

BOSCO CHRISTIANO MACIEL DA SILVA

Estudo do reconhecimento de epitopos das proteínas Gag e Nef do HIV-1 por linfócitos T em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 não progressores por longo tempo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

“Resplandecente é a Sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam descobrem-na facilmente. Os que a procuram encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam. Quem, para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho, porque a encontrará sentada à sua porta.”

Sab. 6, 12-14

*“A verdade brotará da terra, e a justiça olhará do alto do céu. Enfim, o **Senhor** nos dará seus benefícios, e nossa terra produzirá seu fruto. A justiça caminhará diante dele, e a felicidade lhe seguirá os passos.”*

Salmo 85, 12-14

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve. E a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

“O amor assume em si mesmo a vida do amado.

Quanto maior é o amor, maiores são os sofrimentos da alma.

*Quanto mais completo é o amor, mais completo o conhecimento de **Deus**.*

Quanto mais ardente é o amor, mais ardente a oração.

Quanto mais perfeito é o amor, mais santa a vida.”

Staretz Silvano

*A **DEUS**, meu grande Amor!*

Muito obrigado pelo dom da vida, pela família, pelos amigos que possuo e por me dar, a cada momento: fé, amor, paz, força interior, inteligência e serenidade para viver, enfrentar os obstáculos do dia-a-dia e procurar fazer bom uso do livre arbítrio, respeitando a individualidade de cada um.

“Sabemos que pessoas felizes e sorridentes contagiam outras que andam desanimadas e tristes. Que o humor de algumas pessoas possa resgatar a dignidade de tantos irmãos e irmãs machucados pelo preconceito que destrói e nos faz chorar de verdade. Sorrir e amar podem ser sinônimos desta surpreendente terapia de quem é de fato, amigo. Prevenir pelo humor sem jamais deixar de amar, eis o desafio.”

Sem Aids, com Amor!

D. Paulo Evaristo Arns, Cardeal

*Ao meu pai, **Olívio Luíz da Silva Filho (In Memoriam)**, e a todos os portadores do HIV/Aids. Em especial, aos voluntários de inúmeras pesquisas e que já faleceram, vítimas solicitadas pela Ciência para o benefício da humanidade que, com seus “olhares” e “desabaços”, falavam-nos de seu amor pela vida e de sua vontade de viver, muitas vezes, depositando em nós toda sua confiança e esperança.*

“O seu coração está onde está o seu tesouro.”

Paulo Coelho

*À minha amada mãe, **Prof^a. Maria Helena Ribeiro Maciel (UFPB)**. Exemplo de Mãe, de Mestre, de Mulher, de Amor e de Dedicação: à Vida, à Família e à Educação. Foi graças aos seus ensinamentos, e pautando-me em seus princípios, em sua ética e em seus exemplos, que tive força e coragem para lutar e chegar até esta etapa.*

*“Um **amigo** fiel é uma poderosa proteção: quem o achou encontrou um tesouro. Nada é comparável a um amigo fiel; o ouro e a prata não merecem ser postos em paralelo com a sinceridade de sua fé. Um amigo fiel é um remédio de vida e imortalidade; quem teme ao **Senhor** achará esse amigo.”*

Eclo 6, 14-16

*A **Marcos Roberto Guilherme**, por seu companheirismo. Por me mostrar a cada dia que podemos contar com verdadeiros amigos, não só nos momentos bons e alegres, mas sobretudo nos momentos de adversidades e dissabores, de tristeza, de desânimo, de dificuldades.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu orientador e amigo, **Dewton de Moraes Vasconcelos** (LIM 56 – Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências – FMUSP), e aos amigos **Luis Fernando de Macedo Brígido (Lula)** e **Rosangela Rodrigues (Ro)** (Laboratório de Genotipagem do HIV – Instituto Adolfo Lutz), que me acolheram com muito carinho em seus respectivos laboratórios durante a preparação e execução desta pesquisa. Pelos exemplos de vida, de dedicação, de idealismo, de profissionalismo, e por me fazerem ver que um “outro” meio de fazer pesquisa científica, e com qualidade, é possível. Pela amizade conquistada; pela oportunidade de trabalhar em conjunto, com liberdade e de aprender ainda mais; pelos estímulos recebidos para a realização deste trabalho; pelo crescimento profissional; pela confiança em mim depositada; pela paciência nos momentos difíceis, eu vos serei eternamente grato por todos os momentos dedicados à minha pessoa...*

Vós sois “seres humanos raros”!!!

AGRADECIMENTOS

*Há 16 anos (13 de março de 1992), meu pai perdia sua luta contra o HIV em Nova Iorque, EUA, e pela **Providência Divina** partia para outra “dimensão”, deixando-me uma lacuna e com uma dor difícil de explicar... Naquela época, não havia tratamento como hoje, e ter um diagnóstico positivo para o HIV era como ter uma “sentença de morte pronunciada antecipadamente” e prever que “ela estaria próxima”. Se ainda hoje não é fácil para uma pessoa descobrir-se HIV soropositiva, haja vista que a Aids continua sendo uma moléstia incurável, imagine-se há 20 anos...*

Nessa época, eu estava cursando Farmácia na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e via de perto o quanto a Aids trazia consigo uma “carga” de preconceitos, além de todo sofrimento causado aos doentes, seus familiares e amigos. Havia, inclusive, falta de profissionais que se dispunham a trabalhar em serviços de pacientes com HIV/Aids, por medo, desconhecimento das vias de transmissão, irresponsabilidade e até mesmo por preconceito. Então, pelo que vivenciei e sofri, conhecendo o sofrimento e as dores de meu pai, e de tantos irmãos em Cristo, resolvi não me curvar diante deste mal, que havia “minado” meu pai, e continuava (continua) a ceifar milhares de vítimas em todo o mundo, sobretudo nos países mais pobres. Fui à luta e ingressei na área da Pesquisa Científica, sempre objetivando trabalhar em prol de uma melhor compreensão da infecção pelo HIV e em busca de uma imunoterapia / vacina contra o HIV.

Assim, iniciei minha carreira científica como estagiário do Laboratório de Micologia (Estudo dos Fungos), dirigido pela Prof^ª. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (UFPB), a quem tenho grande estima e admiração, pois a mesma

abriu-me as “portas” para um mundo tão encantador, como é o da Pesquisa. Edel, meu muito obrigado!

*Após o término do Curso de Farmácia, há 12 anos, vim para esta encantadora megalópole, São Paulo. Na bagagem, eu trazia muitos sonhos, planos e uma vontade imensa de crescer, vencer e trabalhar com “algo” na área de HIV/Aids. Aqui, sozinho, e com o auxílio de poucos amigos que fui conhecendo, iniciei uma nova e longa caminhada, a qual também teve suas linhas tortuosas e os seus desníveis, próprios da frágil natureza humana. Mas, com a “força” e a “luz” do **Espírito Santo**, eu fui crescendo, ultrapassando barreiras, vencendo as dificuldades e conquistando o meu “espaço”.*

Passei por vários laboratórios e sob a orientação de diversos pesquisadores de alto nível, com os quais eu pude aprender bastante na “bancada”, trocar idéias, experiências, e também fazer novas amizades. Assim, eu quero citar e desde já agradecer aos ilustríssimos “Mestres” por todo aprendizado obtido e amizade: Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, Prof^{el}. Dra. Olga Fischman Gompertz e Dra. Marly Forjaz (EPM-UNIFESP), Prof^{el}. Dra. Claudete Rodrigues Paula (ICB-USP), Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido e Dra. Rosangela Rodrigues (Instituto Adolfo Lutz-SP), e o Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos (LIM 56-FMUSP), meu atual orientador.

Finalmente, como sempre busquei, tive a oportunidade de ingressar no Mestrado pelo Departamento de Microbiologia do ICB-USP onde desenvolvi um projeto sobre as dermatofitoses em pacientes com HIV/Aids, sob a preciosa orientação do Prof. Dr. Valderéz Gambale, a quem sou grato, por sua valiosa contribuição e amizade. O mestrado possibilitou-me uma rica troca de experiência e vivência no Centro de Referência e Tratamento de DST/Aids em São

Paulo, sob a supervisão da amiga Dra. Márcia Cristina Naomi Yoshioka, bem como nas Disciplinas de Moléstias Infecciosas e Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP, sob a supervisão do Dr. Luis Guilherme Martins Castro (Guiga), além de ter me aberto as portas para a prazerosa experiência de “aprender no exterior”, pois foi durante o mestrado que pude estudar e desenvolver parte de minha dissertação em Angers, França, sob a co-orientação do Dr. Jean-Philippe BOUCHARA.

Também, nessa época, em Paris, tive a oportunidade de conhecer a Prof^{ta}. Dra. Brigitte AUTRAN, pesquisadora de renome internacional na área de HIV (Imunologia), que se tornaria posteriormente minha supervisora nesta etapa do Doutorado. Foi através da Dra. AUTRAN que veio o desafio, a oportunidade de conhecer melhor e aprender ainda mais sobre o HIV/Aids, de estudar e morar em Paris, e a difícil decisão de trocar a Micologia pela Imuno-Virologia do HIV. Foi assim que cheguei até o presente momento.

*Hoje, a concretização deste trabalho tem para mim um valor inestimável. Não somente por todas as experiências (boas e ruins) vividas e partilhadas, mas por todos os conhecimentos obtidos, pela luta e, sobretudo, pelas amizades conquistadas. **Eu venci mais esta etapa! Obrigado, meu Deus e meu Pai!** Obrigado também a todos aqueles que me acolheram e me apoiaram, tornando esta uma vitória “**nossa.**”*

Muito obrigado a todos os indivíduos franceses, HIV soropositivos, voluntários desta pesquisa. Sem a vossa colaboração e participação, este trabalho não teria sido realizado.

À Prof^{ta}. Dra. Brigitte AUTRAN, Pesquisadora do Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do “Grupo Hospitalar Pitié-Salpêtrière;

Assistência Pública – Hôpitaux de Paris”, França, onde realizei a parte experimental deste projeto, que me acolheu e orientou, e aos amigos pesquisadores, técnicos, funcionários, alunos e estagiários do laboratório, que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na execução dos testes de ELISPOT. O aprendizado obtido nesse período foi muito importante e enriquecedor.

Ao Prof. Dr. Patrice DEBRE, Chefe do Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do “Grupo Hospitalar Pitié-Salpêtrière; Assistência Pública – Hôpitaux de Paris”, França, pela acolhida em seu laboratório.

Aos queridos amigos (como irmãos mais velhos) Emile FOUGERAY e Dominique LE GUILLERMIC (Paris, França) que gentilmente me receberam e acolheram em sua residência, em todas as vezes que estive em Paris, desde o ano de 2000, independentemente do tempo que passei lá. Pela amizade, conselhos, auxílio precioso nas questões burocráticas e na correção do francês, e também pelo convívio agradável, que tornou minhas estadas naquele país ainda mais prazerosas. Amigos raros e difíceis de encontrar em um país estrangeiro.

“A Madame le Professeur Brigitte AUTRAN et à tous les membres (médecins, pharmaciens, techniciens, étudiants, stagiaires et secrétaires) du Laboratoire d’Immunologie Cellulaire et Tissulaire de l’Hôpital Pitié-Salpêtrière de Paris, France, qui ont pris part de près ou de loin à l’élaboration de ce travail. Mon très grand Merci pour l’accueil dans votre équipe qui m’a reçu avec amitié, gentillesse, disponibilité pour l’enseignement et l’aide précieuse apportés aux expériences de ELISPOT sur du matériel biologique si précieux.

Brigitte, merci de m’avoir fait profiter de votre enthousiasme, de vos compétences en immunologie et nombreux conseils sur les patients ALT et l’immunologie du VIH. Que vous puissiez trouver ici le témoignage de mon affection,

de ma reconnaissance, de ma profonde gratitude et respect pour l'attention que vous m'avez portée tout au long des stages suivis avec vous.

Je remercie également le Professeur Patrice DEBRE de m'avoir accueilli dans son service. Je tiens à lui exprimer ma respectueuse gratitude.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire d'immunologie cellulaire et tissulaire, et tout particulièrement Aurélie SCHNURIGER qui a contribué à cette étude, mais aussi le Docteur Guislaine CARCELAIN, le Docteur Assia SAMRI, Sophie HILPERT, Anne BOUGARIE, Hilma, Karine, Krys, Angélique, Isabelle, Muriel, Evelyne.

Aux très chers et bien-aimés amis (comme des grands frères) Emile FOUGERAY et Dominique LE GUILLERMIC, qui très gentiment m'ont reçu et accueilli dans leur résidence, toutes les fois que je suis allé à Paris depuis l'an 2000, indépendamment du temps que je suis resté là-bas. Par leur amitié, conseils, aide précieuse sur les questions bureaucratiques et pour les corrections du français, et aussi la convivialité très agréable, qui a rendu mes séjours dans votre pays encore plus plaisant. Pardon pour mes fautes. Vous êtes des amis très rares et difficile à trouver dans un pays étranger.”

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, Chefe do LIM 56 desta Faculdade, que gentilmente me acolheu e permitiu que esta pesquisa, embora efetuada na França, pudesse ser concluída em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Evandro A. Rivitti, Diretor da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas desta Universidade pela oportunidade de aprendizado.

À Prof^{ta}. Dra. Mirian Nacagami Sotto, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Dermatologia desta Faculdade, pela oportunidade de aprendizado.

Aos Drs. Gil Benard, Jorge Casseb, Maria Notomi Sato e demais pesquisadores do LIM 56, pelo apoio, troca de conhecimentos, críticas, sugestões e amizade.

