre uma diminuição da viremia plasmática e

aparecimento de uma resposta imune adaptativa que controla, mas não consegue destruir o vírus, denominada fase de latência(FAUCI, 1993; , 2008).

A fase de latência corresponde ao período posterior à fase aguda na qual os níveis de HIV-1 plasmáticos permanecem estáveis por meses ou anos(FAUCI, 1993; , 2007a). Esta estabilidade ocorre devido ao surgimento de uma da resposta imune específica que produz anticorpos neutralizantes anti-HIV-1, pela existência de linfócitos citotóxicos T CD8⁺ anti-HIV-1 específicos e pelo aumento da proporção de linfócitos T CD4⁺. Neste período, ocorre uma intensa replicação viral nos principais reservatórios do HIV-1 do organismo. Enquanto a célula permanece inativada, o HIV-1 mantém-se na forma de provírus integrado ao DNA celular(FAUCI, 1993). A ativação celular é o principal fator que permite a formação de novos vírions (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996). Após a ativação celular ocorre uma rápida produção de proteínas virais que agem nos fatores de transcrição celular permitindo ao final do processo a formação de novos vírions que são lançados no plasma (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996). Existem alguns fatores celulares que limitam o processo de replicação em células latentes como a citidina desaminase APOBEC3G (*apolipoprotein-B messenger-RNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*), o fator de transcrição nuclear NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), o fator nuclear- κ B (*NF- κ B*), proteína regulatória MURR1 e a proteína ligante polipirimidina (PTB) (FACKLER, ALCOVER *et al.*, 2007).

A desregulação observada do sistema imune na fase final de latência ocorre em conjunto com o avanço da cronicidade da infecção que é o resultado do aumento da replicação viral, aumento da carga viral e de um decréscimo progressivo das células T CD4⁺ (FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996). Um dos mecanismos utilizados pelo vírus para desregular a função imune é o interrupção da sinapse imunológica (FACKLER, ALCOVER *et al.*, 2007). Durante a infecção pelo HIV-1 ocorre um tráfico alterado dos receptores das células T (TCR) e das moléculas de sinalização LCK nos endossomas da célula T CD4⁺, resultando numa apresentação e reconhecimento de antígenos ineficiente via TCR/MHC para sinapse imunológica (FACKLER, ALCOVER *et al.*, 2007). A resposta humoral é intensa (**Figura IV**) e inclui o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes específicos que aparecem normalmente entre 60 e 180 dias após a infecção inicial e permanecem durante a fase crônica. Os anticorpos neutralizantes reconhecem a região variável V3 da gp120 do envelope viral impedindo a entrada do vírus na célula (PILGRIM

et al., 1997; STAMATATOS et al., 2001; FAUCI, 2008). A citotoxicidade celular dependente de anticorpos aparece na infecção aguda e permanece durante todo o curso da infecção, eliminando células infectadas recobertas por gp120 e anticorpos (KOUP, SAFRIT *et al.*, 1994; PANTALEO and FAUCI, 1995; COHEN, PAOLUCCI *et al.*, 1998).

O HIV-1 utiliza vários mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro, como a diminuição da expressão das moléculas de MHC-I da superfície celular mediada pela proteína Nef, aumento da regulação do Fas-ligante na superfície de linfócitos T CD4⁺ infectados, infecção das células alvo que são resistentes a lise por CTL, destruição de linfócitos T CD4⁺ que regula a função das CTL e escape por mutações (O'CONNOR and WATKINS, 1999). Uma das hipóteses que explica como o vírus evade do sistema imune está baseada na pressão seletiva do tipo selvagem do vírus por uma resposta CTL agressiva que promove o aparecimento de variantes virais melhores adaptadas (O'CONNOR and WATKINS, 1999). Contudo, não se sabe de que maneira os linfócitos citotóxicos exercem este tipo de pressão, e se isto é o objeto da variação entre epitopos de linfócitos citotóxicos ou entre indivíduos (O'CONNOR and WATKINS, 1999). A replicação dinâmica do HIV sugere que cada substituição possível de nucleotídeos é produzida na população viral a cada dia, promovendo uma seleção de variantes com alta adaptação (WOLINSKY, KORBER *et al.*, 1996). Outro mecanismo utilizado pelo vírus para escapar do sistema imune é a diminuição da expressão de peptídeos via MHC de classe I da superfície das células infectadas. Com isto as CTL deixam de identificar de forma eficiente os peptídeos virais apresentados pelas células infectadas (EVANS and DESROSIERS, 2001).

Entretanto, uma resposta T CD8⁺ isolada não é suficiente para induzir uma resposta imune contra o vírus. Estudos demonstraram que uma resposta eficiente CTL estava associada a uma intensa resposta T CD4⁺ (ROSENBERG, BILLINGSLEY *et al.*, 1997; HEENEY, 2002), tendo em vista que estas células são indispensáveis para iniciação e manutenção da resposta primária e para resposta T CD8⁺ (KALAMS and WALKER, 1998).

Existem evidências da importância da resposta CTL no controle da progressão da doença em indivíduos identificados como não progressores. Estes indivíduos apresentaram fortes respostas de linfócitos T CD8⁺ específicas, associados ao marcador de ativação HLA-DR e ausência do marcador CD38⁺ que permitem que haja um controle da viremia

por um período de tempo muito maior do que aqueles encontrados nos típicos progressores (SAEZ-CIRION, PANCINO *et al.*, 2007).

Existem locais denominados reservatórios virais no organismo onde o HIV-1 pode se replicar durante todas as fases da doença produzindo novos vírus continuamente no citosol de células ativadas. Estes locais anatômicos de difícil acesso e penetração da droga são o sistema nervoso central, os tecidos linfóides do intestino, células dendríticas, macrófagos e os linfócitos T CD4⁺ de memória (FOX, TENNER-RACZ *et al.*, 1991; FAUCI, 1993; PANTALEO, GRAZIOSI and FAUCI, 1993; BLANKSON, PERSAUD *et al.*, 1999; SILICIANO, 1999; COHEN and WALKER, 2001)

Estudos populacionais em indivíduos infectados sugerem uma associação entre certos tipos de alelos de MHC-I e a razão da progressão da doença (CARRINGTON, NELSON *et al.*, 1999; HENDEL, CAILLAT-ZUCMAN *et al.*, 1999). Em particular, pode-se citar as moléculas HLA-B57, HLA-B27 e HLA-B63 que se correlacionam com o desenvolvimento lento da progressão da doença. (FRAHM, ADAMS *et al.*, 2005).

Tipicamente no decorrer da infecção ocorre uma perda do equilíbrio entre o vírus e resposta imune, os indivíduos saem da fase de latência e entram numa fase denominada de AIDS (PANTALEO and FAUCI, 1995; FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996). Nesta fase os indivíduos apresentam uma forte diminuição das respostas humoral e celular contra o HIV-1. Ocorre aumento da viremia plasmática, diminuição da proporção dos linfócitos T CD4⁺ para níveis inferiores a 200 células/ mL e o aparecimento de doenças oportunistas e de neoplasias (PANTALEO and FAUCI, 1995; FAUCI, PANTALEO *et al.*, 1996).

2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1

Uma das características mais importantes do HIV é sua extrema variabilidade genética durante o curso da infecção, no qual a distribuição das variantes virais de cada indivíduo sofre mudanças. Vários fatores estão relacionados a esta grande diversidade genética e biológica. A combinação da alta taxa de erros da transcriptase reversa associada a alta capacidade de mudança do vírus *in vivo* explicam o número elevado de variantes virais encontradas *in vivo*. Mudanças da seqüência nucleotídica, resultantes de erros de leitura produzidos pela transcriptase reversa, pode levar a uma taxa de aproximadamente 3

$\times 10^{-5}$ substituições de nucleotídeos por sítio em cada ciclo de replicação. Além disso, podem ocorrer igualmente substituições, deleções e inserções de pares de bases, que são dificilmente estimados. O HIV-1 apresenta uma alta taxa de produção de vírus (COFFIN, 1995b; WEI, GHOSH *et al.*, 1995), estima-se que cerca de 10^{11} partículas virais são formadas por dia e que a cada trinta minutos existe uma nova partícula viral formada. Por outro lado, a pressão seletiva *in vivo* proveniente da resposta imune do hospedeiro ou da exposição a drogas anti-retrovirais leva ao aparecimento de mutantes resistentes (RICHMAN, 2001).

Análises filogenéticas de seqüências genômicas do HIV permitiram a classificação deste vírus em dois tipos: HIV-1 e HIV-2 (FAUCI, 2008). O HIV-2 é formado por seis subtipos genéticos, ordenados de A à F, apresentando distribuição mais restrita ao Oeste da África e recentemente foi registrado na Índia (ALAEUS, 2000; FAUCI, 2008). O HIV-1 pode ser associado à maior parte das infecções do mundo pelo HIV. A análise filogenética dos isolados virais do HIV-1 indicam que estes estão divididos em três grupos: o grupo M (majoritário), O (*Outlier*) e N (não M ou O) (TATT, BARLOW *et al.*, 2001; SIMON, HO *et al.*, 2006). O grupo M é o responsável pela maior parte das infecções do mundo e pode ser subdividido em 9 subtipos que variam do grupo A-D, F-J, e em 20 formas recombinantes circulantes (CRF) (MCCUTCHAN, 2000). Esta distribuição em grupos e subtipos está ligada a diferenças em assinaturas genéticas dos vírus e também devido à localização geográfica (**Figura V**). A classificação dos diferentes subtipos do HIV-1 baseia-se em diferenças existentes nas seqüências nucleotídicas encontradas nas proteínas virais de cada subtipo viral. Desta forma, entre os subtipos do HIV-1 encontra-se diferenças entre as proteínas do envelope de 20%, GAG 16% e 13% entre as regiões da polimerase (MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 2002).

O subtipo C do HIV-1 é o mais prevalente no mundo com aproximadamente 55-60% dos casos, seguidos pelo subtipo A, B e recombinantes CRF01_AE e CRF_AG (SIMON, HO *et al.*, 2006). Nas Américas, Europa ocidental e América do Norte, o subtipo B é o mais predominante, contudo, há evidências que infecções com outros subtipos estejam aumentando (PETERS, 2001).



Figura V. Distribuição Mundial dos subtipos e modos de transmissão do HIV-1
HSex- Transmissão heterossexual; **MSM-** Transmissão homossexual; **IDU-** Usuário de droga injetável
 Adaptado de (SIMON, HO *et al.*, 2006)

No Brasil, o subtipo B é o mais prevalente, mas, já foram descritos os subtipos A, C, D, F e recombinantes B/F e B/C (POTTS, KALISH *et al.*, 1993; MORGADO, SABINO *et al.*, 1994; BELLO, EYER-SILVA *et al.*, 2007; BRIGIDO, NUNES *et al.*, 2007; VERAS, VERAS *et al.*, 2007). O subtipo B apresenta-se no Brasil sob duas formas principais. Uma forma semelhante a da Europa e da América do Norte com a seqüência de aminoácidos GPGR no topo da alça V3, e uma segunda variante que apresenta uma substituição da prolina por um triptofano (P-W) nesta região, resultando numa seqüência GWGR, conhecida com B^{BR} ou B^W (POTTS, KALISH *et al.*, 1993; MORGADO, SABINO *et al.*, 1994; GALVAO-CASTRO, COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 1996; MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 1998; MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 2002) O subtipo C do HIV-1 é predominante na região Sul do Brasil, representando em algumas regiões mais de 48% das amostras (LOCATELI, STOCO *et al.*, 2007). O subtipo D já foi identificado em amostras do Rio de Janeiro onde a maior prevalência é dos subtipos B, F1 e BF1 (COUTO-FERNANDEZ, EYER-SILVA *et al.*, 2006). Na Bahia foi encontrado predominantemente o subtipo B, também foram identificadas formas recombinantes BF em um estudo realizado em 2006 (DOURADO, MILROY *et al.*, 2007).