Aos amigos do LIM 56, Alexandre de Almeida, Anna Cristina Collanieri, Maurício Domingues Ferreira, Viviane Olivastro Bressani e demais alunos, estagiários e funcionários, pela amizade, esclarecimento de dúvidas e auxílio nos momentos de dificuldades.

Ao André Seiji Goto, pela realização dos desenhos.

Ao Isac de Castro, pela valiosa colaboração com os testes estatísticos.

Ao amigo Vítor França Galvão, pela sua prestativa e preciosa revisão e correção da língua portuguesa.

À bibliotecária Marinalva de Souza Aragão e demais bibliotecárias da Biblioteca desta Faculdade, pelas correções das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À farmacêutica e amiga Márcia Tazima Imaniche, Chefe do Serviço de Farmácia do Hospital Municipal Dr. Cármino Caricchio (Hospital Municipal do Tatuapé), onde trabalho, pela amizade, apoio e flexibilidade (modificando folgas e/ou plantões), visando atender minhas necessidades no Doutorado, sempre que precisei me ausentar do Serviço.

Aos nobres amigos farmacêuticos, Cristina Tieko Takayasu, Josefa Solange Vieira de Albuquerque, Marco Antônio Salvador, Roberta Fernandes

Couto e Severiano Tolentino de Freitas Neto, com os quais eu trabalho (Hospital Municipal do Tatuapé) e divido parte do meu dia, pela amizade, troca de experiências, paciência e disponibilidade sempre que precisei substituir plantões com algum de vós, para que pudesse dar continuidade ao projeto de Doutorado.

Aos queridos amigos e “parceiros” de trabalho do Hospital Municipal do Tatuapé: Alex Sandro Silva, Amanda Chaves, Ana Paula de Almeida, Ana Ruth Oliveira, Anderson Alves (Dinho), Arlete Silva, Camilla Santos, Édison Campanha, Egline Amorim, Elisângela de Araújo, Fernanda Ferreira, Iara de Lima, Jacira Cabral, João Borges da Costa, Jolenos da Costa, Jorge da Silva, Laurina da Silva, Magnólia Almeida, Marcia Ferreira, Maria Carolina O. e Silva (Carol), Meire Reis, Milena Alayeto, Nair Gomes, Oscar Olivieri, Osvaldo Júnior, Pamella Piera, Pryscilla Andrade, Renata Ribeiro, Rita de Cássia Souza, Rosaria Batista, Sidimar da Silva, Sue Ellen Magalhães, Tadayoshi Ito, Tais Brito e Wanderley de Moraes, pela amizade, agradável convívio e consideração.

Enfim, a todos os amigos mais próximos, que me deram suporte emocional, sendo muitas vezes como “irmãos”, aos quais tenho admiração, carinho e respeito, pelo que são e representam para mim.

Aos queridos amigos Alfredo Paula, Alice Bonifácio Lopes, Claudete Rodrigues Paula, Irma Nelly Gutierrez Rivera, Luzinete Alves Silva e Maria Walderez Szeszs, que me proporcionaram agradáveis companhias e momentos inesquecíveis nos inúmeros passeios e “encontros” que realizamos nesta cidade encantadora. Por todos os momentos compartilhados juntos, pelo carinho, amizade, confiança e estímulos demonstrados por vós a minha pessoa.

Ao querido amigo Cláudio Toledo Soares Pereira, a quem eu tenho muito carinho, consideração e respeito, que durante a realização deste

trabalho esteve sempre presente, incentivando-me, compartilhando bons momentos e também os mais árduos, ouvindo os meus “desabaços”, respeitando-me, criticando-me nos momentos necessários e ajudando-me nos momentos de dissabores.

Aos queridos amigos Alberto Gezler Franco, Cláudio Risk, Eduardo Augusto de Oliveira, Eliana Danza, Gilvane Casimiro da Silva (Gil), José Carlos Fonseca, Juliano Moraes, Lucília Nunes da Silva, Márcia de Oliveira, Maurício Canjos, Renato Alves, Ricardo Marreiros, Tácito Bispo Molicca (In Memoriam), pela confiança, paciência, amizade e incentivos.

Ao amigo João Leandro de Paula Ferreira do Laboratório de Genotipagem do HIV – Instituto Adolfo Lutz, pela amizade, esclarecimento de dúvidas e ensinamentos em Virologia.

À amiga Rosemeire Aparecida Silva (Rose), com quem partilhei muitos momentos agradáveis durante o Doutorado. Por sua amizade, profissionalismo, autenticidade, maneira de ser e de enfrentar a vida.

À amiga Vanessa Gontijo, médica infectologista (Hospital Municipal do Tatuapé) pela amizade, troca de experiências e esclarecimento de dúvidas.

À amiga Ilse de C. Salles Vasconcelos, pela pessoa que você é, e pela confiança, apoio, torcida, sugestões e agradável companhia nos inúmeros “almoços” que tivemos, juntamente com o Dewton.

Aos queridos e inesquecíveis amigos de Pós-Graduação (desde a época do Mestrado): André Gasparetto, Eriques G. da Silva, Eveline Pípulo Milan (UFRN), Flávio Cesar Viani, Flávia Emi Matsumoto, Francisco de Assis Baroni (UFRJ), Jairo Ivo dos Santos (UFSC), Lília M. Dutra, Luciana da Silva Ruiz, Marcos Ereno Auler, Maria Tereza Barreto (UFRN), Mauro Cintra Giudice, Regina

Barbieri, Rinaldo Ferreira Gandra e Satiko Uehara. Pela amizade, agradável convívio e troca de experiências durante os anos que estivemos mais próximos.

Aos meus irmãos Ticiano Maciel Costa, Vítor Maciel Costa e Mariama Maciel Costa, às minhas cunhadas Rafaela Albuquerque Pinto Brandão Costa, Mayra Danielly de Oliveira Rodrigues e ao meu sobrinho Gabriel de Oliveira Maciel Costa (um mês de vida!), que ainda nem conheço. Pelo que vocês representam para mim e por tornarem o meu dia-a-dia mais bonito e alegre.

Ao meu padrasto, Sósthene Marinho Costa, por ser um excelente companheiro para minha mãe, além de grande pai e educador, e por todo suporte e auxílio nos momentos em que precisei.

À querida tia Maria Josenilda Gonçalves da Silva, médica epidemiologista, pela coragem de vencer a resistência que tinha em trabalhar com HIV/Aids, pelo sofrimento causado com a perda do querido irmão Olívio, a quem assistiu seu sofrimento de perto, e por dar hoje sua contribuição profissional à luta contra essa moléstia. Admiro sua coragem e agradeço pelo apoio e incentivos.

À minha família, que esteve sempre presente me incentivando, fornecendo a estrutura necessária, com amor e dedicação, ajudando-me nas horas mais difíceis, acreditando, torcendo e orando muito por mim. Em especial, gostaria de agradecer a minha avó materna, Josefa Ribeiro Maciel (Teté) e tia Maria das Neves Silva (tia Neves), que me ensinaram a ler e escrever, antes mesmo de minha ida à escola, com a “cartilha do ABC”, em minha infância.

À tia Ruth Lima Ribeiro Silva e à prima Maria Cristina Ribeiro Portella Nunes por todo amor, carinho, confiança, conselhos, orações e ajuda que me prestaram. Em especial, pelo auxílio financeiro providencial nas minhas viagens à França, onde realizei esta pesquisa, e nos momentos mais difíceis. As senhoras são

muito importantes e certamente contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Eu lhes serei eternamente grato por todo empenho demonstrado visando o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao amigo Petrônio Portella Nunes Filho, pela amizade, incentivos, apoio, e pelo auxílio precioso na tradução e sugestões do inglês.

A todos os outros familiares, os quais não foram mencionados, mas que certamente sempre acreditaram, torceram e torcem muito por mim. Saibam que amo muito a minha família e a cada um em particular, de um modo especial.

Ao Revmo. Dom Abade Mathias Tolentino Braga, OSB, ao Revdo. Dom Bernardo Schuler de Carvalho, OSB, meu amigo e “padrinho espiritual” e toda a comunidade do Mosteiro de São Bento de São Paulo, que sempre me acolheram bem e onde encontro um ambiente de amor e paz, propício para um encontro mais “íntimo” com Deus; pela amizade, consideração e orações.

À Revma. Madre Martha Lúcia Ribeiro Teixeira, OSB, Ir. Miriam Teixeira de Almeida, OSB, minha amiga e “madrinha espiritual”, e demais monjas do Mosteiro Nossa Senhora da Paz (Itapecerica da Serra, SP), pela amizade conquistada, apoio, estima e orações fervorosas para minha pessoa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental para a condução desta pesquisa.

Ao “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)” – Instituto Nacional de Saúde e de Pesquisa Médica (França), pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

A todos os brasileiros que, “pagando os impostos” com o suor do seu trabalho, nos ajudaram a receber da FAPESP uma “bolsa de estudos” para realizarmos esta pesquisa.

*Enfim, a todas as pessoas que, embora não mencionadas, estiveram ao meu lado em algum momento, colaborando de uma forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Confiaram em minha pessoa, em meu trabalho e em meu potencial e não me criticaram nos momentos difíceis, mas que, sobretudo me incentivaram e ajudaram. Certamente, vocês contribuíram para a minha formação como **“Doutor”**.*

A parte experimental desta pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do Hospital Pitié-Salpêtrière (Unidade INSERM U543) de Paris, França, sob a supervisão da Prof^a. Dra. Brigitte AUTRAN. Teve como apoio financeiro a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, processo 2003/14028-2, e o Instituto Nacional de Saúde e de Pesquisa Médica (INSERM), França.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	A infecção pelo HIV	6
3.1.1	Epidemiologia	6
3.1.2	O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	12
3.1.3	Variabilidade viral	20
3.1.4	Ciclo viral	23
3.1.5	Fisiopatologia da infecção	27
3.1.6	Diagnóstico biológico	31
3.1.7	Tratamento	35
3.2	A resposta imunológica anti-HIV	43
3.2.1	Imunidade anti-viral	43
3.2.2	Especificidades da resposta imunológica anti-HIV	56

3.2.2.1	Resposta humoral anti-HIV	58
3.2.2.2	Resposta celular anti-HIV	60
3.3	Indivíduos não progressores por longo tempo (LTNP)	66
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	76
4.1	Delineamento experimental	76
4.2	Pacientes	77
4.2.1	Características da população estudada	78
4.3	Processamento das amostras, imunofenotipagem e carga viral	81
4.4	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMSP)	82
4.5	Separação de CMSP	83
4.6	Criopreservação de CMSP	84
4.7	Descongelamento de CMSP	85
4.8	Peptídeos sintéticos do HIV-1	87
4.9	Ensaio ELISPOT Interferon-Gama (IFN- γ)	91
4.9.1	Sensibilização das placas	92
4.9.2	Bloqueio das placas	93
4.9.3	Depósito e estimulação das suspensões celulares com estímulos antigênicos	94
4.9.4	Revelação e leitura	95
4.10	Estudo longitudinal	97
4.11	Identificação de epitopos das proteínas Gag e Nef do HIV-1	98

4.12	Análise estatística	98
5	RESULTADOS	101
5.1	Condições de validação dos ensaios ELISPOT	101
5.1.1	Disponibilidade das amostras e viabilidade celular	101
5.1.2	Controles da reação	102
5.1.3	Limite de positividade (<i>Cut-off</i>)	105
5.2	Resultados descritivos	105
5.2.1	Ensaio com ELISPOT IFN- γ em CMSP total (Ano 1)	105
5.2.2	Intensidade das respostas	110
5.2.3	Resultado dos ensaios ELISPOT IFN- γ em CMSP total: estudo longitudinal	113
5.2.4	Reconhecimento específico dos epitopos	121
5.3	Correlação das respostas com os parâmetros avaliados	123
5.4	Identificação de epitopos de Gag e Nef do HIV-1	125
6	DISCUSSÃO	131
7	CONCLUSÕES	149
8	ANEXOS	150
9	REFERÊNCIAS	180

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
aa	Aminoácido
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Assintomáticos por longo tempo
APC	Célula apresentadora de antígeno
β	Beta
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BCR	Receptor de célula B
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus centígrados
CCR5	Co-receptor para HIV-1 (receptor de quimiocina)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Centros de prevenção e controle de doenças
CDR	Região determinante de complementaridade
Cm ²	Centímetro quadrado
CMSP	Célula mononuclear de sangue periférico
CO ₂	Gás carbônico
CXCR4	Co-receptor para HIV-1
CTL	Linfócito T citotóxico
δ	Delta
DC	Célula dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
<i>et al.</i>	E outros
Fas	<i>Fas</i>
Fas-L	<i>Ligante de Fas</i>

γ	Gama
g	Gramma
x g	Gravidade
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia anti-retroviral altamente ativa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
L	Litro
LTNP	Não progressor por longo tempo
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
N ₂	Nitrogênio molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
PN-DST	Programa Nacional de DST e Aids
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura)
RT	Transcriptase reversa
SBF	Soro bovino fetal
SFC	Célula formadora de spot
TCR	Receptor de célula T
TNF	Fator de necrose tumoral
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição mundial do HIV	7
Figura 2	– Estrutura do HIV-1 com suas principais proteínas	17
Figura 3	– Genoma do HIV-1	18
Figura 4	– Representação filogenética do HIV-1 e HIV-2	21
Figura 5	– Ciclo replicativo do HIV	24
Figura 6	– História natural da infecção pelo HIV	34
Figura 7	– Papel central do linfócito T CD4 ⁺ na resposta imunológica contra os diversos agentes patogênicos	45
Figura 8	– Moléculas que participam da interação entre o linfócito T CD4 ⁺ e a célula apresentadora de antígeno (APC)	46
Figura 9A	– Apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC – classe I	48
Figura 9B	– Apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC – classe II	48
Figura 10	– Regulação da resposta imunológica por citocinas	51
Figura 11	– Mecanismos de citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8 ⁺ efetores	53
Figura 12	– Delineamento experimental do projeto	76
Figura 13	– Representação esquemática dos peptídeos de Gag utilizados	89
Figura 14	– Etapas do ensaio ELISPOT IFN- γ	92
Figura 15	– Resultado de um teste ELISPOT IFN- γ do indivíduo 6002 (ano 2) com CMSP estimuladas pelos 18 <i>pools</i> de peptídeos do HIV-1	104