Existem poucas evidências de uma correlação entre variabilidade genética e transmissibilidade, infectividade, patogenicidade e propriedades biológicas do HIV, entretanto alguns estudos sugerem que a progressão para AIDS nos indivíduos infectados pelo HIV subtipo B pode ser mais rápida do que os indivíduos infectados pelo subtipo B^{BR} (SANTORO-LOPES, HARRISON *et al.*, 2000; CASSEB, KOMNINAKIS *et al.*, 2002).

2.6 Vacinas e AIDS

Na África Sub-Sahariana encontra-se a maior prevalência de indivíduos infectados pelo HIV-1, em alguns países a prevalência varia entre 2-15% da população. Esta região que corresponde a 68% dos adultos e 90% de todas as crianças infectadas pelo HIV-1 no mundo. Além disso, cerca de 75% de todas as mortes relativa a AIDS são registradas nesta região geográfica do mundo (UNAIDS, 2007).

Apesar de existirem drogas que melhoram a qualidade de vida, diminuem a mortalidade e morbidade dos indivíduos infectados pelo HIV-1, o tratamento não é capaz de curar esta infecção. Por outro lado, poucos indivíduos infectados pelo HIV-1 no mundo têm acesso a esse tipo de tratamento. Isto geralmente está associado ao elevado custo destas drogas. Embora seus benefícios da terapia sejam importantes, muitos indivíduos infectados não conseguem tolerar os efeitos colaterais das drogas (UNAIDS, 2007).

O principal objetivo de uma vacina é promover uma imunidade duradoura contra o patógeno. A construção de vacinas baseia-se em estratégias que induzam o sistema imune na prevenção de infecções (NOSSAL, 1997; JOHNSTON and FAUCI, 2007; WELSH and FUJINAMI, 2007). Já foram desenvolvidas vacinas que protegem indivíduos contra outras infecções virais, mas, até o momento não foi desenvolvida uma vacina eficiente contra o HIV-1. Dentre as metodologias que foram eficientes para a construção de vacinas contra infecções virais pode-se citar: vacinas desenvolvidas a partir de cultura de vírus inativados (hepatite A, gripe, encefalite japonesa, pólio e raiva), ou vírus atenuados em cultura de ovos embrionados, *in vitro*, para reduzir sua virulência em relação a humanos (adenovírus, sarampo, caxumba, pólio, rubéola, varicela zoster, febre amarela e varíola), ou o uso de proteínas recombinantes (hepatite B e papiloma). (TONKS, 2007; WELSH and FUJINAMI, 2007).

Desde a descoberta do HIV há quase 25 anos inúmeras equipes tentam desenvolver uma vacina contra o HIV-1 que seja eficiente, com poucos efeitos colaterais e que diminua os casos de indivíduos infectados pelo HIV-1 no mundo diminuindo os casos de mortes associados a AIDS (NABEL, 2007). A infecção natural do HIV-1 não resulta na eliminação do vírus e em imunidade protetora contra re-infecções (ALTFELD, ALLEN *et al.*, 2002). Isto é demonstrado em casos de superinfecção (re-infecção com uma cepa heteróloga do vírus) em indivíduos infectados pelo HIV-1, conduzindo ao aparecimento de formas recombinantes virais e aumentando da diversidade genética do vírus (WANG, LAL *et al.*, 2000; ALTFELD, ALLEN *et al.*, 2002; ALLEN and ALTFELD, 2003)

Uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV é a variabilidade genética do vírus (MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 2002; DE GROOT, BISHOP *et al.*, 2004; SINGH, 2006; JOHNSTON and FAUCI, 2007). Estudos apontam que não mais de 50 a 80% dos epitopos são reconhecidos de forma cruzada entre os diferentes subtipos de HIV-1 (FERNANDEZ, FIDLER *et al.*, 1997). Além disso, existem múltiplos mecanismos desenvolvidos pelo HIV contra o sistema imune, destes podem-se citar: i) diminuição da produção das moléculas do MHC de classe I, o que reduz reconhecimento por parte dos linfócitos CTL; ii) impedimento do acesso de anticorpos neutralizantes devido ao mascaramento dos sítios de ligação importantes do vírus por alças hipervariáveis ou por resíduos de glicanos das glicoproteínas da superfície (EMINI and KOFF, 2004; GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006).

Uma vacina ideal deveria possuir características dos subtipos locais circulantes do HIV a fim de aumentar as chances de proteção, com capacidade para induzir tanto uma resposta imune humoral quanto uma resposta celular (GASCHEN, TAYLOR *et al.*, 2002; JOHNSTON and FAUCI, 2007; NABEL, 2007). Assim, a resposta humoral produziria anticorpos neutralizantes que poderiam prevenir à infecção de novas células do hospedeiro, a ativação de células NK e a ativação de linfócitos T CD8⁺ que destruiriam células produtoras de antígenos virais (RICHMAN, WRIN *et al.*, 2003; EMINI and KOFF, 2004). Entretanto, existem evidências *in vivo* de escape de variantes aos anticorpos neutralizantes durante o curso da infecção (RICHMAN, WRIN *et al.*, 2003). As vacinas atuais contra o HIV-1 baseiam-se no desenvolvimento de uma resposta imune celular (GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006; JOHNSTON and FAUCI, 2007)

O primeiro teste de vacinas de Fase I contra o HIV-1 foi realizado nos Estados Unidos no ano de 1987. Desde então, mais de 35 vacinas candidatas já foram testadas em mais de 65 testes de Fase I/II, envolvendo acima de 10000 indivíduos em mais de 10 países (GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006).

Já foram testadas vacinas contra o HIV-1 baseadas em vírus atenuado ou totalmente inativado, contudo, devido a falta de segurança na utilização desta metodologia foi interrompido o desenvolvimento contendo o HIV completo. Já foi testado o uso de proteínas e de peptídeos em vacinas com subunidades virais, não potencialmente perigosos do HIV, com capacidade de induzir a produção de anticorpos. Mas, depois da falha da vacina baseada na gp20, nenhuma outra vacina deste tipo foi testada em ensaios. As vacinas de DNA baseada no uso de genes isolados do HIV-1 podem induzir uma resposta imune celular. Estes genes codificam proteínas virais, quando incorporadas nas células humanas. As vacinas com vetores recombinantes utilizam vírus atenuados que transportam genes isolados do HIV para as células. Dois grandes ensaios clínicos avaliaram vacinas com vetores virais: um utilizou o vetor canarypox e outros vetores de adenovírus contendo genes GAG, NEF e POL do HIV-1. A combinação de estratégias e o uso de imunógenos diferentes tem sido aventado para produzir uma resposta imune mais ampla, mais potente e durável (TONKS, 2007). Os ensaios clínicos utilizando vacinas em curso em diversos países estão representados no **Quadro I**.

As novas estratégias para o desenvolvimento de imunógenos do envelope do HIV baseiam-se na tentativa de mimetizar o trímero da superfície viral, ou redirecionar as resposta imunes para epitopos conformacionais conservados ou desviar as respostas imunes dos alças hipervariáveis (JOHNSTON and FAUCI, 2007).

O desenvolvimento de uma vacina que seja capaz de impedir a infecção, retardar ou interromper a progressão da doença continua em aberto (EMINI and KOFF, 2004). Embora as vacinas testadas nos diversos ensaios clínicos tenham se mostrado imunogênicas, não foram capazes de impedir a infecção, ou controlar a viremia em indivíduos infectados (SANTORO-LOPES, HARRISON *et al.*, 2000)

A importância do papel dos linfócitos T CD4⁺ no controle da infecção pelo HIV-1 já foi demonstrado, mas, pouco se sabe a respeito da identificação de epitopos reconhecidos por estas células em relação aos epitopos reconhecidos de linfócitos TCD8⁺(VAN DER BURG, KWAPPENBERG *et al.*, 1999). Além disso, já foi demonstrado uma relação inversa entre as respostas de células T CD4⁺ e a carga viral (JANSEN, VAN BAARLE *et al.*, 2006). Dado ao papel indispensável destas células na determinação do status funcional e na resposta efetora de memória, o reconhecimento de epitopos HIV-1 é essencial para qualquer candidato à vacina contra o HIV-1.

Quadro I. Testes Clínicos de Vacinas HIV-1

Candidate and Trial Phase	Components (Clade)	Countries Hosting Trial	Developers, Sponsors, Collaborators
Canarypox plus envelope, phase 3	gag, pro, env (E) plus gp120 (B, E)	Thailand	NIAID, Sanofi Pasteur, Thailand Ministry of Public Health, U.S. Army Medical Research and Materiel Command, VaxGen
Ad5, phase 2b	gag, pol, nef (B)	Dominican Republic, Haiti, Jamaica, Peru, South Africa, United States	HIV Vaccine Trials Network, Merck, NIAID
DNA plus Ad5, phase 2	gag, pol, nef (B), env (A, B, C) plus gag, pol (B), env (A, B, C)	Kenya, Haiti, Jamaica, Rwanda, South Africa, Tanzania, Uganda, United States	HIV Vaccine Trials Network, International AIDS Vaccine Initiative, NIAID, U.S. Army Medical Research and Materiel Command
Canarypox plus lipopeptides, phase 2	gag, pol, nef, env (B) plus cytotoxic T lymphocyte epitopes (B)	France	ANRS, Sanofi Pasteur
DNA plus protein, phase 1	T helper epitopes from gag, pol, vpr, nef (B)	Peru, United States	HIV Vaccine Trials Network, NIAID, Pharmexa-Epimmune
DNA plus peptides, phase 1	gag (B) multiple T-cell epitopes (plus or minus IL-15 or IL-12 adjuvant or GM-CSF)	Brazil, Thailand, United States	HIV Vaccine Trials Network, NIAID, Wyeth
DNA-PLG plus envelope, phase 1	gag, env (B) plus oligomeric gp140 (B)	United States	HIV Vaccine Trials Network, NIAID, Novartis
Anthrax-derived polypeptide-HIV gag fusion protein, phase 1	gag (B)	United States	Avant Immunotherapeutics, Walter Reed Army Institute of Research
DNA plus modified vaccinia Ankara, phase 1	gag, pol, nef, tat, env (C)	United States	Aaron Diamond AIDS Research Center, International AIDS Vaccine Initiative
Modified vaccinia Ankara, phase 1	gag, pol, nef, tat, env (C)	India	Indian Council of Medical Research, International AIDS Vaccine Initiative
Fowlpox plus modified vaccinia Ankara, phase 1	gag, pol, nef, tat, rev, env (B)	Brazil, United States	HIV Vaccine Trials Network, NIAID, Therion Biologics
Adeno-associated virus, phase 1	gag, pr, rt (C)	Belgium, Germany, India, South Africa, Zambia	International AIDS Vaccine Initiative, Targeted Genetics
Venezuelan equine encephalitis viral replicon, phase 1	gag (C)	Botswana, South Africa, United States	AlphaVax, HIV Vaccine Trials Network, NIAID

Ad5- Adenovirus tipo 5, PLG- polilactideo co-glicolideo, GM-CSF Fator estimulador de colônia de macrófago-granulocito, NIAID- Instituto nacional de Alergia e Doenças infecciosas, ANRS Agencia Nacional Francesa de combate a AIDS.

3.0 Justificativa

O HIV-1 é uma pandemia e o número de indivíduos infectados continua em franca expansão. Embora o tratamento atual melhore a qualidade de vida e diminua a mortalidade e morbidade, não leva a cura da doença. A maior prevalência da doença é encontrada na África, onde ocorre cerca de 68% dos casos da doença em adultos e 90% de todas as crianças infectadas pelo vírus no mundo. O acesso do tratamento é limitado nesta população devido ao alto custo dos medicamentos.

O desenvolvimento de uma vacina é uma das propostas para o controle do crescente número de indivíduos infectados pelo HIV-1 mundo. Contudo, a variabilidade genética do vírus é o principal obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra o HIV-1. O HIV-1 do grupo M pode ser subdividido em 9 subtipos diferentes e formas recombinantes circulantes (CRF). No Brasil embora o subtipo B seja predominante, existe um número crescente de casos de HIV-1 do subtipo C, F e formas recombinantes. No Brasil, não existem trabalhos sobre o reconhecimento de epitopos de proteínas dos diversos subtipos do HIV-1 circulantes no País. A identificação de epitopos de proteínas virais do HIV-1 reconhecidos por linfócitos T pode ser uma metodologia eficiente para o desenvolvimento de estratégias para o controle da infecção e para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos entre vírus e hospedeiro.

4.0 Objetivo

4.1 Geral

- Avaliar o padrão da resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV frente às proteínas GAG e NEF dos diferentes subtipos do HIV-1.

4.2 Específico

- Avaliar a frequência e magnitude da resposta peptídeos das proteínas *GAG* e *NEF* do HIV-1 dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HxB2;
- Determinar os subtipos virais das amostras estudadas;
- Correlacionar os subtipos virais e a resposta aos *pools* de peptídeos das seqüências das proteínas GAG e NEF do HIV-1 dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HXB2.

5.0 Pacientes e métodos

5.1 Área e população de estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, analítico que faz parte de um estudo multicêntrico envolvendo quatro sítios no Brasil: Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- FIOCRUZ, Salvador-BA, o Laboratório de Imunologia Instituto de Coração, São Paulo- SP, o Laboratório de Retrovírus Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP, o Laboratório de AIDS- do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ e o Laboratório de Immunologie Tissulaire, et Cellulaire, Hôpital Pitié –Sapêtrière, Paris-França.

Em Salvador, foram selecionados 16 pacientes infectados pelo HIV-1 acompanhados no Serviço de Infectologia do Hospital Universitário Edgar Santos (HUPES) Salvador, Bahia. Os critérios de inclusão foram: pacientes em uso de terapia antiretroviral (HAART) há pelo menos 1 ano com contagem de linfócitos T CD4⁺ entre 250 – 500 células/mL e carga viral < 10000 cópias/mL (pacientes progressores controlados). Além disso, foram incluídos dois indivíduos com infecção documentada pelo HIV-1 há mais de 7 anos com a proporção de linfócitos T CD4 > 500 células/mm³ e carga viral ≤ 10000 cópias/ml, na ausência de tratamento antiretrovirais pacientes (pacientes não progressores). Os controles não infectados foram doadores voluntários selecionados no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-Ba. O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos participantes do estudo. As características dos pacientes envolvidos no estudo estão descritos na **Tabela 1**.

5.2 Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC):

Oitenta mililitros (80mL) de sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV-1 e 20mL dos indivíduos controles foram coletados em tubos heparinizados (BD Vacutainer por punção venosa. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/mL) (GE Healthcare Amersham

Biosciences, Sweden) e criopreservadas em solução de soro fetal bovino (SFB) com 10% dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, cinco mililitros de sangue periférico dos pacientes infectados pelo HIV-1 foram coletados em tubos com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA), obtido o PBMC conforme descrito acima e criopreservados na forma de *pellet* seco a -20°C para posterior extração DNA.

Para os ensaios funcionais as células foram descongeladas e a viabilidade celular foi avaliada uma hora e 18 horas após o descongelamento das PBMC. Utilizou-se corante vital Azul de Tripán (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Calculou-se o percentual das células vivas, sendo consideradas passíveis de utilização as suspensões celulares com viabilidade superior a 85% e recuperação acima de 50%.

5.3 Peptídeos de proteínas do HIV-1

Foram selecionados peptídeos correspondentes às proteínas GAG p24, GAG p17 e NEF de seqüências de diferentes subtipos circulantes no Brasil, discordantes daquelas encontradas no subtipo B do isolado HXB2. Foram realizados alinhamentos para caracterização de epítopos dos subtipos B^{BR}, C e F de seqüências brasileiras e do isolado B (HXB2) do HIV-1 com a elaboração de consensos, a partir do alinhamento de isolados de HIV-1 brasileiros e de referências do HIV-1 obtidas no website “Los Alamos National Laboratory” (<http://hiv-web.lanl.gov>) realizado pela equipe da Dra. Mariza Morgado (Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, FIOCRUZ- Rio de Janeiro). Foram preparados 23 diferentes *pools* de peptídeos, contendo cada um deles em média 10 seqüências de peptídeos com 15 (X15X) resíduos de aminoácidos, com sobreposição de 11 aminoácidos, correspondendo às seqüências selecionadas. Os *pools* podem ser sumarizados da seguinte maneira: i) Proteína GAG do subtipo B HxB2 (11 *pools*); ii) Proteína NEF do subtipo B HXB2 (3 *pools*); iii) Proteína GAG B brasileira (BBR ou BB) (1 pool), C e F (1 pool cada); iv) Proteína GAG dos subtipos C ou F sem reatividade cruzada e discordantes para o subtipo B (2 *pools*) **Anexo A.**

5.4 Quantificação de Células Produtoras de IFN- γ por Elispot

O ensaio de Elispot foi realizado sobre membranas de placas de cultura Millipore (Millipore Immobilion P Membrane; MAIPS4510) de 96 poços previamente sensibilizados com anticorpo de captura anti-IFN- γ (Diaclone, França). As células (1×10^5 PBMC/poço) foram cultivadas em presença dos diferentes *pools* de peptídeos na concentração final de $2 \mu\text{g/mL}$, em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com Glutamina, aminoácidos essenciais, piruvato de sódio, penicilina e estreptomicina durante 20 horas a 37°C , em estufa com 5% de CO_2 . Os ensaios foram realizados em triplicatas. Seis poços suplementares foram reservados aos controles negativos e positivos: 3 poços contendo unicamente a suspensão celular e meio RPMI suplementado com 10% de SFB (controle negativo) e 3 poços de controle positivo contendo a suspensão celular estimulada por $10 \mu\text{g/mL}$ fitohemaglutinina (PHA).

Para a revelação, utilizou-se um anticorpo de detecção anti-IFN- γ (Diaclone, França) e a posterior adição de uma solução de streptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (Amersham, Sweden) e do substrato da enzima: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma, Steinheim, Germany) conjugado ao agente catalisador nitro blue tetrazolium (NBT/BCIP) (Sigma, Steinheim, Germany). O IFN- γ produzido pelas células foi identificado por *spots* de cor violeta após 3-5 minutos de incubação a temperatura ambiente. Os spots foram contados automaticamente pelo microscópio (Axioplan-2 Imaging ZEISS) com auxílio de uma câmara (Sony) ligada a um microcomputador e do software KS-EliSpot.

O número de *spots* formados pela resposta específica ao peptídeo foi calculado a partir da média de *spots forming cells* ($\text{SFC} \times 10^5/\text{PBMC}$) da triplicata, subtraindo-se a média de SFC dos poços do controle negativo. Este número foi multiplicado por um fator 10 e o resultado foi expresso em $\text{SFC} \times 10^6$ PBMC.

5.5 Determinação do Subtipo viral dos pacientes infectados pelo HIV-1

O PBMC utilizado para determinar o subtipo viral dos pacientes infectados pelo HIV-1 foi obtido a partir do gradiente de Ficoll e mantido a -20°C . A extração do DNA das PBMCs foi realizada através do método de extração da Qiagen (QIAamp DNA minikit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Alemanha) conforme instruções do fabricante. A determinação dos subtipos virais do HIV-1 foi realizada por Dr Luiz Fernando Brígido do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP. A investigação dos tipos de HIV-1 foi realizado no www.ncbi.gov, REGA ferramenta de subtipagem (<http://jose.med.kuleuven.be/subtypetool/html/index.html>) e depois caracterizado por análise filogenética. Múltiplos alinhamentos foram executados usando o software de alinhamento múltiplo Clustal W, com bases na referência disponível em Los Alamos HIV-1 Database (www.hiv.lanl.gov) e editado manualmente de acordo com o codon de leitura usando o software BioEdit. Foi utilizada a seqüência do HIV-1 subtipo O (OSEMP1300) como *outgroup*.

5.6 Análise estatística

Os dados estão representados em médias de $\text{SCFx}10^6/\text{PBMC}$. As comparações entre o número de células produtoras de IFN- γ foram realizadas através de ANOVA e teste para significância Kruskal–Wallis, pós teste de Dunns e correlação de Pearson. Foi considerado significativo valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad versão 3.

6.0 Resultados

6.1 Principais características clínico-demográficas dos pacientes infectados pelo HIV-1 envolvidos no estudo

Os dados da **Tabela 1** apresentam as principais características dos pacientes que fizeram parte do estudo. No total, foram analisados 16 pacientes, 56% foram do sexo masculino. A idade média dos pacientes do sexo masculino foi de 45 anos, enquanto que do sexo feminino foi de 35 anos. A proporção média de linfócitos T CD4⁺ foi de 453 ±96.4 células/ mL. A carga viral média dos pacientes foi de 3681± 2800 cópias/mL.

Tabela 1. Principais características clínico-demográficas dos pacientes infectados pelo HIV-1 envolvidos no estudo.