- Figura 16** – Frequência de indivíduos HIV-1+ LTNP com respostas positivas para cada *pool* de peptídeos do HIV-1, determinadas por ELISPOT IFN- γ (ano 1) 107
- Figura 17** – Frequência de indivíduos HIV-1+ LTNP com respostas positivas às proteínas do HIV-1, determinadas por ELISPOT IFN- γ (ano 1) 109
- Figura 18** – Intensidade de resposta imune celular para cada *pool* de peptídeos do HIV-1 em indivíduos HIV-1+ LTNP pela técnica de ELISPOT IFN- γ (ano 1) 111
- Figura 19** – Intensidade de resposta imune celular às proteínas do HIV-1 em indivíduos HIV-1+ LTNP pela técnica de ELISPOT IFN- γ (ano 1) 113
- Figura 20** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2002 no decorrer do tempo 116
- Figura 21** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4034 no decorrer do tempo 116
- Figura 22** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 8011 no decorrer do tempo 117
- Figura 23** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2014 no decorrer do tempo 117
- Figura 24** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 5002 no decorrer do tempo 118
- Figura 25** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 6002 no decorrer do tempo 118

- Figura 26** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4030 no decorrer do tempo 119
- Figura 27** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2009 no decorrer do tempo 119
- Figura 28** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4050 no decorrer do tempo 120
- Figura 29** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4054 no decorrer do tempo 120
- Figura 30** – Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 8021 no decorrer do tempo 121
- Figura 31** – Análise da dominância clonal 122
- Figura 32** – Exemplo de resposta a peptídeos individuais em teste de ELISPOT IFN- γ 126
- Figura 33** – Localização dos epitopos (classe I) identificados na seqüência da proteína Gag do HIV-1 (HXB2), nos complexos peptídeo-HLA: A2, A3, A26, B27, B44, B57 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características dos pacientes incluídos no estudo	80
Tabela 2	– <i>Pools</i> de peptídeos, seqüência dos aminoácidos reproduzidos pelos <i>pools</i> utilizados, número de peptídeos compondo cada <i>pool</i> e posição na proteína viral (HIV-1, HXB2)	90
Tabela 3	– Resultados do ensaio de ELISPOT IFN- γ em CMSP dos pacientes avaliados no estudo (ano 1)	108
Tabela 4	– Correlação entre os diversos parâmetros relacionados à evolução clínica dos indivíduos infectados pelo HIV-1	124
Tabela 5	– Reconhecimento de peptídeos individuais componentes dos <i>pools</i> de peptídeos de HIV-1 que estimularam respostas em 10 indivíduos HIV-1+ LTNP, pela técnica de ELISPOT IFN- γ , e suas respectivas seqüências	129
Tabela 6	– Epitopos do HIV-1 reconhecidos por 10 indivíduos HIV-1+ LTNP no ensaio de ELISPOT IFN- γ	130

RESUMO

DA SILVA BCM. *Estudo do reconhecimento de epitopos das proteínas Gag e Nef do HIV-1 por linfócitos T em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 não progressores por longo tempo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 203p.

Os linfócitos T têm um papel central no controle da infecção pelo HIV-1. As respostas mediadas por esses linfócitos contra epitopos do HIV-1 restritos a moléculas HLA de classe I podem estar associadas à proteção natural em indivíduos LTNP. Relatos sugerem que determinados alelos HLA apresentam-se mais representados entre os LTNP. Para avaliar esses aspectos na coorte francesa ALT, coletamos células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de 24 indivíduos LTNP e verificamos a frequência de respostas específicas para o HIV-1. Para isso, utilizamos *pools* de peptídeos sobrepostos de Gag e regiões imunodominantes da RT e Nef, e identificamos epitopos do HIV-1 restritos a moléculas HLA de classe I, associados ou não à proteção, através do ensaio de ELISPOT IFN- γ . Todos os indivíduos apresentaram respostas específicas aos *pools* testados, com uma mediana de 5 (2-12). Todas as proteínas do HIV-1 foram reconhecidas, sendo que Gag-p24 e Nef foram as mais frequentemente reconhecidas pelas CMSP dos indivíduos avaliados. A intensidade total de resposta de linfócitos T específicos aos *pools* de Gag, RT e Nef do HIV-1 em cada indivíduo variou de 160 a 12307 SFC/10⁶ CMSP (mediana: 2025). Observamos o reconhecimento de 22 epitopos já descritos na literatura, contidos nas proteínas Gag-p17, Gag-p24 e Nef do HIV-1, restritos a moléculas HLA de classe I, a maioria descrita como protetoras da progressão para a doença. Quatro novos epitopos ainda não descritos na literatura também foram observados. Concluímos que: respostas específicas mediadas por linfócitos T, eficazes e dirigidas contra um amplo painel de epitopos do HIV-1, estão presentes nos indivíduos LTNP; a presença de moléculas HLA de classe I associadas à proteção favorece o reconhecimento preferencial de epitopos do HIV-1 restritos por elas na maioria dos indivíduos LTNP; esses aspectos devem ser levados em conta na perspectiva do desenvolvimento de uma vacina candidata contra o HIV-1.

Descritores: 1.HIV 2.Síndrome de imunodeficiência adquirida 3.Sobreviventes de longo prazo ao HIV 4.Linfócito T 5.Epitopos de linfócito T 6.Peptídeos 7.Antígenos HLA

SUMMARY

DA SILVA BCM. *Study of the recognition of HIV-1 Gag and Nef epitopes by T lymphocytes in chronically infected HIV-1 Long-Term Non-Progressors* [Ph. D. thesis]. University of São Paulo Faculty of Medicine, SP (Brazil); 2008.

T lymphocytes (T-L) have a paramount role in the control of HIV-1 infection. The responses mediated by these cells against HLA class I epitopes may be associated to the natural protection in long-term non-progressors (LTNP). The literature suggests that some HLA alleles relate to the protection against the immune dysfunction. The aim of this research is to study the recognition of HIV-1 Gag, Nef and RT epitopes by T-L through an ELISPOT IFN- γ assay in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 24 LTNP selected from French ALT study group. We evaluated the frequency of anti-HIV-1 responses and identified HLA class I epitopes. All individuals presented specific responses to the pools of peptides tested with a median of 5 (2-12). Gag-p24 and Nef were the most frequently recognized proteins. The magnitude of the responses varied from 160 to 12307 SFC/10⁶ PBMC (median=2025). We observed the recognition of 22 epitopes already described in HIV-1 Gag-p17, Gag-p24 and Nef, restricted to HLA class I molecules reported as protective. We have also observed four new epitopes not already described in the literature. Our results suggest that: HIV-1 responses by T-L are present in LTNP; the presence of HLA class I molecules associated with protection in the majority of LTNP are related to the recognition of MHC restricted HIV-1 epitopes; these aspects must be taken into account in the development of a candidate vaccine against HIV-1.

Descriptors: 1.HIV 2.Acquired immunodeficiency syndrome 3.HIV long-term survivors 4.T lymphocytes 5.Epitopes T lymphocyte 6.Peptides 7.HLA antigens

1 INTRODUÇÃO

A pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome – Aids*) é uma das mais importantes das últimas décadas. Esta síndrome é decorrente da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*). Desde a identificação do HIV pela equipe do Dr. Luc Montagnier, no Instituto Pasteur de Paris, em 1983, numerosos trabalhos têm sido desenvolvidos no mundo inteiro visando a conhecer melhor a fisiopatologia da infecção por este vírus.

As principais células-alvo do vírus no organismo são os linfócitos T auxiliares, portadores do receptor CD4. O vírus causa um efeito citopático importante nessas células, que, associado à destruição das células infectadas pelas defesas do organismo, conduzem progressivamente a uma redução dos linfócitos T CD4⁺, indispensáveis à imunidade. Assim, agentes de baixa patogenicidade, conhecidos como *oportunistas*, podem se desenvolver sem controle e provocar infecções graves e, na maioria das vezes, fatais.

Obter uma vacina contra o HIV, que seja eficaz em todas as regiões do mundo, é uma prioridade global. As pesquisas sobre o HIV levaram ao surgimento de tratamentos com medicamentos anti-retrovirais eficazes, que conseguiram controlar a infecção e prolongar a sobrevivência das pessoas infectadas por vários anos. Entretanto, nenhuma vacina preventiva pôde ser elaborada até o presente momento, apesar dos vários ensaios com vacinas que têm sido testados, principalmente devido à grande variabilidade genética do vírus, principal obstáculo à obtenção de uma vacina comprovadamente eficaz para a prevenção da infecção ou da doença.

Embora várias vacinas experimentais tenham se mostrado imunogênicas em ensaios clínicos, a ampla maioria não mostrou proteção em ensaios de vacinação profilática, ou o controle da viremia, no caso das vacinas terapêuticas.

As respostas de linfócitos T contra o HIV possuem um papel fundamental no controle imune do vírus e nas estratégias vacinais, profiláticas ou terapêuticas. Levando em consideração que as principais vacinas experimentais atualmente em estudo se baseiam na indução de respostas de linfócitos T contra epítopos do HIV de subtipo B ocidental, é necessário que se definam os epítopos reconhecidos pelos linfócitos T de pacientes infectados pelo HIV.

A evolução da infecção pelo HIV é variável nos diferentes indivíduos. A passagem para a fase de Aids, ou seja, sintomática, pode iniciar após em média oito a 10 anos, a partir da infecção primária, segundo diversos estudos, com extremos entre dois e 12 anos. Essa evolução variável depende tanto de fatores virais como de fatores ligados ao hospedeiro, como certos determinantes genéticos ou um *status* imunológico particular. Um melhor conhecimento da resposta imunológica do HIV é, portanto, indispensável para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de vacinas eficazes.

Em uma minoria de pessoas infectadas pelo HIV, a evolução da doença é particularmente lenta: são os indivíduos não progressores por longo tempo (*Long Term Non Progressors* – LTNP; *Long Term Survivors* – LTS), também conhecidos como progressores lentos. Uma resposta imunológica eficaz dependente principalmente de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos parece caracterizar esses indivíduos.

Nesta pesquisa, realizamos um estudo sobre o *status* imunológico de indivíduos franceses LTNP incluídos na coorte francesa de indivíduos assintomáticos por longo tempo (*Asymptomatiques à Long Terme* – ALT), através da avaliação da reatividade imunológica desses indivíduos a epitopos virais do HIV-1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a reatividade de linfócitos T de indivíduos infectados com isolados do HIV-1, LTNP, a epitopos contidos em Gag, Nef e transcriptase reversa (RT) do HIV-1 (isolado HXB2).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudar a frequência de linfócitos T produtores de interferon gama (IFN- γ) de indivíduos infectados pelo HIV-1 (subtipo B), LTNP, contra *pools* de peptídeos sobrepostos correspondentes às proteínas Gag p24, Gag p17, Gag p2, p7, p1 e p6, Nef e RT, derivadas do isolado HIV-1, subtipo B, através do ensaio *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot* para IFN- γ (ELISPOT IFN- γ).

2.2.2 Estudar a frequência de linfócitos T produtores de interferon gama (IFN- γ) em um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 (subtipo B), LTNP, contra *pools* de peptídeos sobrepostos correspondentes às proteínas Gag p24, Gag p17, Gag p2, p7, p1 e p6, Nef e RT, derivadas do isolado HIV-1, subtipo B, ao longo do tempo (ano 1 – ano 6).

2.2.3 Identificar epitopos do HIV-1, reconhecidos pelos linfócitos T, que sejam apresentados por moléculas de HLA de classe I associadas ou não à proteção.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A infecção pelo HIV

3.1.1 Epidemiologia

O HIV é o agente etiológico da infecção emergente mais importante das últimas décadas e causador da Aids. Sabe-se que 33,2 milhões (30,6 – 36,1) de pessoas vivem com HIV no mundo inteiro (Figura 1), a maioria delas (dois terços) vivendo em países da África subsaariana, que tem 22,5 milhões (20,9 – 24,3) de casos, 68% do total de casos, e em países em desenvolvimento. O HIV infecta mais de 6.800 pessoas a cada dia, tendo infectado 2,5 milhões (1,8 – 4,1) de pessoas em 2007, enquanto que mais de 5.700 pessoas morrem por dia em decorrência da Aids, que já matou mais de 20 milhões de indivíduos, com uma prevalência variável dependendo do país observado, estando entre as principais causas de mortes em todo o mundo, e a primeira causa de mortes na África.

Apenas em 2007, 2,1 milhões (1,9 – 2,4) de pessoas faleceram, vítimas da doença (UNAIDS-WHO, 2007¹).