Identificação	Sexo	Idade (Anos)	Contagem de Linfócitos T CD4 ⁺ (células/mL)	Carga Viral (número de cópias/mL)	Tratamento utilizado
BA01	M	62	490	1300	AZT/3TC/NFV
BA02	M	55	385	2600	AZT/3TC/EFV
BA03	F	27	500	1400	AZT/3TC/NVP
BA04	F	32	418	3300	NFV/ATV
*BA05	M	46	678	10000	Sem tratamento
BA06	M	51	500	1700	BIOVIR/EFV
BA07	F	40	383	5000	AZT/3TC/NVP
BA08	F	28	308	4300	AZT/3TC/NVP
BA09	M	37	431	5400	BIOVIR/KALETRA
BA10	F	45	398	8900	AZT/3TC/EFV
BA11	M	32	335	3600	AZT/3TC/ATV
BA12	M	41	441	1200	AZT/3TC/EFV
BA13	M	45	500	1400	AZT/3TC/EFV
BA14	F	37	500	1000	BIOVIR/NFV
BA15	M	38	383	1600	Sem tratamento
*BA16	F	40	609	6200	Sem tratamento
Média		41	453	3681	
± SD		± 9.5	± 96.4	±2800	

AZT: zidovudine; **BIOVIR**: zidovudina + lamivudina; **3TC**: lamivudina ; **NVP**: nevirapina; **ATV** : atazanavir; **NFV**: nelfinavir; **KALETRA**: lopinavir/ritonavir; **EFV**: efavirenz. **Parâmetros- * LTNP**: Lento progressor; **HAART**: Terapia antiretroviral. Controles negativos: **Idade média** 25 ± 3.4 anos; **Sexo**: 3F e 1 M

Três dos dezesseis pacientes não faziam uso de terapia antiretroviral. Além disso, dois desses pacientes foram classificados como LTNP. Vinte e cinco por cento dos

pacientes usavam o esquema terapêutico AZT/3TC/EFV, dezoito por cento AZT/3TC/NVP, dois pacientes com BIOVIR/NFV, um com esquema BIOVIR/KALETRA e outro com BIOVIR/EFV.

6.2 Magnitude da resposta da produção de IFN- γ dos pacientes infectados por HIV-1

A **Figura 1** representa a magnitude da resposta frente aos peptídeos do isolado HxB2 e das seqüências B^{BR}, C e F de cada paciente. A magnitude da resposta representa a soma de todos os spots positivos para cada individuo. A magnitude média de respostas dos pacientes do estudo foi de 3506 ± 2448 SFCx10⁶ PBMC, com mediana de 3348 SFCx10⁶ PBMC. A menor magnitude foi de 193 SFCx10⁶ PBMC, encontrada no paciente BA16 e a maior de 8259 SFCx10⁶ PBMC no paciente BA09. Todos os pacientes estudados apresentaram reatividade a pelo menos três *pools*. O maior número de peptídeos reconhecidos foi observado no paciente BA15 que respondeu a 22 *pools*, com magnitude de 3198 SFC x10⁶.

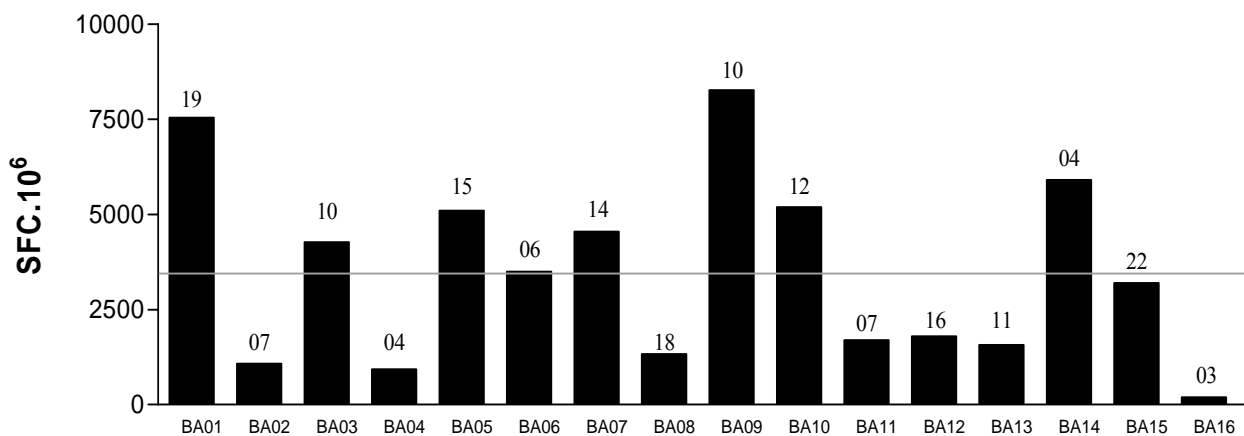


Figura 1 . Produção de IFN- γ dos pacientes infectados pelo HIV-1 em resposta aos pools de peptídeos do isolado HXB2 e dos subtipos B^{BR}, C e F de pacientes infectados pelo HIV-1 (acima de 30 SFCx10⁶). Os resultados representam a soma total dos spots positivos acima de 30 SFCx10⁶PBMC. Os números acima de cada barra representam o número total de pools com resposta positiva para cada paciente. A reta representa a magnitude média do estudo.

6.3 Frequência de pacientes infectados pelo HIV-1 respondedores aos *pools* do isolado HXB2 e dos subtipos B^{BR}, C e F

A frequência média de respondedores aos *pools* do isolado HXB2 foi de 41%. A maior frequência de respondedores foi para os *pools* de peptídeos NEF, 62% e 70% dos pacientes responderam aos *pools* de NEF 3 e NEF 2, respectivamente. Os *pools* dos peptídeos *p17* e *p24* tiveram uma média de respondedores de 42% (**Figura 2A**).

A frequência média de respondedores aos *pools* das seqüências B^{BR}, C e F foi de 49% (**figura 2B**). Os *pools* da proteína NEF apresentaram as maiores frequências entre os respondedores. Oitenta e sete por cento dos pacientes responderam aos *pools* da proteína NEF do subtipo F, 62% para o subtipo C e 69% para o subtipo B^{BR}. O pool correspondente a proteína GAG do subtipo F (GAG F1) foi reconhecido por 62% dos pacientes, enquanto o pool da proteína GAG do subtipo C (GAG C2) apresentou a menor frequência de respondedores, 19%.

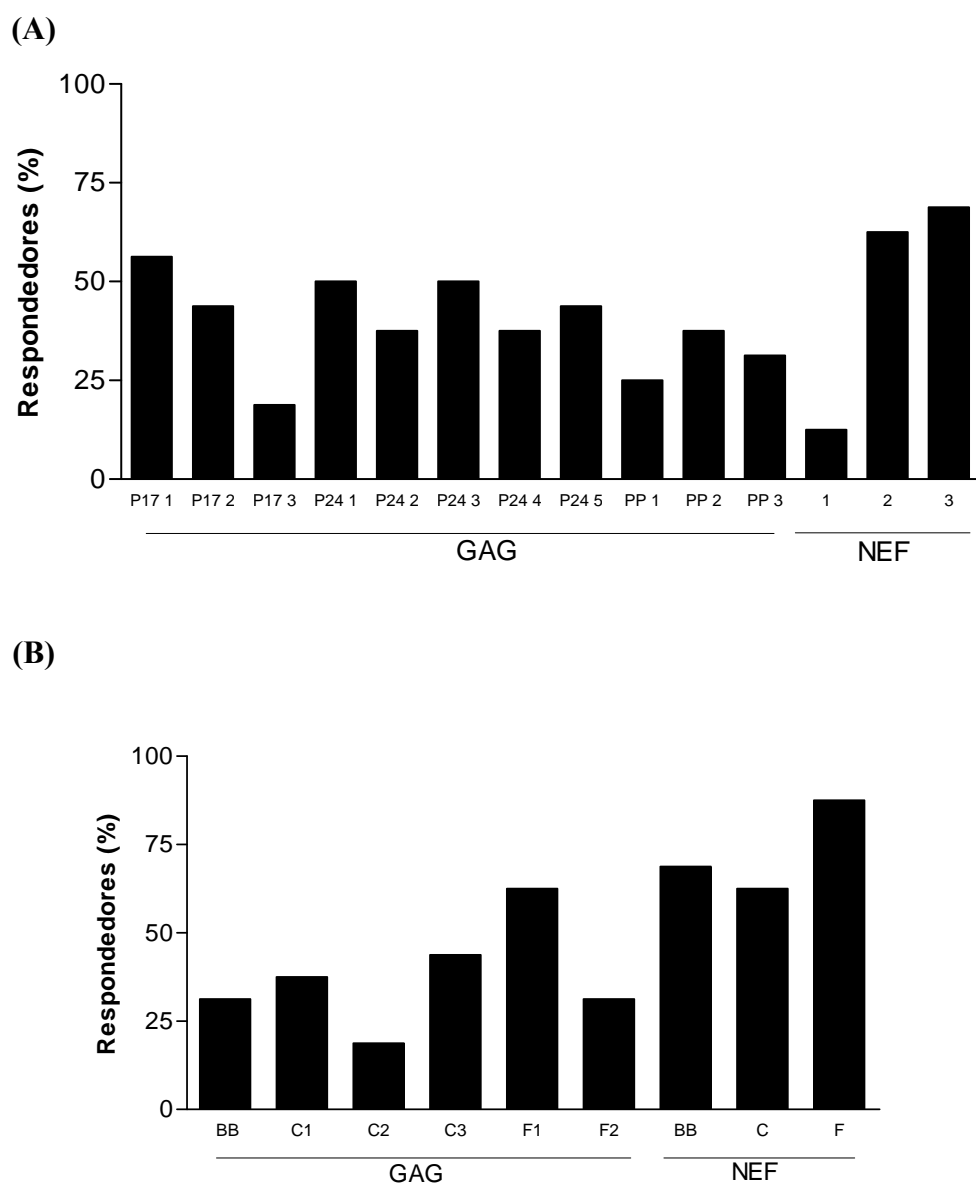


Figura 2. Frequências dos respondedores aos peptídeos do isolado HXB2 (A) e das seqüências brasileiras (B).

BB corresponde aos *pools* de peptídeos da proteína GAG e NEF do subtipo B^{BR}.

C1, C2, C3 correspondem aos *pools* de peptídeos da proteína GAG e NEF do subtipo C .

F1 e F2 correspondem aos *pools* de peptídeos das proteínas GAG e NEF do subtipo F

Foram considerados respondedores indivíduos com $\geq 30 \text{ SCF} \times 10^6$ PBMC frente ao. pool

6.4 Produção de IFN- γ entre os respondedores das seqüências B^{BR}, C e F e do Isolado HxB2

A produção de IFN- γ , avaliada através do ensaio ELISPOT, para cada um dos *pools* de peptídeos está representada na **Figura 3**. Individualmente, os *pools* de peptídeos que apresentaram as maiores médias de número de spots foram da proteína NEF do subtipo F com 474 SFCx10⁶PBMC, seguido do pool NEF 3 do subtipo HXB2 com 431 SFCx10⁶ PBMC e os *pools* de GAG p24.1 com 377 SFCx10⁶ PBMC e p24.4 com 177 SFCx10⁶ PBMC do isolado HXB2.

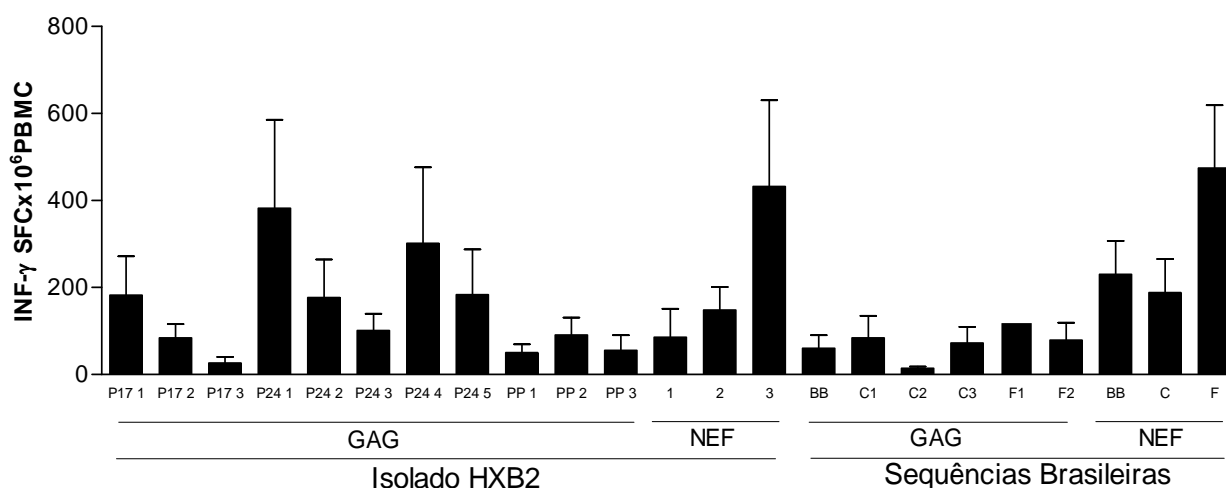


Figura 3. Representação da média de produção de IFN- γ entre os respondedores aos pools de peptídeos das seqüências do HIV-1 B^{BR}, C e F e do isolado HxB2. As barras representam a produção máxima de IFN- γ para cada pool de peptídeo.

BB representa o pool de peptídeos das proteínas do subtipo B^{BR}.

C1, C2 E C3 representam os pools da proteína do subtipo C.

F representam os pools das proteínas do subtipo F.

6.5 Correlação entre subtipos virais e resposta aos *pools* de peptídeos das seqüências B^{BR}, C e F e do isolado HxB2 do HIV-1

A maior parte das seqüências de vírus dos pacientes pertencia ao subtipo B (75%) **Tabela 2.** Quatro pacientes apresentaram seqüências correspondentes ao subtipo B tanto em GAG quanto em NEF e seis outros apresentavam vírus do subtipo B em uma das duas proteínas. Não foram encontradas seqüências virais dos subtipos B^{BR}. O subtipo F isoladamente foi encontrado apenas em um paciente, na proteína NEF. Cinco pacientes (31%) apresentaram seqüências recombinantes do subtipo BF e 1 (6%) paciente do subtipo DF. Em duas amostras (12%) não foi possível determinar o subtipo viral.

Em relação a gag, 63% dos pacientes eram do subtipo B, 19%CFR BF e 1 CFR DF. Para 2 pacientes não foi possível determinar o subtipo. Em relação a NEF 50% dos pacientes eram do subtipo B, 19% CFR BF e 1 paciente F. Para 25% dos pacientes não foi possível determinar o subtipo viral.

Tabela 2. Subtipos virais dos pacientes em relação às proteínas GAG e NEF do HIV-1

Paciente	GAG	NEF
BA01	ND	B
BA02	B	B
BA03	B	F
BA04	B	B
BA05	BF	ND
BA06	B	B
BA07	B	B
BA08	DF	ND
BA09	B	BF
BA10	ND	ND
BA11	B	B
BA12	BF	BF
BA13	B	BF
BA14	B	B
BA15	B	ND
BA16	BF	B

B-subtipo B; F- subtipo F
 BF e DF :formas recombinantes
 ND não determinado

6.6 Resposta aos *pools* de peptídeos de GAG das seqüências do HIV-1 dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HxB2 dos indivíduos com subtipos em relação a GAG

Avaliamos o número de *pools* reconhecidos e magnitude da resposta aos *pools* de GAG do isolado HXB2 e dos subtipos B^{BR}, C e F em pacientes com o subtipo viral determinado em GAG. A **Tabela 3** reúne os pacientes agrupados conforme o subtipo viral determinado em GAG. As colunas mostram o número de *pools* reconhecidos e a magnitude da resposta em relação aos *pools* de GAG do isolado HXB2, B^{BR}, C e F.

Os pacientes com subtipo B em GAG (**Tabela 3**) respondem mais frequentemente aos *pools* do isolado HXB2, com uma média de 4 ± 3 *pools* de peptídeos, e magnitude de 1385 ± 1386 SFCx10⁶ PBMC. A resposta aos *pools* correspondente aos subtipos B^{BR}, C e F foram menores. A maior resposta foi para os *pools* do subtipo C 1 ± 1 pool com magnitude de 149 ± 260 SFCx10⁶ PBMC.

Quando analisamos o perfil de resposta dos pacientes com formas recombinantes BF em GAG, observa-se que o número de *pools* reconhecidos e a magnitude da resposta foram equivalentes para os *pools* de GAG de HXB2 e do subtipo F.

Os pacientes cujos subtipos virais não foram determinados em GAG (ND) apresentaram igualmente um perfil e respostas semelhantes aos dos indivíduos isolados virais do tipo B, BF ou DF em GAG. O maior número de *pools* reconhecidos pertencia ao isolado HXB2. Os *pools* correspondentes às proteínas do subtipo C e F foram reconhecidos na mesma freqüência e intensidade por este grupo de indivíduos. Os *pools* de GAG do subtipo B^{BR} foram reconhecidos com menor freqüência e intensidade pelos pacientes com subtipo B, DF, BF ou não determinado.

Tabela 3. Número de *pools* de peptídeos reconhecidos e magnitude da resposta aos *pools* de GAG dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HxB2 dos pacientes com subtipo viral determinado em GAG

Subtipo GAG	Pacientes	GAG							
		HXB2		B ^{BR}		C		F	
		# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC
B	BA02	1	183	0	0	0	0	1	37
	BA03	3	717	1	33	1	37	0	0
	BA04	4	739	0	0	0	0	0	0
	BA06	2	2000	1	477	0	0	0	0
	BA07	4	2590	0	0	2	157	1	53
	BA09	4	4700	0	0	1	836	1	893
	BA11	3	1183	0	0	0	0	0	0
	BA13	6	347	0	0	2	137	1	33
	BA14	1	473	0	0	1	37	0	0
	BA15	10	913	1	60	3	290	2	180
	Média	4	1385	0	57	1	149	1	120
SD	3	1386	0	149	1	259	1	277	
DF	BA08	0	0	0	0	0	0	2	566
BF	BA05	6	1610	0	0	1	40	2	496
	BA12	6	670	1	130	3	290	2	160
	BA16	1	93	0	0	0	0	1	60
	Média	3	593	0	33	1	83	2	321
SD	3	740	1	65	1	140	1	248	
ND	BA01	14	4130	0	0	1	40	2	570
	BA10	5	3720	1	167	1	600	0	0
	Média	10	3925	1	84	1	320	1	285
SD	6	290	1	118	0	396	1	403	
Média geral	4	1510	0	124	1	245	1	280	
SD	4	1603	0	69	1	196	1	140	

B- subtipo viral B, BF- subtipo viral forma recombinante BF, F-subtipo viral F, ND- subtipo viral não determinado, HXB2- *pools* isolado HXB2, BBR- pool isolado BBR, C- pool isolado C, F- pool isolado F; SD- desvio padrão

6.7 Resposta aos *pools* de peptídeos de NEF das seqüências do HIV-1 dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HXB2 dos indivíduos com subtipo viral em relação a NEF

Em seguida, avaliamos o número de *pools* reconhecidos e magnitude da resposta aos *pools* de NEF do isolado HXB2 e dos subtipos B^{BR}, C e F em pacientes com o subtipo viral determinado em NEF. A **Tabela 4** reúne os pacientes agrupados conforme o subtipo viral determinado em NEF. As colunas mostram o número de *pools* reconhecidos e a magnitude da resposta em relação aos *pools* de NEF do isolado HXB2, B^{BR}, C e F.

As análises dos pacientes com subtipo viral B em NEF (**Tabela 4**) mostraram que as respostas foram mais freqüentes para os *pools* do isolado HXB2 com 1 ± 1 *pools* de peptídeos e magnitude de 766 ± 1167 SFCx10⁶ PBMC. Os pacientes responderam em média a um dos *pools* das seqüências dos subtipos B^{BR}, C e F. A maior magnitude foi registrada para o pool da correspondente a NEF do subtipo F com 575 ± 783 SFCx10⁶ PBMC.

Os pacientes com a forma recombinante BF responderam em média a 1 ± 1 *pools* da proteína NEF do isolado HXB2, com uma magnitude de 593 ± 740 SFCx10⁶ PBMC. Apenas um dos pacientes apresentou o subtipo F em NEF. Este respondeu a um pool de cada uma das seqüências virais avaliadas. A magnitude da resposta variou de 33 SFCx10⁶ PBMC para pool de NEF do subtipo B^{BR} a 321 SFCx10⁶ PBMC para o pool da proteína NEF do subtipo C.

Os pacientes com subtipo não determinados para NEF responderam em média a 2 *pools* de peptídeos de NEF do isolado HXB2, com uma magnitude média de 752 ± 621 SFCx10⁶ PBMC. As respostas para os demais *pools* dos subtipos B^{BR}, C e F foram equivalentes, os pacientes responderam em média a 1 ± 1 *pools* para cada seqüência avaliada, entretanto com diferenças na magnitude. A maior magnitude foi de 340 ± 497 SFCx10⁶ PBMC para os *pools* do isolado B^{BR} e a menor foi de 126 ± 63 SFCx10⁶ PBMC para o pool de peptídeos de NEF do subtipo C.

Em resumo, observa-se que a resposta média para os *pools* correspondentes a proteína NEF de diferentes subtipos foi semelhante, com 1 ± 1 pool. A maior magnitude foi de 683 ± 846 SFCx10⁶ PBMC para os *pools* de NEF do isolado HXB2, seguido da magnitude para o pool de NEF do subtipo F de 500 ± 583 SFCx10⁶ PBMC.