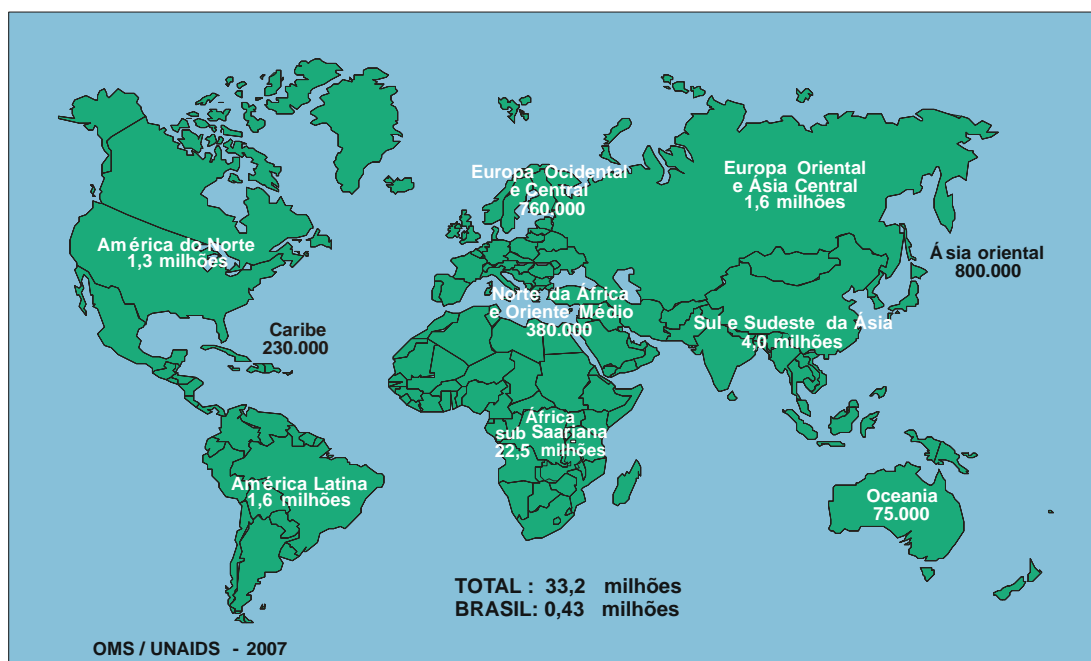


Figura 1. Distribuição mundial do HIV (UNAIDS/WHO – Dezembro 2007)

A Aids foi descrita pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos da América (EUA), e assumiu proporções alarmantes em curto período, causando um impacto enorme na epidemiologia das doenças infecciosas (Dowdle, 1983²; Gourevitch, 1996³; Veronesi, Focaccia e Lomar, 2000⁴; Fauci, 2003⁵).

A pandemia do HIV é extremamente complexa, composta por centenas de epidemias separadas nas comunidades em torno do globo terrestre e está se expandindo rapidamente, particularmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde vivem mais de 95% de todas as pessoas infectadas pelo HIV (Johnson, 2000⁶). Em muitos países, a expectativa de vida foi reduzida em 10 a 20 anos. Estima-se ainda que, nos próximos anos, 20 a 40 milhões de crianças tornar-se-ão órfãs em decorrência da Aids (UNAIDS/WHO, 2007¹).

O Brasil é um dos países mais afetados pelo HIV na América Latina. De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde sobre Aids e DST, o número de casos de Aids, notificados oficialmente até 30 de junho de 2007, foi de 474.273, acumulado desde 1980, assim distribuídos: 61% (289.074 casos) estão concentrados no Sudeste, 18,8% (89.250 casos) no Sul, 11,2% (53.089 casos) no Nordeste, 5,6% (26.757 casos) no Centro-Oeste e 3,4% (16.103 casos) na região Norte. O número de óbitos por Aids no Brasil entre 1980 e 2006 foi de 192.709, sendo 2,6% (4.968 óbitos) no Norte, 4,5% (8.738 óbitos) no Centro-Oeste, 9,5% (18.379 óbitos) no Nordeste, 15% (28.784 óbitos) no Sul e 68,4% (131.840 óbitos) na região Sudeste (Ministério da Saúde, 2007⁷).

O Estado de São Paulo possuía 181.641 casos de Aids, 38,3% do total de casos em todo o Brasil, notificados até 30 de junho de 2007. O município de São Paulo acumula o maior número de registros, com 64.703 casos, 14,9% do total de casos no país, notificados até dezembro de 2006 (Secretaria Municipal da Saúde, 2007⁸). Estima-se haver centenas de milhares de brasileiros infectados pelo HIV, aproximadamente 600.000 portadores, a maioria dos quais desconhecendo tal fato.

A evolução mundial da epidemia do HIV é marcada por várias tendências: pauperização, interiorização, expansão entre heterossexuais, feminilização e aumento da incidência em grupos mais jovens.

O número de mulheres adultas (15 anos ou mais) infectadas pelo HIV está elevado como nunca esteve. Estima-se que em 2007, 15,4 milhões (13,9 – 16,6) de mulheres viviam com HIV/Aids, constituindo um aumento de 1,6 milhões a mais do que o total de casos relatados em 2001 [13,8 milhões (12,7 – 15,2)]. Na maioria dos países, as novas infecções pelo HIV são largamente concentradas entre os jovens (15-24 anos). Entre os adultos com 15 anos ou mais, os jovens representaram 40% do total das novas infecções ocorridas em 2007 (UNAIDS/WHO, 2007¹).

No Brasil, do total de casos de Aids notificados até 30 de junho de 2007, 66,3% foram do sexo masculino (314.294 casos) e 33,7% do feminino (159.793 casos) e, em 2006, a taxa de incidência foi de 21,1 por 100.000 habitantes entre homens e 14,0 por 100.000 habitantes entre mulheres. O coeficiente de incidência dos casos de Aids vem caindo, progressivamente, em ambos os sexos. Esta queda, no entanto, é mais acentuada no sexo masculino, onde passou de 15,1 casos em homens para uma mulher em 1986, para 1,5 casos em homens para uma mulher em 2005 (Ministério da Saúde, 2007⁷).

No município de São Paulo, a razão de sexo que, em 1985, era de 26 casos em homens para uma mulher, a partir de 1997 passou a ser de dois casos em homens para uma mulher, com tendência à equivalência da relação (Secretaria Municipal da Saúde, 2007⁸).

A faixa etária dos 25 aos 49 anos concentra o maior número de casos de Aids em nosso país, representando 78,1% dos casos masculinos e 71% dos casos femininos. No município de São Paulo, 55.948 casos de Aids (86,5% do total de casos) estão concentrados nesta faixa etária (Secretaria Municipal da Saúde, 2007⁸).

O número de jovens com Aids no Brasil, notificados oficialmente até 30 de junho de 2007, foi de 54.965, sendo 10.337 entre jovens de 13 a 19 anos e 44.628 entre os de 20 e 24 anos, acumulado desde 1982, quando foi notificado o primeiro caso de Aids em jovens brasileiros. Esse número vem crescendo desde o início da epidemia (Ministério da Saúde, 2007).

A transmissão do HIV se faz essencialmente por três vias:

a) Contaminação pela via sexual, por ocasião de relações não protegidas com um(a) parceiro(a) infectado(a). Inicialmente, as populações homossexuais foram colocadas em evidência, mas logo este meio de contaminação foi estendido a todas as formas de orientação sexual;

b) Contaminação pela via sangüínea, que concerne particularmente aos usuários de drogas endovenosas, os quais partilham seringas não estéreis, previamente utilizadas por uma pessoa infectada; mas, igualmente, às pessoas transfundidas com hemoderivados, antes da existência de um controle mais rigoroso dos bancos de sangue e dos métodos de diagnóstico que, com uma melhor acurácia, permitiram minimizar o risco de contaminação, e igualmente os acidentes de trabalho com exposição ao sangue,

por meio de ferimentos por profissionais de risco, como os da área da saúde;

c) Contaminação materno-fetal, durante a gravidez, no parto e durante o aleitamento materno.

3.1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A origem do HIV é, sem contestação, o Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus* – SIV). Diversas espécies de primatas são portadoras do SIV há muitos anos. O SIV é transmitido sexualmente entre os macacos, mas não causa Aids em seus hospedeiros, os macacos-verdes (*Cercopithecus aethiops*) e os mangabeis (*Cercocebus atys*). Porém, pode causar a Síndrome da Imunodeficiência Símia (*Simian Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Sais), uma síndrome semelhante à Aids em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), encontrados na África.

O HIV foi descoberto na década de 80, em macacos Rhesus mantidos em cativeiro que apresentavam Sais e, então, várias hipóteses foram desenvolvidas com a finalidade de explicar a zoonose, ou a transmissão do vírus do animal ao homem

através da caça aos chimpanzés, uma prática comum no continente africano (Sharp *et al.*, 1999⁹; Hahn *et al.*, 2000¹⁰).

Acreditava-se que um vírus batizado de SIVcpz, sigla para Vírus da Imunodeficiência Símia para chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) do sudeste da África, fosse a origem do HIV, embora o SIVcpz não cause nenhuma doença parecida com a Aids nos chimpanzés (Hayami *et al.*, 1994¹¹; Gao *et al.*, 1999¹²).

Caçadores de chimpanzés foram provavelmente os primeiros seres humanos a contrair o vírus. Casos de Aids teriam aparecido primeiramente em Kinshasa, capital da República Democrática do Congo, que seria a área urbana mais próxima, na década de 30. Entretanto, de acordo com cientistas, como os casos eram raros e os sintomas de Aids diferentes entre indivíduos, demorou 50 anos para que o HIV fosse identificado.

Como o SIVcpz, até algum tempo atrás, só havia sido detectado através de exames de sangue de animais em cativeiro, havia a possibilidade de que outra espécie pudesse ser hospedeira tanto do HIV, como do SIVcpz. Uma equipe de cientistas encontrou um grupo de animais selvagens portadores do vírus SIVcpz (Van Heuverswyn *et al.*, 2006¹³).

Os pesquisadores fizeram, então, a análise de fezes de chimpanzés retiradas de áreas remotas nas florestas da República de Camarões, e conseguiram determinar a seqüência genética do vírus nos chimpanzés. Testes de laboratório também detectaram anticorpos específicos e informações genéticas relacionadas à presença do vírus em 35% dos chimpanzés, em alguns dos grupos estudados. Alguns dos vírus analisados tinham grande semelhança com isolados do HIV. Os chimpanzés do sudeste de Camarões foram os que demonstraram ter os vírus mais parecidos com a forma de HIV mais comum em todo o mundo (Van Heuverswyn *et al.*, 2006¹³).

Devido aos achados, os cientistas afirmam que é possível que a transmissão do vírus dos chimpanzés para os homens tenha ocorrido no sudeste da República de Camarões e se espalhado para o resto do mundo.

Em 1981, os Centros para o Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) notificaram a ocorrência de casos de pneumonia pelo *Pneumocystis jiroveci* e de Sarcoma de Kaposi em homossexuais masculinos jovens previamente saudáveis, que passaram a apresentar um quadro de deficiência imunológica grave, linfadenopatia generalizada e acentuada diminuição do número absoluto de linfócitos T auxiliares (L-T CD4⁺) no sangue periférico (CDC, 1981a¹⁴; CDC, 1981b¹⁵;

CDC, 1981c¹⁶; Durack, 1981¹⁷; Gottlieb *et al.*, 1981¹⁸; Masur *et al.*, 1981¹⁹).

Após a descrição dos primeiros casos, a imunodeficiência também foi observada em usuários de drogas injetáveis, receptores de transfusão, hemofílicos e crianças recém-nascidas de mães usuárias de drogas injetáveis (CDC, 1982a²⁰; 1982b²¹, 1982c²²). A denominação "Síndrome da Imunodeficiência Adquirida", ao final de 1982, já era utilizada para a descrição desta síndrome, cuja investigação epidemiológica determinou que se tratava de doença infecciosa transmitida por contato sexual, sangue e hemoderivados.

No final de 1983, pesquisadores franceses da equipe do Dr. Luc Montagnier, no Instituto Pasteur de Paris, identificaram o agente etiológico da Aids, como sendo um vírus, o qual foi denominado Vírus Associado à Linfadenopatia (*Lymphadenopathy-Associated Virus* – LAV), atualmente HIV (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983²³). Quase simultaneamente, a equipe do Dr. Jay Levy em São Francisco, Califórnia, identificou um retrovírus em portadores de Aids, denominando-o vírus associado à Aids (*Aids Associated Retrovirus* – ARV) (Levy *et al.*, 1984²⁴; Luciw *et al.*, 1984²⁵).

De acordo com a classificação do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Viruses* – ICTV), o HIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, um grupo que se caracteriza por provocar infecção latente em longo prazo e efeitos citopáticos em curto prazo, com envolvimento da resposta imunológica do hospedeiro, produzindo interações notavelmente complexas e doença lentamente progressiva e fatal, incluindo síndromes debilitantes e degeneração do sistema nervoso central (Haase, 1986²⁶; Fields *et al.*, 1996²⁷; Sharp *et al.*, 1999⁹; Abbas *et al.*, 2003²⁸; Picker, 2006²⁹).

Dois tipos de vírus foram identificados: HIV do tipo 1 (HIV-1), de distribuição mundial, e HIV do tipo 2 (HIV-2), encontrado essencialmente no oeste da África. Apesar de possuírem diferenças quanto às estruturas genômicas e distribuição geográfica, ambos podem causar síndromes clínicas semelhantes, embora o potencial patogênico do HIV-2 seja menor que do HIV-1 (Kanki *et al.*, 1999³⁰; Reeves e Doms, 2002³¹).

Estruturalmente, o HIV-1 constitui-se de uma partícula icosaédrica com cerca de 100 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro (Figura 2), composta de um envoltório viral (envelope) fosfolipídico, onde estão inseridas proteínas virais e da célula hospedeira, incluindo as duas principais glicoproteínas virais, a gp120 e gp41, associadas de

forma não-covalente (Barré-Sinoussi, 1996³²; Fields *et al.*, 2001²⁷; Sierra *et al.*, 2005³³).