Tabela 4. Número de *pools* peptídeos reconhecidos e magnitude da resposta aos *pools* de NEF dos subtipos B^{BR}, C e F e do isolado HxB2 dos pacientes com subtipo viral em relação a NEF

Subtipo NEF	Pacientes	NEF							
		HXB2		B ^{BR}		C		F	
		# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC	# pools	SFCx10 ⁶ PBMC
B	BA01	3	1633	0	0	1	40	1	330
	BA02	2	233	1	127	1	157	1	343
	BA04	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA06	1	307	1	387	0	0	1	327
	BA07	1	115	1	200	1	670	1	500
	BA11	0	0	1	193	1	40	1	210
	BA14	1	3073	0	0	0	0	1	2317
	BA16	0	0	1	40	0	0	0	0
	Média	1	766	1	130	1	130	1	575
SD	1	1167	1	145	1	245	0	783	
BF	BA09	1	233	1	793	0	0	1	737
	BA12	1	195	1	165	1	135	1	55
	BA13	2	417	0	0	1	303	1	333
	Média	1	282	1	319	1	146	1	375
	SD	1	119	1	418	1	152	0	343
F	BA03	1	1033	1	237	1	1150	1	1027
	BA05	3	1157	1	1103	1	50	1	880
	BA08	1	317	0	0	1	203	1	240
	BA10	2	133	1	210	1	117	1	237
	BA15	2	1400	1	165	1	135	1	55
Média	2	752	1	370	1	126	1	353	
SD	1	621	1	497	0	63	0	362	
Média geral	1	683	1	239	1	200	1	506	
	1	846	0	315	0	315	0	583	

B- subtipo viral B, BF- subtipo viral forma recombinante BF, F-subtipo viral F, ND- subtipo viral não determinado, HXB2- *pools* isolado HXB2, B^{BR}- pool isolado B^{BR}, C- pool isolado C, F- pool isolado F; SD- desvio padrão

7.0 Discussão

Neste estudo, avaliou-se a resposta de pacientes infectados pelo HIV-1 contra proteínas virais GAG (p17 e p24) e NEF dos subtipos B^{BR}, C, F e do isolado B (HXB2) que continham seqüências imunogênicas com um nível elevado de disparidade de seqüências entre os subtipos das seqüências brasileiras e do isolado HXB2. Nossos resultados apontam que PBMC de pacientes com subtipo B, BF, DF e F reconhecem as seqüências das proteínas testadas do HXB2 com frequência e magnitudes da resposta comparáveis.

Estudos anteriores demonstraram que o conhecimento da variabilidade genética do vírus diminuem as chances de falha de uma candidata a vacina (NABEL, 2007; ROLLAND, NICKLE *et al.*, 2007). A diversidade genética apresentada pelo HIV-1 é uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina eficiente. As mudanças dos aminoácidos impedem que o sistema imune produza uma resposta eficaz, duradoura e que por final elimine o vírus (GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006).

A diversidade do HIV-1 no Brasil é demonstrada em vários trabalhos recém publicados. Nosso trabalho identificou numa pequena amostra de 16 pacientes uma grande variedade de subtipos virais do HIV-1, com pacientes apresentaram subtipo viral B, F, recombinantes B/F e D/F. Este resultado concorda com estudos sobre a epidemiologia do HIV-1 no Brasil que demonstram a grande diversidade de subtipos circulantes. No Brasil existe um predomínio de subtipo viral B (MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 2002), com prevalência do subtipo C no Sul do país (BRIGIDO, NUNES *et al.*, 2007; LOCATELI, STOCO *et al.*, 2007; MONTEIRO, FERRARO *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado a existência de casos isolados do subtipo D (MORGADO, GUIMARAES *et al.*, 1998) e a existência de formas recombinantes B/F, C/B circulantes no país (COUTO-FERNANDEZ, EYER-SILVA *et al.*, 2006; MONTEIRO, FERRARO *et al.*, 2007). Estes dados informam a grande diversidade de subtipos circulantes no país e possivelmente podem demonstrar indiretamente as possíveis diferenças das seqüências de aminoácidos dos vírus circulantes no país. Em outros países já foram descritos diferenças entre aminoácidos de subtipos virais diferentes do HIV-1. Como exemplo, pode-se citar das diferenças existentes entre os aminoácidos dos subtipos do HIV-1 das formas recombinantes do Sul da África que

apresentam 25-35% de divergência entre dois subtipos, além de apresentarem uma divergência superior a 20% entre qualquer um dos subtipos (GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006). Sabe-se que a diversidade genética encontrada no HIV-1 é um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina (GIRARD, OSMANOV *et al.*, 2006).

A análise da magnitude da resposta dos pacientes demonstrou que esta foi maior para os *pools* do isolado HXB2. Uma explicação para este fato, foi que 75% dos pacientes apresentaram o subtipo viral B do HIV-1. Por outro lado, os indivíduos que apresentaram subtipo viral recombinante, ou não determinado, também apresentaram uma maior magnitude de respostas para os *pools* de peptídeos do isolado HXB2. Uma outra explicação é o fato de que os *pools* da proteína HXB2 apresentavam um maior número de seqüências peptídicas em comparação aos outros *pools* de proteínas utilizadas. Por exemplo, o pool da proteína GAG do isolado HXB2 foi formada por 11 *pools* de peptídeos, cada pool de peptídeo foi formado por 10 seqüências de peptídeos com 15 aminoácidos (X15X). Assim, o pool GAG do isolado HXB2 possuía 110 seqüências de peptídeos. Comparado a proteína GAG do subtipo C (C1, C2 e C3), que possuíam ao todo, uma seqüência de 40 peptídeos de 15 aminoácidos (X15X), distribuídos em 3 *pools*, o pool do isolado HXB2 tinha cerca 3 vezes mais seqüências do que encontrado no outro pool. Desta forma, as chances de existir uma maior reatividade para o pool HXB2 foi maior do que a de qualquer outro pool utilizado no estudo. Também, não foi possível determinar o epitopo imunodominante em nenhum dos *pools* estudos.

Existe uma necessidade para a identificação de epitopos e elucidação da resposta de células T CD4+ anti-HIV, tendo em vista que o reconhecimento de epitopos do HIV-1 pela célula T CD4+ pode ser uma parte essencial de uma candidata a vacina. Em nosso estudo foi utilizado epitopos de células T CD4+ das proteínas GAG e NEF devido a sua conhecida imunogenicidade para o sistema imune (LAZARO, THEODOROU *et al.*, 2005). As respostas de células T CD4+ são importantes para a indução e manutenção da respostas citotóxicas T CD8+ eficazes (KALAMS and WALKER, 1998). As respostas T CD4+ anti-HIV estão claramente associadas a proteção (HEENEY, 2002). Além disso, respostas proliferativas potentes de células T CD4+ foram encontradas em pacientes que eram capazes de controlar a viremia na ausência de terapia Antiretroviral (ROSENBERG, BILLINGSLEY *et al.*, 1997). De fato, os linfócitos T CD8+ podem secretar menos INF- γ e ser menos citolíticos devido ao fato de uma indução inadequada das células T CD4+

(SHANKAR, RUSSO *et al.*, 2000). Aliado a isto, sabe-se que respostas de células T CD4+ anti HIV-1 simultaneamente positivas pra INF- γ e interleucina- 2 (IL-2) ou CD28+ e IL2 estão associadas a não progressão da doença (BOAZ, WATERS *et al.*, 2002).

Outro ponto importante para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1 é a avaliação das possíveis divergências genéticas entre os subtipos e a possibilidade de ocorrer superinfecção nestes indivíduos. Alguns casos de superinfecção pelo HIV-1 já foram relatados, onde indivíduos infectados por formas recombinantes CRF A/E foram superinfectados por vírus brasileiros B (JOST, BERNARD *et al.*, 2002) ou uma superinfecção pelo HIV-1 de subtipo B com 12% de divergência genética a partir do vírus original infectante. O primeiro caso, já existia uma resposta imune baixa a pelo menos um dos epitopos GAG antes da superinfecção, sem reação cruzada com a segunda seqüência viral. Enquanto que no segundo caso, ocorreu perda do controle viral apesar de existir uma resposta de linfócitos T CD8+ contra o vírus primário que reagiu cruzadamente com a maioria das seqüências do vírus superinfectante (ALTFELD, ALLEN *et al.*, 2002). Variantes naturais de isolados com mutações pontuais em epitopos deixaram de ser reconhecidos por linfócitos T CD4+ (HARCOURT, GARRARD *et al.*, 1998) e por linfócitos T CD8+ (JOHNSON, TROCHA *et al.*, 1992)

Embora algumas abordagens experimentais já foram utilizadas, tenham-se mostrado imunogênicas em ensaios clínicos, a ampla maioria não mostrou proteção em ensaios de vacinação profilática, ou controle da viremia no caso de vacinas terapêuticas. Ensaios de fase I/II com a vacina terapêutica VACCITERR ANRS 094, desenvolvida na França, mostraram que os grupos que receberam o subtipo B- ALVAC-HIV-1 Vcp 1433 (LAI *env, gag, prot* (RT,nef), conseguiram controlar a viremia por um período mais longo que o grupo controle. Isto, indicou a Vcp-HIV-1 como vacina candidata promissora, para um ensaio mais amplo. Um estudo mantido pela MERCK foi cancelado. Este estudo de fase III que fazia parte da HIV vaccine Trials network (HTVN) e do National Intitute of Health (NIH) foi cancelado pelo fato de que os indivíduos que receberam a vacina mostravam um risco maior de contrair o HIV do que aqueles que receberam o placebo (COHEN, 2007).

Os *pools* de peptídeos utilizados apresentaram reatividade entre os pacientes infectados pelo HIV-1. Por outro lado, este estudo não nos permitiu definir epitopos

imunodominantes e sua correlação com a progressão da doença, viremia e proporção de CD4+. Acreditamos que a identificação de epitopos de células T CD4+ seja um fator importante para o desenvolvimento de vacina terapêutica contra os mecanismos de ação do HIV-1.

8.0 Conclusões

- A frequência média de respondedores aos *pools* das proteínas do isolado HXB2 do HIV-1 foi de 41% e dos subtipos BBR, C e F do HIV-1 foi de 49%;
- As maiores frequências de respondedores para os *pools* das proteínas do isolado HXB2 do HIV-1 foram para os *pools* NEF (2 e 3) e para os *pools* referentes às proteínas do subtipos brasileiros BBR, C e F do HIV-1 foram para os *pools* NEF (BB, C e F).
- Os pacientes infectados pelo HIV-1, independente do subtipo viral, apresentaram uma maior magnitude da resposta para os *pools* de peptídeos GAG e NEF do isolado HXB2 ;

9.0 Perspectivas

- Tipificação do HLA dos pacientes de estudo;
- Definição de células T com reatividade específica contra o HIV-1;
- Abertura dos *pools* de peptídeos para identificação e quantificação de epitopos reconhecidos;
- Análise da reatividade cruzada entre as seqüências de epitopos dos subtipos B isolado HXB2, B^{BR}, C e F.

10.0 Referências Bibliográficas

- ALAEUS, A. **Significance of HIV-1 genetic subtypes**. Scand J Infect Dis, v.32, n.5, p.455-63. 2000.
- ALLEN, T. M. and M. ALTFELD. **HIV-1 superinfection**. J Allergy Clin Immunol, v.112, n.5, Nov, p.829-35; quiz 836. 2003.
- ALTFELD, M., T. M. ALLEN, *et al.* **HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus**. Nature, v.420, n.6914, Nov 28, p.434-9. 2002.
- AUTRAN, B., F. HADIDA, *et al.* **Evolution and plasticity of CTL responses against HIV**. Curr Opin Immunol, v.8, n.4, Aug, p.546-53. 1996.
- BARRE-SINOUSSE, F. **HIV as the cause of AIDS**. Lancet, v.348, n.9019, Jul 6, p.31-5. 1996.
- BELLO, G., W. A. EYER-SILVA, *et al.* **Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil**. Infect Genet Evol, v.7, n.2, Mar, p.263-70. 2007.
- BLANKSON, J., D. PERSAUD, *et al.* **Latent reservoirs for HIV-1**. Curr Opin Infect Dis, v.12, n.1, Feb, p.5-11. 1999.
- BOAZ, M. J., A. WATERS, *et al.* **Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection**. J Immunol, v.169, n.11, Dec 1, p.6376-85. 2002.
- BORROW, P., H. LEWICKI, *et al.* **Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection**. J Virol, v.68, n.9, Sep, p.6103-10. 1994.
- BRIGIDO, L. F., C. C. NUNES, *et al.* **HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil**. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.12, Dec, p.1579-86. 2007.
- CARRINGTON, M., G. W. NELSON, *et al.* **HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage**. Science, v.283, n.5408, Mar 12, p.1748-52. 1999.
- CASSEB, J., S. KOMNINAKIS, *et al.* **HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)?** Int J Infect Dis, v.6, n.3, Sep, p.164-9. 2002.
- CHAN, D. C. and P. S. KIM. **HIV entry and its inhibition**. Cell, v.93, n.5, May 29, p.681-4. 1998.
- CLERICI, M. and G. M. SHEARER. **Correlates of protection in HIV infection and the progression of HIV infection to AIDS**. Immunol Lett, v.51, n.1-2, Jun, p.69-73. 1996.

COFFIN, J. M. **HIV pathogenesis. Lines drawn in epitope wars.** Nature, v.375, n.6532, Jun 15, p.534-5. 1995a.

_____. **HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy.** Science, v.267, n.5197, Jan 27, p.483-9. 1995b.

COHEN, D. E. and B. D. WALKER. **Human immunodeficiency virus pathogenesis and prospects for immune control in patients with established infection.** Clin Infect Dis, v.32, n.12, Jun 15, p.1756-68. 2001.

COHEN, J. **AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm?** Science, v.318, n.5853, Nov 16, p.1048-9. 2007.

COHEN, M. **Natural history of HIV infection in women.** Obstet Gynecol Clin North Am, v.24, n.4, Dec, p.743-58. 1997.

COHEN, O. J., S. PAOLUCCI, *et al.* **CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta32.** J Virol, v.72, n.7, Jul, p.6215-7. 1998.

COUTO-FERNANDEZ, J. C., W. A. EYER-SILVA, *et al.* **Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil.** AIDS Res Hum Retroviruses, v.22, n.2, Feb, p.207-11. 2006.

DE GROOT, A. S., E. A. BISHOP, *et al.* **Engineering immunogenic consensus T helper epitopes for a cross-clade HIV vaccine.** Methods, v.34, n.4, Dec, p.476-87. 2004.

DOURADO, I., C. A. MILROY, *et al.* **HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil.** Cad Saude Publica, v.23, n.1, Jan, p.25-32. 2007.

EMINI, E. A. and W. C. KOFF. **AIDS/HIV. Developing an AIDS vaccine: need, uncertainty, hope.** Science, v.304, n.5679, Jun 25, p.1913-4. 2004.

EVANS, D. T. and R. C. DESROSIERS. **Immune evasion strategies of the primate lentiviruses.** Immunol Rev, v.183, Oct, p.141-58. 2001.

FACKLER, O. T., A. ALCOVER, *et al.* **Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis?** Nat Rev Immunol, v.7, n.4, Apr, p.310-7. 2007.

FAUCI, A. S. **Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy.** Science, v.262, n.5136, Nov 12, p.1011-8. 1993.

_____. **25 years of HIV/AIDS science: reaching the poor with research advances.** Cell, v.131, n.3, Nov 2, p.429-32. 2007a.

_____. **Pathogenesis of HIV disease: opportunities for new prevention interventions.** Clin Infect Dis, v.45 Suppl 4, Dec 15, p.S206-12. 2007b.

_____. **25 years of HIV**. Nature, v.453, n.7193, May 15, p.289-90. 2008.

FAUCI, A. S., G. PANTALEO, *et al.* **Immunopathogenic mechanisms of HIV infection**. Ann Intern Med, v.124, n.7, Apr 1, p.654-63. 1996.

FERNANDEZ, M. H., S. J. FIDLER, *et al.* **CD4+ T-cell recognition of diverse clade B HIV-1 isolates**. Aids, v.11, n.3, Mar, p.281-8. 1997.

FOX, C. H., K. TENNER-RACZ, *et al.* **Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA**. J Infect Dis, v.164, n.6, Dec, p.1051-7. 1991.

FRAHM, N., S. ADAMS, *et al.* **HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load**. J Virol, v.79, n.16, Aug, p.10218-25. 2005.

GALVAO-CASTRO, B., J. C. COUTO-FERNANDEZ, *et al.* **A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.91, n.3, May-Jun, p.335-8. 1996.

GAO, F., L. YUE, *et al.* **Genetic variation of HIV type 1 in four World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: generation of functional envelope (glycoprotein 160) clones representative of sequence subtypes A, B, C, and E. WHO Network for HIV Isolation and Characterization**. AIDS Res Hum Retroviruses, v.10, n.11, Nov, p.1359-68. 1994.

GASCHEN, B., J. TAYLOR, *et al.* **Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection**. Science, v.296, n.5577, Jun 28, p.2354-60. 2002.

GIRARD, M. P., S. K. OSMANOV, *et al.* **A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV)**. Vaccine, v.24, n.19, May 8, p.4062-81. 2006.

GOEPFERT, P. A. **Making sense of the HIV immune response**. Top HIV Med, v.11, n.1, Jan-Feb, p.4-8. 2003.

HARCOURT, G. C., S. GARRARD, *et al.* **HIV-1 variation diminishes CD4 T lymphocyte recognition**. J Exp Med, v.188, n.10, Nov 16, p.1785-93. 1998.

HEENEY, J. L. **The critical role of CD4(+) T-cell help in immunity to HIV**. Vaccine, v.20, n.15, May 6, p.1961-3. 2002.

HENDEL, H., S. CAILLAT-ZUCMAN, *et al.* **New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS**. J Immunol, v.162, n.11, Jun 1, p.6942-6. 1999.

JANSEN, C. A., D. VAN BAARLE, *et al.* **HIV-specific CD4+ T cells and viremia: who's in control?** Trends Immunol, v.27, n.3, Mar, p.119-24. 2006.

JOHNSON, R. P., A. TROCHA, *et al.* **Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation.** J Exp Med, v.175, n.4, Apr 1, p.961-71. 1992.

JOHNSTON, M. I. and A. S. FAUCI. **An HIV vaccine--evolving concepts.** N Engl J Med, v.356, n.20, May 17, p.2073-81. 2007.

JOST, S., M. C. BERNARD, *et al.* **A patient with HIV-1 superinfection.** N Engl J Med, v.347, n.10, Sep 5, p.731-6. 2002.

KALAMS, S. A. and B. D. WALKER. **The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses.** J Exp Med, v.188, n.12, Dec 21, p.2199-204. 1998.

KOUP, R. A., J. T. SAFRIT, *et al.* **Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.** J Virol, v.68, n.7, Jul, p.4650-5. 1994.

LAZARO, E., I. THEODOROU, *et al.* **Sequences of clustered epitopes in Gag and Nef potentially presented by predominant class I human leukocyte antigen (HLA) alleles A and B expressed by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients in Vietnam.** AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.6, Jun, p.586-91. 2005.

LEVY, J. **The CD8 cell antiviral factor: an interview with immunologist Jay Levy, MD. Interview by Mark Mascolini.** Beta, Jun, p.18-24. 1995.

LOCATELI, D., P. H. STOCO, *et al.* **Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil.** J Med Virol, v.79, n.10, Oct, p.1455-63. 2007.

MCCUTCHAN, F. E. **Understanding the genetic diversity of HIV-1.** Aids, v.14 Suppl 3, p.S31-44. 2000.

MIGUELES, S. A. and M. CONNORS. **The Role of CD4(+) and CD8(+) T Cells in Controlling HIV Infection.** Curr Infect Dis Rep, v.4, n.5, Oct, p.461-467. 2002.

MONTEIRO, J. P., G. A. FERRARO, *et al.* **Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil.** AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.1, Jan, p.135-43. 2007.

MORGADO, M. G., M. L. GUIMARAES, *et al.* **HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.2, Mar, p.143-50. 2002.

_____. **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 Retrovirol, v.18, n.5, Aug 15, p.488-94. 1998.

MORGADO, M. G., E. C. SABINO, *et al.* **V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F.** AIDS Res Hum Retroviruses, v.10, n.5, May, p.569-76. 1994.

MUNIER, M. L. and A. D. KELLEHER. **Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection.** Immunol Cell Biol, v.85, n.1, Jan, p.6-15. 2007.

NABEL, G. J. **Mapping the future of HIV vaccines.** Nat Rev Microbiol, v.5, n.7, Jul, p.482-4. 2007.

NOSSAL, G. J. **Host immunobiology and vaccine development.** Lancet, v.350, n.9087, Nov 1, p.1316-9. 1997.

O'BRIEN, S. J. and J. P. MOORE. **The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS.** Immunol Rev, v.177, Oct, p.99-111. 2000.

O'CONNOR, D. H. and D. I. WATKINS. **Houdini's box: towards an understanding of AIDS virus escape from the cytotoxic T-lymphocyte response.** Immunogenetics, v.50, n.3-4, Nov, p.237-41. 1999.

PANTALEO, G. and A. S. FAUCI. **New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection.** Annu Rev Immunol, v.13, p.487-512. 1995.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, *et al.* **HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.** Nature, v.362, n.6418, Mar 25, p.355-8. 1993.

_____. **New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** N Engl J Med, v.328, n.5, Feb 4, p.327-35. 1993.

PETERS, B. S. **The basis for HIV immunotherapeutic vaccines.** Vaccine, v.20, n.5-6, Dec 12, p.688-705. 2001.

POTTS, K. E., M. L. KALISH, *et al.* **Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group.** Aids, v.7, n.9, Sep, p.1191-7. 1993.

RICHMAN, D. D. **Antiretroviral activity of emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor.** Antivir Ther, v.6, n.2, Jun, p.83-8. 2001.

RICHMAN, D. D., T. WRIN, *et al.* **Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.7, Apr 1, p.4144-9. 2003.

ROLLAND, M., D. C. NICKLE, *et al.* **HIV-1 group M conserved elements vaccine.** PLoS Pathog, v.3, n.11, Nov, p.e157. 2007.

ROSENBERG, E. S., J. M. BILLINGSLEY, *et al.* **Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.** *Science*, v.278, n.5342, Nov 21, p.1447-50. 1997.

SAEZ-CIRION, A., C. LACABARATZ, *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*, v.104, n.16, Apr 17, p.6776-81. 2007.

SAEZ-CIRION, A., G. PANCINO, *et al.* **HIV controllers: how do they tame the virus?** *Trends Immunol*, v.28, n.12, Dec, p.532-40. 2007.

SANTORO-LOPES, G., L. H. HARRISON, *et al.* **HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br?** *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.16, n.10, Jul 1, p.953-8. 2000.

SHANKAR, P., M. RUSSO, *et al.* **Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection.** *Blood*, v.96, n.9, Nov 1, p.3094-101. 2000.

SILICIANO, R. F. **Reservoirs for HIV-1.** *Curr Infect Dis Rep*, v.1, n.3, Aug, p.298-304. 1999.