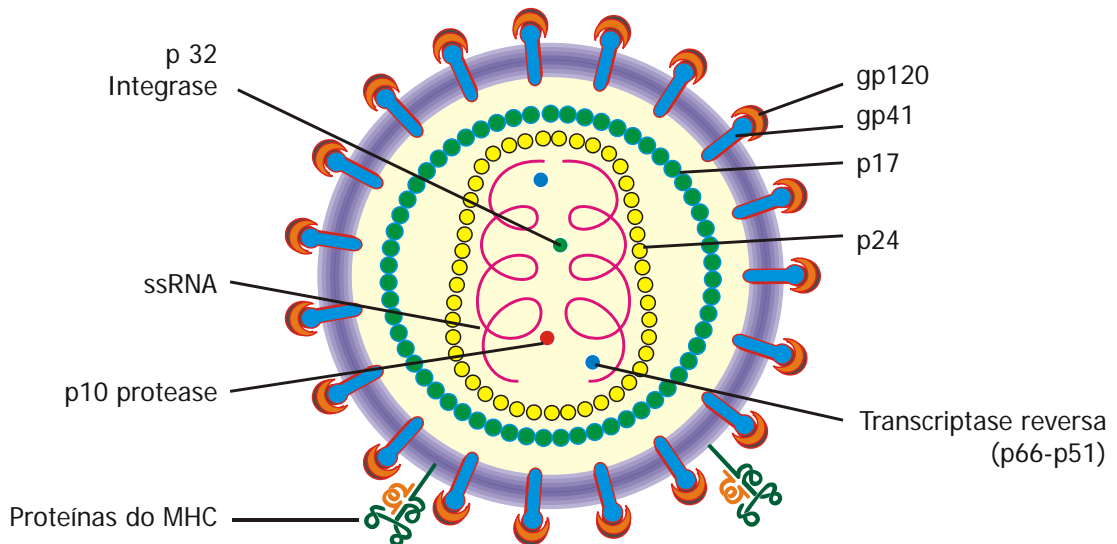


Figura 2. Estrutura do HIV-1 com suas principais proteínas

O genoma viral do HIV-1, seqüenciado em 1985 por Wain-Hobson *et al.*³⁴, possui estrutura típica dos retrovírus, sendo formado por duas fitas simples e idênticas de RNA diplóide, de polaridade positiva, cada uma com aproximadamente 9,2 quilobases (Kb) de comprimento; possui o gene *gag*, que codifica as sete proteínas estruturais: p24, principal proteína do capsídeo; p17, proteína da matriz; p7 e p9, proteínas do núcleo-capsídeo, que se ligam ao RNA; três pequenas proteínas: p1 e p2 (regulação da

clivagem de Gag); p6 (empacotamento dos vírions); gene *env*, que codifica as duas glicoproteínas do envelope: gp41 e gp120, necessárias para mediar a ligação ao receptor CD4 e para a fusão com a membrana celular da célula hospedeira, e o gene *polimerase* (*pol*), que codifica polimerases e integrases: p66/p51, transcriptase reversa (RT, heterodímero); p10, protease; p32, integrase, necessárias para a replicação viral (Figura 3) (Barré-Sinoussi, 1996³²; Fields *et al.*, 2001²⁷; Sierra *et al.*, 2005³³).

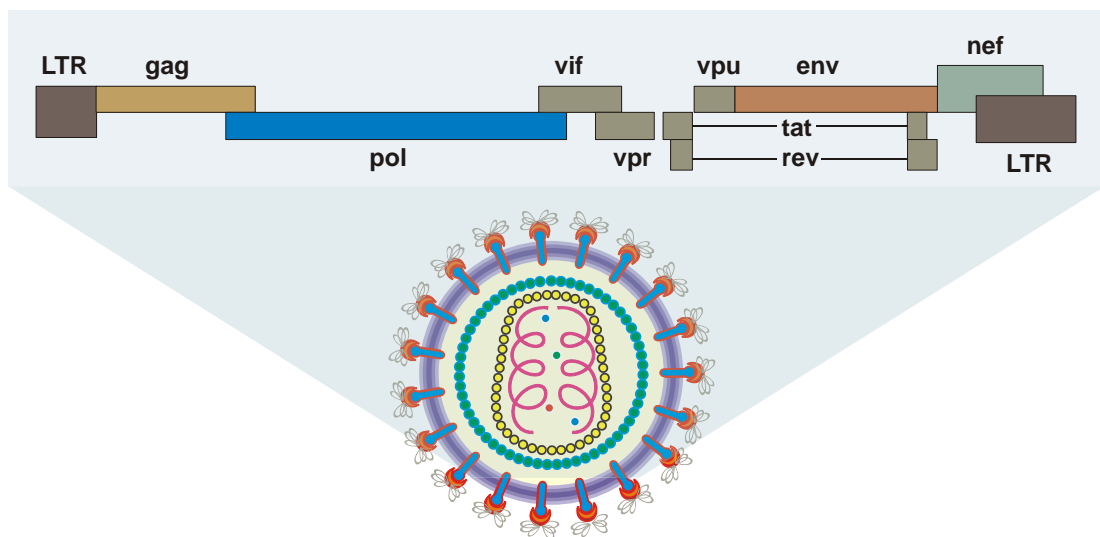


Figura 3. Genoma do HIV-1

Outros genes também participam do processo de replicação viral, atuando como genes regulatórios ou acessórios,

incluindo as três proteínas de regulação: *tat*, proteína transativadora, necessária para o alongamento dos transcritos virais, uma vez que estimula a expressão das repetições terminais longas (*Long Terminal Repeats* – LTRs); *rev*, proteína reguladora da síntese das proteínas virais, que promove a inclusão nuclear dos RNAs virais processados incompletamente ou não processados; e *nef*, “fator negativo”, que regula negativamente a expressão do receptor CD4 das células do hospedeiro e facilita a liberação do vírus pelas células, regulando também negativamente a expressão das moléculas do MHC de classe I, além de três proteínas acessórias: *vif*, fator de infectividade dos vírions, que aumenta a infectividade das partículas virais; *vpr*, “proteína viral R” (transativadora), que promove o transporte nuclear do DNA viral e *vpu*, “proteína do vírion U” (secreção dos vírions), que também regula negativamente a expressão do receptor CD4 das células do hospedeiro e facilita a liberação do vírus pelas células (Fields *et al.*, 2001²⁷; Greene e Peterlin, 2002³⁵).

3.1.3 Variabilidade viral

Uma das características do HIV é sua grande variabilidade (Brun-Vézinet et al., 1999³⁶). Filogeneticamente, o HIV-1 possui três grupos: o grupo M (*Major*), responsável pela maioria das infecções no mundo inteiro; O (*Outlier*), um grupo relativamente raro encontrado atualmente na República de Camarões, no Gabão e na França; e o grupo N (*New*), descoberto em 1998 na República de Camarões, considerado como extremamente raro. Os grupos apresentam vários subtipos, definidos pelas distâncias filogenéticas que os separam (Figura 4). A distância filogenética entre as variantes do HIV-1 permite classificá-lo em 11 subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) e 43 formas recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Forms* – CRF) (Los Alamos, 2008; <http://www.hiv.lanl.gov/>³⁷).

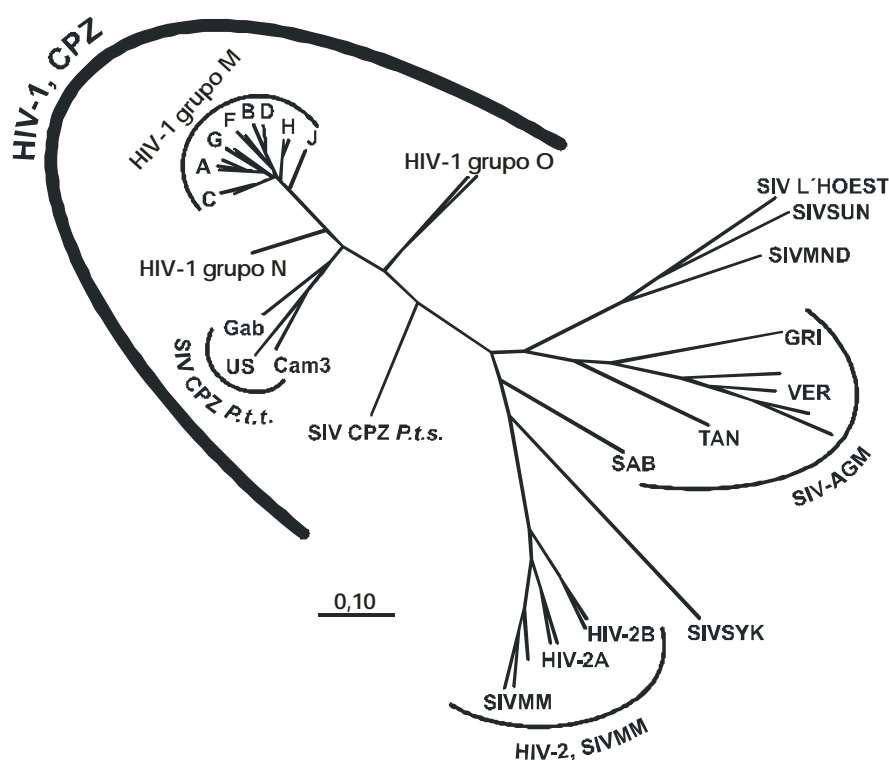


Figura 4. Representação filogenética do HIV-1 e HIV-2. A figura mostra os principais grupos e subtipos do HIV-1 e HIV-2 em relação aos principais isolados de SIV.

FONTE: Reeves JD e Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol.* 2002;83;p.1254

No mundo inteiro, cerca de 50% dos indivíduos estão infectados pelo HIV-1 subtipo C, enquanto o subtipo B, predominante nos países industrializados, posiciona-se como o terceiro mais freqüente, com cerca de 12% dos pacientes infectados. Entretanto, outros subtipos do HIV-1 (A, D, F e recombinantes) estão amplamente disseminados na África e Ásia (WHO-UNAIDS, 2001³⁸; Fang *et al.*, 2004³⁹). A diversidade de seqüências inter-subtipo pode chegar a 35% e a intra-subtipo pode ser de até 20% (Gaschen *et al.*,

2002⁴⁰), sugerindo um extenso polimorfismo em epitopos reconhecidos pelos linfócitos T.

No Brasil, as principais variantes descritas são: HIV-1 B, HIV-1 F, HIV-1 C e mosaicos com diferentes padrões de recombinação, além de casos isolados da variante HIV-1 D. Existem ainda diferenças regionais, com relação à prevalência das variantes virais. Diversos estudos têm identificado a variante HIV-1 B como predominante no País, porém com a co-circulação de pelo menos mais uma variante não B por região geográfica (Potts *et al.*, 1993⁴¹; Morgado *et al.*, 1994⁴²; Brindeiro *et al.*, 2003⁴³).

No estado de São Paulo, o HIV-1 B predomina (cerca de 80% dos isolados), com o HIV-1 F em torno de 10%, além de casos isolados de HIV-1 D e HIV-1 C, e de mosaicos B/F em 9% dos casos (WHO, 1994⁴⁴; Sabino *et al.*, 1996⁴⁵; Morgado *et al.*, 1998⁴⁶; Couto-Fernandez *et al.*, 1999⁴⁷; Bongertz *et al.*, 2000⁴⁸; Brígido *et al.*, 2005⁴⁹).

A grande variabilidade genética do HIV, uma das características mais importantes da biologia do vírus, decorre da falta de correção na etapa de retrotranscrição viral, associada a uma elevada taxa de replicação, conferindo uma extraordinária velocidade evolutiva, muito superior às já observadas para outros

patógenos. Esta rápida evolução do vírus está associada a uma crescente dispersão genômica, promovendo a alta variabilidade genética. Dessa forma, esta dinâmica do HIV impõe sérios obstáculos ao controle efetivo da epidemia (Fenyö *et al.*, 1988⁵⁰; Coffin, 1995⁵¹; Barré-Sinoussi, 1996³²; Wain-Hobson, 1996⁵²).

3.1.4 Ciclo viral

O HIV infecta as células que apresentam o receptor CD4. As principais células-alvo do vírus no organismo são os linfócitos T CD4⁺ (Douek *et al.*, 2002⁵³). A infecção dessas células ocorre predominantemente no trato gastrointestinal, onde a maioria dos linfócitos T CD4⁺ é encontrada, além dos nódulos linfáticos, outros tecidos linfáticos e no sangue periférico (Brenchley *et al.*, 2004⁵⁴). A infecção dos macrófagos e das células dendríticas pelo HIV foi demonstrada, e essas células infectadas constituem um reservatório importante do vírus (Gartner *et al.*, 1986⁵⁵; Chun *et al.*, 1997⁵⁶; Sipsas *et al.*, 1997⁵⁷; Larsson *et al.*, 2002⁵⁸; Turville *et al.*, 2002⁵⁹).

O ciclo viral nas células (Figura 5) se desenvolve em quatro fases (Freed, 1998⁶⁰; Goff, 2001⁶¹; Doms, 2002⁶²; Sierra *et al.*, 2005³³):

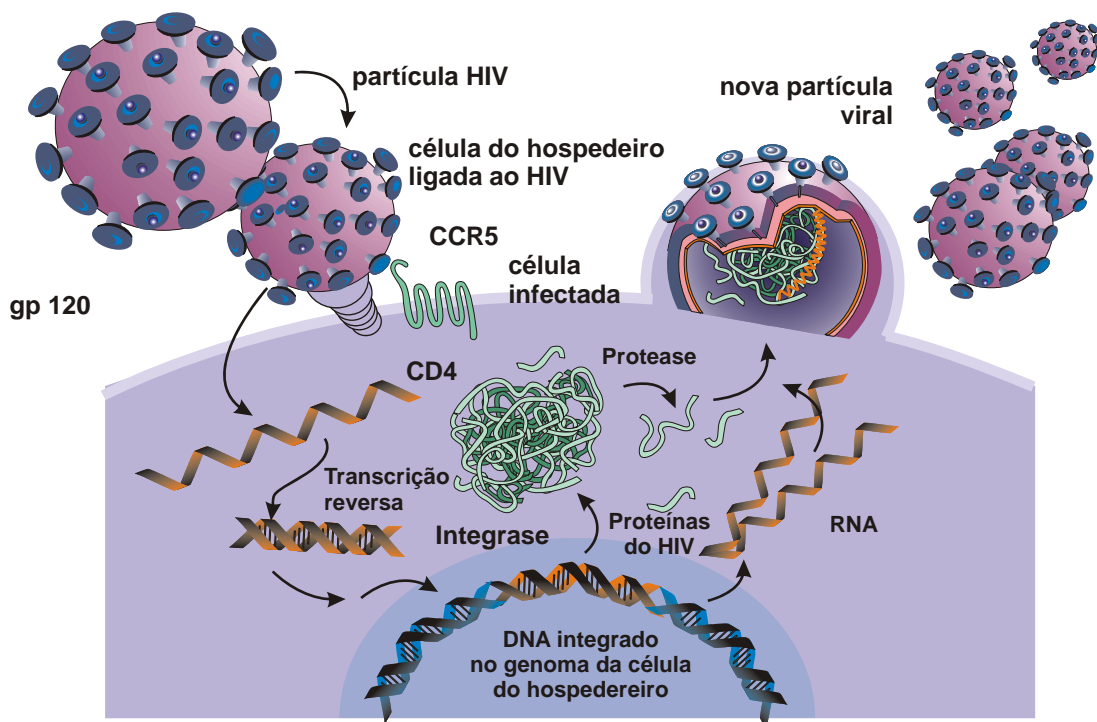


Figura 5. Ciclo replicativo do HIV

a) *Ligação e penetração do vírus na célula (invasão celular):*

A entrada do vírus se faz por um mecanismo de fusão com a membrana celular da célula hospedeira, após a fixação das glicoproteínas do envelope viral (gp41 e gp120) sobre o receptor

CD4 e os co-receptores do vírus. Esses co-receptores são membros de uma família de receptores de quimiocinas, principalmente os receptores de beta-quimiocinas CCR5 e CXCR4 (Doms, 2001⁶²). A utilização do co-receptor CCR5 é preferencial no momento da infecção, seguida de isolados virais que utilizam o co-receptor CXCR4 no final da doença, em torno de 50% dos pacientes. Mais raramente, alguns isolados virais ainda utilizam os co-receptores CCR3 e CCR2b (Philpott, 2003⁶³).

b) Transcrição reversa e replicação do genoma:

Uma vez que um vírion HIV penetrou em uma célula, as enzimas do complexo núcleo-protéico (núcleo-capsídeo) tornam-se ativas e o ciclo viral propriamente dito tem início. Após a liberação dos núcleo-capsídeos no citoplasma da célula hospedeira, a RT viral realiza a retrotranscrição do RNA viral em cDNA (DNA complementar do genoma viral), sem mecanismos de correção, gerando nesta etapa uma elevada taxa de mutagênese.

O cDNA é, então, transferido para o núcleo da célula hospedeira, graças à intervenção da proteína Nef, e se integra ao genoma da célula infectada, com auxílio da proteína viral integrase, sendo denominado de provírus. O genoma viral pode,

então, permanecer em um estado de provírus latente (transcricionalmente inativo) durante meses ou anos, integrado ao genoma celular da célula hospedeira, ou passar para a fase replicativa.

c) Expressão dos genes virais:

A transcrição do DNA do provírus integrado em RNA mensageiro viral (RNAm) se faz sob o controle de fatores de transcrição celulares da célula hospedeira. A maturação dos RNAm inclui um *splicing* (edição) diferencial conduzindo ao RNAm Gag-Pol e aos RNAm Vif, Vpr e Vpu/Env de uma parte, e aos RNAm multi-editados Tat, Rev e Nef de outra parte. Após o transporte através da membrana celular para o citoplasma, a tradução das proteínas virais utiliza a maquinaria celular da célula hospedeira.

d) Maturação dos vírions:

O processo de replicação viral é finalizado com a montagem, no citoplasma, dos precursores das proteínas virais,

de antemão glicosiladas, com o genoma viral produzido após a replicação, conduzindo à constituição de novos vírions (partículas virais), que saem da célula por brotamento. Esses vírions tornam-se plenamente infecciosos depois da clivagem proteolítica pela protease viral (Lochrie *et al.*, 1997⁶⁴): o precursor gp160 das glicoproteínas do envelope é clivado em gp41 e gp120; o precursor p55 sintetizado após a tradução dos RNAm proveniente do gene *gag* é clivado nas proteínas estruturais p17, p24 e nas pequenas proteínas (p1, p2, p6 e p7). Esses vírions têm como uma de suas características o fato de expressarem diferentes versões do RNA viral ancestral, uma vez que as eventuais modificações introduzidas na etapa de retrotranscrição podem ser incorporadas às partículas emergentes.

3.1.5 Fisiopatologia da infecção

A replicação do HIV no organismo ocorre em vários órgãos (gânglios linfáticos, cérebro, músculos etc.) e/ou nos líquidos biológicos (sangue, lavado bronco-alveolar etc.), nos quais encontramos células-alvo do vírus. A infecção das células-alvo explica a redução da imunidade celular com a depleção dos linfócitos T CD4⁺ e disfunção dos macrófagos, assim como o tropismo

particular do vírus pelos gânglios e pelo sistema nervoso central (Dunfee *et al.*, 2006⁶⁵; Thomas *et al.*, 2007⁶⁶). Os órgãos linfóides, que são a sede da produção e da maturação das células do sistema imunológico, são, dessa forma, atingidos desde os estágios precoces da infecção e constituem reservatórios do vírus (Pierson *et al.*, 2000⁶⁷; Douek *et al.*, 2003⁶⁸).

Em relação à resposta imunológica do indivíduo infectado, a infecção pelo HIV é crônica: o HIV tem a capacidade de se replicar constantemente no organismo, e sua grande variabilidade genética lhe permite escapar à resposta imunológica.

A replicação constante do HIV é considerada como responsável pela redução progressiva dos linfócitos T CD4⁺ através de mecanismos diretos (efeito citopático do vírus) e indiretos (destruição das células infectadas, apoptose das células em contato com antígenos do HIV, morte ou anergia celular por hiperestimulação) (Fields *et al.*, 1996²⁷). Os linfócitos T CD4⁺ destruídos progressivamente são rapidamente renovados, até que a alteração dos órgãos linfóides centrais não permite mais sua regeneração. A ativação crônica de células imunocompetentes induzida pela persistência do HIV no organismo provoca a apoptose dessas células e está, então, implicada igualmente na evolução para um *deficit* imunitário profundo (Gougeon e Montagnier, 2000⁶⁹).

Três fases clínicas podem ser observadas na infecção pelo HIV-1: a fase aguda ou infecção primária, que pode ser assintomática, oligossintomática ou se manifestar como Síndrome Retroviral Aguda (SRA), a fase assintomática e a fase sintomática/avançada da doença, que inclui sintomas constitucionais, decorrentes de infecções e/ou neoplasias oportunistas, conhecidas como manifestações definidoras da síndrome da imunodeficiência (Aids). Há uma grande variabilidade individual quanto à progressão da doença, e os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão totalmente esclarecidos (Miedema e Klein, 1996⁷⁰)

A infecção primária pelo HIV não é sempre sintomática e se desencadeia depois de um período de incubação de, em média, 10 dias após a contaminação (duração máxima de três meses). Os sintomas eventuais presentes em 50 a 80% dos casos, constituindo a SRA podem ser do tipo: febre, adenopatia, faringite, mialgia, artralgia, exantema maculopapular eritematoso, disfagia, ulcerações mucocutâneas envolvendo mucosa bucal ou genital, cefaléia, fotofobia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, náuseas e vômitos. Os pacientes podem apresentar ainda candidíase oral, neuropatia periférica, meningoencefalite asséptica e síndrome de Guillain-Barré. Em 50% dos casos, aproximadamente, observa-se

leucopenia, seguida de uma síndrome mononucleósica e aumento das transaminases.

Durante algumas semanas, a multiplicação do vírus no organismo é intensa. Em seguida, o controle imunológico é instaurado. Este controle permite o estabelecimento de um equilíbrio que se traduz clinicamente por uma fase assintomática mais ou menos longa, segundo os indivíduos infectados, que pode durar até mais de 10 anos. Esta é uma fase de latência clínica, porém não virológica, com replicação constante do vírus (Chun *et al.*, 1997⁵⁶). Inicialmente, acreditava-se que durante a fase assintomática da doença haveria uma “latência” da ação do vírus no organismo e do sistema imunológico do hospedeiro, entretanto estudos mais recentes mostraram que mesmo indivíduos assintomáticos e imunocompetentes produzem, em sua maioria, e de forma contínua, uma significativa quantidade de vírus. Assim, até o presente momento a latência do HIV-1 representa a principal barreira para erradicação do vírus (Finzi *et al.*, 1999⁷¹; Chouquet *et al.*, 2002⁷²; Sierra *et al.*, 2005³³).

Em 50% dos casos, encontra-se uma síndrome de linfadenopatia generalizada persistente.

Contudo o vírus está sempre presente e chega finalmente a contornar as defesas do hospedeiro e a induzir um

deficit imunológico profundo, que é traduzido pela fase sintomática (Aids), fatal em alguns anos. A alteração profunda do sistema imunológico leva, então, ao desenvolvimento de infecções oportunistas e de neoplasias malignas, sendo as mais freqüentes: candidíase oro-faríngea, infecção por citomegalovirus (CMV), toxoplasmose cerebral, tuberculose, infecções por micobactérias atípicas, pneumocistose por *Pneumocystis jiroveci*, encefalopatia pelo HIV, linfoma, sarcoma de Kaposi, entre outras.

3.1.6 Diagnóstico biológico

A pesquisa de anticorpos dirigidos contra o HIV, que aparecem normalmente após três semanas depois do contágio, é utilizada para o diagnóstico inicial da infecção, através dos testes de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e *Western blotting*. Entretanto, a sorologia torna-se pouco informativa durante a evolução para a fase de Aids, uma vez que a imunossupressão altera a síntese de anticorpos. O diagnóstico também pode ser confirmado

pela pesquisa do antígeno p24, ou seja, a dosagem da proteína p24 do vírus no sangue dos pacientes infectados, que aparece precocemente depois do contágio.

Os marcadores biológicos utilizados para o monitoramento clínico-laboratorial do indivíduo infectado pelo HIV são a quantificação de linfócitos T CD4⁺ sangüíneos (imunofenotipagem) e os níveis plasmáticos de RNA viral, conhecido como "carga viral", associados a informações clínicas do paciente (Mellors *et al.*, 1997⁷³).

A avaliação de linfócitos T CD4⁺ vem sendo utilizada desde os primeiros anos da epidemia (Dalglish *et al.*, 1984⁷⁴) como parâmetro objetivo que permite avaliar o impacto imunológico da replicação viral. O número de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico é considerado o principal marcador de dano imunológico causado pela infecção pelo HIV e um importante indicador de progressão para Aids (Loveday e Hill, 1995⁷⁵). Sua quantificação se dá a partir do sangue total através de uma técnica denominada citometria de fluxo, e permite estimar o estágio da imunodeficiência, a indicação de início de terapia anti-retroviral e de medicação profilática para doenças oportunistas. Os valores de linfócitos T CD4⁺ são considerados alterados quando estão abaixo de 500 células/mm³ de sangue periférico (ou 24-28%).

O nível de RNA do HIV-1 no plasma é um marcador clínico importante, pois serve como marcador do risco de queda subsequente nas contagens de linfócitos T CD4⁺. O número de partículas virais é mais elevado durante a infecção primária, e mais baixo na fase crônica assintomática. Mellors *et al.*⁷⁶ (1996) afirmam que existe uma relação direta entre a quantidade de HIV detectada e a rapidez com que a infecção progride. A quantificação dos níveis de RNA viral é feita por amplificação do genoma viral depois da transcrição reversa (rtPCR quantitativo, amplificação isotérmica do cDNA ou por *"branched DNA"*). Normalmente, níveis elevados de replicação viral e aumento da viremia estão associados à deterioração acelerada do sistema imune. Dessa forma, a quantificação dos níveis de RNA viral é indicada para avaliar a progressão da doença e eficácia dos medicamentos anti-retrovirais. As variações desses marcadores durante a infecção estão ilustrados na figura 6.