SIMON, V., D. D. HO, *et al.* **HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment.** *Lancet*, v.368, n.9534, Aug 5, p.489-504. 2006.

SINGH, M. **No vaccine against HIV yet--are we not perfectly equipped?** *Virol J*, v.3, p.60. 2006.

STEVENSON, M. **HIV-1 pathogenesis.** *Nat Med*, v.9, n.7, Jul, p.853-60. 2003.

TATT, I. D., K. L. BARLOW, *et al.* **The public health significance of HIV-1 subtypes.** *Aids*, v.15 Suppl 5, p.S59-71. 2001.

TONKS, A. **Quest for the AIDS vaccine.** *Bmj*, v.334, n.7608, Jun 30, p.1346-8. 2007.

UNAIDS. **AIDS the epidemic update.** Regional Support Team for Eastern and Southern Africa. 2007.

VAN DER BURG, S. H., K. M. KWAPPENBERG, *et al.* **Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules.** *J Immunol*, v.162, n.1, Jan 1, p.152-60. 1999.

VERAS, N. M., V. S. VERAS, *et al.* **HIV type 1 genetic variability in central Brazil.** *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.23, n.12, Dec, p.1481-90. 2007.

WANG, B., R. B. LAL, *et al.* **Molecular and biological interactions between two HIV-1 strains from a coinfecting patient reveal the first evidence in favor of viral synergism.** *Virology*, v.274, n.1, Aug 15, p.105-19. 2000.

WEI, X., S. K. GHOSH, *et al.* **Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.** Nature, v.373, n.6510, Jan 12, p.117-22. 1995.

WELSH, R. M. and R. S. FUJINAMI. **Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design.** Nat Rev Microbiol, v.5, n.7, Jul, p.555-63. 2007.

WOLINSKY, S. M., B. T. KORBER, *et al.* **Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection.** Science, v.272, n.5261, Apr 26, p.537-42. 1996.

Anexos

Anexo A. Sequências de peptídeos e composição dos *pools* das proteínas GAG e NEF dos subtipos B isolado HXB2

P17-1	P17-2	P17-3	P24-1	P24-2	P24-3	P24-4	P24-5
MGARASVLSGGELDR	AVNPGLETSEGCRQ	HQRIEIKDTKEALDK	PIVQNIQQQMVHQAI	EGATPQDLNMLNTV	GPIAPGQMREPRGSD	WIILGLNKIVRMYS	ASQEVKNWMTETLLV
ASVLSGGELDRWEKI	GLETSEGCRQILGQ	EIKDTKEALDKIEEE	NIQQQMVHQAISPR	PQDLNMLNTVGGHQ	PGQMREPRGSDIAGT	GLNKIVRMYSPTSIL	VKNWMTETLLVQAN
SGGELDRWEKIRLRP	TSEGRQILGQLQPS	TKEALDKIEEQNKS	GQMVHQAISPRTLN	NTMLNTVGGHQAA	REPRGSDIAGTTSTL	IVRMYSPTSILDIRQ	MTETLLVQANPDCK
LDRWEKIRLRPGGKK	CRQILGQLQPSLQ	LDKIEEQNKS	HQAISPRTLN	NTVGGHQAAQMLKE	GSDIAGTTSTLQEQI	YSPTSILDIRQGPKE	LLVQANPDCKTILK
EKIRLRPGGKKKYKL	LGQLQPSLQ	EEEQNKS	PRTLNAWVKVVEKA	GHQAAMQMLKETINE	AGTTSTLQEQIGWMT	SILDIRQGPKEPFRD	NANPDCKTILKALGP
LRPGGKKKYKLKHIV	LQPSLQ	NKSKKKAQAAADTG	NAWVKVVEEKAFSPE	AMQMLKETINEEAAE	STLQEQIGWMTNPP	IRQGPKEPFRDYVDR	DCKTILKALGPAATL
GKKKYKLKHIVWASR	LQTGSEELRSLYNTVA	KKAQAAADTG	KVVEEKAFSPEVIM	LKETINEEAAEWDRV	EQIGWMTNPPPIV	PKEPFRDYVDRFYKT	ILKALGPAATLEEMM
YKLKHIVWASRELER	EELRSLYNTVATLYC	AAADTG	EKA	INEEAAEWDRVHPVH	WMTNPPPIVGEIYK	FRDYVDRFYKTLRAE	LGPAATLEEMMTACQ
HIVWASRELERFAVN	SLYNTVATLYCVHQR	DTGHSSQVSNYPIV	SPEVIMFMSALSEGA	AAEWDRVHPVHAGPI	NPPPIVGEIYKRWII	VDRFYKTLRAEQASQ	ATLEEMMTACQGVGG
ASRELERFAVNPGLL	TVATLYCVHQRIEIK	SSQVSNYPIVQNIQ	IPMFSALSEGATPQD	DRVHPVHAGPIAPGQ	PVGEIYKRWIILGLN	YKTLRAEQASQEVKN	EMMTACQGVGGPGHK
LERFAVNPGLLETSE	LYCVHQRIEIKDTKE	SNYPIVQNIQQQMV	SALSEGATPQDLNTM	PVHAGPIAPGQMREP	IYKRWIILGLNKIVR	RAEQASQEVKNWMTTE	ACQGVGGPGHKARVL

PP-1	PP-2	PP-3	NEF-1	NEF-2	NEF-3
VGGPGHKARVLAEAM	KEGHTARNCRAPRKK	YKGRPGNFLQSRPEP	PFKNLKTGMEWRFD	LLRWGLTMMVGFVPT	LEGLIHSQRRQDILD
GHKARVLAEAMSQVT	TARNCRAPRKKGCWK	PGNFLQSRPEPTAPP	LKTGMEWRFD	GLTMMVGFVPTQVP	IHSQRRQDILD
RVLAEAMSQVTNTAT	RAPRKKGCWKCGKE	LQSRPEPTAPPFLQS	MEWRFD	MVGFVPTQVPLRPM	RRQDILD
EAMSQVTNTATIMMQ	RKKGCWKCGKEGHQM	PEPTAPPFLQSRPEP	FDSRLAFHHVARELH	PVTPQVPLRPMTYKA	ILD
SQVTNTATIMMQRGNF	WKCGKEGHQMKDCT	APPFLQSRPEPTAPP	LAFHHVARELHPEYF	PQVPLRPMTYKAAVDL	WIYHTQGYFPDWQNY
TATIMMQRGNFRNQR	GKEGHQMKDCTERQA	LQSRPEPTAPPEESF	HVARELHPEYFKNCK	RPMTYKAAVDLSHFL	TQGYFPDWQNYTPGP
MMQRGNFRNQRKMKV	HQMKDCTERQANFLG	PEPTAPPEESFRSGV		YKAAVDLSHFLKEKG	FPDWQNYTPGPGVRY
GNFRNQRKMKVCFNC	DCTERQANFLGKIWP	APPEESFRSGVETTT		VDLSHFLKEGGLEG	WQNYTPGPGVRYPLTF
NQRKMKVCFNCGKEG	RQANFLGKIWPSYKG	ESFRSGVETTPPQK		HFLKEGGLEGLIHS	PGPGVRYPLTFGWCY
MVKCFNCGKEGHTAR	FLGKIWPSYKGRPGN	SGVETTPPQKQEP		EKGGLIHSQRRQ	VRYPLTFGWCYKLV
FNCGKEGHTARNCRA	IWPSYKGRPGN	TTTTPPQKQEPIDKEL			
		PQKQEPIDKELYPLT			
		EPIDKELYPLTSLRS			
		KELYPLTSLRSLFGN			
		PLTSLRSLFGNDPSSQ			

Anexo B. Sequências de peptídeos e composição dos *pools* das proteínas GAG e NEF dos subtipos brasileiros B, C e F do HIV-1

GAG C1	GAG C2	GAG C3	GAG BB	GAG F1	GAG F2	NEF BB	NEF C	NEF F
MGARASILRGGKLDL	GLLETSEGCKQIIRQ	QKTQQAEAADKGVKS	LQPSLQTGSEELKSLY	EKIRLRPGGKKKYRM	TKEALEKLEEEQNKS	PVRPQVPLRPMTYKGA	KRQDILDLDLVYNTQG	MEWKFD SRLAFHHMA
ASILRGGKLDLWERI	TSEGCKQIIRQLQPA	AEAADKGVKSQNYNYP	LQTGSEELKSLYNTVA	LRPGGKKKYRMKHLI	LEKLEEEQNKSQQKT	PQVPLRPMTYKGALDL	ILDLWVYNTQGYFPD	FDSRLAFHHMARELH
RGGKLDLWERIIRLKP	CKQIIRQLQPALQTG	EAADKGVKSQNYPIV	EELKSLYNTVATLYC	GKKKYRMKHLI WASR	EEEQNKSQQKTQQA	RPMTYKGALDLSHFL	WVYNTQGYFPDWQNY	LAFHHMARELHPEYY
LDTWERIRLKPGGKK	IRQLQPALQTGT KEL	NLQGQMVHQPI SART	STLQEQIGWMTSNPP	YRMKHLI WASRELER	NKSQKTQQAADKG	YKGALDLSHFLKEKG	FPDWQNYTPGPGVRF	HMARELHPEYYKDCK
ERIRLKPGGKKKYMM	LQPALQTGT KELISLY	GQMVHQPI SARTLNAW	EQIGWMTSNPPIPVG	LQPSLQTGSEELKSLY	QKTQQAADKGVSSQ		WQNYTPGPGVRFPLTF	PQVPLRPMTYKGALDL
LKPGGKKKYMMKHLV	LQTGT KELISLYNTVA	HQPISARTLNAWVKVV	WMTSNPPIPVGEIYK	LQTGSEELKSLYNTVA	AAADKGVSSQVSN		PGPGVRFPLTFGWCF	RPMTYKGALDLSHFL
GKKKYMMKHLVWASR	KELISLYNTVATLYC	ARTLNAWVKVVEEKA	YKTLRAEQASQDVKN	EELKSLYNTVAVLYF	DKGVSSQVSNYPIV		VRFPLTFGWCFKLV	YKGALDLSHFLKEKG
YMMKHLVWASRELER	EVRDTKEALDKIKEE	DCKTILRALGPGASL	RAEQASQDVKNWMT	SLYNTVAVLYFVHQR	VDRFFKTLRAEQATQ			LDLSHFLKEKGGLEG
HLVWASRELERFALD	TKEALDKIKEEQNKS	ILRALGPGASLEEMM	ASQDVKNWMTETLLV	TVAVLYFVHQRVEVK	FKTLRAEQATQEVKG			FPDWQNYTPGPGTRY
ASRELERFALDPGLL	LDKIKEEQNKSQQKT	LGPGASLEEMMTACQ		LYFVHQRVEVKDTKE	RAEQATQEVKGMWTD			WQNYTPGPGTRYPLTF
LERFALDPGLETSE	KEEQNKSQQKTQQA	ASLEEMMTACQVGG		HQRVEVKDTKEALEK	ATQEVKGMWTDLLV			PGPGTRYPLTFGWCF
ALDPGLETSEGCKQ	NKSQKTQQA	EAADK		EVKDTKEALEKLEEE	VKGWMTD TLLVQAN			