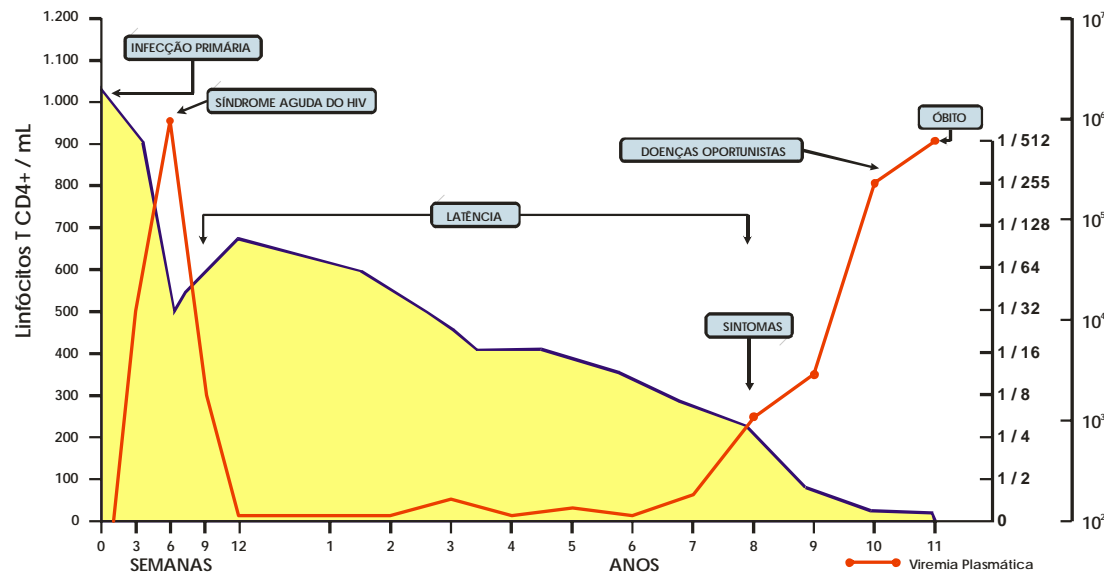


Figura 6. História natural da infecção pelo HIV. Observa-se a evolução da taxa de linfócitos T CD4⁺ sanguíneos e da carga viral plasmática no curso da infecção pelo HIV na ausência de tratamento anti-retroviral

O equilíbrio da carga viral depois da infecção primária tem um valor prognóstico na evolução da infecção. A diminuição dos linfócitos T CD4⁺ sanguíneos é de, em média, 30 a 100 células por mm³ por ano, com importantes variações individuais. O número de linfócitos T CD4⁺ no sangue é primordial para a decisão de iniciar um tratamento anti-retroviral: as recomendações internacionais atuais indicam que o período ideal para iniciar um tratamento é quando essa taxa fica abaixo de 350 células/mm³, sem atingir 200 células/mm³ (Ministério da Saúde, 2007a⁷⁷).

Os principais avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de metodologias laboratoriais padronizadas internacionalmente, tanto para a quantificação de linfócitos T CD4⁺, como para a quantificação da carga viral plasmática. Estes dois testes laboratoriais orientam a condução clínica dos pacientes infectados e são de acesso garantido pela Rede Pública de Saúde no Brasil.

3.1.7 Tratamento

Os primeiros anti-retrovirais, comercializados no final da década de 80 para combater o HIV, foram os análogos de nucleosídeos, utilizados por inibirem a transcriptase reversa do vírus. Atualmente, utilizam-se também outros medicamentos que têm uma ação específica sobre a replicação viral. Duas classes de medicamentos agem sobre a transcriptase reversa:

a) *Análogos de nucleosídeos*: zidovudina (AZT), didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), abacavir (ABC), e *análogos nucleotídicos*: tenofovir (TDF).

O mecanismo de ação dos análogos de nucleosídeos e nucleotídeos é a incorporação do medicamento no DNA em curso de síntese pela enzima, o que provoca o aparecimento de um ácido nucléico anormal que induz alteração da replicação viral.

b) *Não análogos de nucleosídeos*: efavirenz (EFZ) e nevirapina (NVP), que agem se fixando ao lado do sítio ativo da transcriptase reversa.

O combate à Aids por meio de medicamentos foi ampliado no final da década passada, com a introdução de poderosas “armas” terapêuticas e pelo delineamento de novas e eficazes combinações de medicamentos (Pomerantz e Horn, 2003⁷⁸).

Em 1996, uma terceira classe de anti-retrovirais, os *inibidores de protease do HIV (IP)*, apareceu e permitiu uma melhora muito significativa da eficácia dos tratamentos. Essa classe de medicamentos é composta por peptídeo-miméticos, que agem inibindo as clivagens proteolíticas necessárias para a

correta maturação dos vírions, e compreende os seguintes medicamentos: amprenavir (APV), indinavir (IDV), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), atazanavir (ATV), darunavir (DRV), fosamprenavir (FPV).

Novas moléculas de diferentes classes estão sendo atualmente testadas em ensaios clínicos, ou prescritas sob autorização temporária de utilização, assim como os medicamentos que agem segundo um mecanismo de ação diferente, como os *inibidores de fusão*, que impedem a propagação da infecção. O enfuvirtida (ENF ou T20) é o primeiro inibidor de fusão que já está sendo utilizado pelos pacientes com Aids, inclusive em nosso país.

O principal alvo do tratamento anti-retroviral é a completa supressão da carga viral. Com esse objetivo, diversas nações têm preparado manuais para orientar a condução da terapia anti-retroviral em seus pacientes, os quais variam de acordo com a evolução da epidemia em cada país. O tratamento dos pacientes infectados tem tornado a infecção pelo HIV uma doença crônica, cujo manejo adequado permite a sobrevivência do indivíduo infectado e, provavelmente, contribui no controle da infectividade.

No Brasil, o Programa Nacional de DST e Aids (PN-DST-Aids), do Ministério da Saúde, instituiu em 2002 o Comitê

Assessor para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes infectados pelo HIV, pela Portaria/GM/MS n.º 1978 para tratar de forma técnica os aspectos relacionados ao tratamento dos pacientes infectados pelo HIV. Esse comitê reúne-se desde então regularmente para traçar diretrizes que garantam tratamento eficaz, atualizado e de qualidade aos portadores de HIV/Aids, e têm criado os “Consensos de Terapia”, documentos que estabelecem recomendações técnicas para utilização de medicamentos anti-retrovirais (Ministério da Saúde, 2007b⁷⁹).

Por outro lado, devido ao aparecimento de resistência de maneira muito rápida sob a monoterapia, empregada inicialmente, os anti-retrovirais passaram a ser utilizados sempre em associação. A terapia combinada de alta atividade ou Terapia Anti-Retroviral Altamente Ativa (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy – HAART*) passou a ser utilizada mostrando-se capaz, em diversos estudos, de manter o HIV em níveis de replicação abaixo da capacidade de detecção nos testes comerciais, sendo considerada atualmente a única modalidade terapêutica aceitável (Rodrigues, 2004⁸⁰).

As combinações mais freqüentemente prescritas, comumente denominadas “terapia tripla”, são as associações de dois análogos nucleosídicos com um análogo não nucleosídico ou

dois análogos nucleosídicos com um inibidor de protease, ou ainda de três ou mais análogos nucleosídicos combinados a outras classes de anti-retrovirais (Ministério da Saúde, 2007a⁷⁷).

Entretanto, mesmo com a terapia combinada anti-HIV, a resistência continua sendo um problema grave enfrentado pelos pacientes. O surgimento de variantes resistentes à terapia anti-retroviral é uma evidência direta da variabilidade e da dinâmica evolutiva viral, através da adaptação do HIV à pressão seletiva das drogas anti-retrovirais (Rodrigues, 2004⁸⁰; Brigido *et al.*, 2004⁸¹).

A ocorrência rápida de resistência aos tratamentos também pode ser explicada pelo seguinte mecanismo: a taxa de erros da transcriptase reversa é estimada em $1/10^4$ por nucleotídeo por divisão celular. Cada novo vírus produzido possui, por conseguinte, ao menos uma mutação. Como a produção de novos vírus é de 10 milhões por dia, a população viral no organismo é, na realidade, composta por variantes diferentes, evidenciando a existência de uma *quasispecie* viral (Barré-Sinoussi, 1996³²).

Na presença dos anti-retrovirais, os mutantes virais que escapam à ação do medicamento são selecionados e tornam-se progressivamente majoritários nas *quasispecies*.

A associação de várias moléculas permite limitar esse fenômeno, e assim a probabilidade de sobrevivência de mutantes apresentando mutações que confirmam uma resistência simultânea às três classes de anti-retrovirais é muito reduzida.

Uma resposta baseada no tratamento adequado, dependente da infecção inicial por um isolado viral sensível às moléculas utilizadas, requer o início imediato de uma terapia anti-retroviral, assim como uma observância estrita do tratamento (adesão), assegurando concentrações plasmáticas suficientes dos medicamentos, que podem eventualmente ser controladas por dosagens farmacológicas. Isto permite, então, a manutenção de uma carga viral indetectável e o sucesso virológico é atualmente atingido em aproximadamente 70% dos casos.

Dessa forma, é incontestável a afirmação de que o tratamento com anti-retrovirais revolucionou o prognóstico da infecção pelo HIV e mostrou resultados satisfatórios, proporcionando aumento / melhora da sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes, e estendeu sua expectativa de vida. Por outro lado, o custo muito elevado dos anti-retrovirais limita sua utilização nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, onde a incidência da infecção é, portanto, mais elevada.

O Brasil foi o primeiro país da América Latina a adotar a política de distribuição de medicamentos anti-retrovirais de forma gratuita para a população afetada pela epidemia. A distribuição de medicamentos anti-retrovirais em nosso país foi iniciada em 1991 no estado de São Paulo com a distribuição do AZT, e segundo estimativas do Ministério da Saúde, até o final deste ano cerca de 180.000 portadores do HIV/Aids estarão sob tratamento anti-retroviral em todo o país (Ministério da Saúde, 2007a⁷⁷).

Com efeito, a abolição da replicação viral e a manutenção de uma taxa de linfócitos T CD4⁺ sanguíneos superior a 200 células/mm³ permitem minimizar o risco de ocorrência de infecções oportunistas ligadas a uma imunossupressão grave. No caso de uma gravidez, o risco de transmissão do vírus da mãe para a criança durante o parto e lactação passa de 30% em uma mãe sem tratamento, para 1 a 2% em uma mãe sob tratamento anti-retroviral.

No entanto, os tratamentos atuais não permitem a erradicação total do vírus e podem apenas retardar a fase tardia ou terminal da doença. Além disso, os anti-retrovirais induzem a médio e longo prazo o aparecimento de efeitos secundários sérios e muitas vezes graves: lipodistrofia; anomalias do metabolismo glicídico, favorecendo o aparecimento de diabetes; do metabolismo lipídico,

com possíveis conseqüências cardiovasculares; anomalias ósseas; problemas ao nível das mitocôndrias, expondo ao risco de acidose láctica, entre outros.

Novas vias terapêuticas têm sido exploradas: são as estratégias de imunoterapia ativa ou passiva. A interleucina 2 (IL-2) tem sido utilizada por sua atividade anti-viral inespecífica (Carcelain *et al.*, 2003⁸²). A imunoterapia ativa específica consiste na terapia com vacinas e tem sido testada em ensaios clínicos (Letvin, 1993⁸³; Grahan, 2002⁸⁴; Nabel, 2002⁸⁵). Todavia as dificuldades em se criar uma vacina preventiva estão em grande parte ligadas à grande variabilidade do HIV: as proteínas virais podem escapar rapidamente do reconhecimento imunológico estabelecido contra os peptídeos vacinais, o que não impede, portanto, a contaminação.

Uma estratégia vacinal complementar na área do HIV é a vacinação terapêutica em pessoas já infectadas. O princípio dessa estratégia é limitar a replicação viral graças a uma estimulação dirigida do sistema imunológico, possibilitando, teoricamente, a interrupção do tratamento com anti-retrovirais (Gotch *et al.*, 2001⁸⁶; Kinloch-de Loes e Autran, 2002⁸⁷; Autran *et al.*, 2003⁸⁸; Autran *et al.*, 2004⁸⁹; Gudmundsdotter *et al.*, 2006⁹⁰). Isto é justificado pelas observações já feitas em uma minoria de indivíduos infectados cuja progressão da doença é particularmente

lenta: são os indivíduos progressores lentos. Uma das principais razões para sua progressão lenta parece ser a existência de um sistema imunológico mais eficaz para lutar contra o vírus nesse grupo de indivíduos (Walker, 2007⁹¹).

3.2 A resposta imunológica anti-HIV

3.2.1 Imunidade anti-viral

A primeira linha de defesa do organismo, isto é, a reação inflamatória inespecífica, mediada pelas células fagocíticas, e a imunidade inata, mediada principalmente pelas células *Natural Killer* (NK) e células dendríticas (*Dendritic Cells – DCs*), é desencadeada em resposta a toda lesão tissular (erosão, picada, queimadura, irradiação etc.). As células NK, que possuem os marcadores CD16 e CD56, iniciam uma resposta não restrita ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex – MHC*). Elas secretam substâncias [interferon- γ , fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor – TNF*), linfotoxina etc.] e inserem a perforina na membrana citoplasmática, promovendo a

morte da célula-alvo por lise osmótica. A defesa inespecífica do organismo contra os patógenos é baseada também nos fatores solúveis secretados pelos leucócitos, que compreendem as quimiocinas (citocinas de baixo peso molecular responsáveis pela quimioatração de células) e os interferons, principalmente o interferon alfa (IFN- α) (Abbas *et al.*, 2003²⁸; Goldsby *et al.*, 2000⁹²).

Contudo os vírus escapam rapidamente a esses mecanismos, entrando em ação as respostas imunológicas específicas, mediadas pelos anticorpos e pelos linfócitos T citotóxicos. A resposta imunológica específica é desencadeada pela captura do patógeno pelas células apresentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells* – APCs; células dendríticas, macrófagos, linfócitos B) que degradam as proteínas (processamento antigênico) e as apresentam no contexto das moléculas do MHC de classe II (HLA-Dp, Dq e Dr), e pode ser esquematizada da seguinte maneira (Alberts *et al.*, 1994⁹³; Goldsby *et al.*, 2000⁹²; Abbas *et al.*, 2003²⁸) (Figura 7):

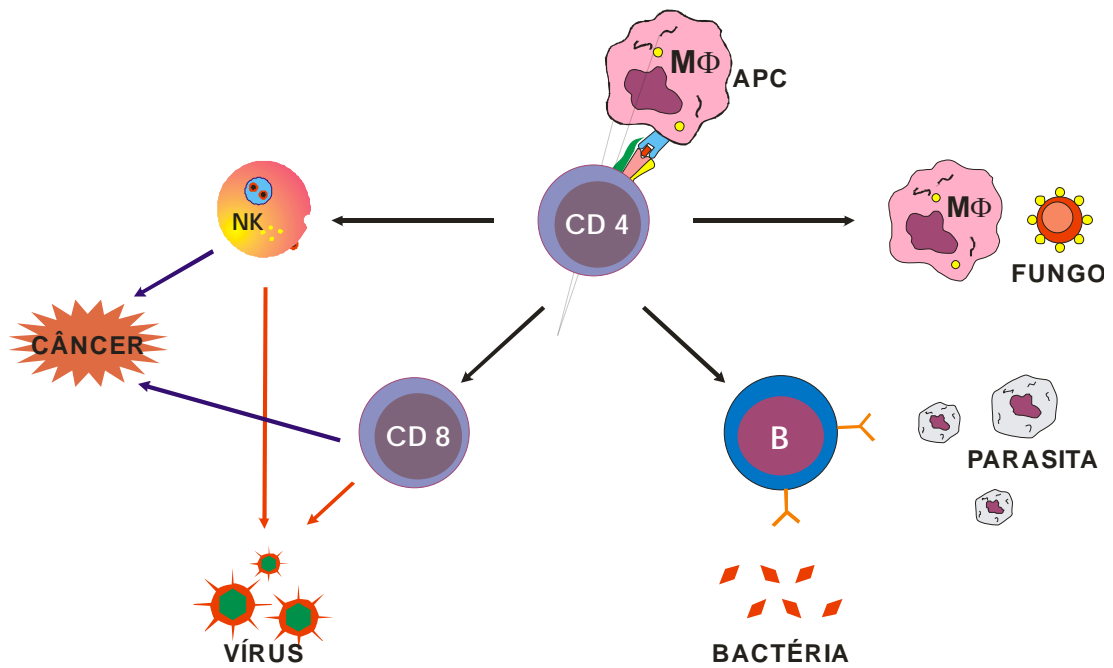


Figura 7. Papel central do linfócito T CD4⁺ na resposta imunológica contra os diversos agentes patogênicos. APC: Célula apresentadora de antígeno; CD4: Linfócito T CD4⁺; CD8: Linfócito T CD8⁺; NK: Célula “natural killer”; B: Linfócito B; MΦ: Macrófago

A) Apresentação do antígeno

O evento central que desencadeia a resposta imunológica específica é a interação entre os linfócitos T e as APCs (Figura 8).

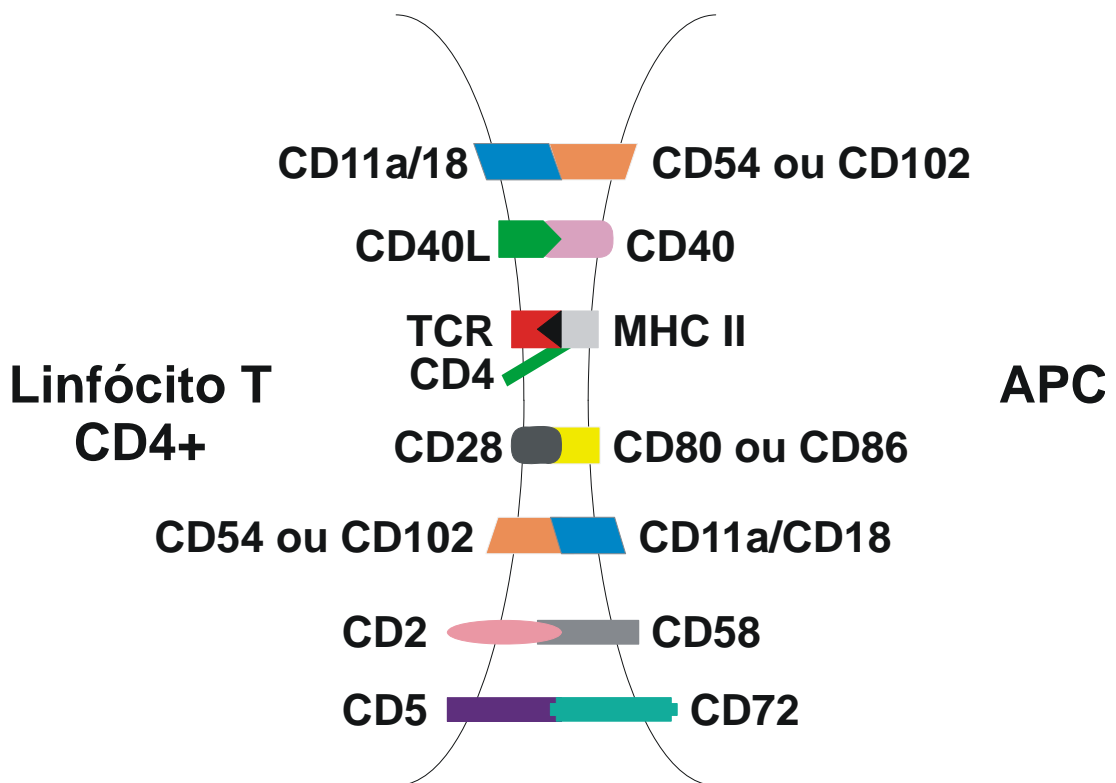


Figura 8. Moléculas que participam da interação entre o linfócito T CD4⁺ e a célula apresentadora de antígeno (APC)

A aproximação dos linfócitos T e das APCs é favorecida pelas moléculas acessórias de adesão: duplas CD2 / LFA-3 (CD58) e LFA-1 (CD11a/CD18) / ICAM 1 (CD54) e 2 (CD102). O principal sinal na ativação do linfócito T é o reconhecimento específico entre o antígeno apresentado sob a forma de peptídeos alinhados no meio de uma fenda na superfície das moléculas do MHC sobre a APC, de um lado, e o receptor das células T (*T Cell Receptor* – TCR) ligado à molécula CD3 e associado ao CD4 (linfócito T auxiliar) ou ao CD8 (linfócito T citotóxico), de outro lado. Níveis diferentes de afinidade da ligação dos peptídeos implicados

na interação TCR / peptídeo antigênico / molécula do MHC determinam a especificidade dessa interação. Uma interação entre o CD28 do linfócito T e a molécula B7 [B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86)] da APC constitui mais um sinal de co-estimulação indispensável nesta etapa.

As moléculas de classe I e de classe II do MHC utilizam-se de diferentes vias intracelulares antes de atingir a superfície, o que reflete sua especialização na apresentação de antígenos protéicos de origens diferentes (intracelulares ou extracelulares, respectivamente).

As moléculas de classe I apresentam peptídeos de oito a nove aminoácidos derivados de proteínas citosólicas sintetizadas endogenamente e fragmentadas no proteassomo. (Figura 9A). Por outro lado, as moléculas de classe II apresentam peptídeos de 10 a 16 aminoácidos derivados de antígenos exógenos que foram internalizadas nas vesículas das APCs (Figura 9B). No caso de uma infecção viral, as células infectadas preparam peptídeos virais endógenos em suas moléculas de classe I para apresentá-los aos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos; CTLs). O restante das células infectadas constitui uma fonte de proteínas virais exógenas cujos peptídeos poderão ser apresentados pelas moléculas de classe II aos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), sendo também uma fonte de

corpos apoptóticos fagocitados pelas células dendríticas, utilizados para ampliar a apresentação de antígenos virais.

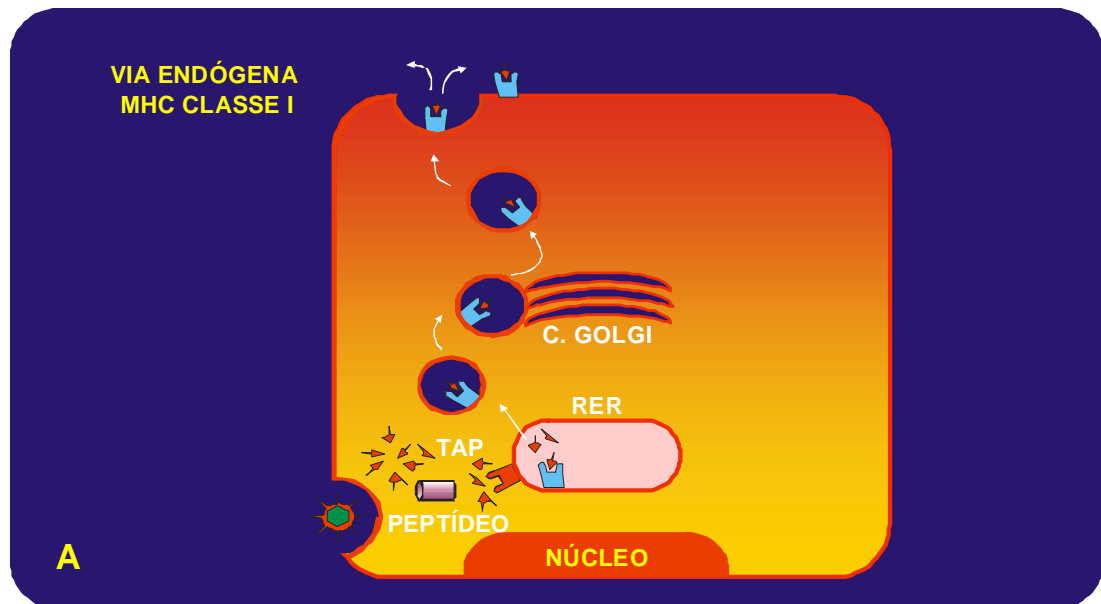


Figura 9A. Apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC – classe I

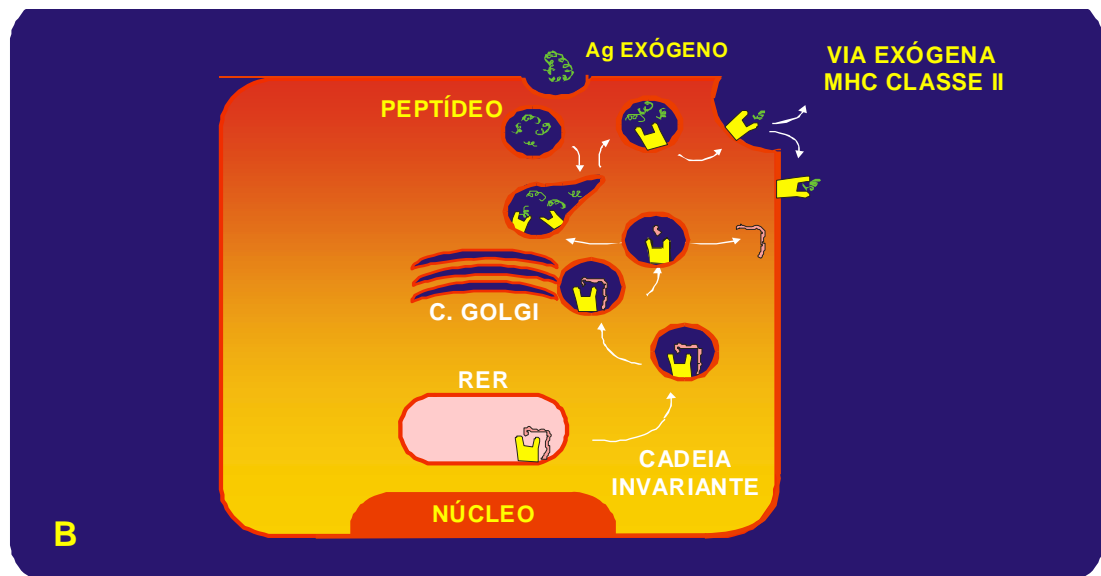


Figura 9B. Apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC – classe II

O complexo peptídeo antigênico / molécula do MHC é reconhecido pelo TCR do linfócito T, que deve estar em condições de reconhecer os variados antígenos. O TCR faz parte da superfamília das imunoglobulinas. Trata-se de um heterodímero formado pela associação de duas cadeias glicoprotéicas que atravessam a membrana (transmembrana) com 40 a 60 quilodaltos (KDa), α e β (presentes em 95% dos linfócitos T), covalentemente ligadas entre si por pontes de dissulfeto ou γ e δ (presente em 5% dos linfócitos T). A diversidade do TCR é assegurada pelos rearranjos aleatórios dos genes V (de variabilidade), D (de diversidade) e J (de junção), durante a diferenciação dos linfócitos T. A resultante desses rearranjos é uma região juncional hipervariável CDR3 (*complementarity determining region 3*) única, diretamente implicada no reconhecimento do complexo peptídeo / MHC. A freqüência do aparecimento de cada CDR3 específico é da ordem de um em 100.000, o que explica a grande diversidade do repertório dos linfócitos T.

Após o reconhecimento de um peptídeo, uma série de acontecimentos ocorre no interior do linfócito T a fim de desencadear a proliferação celular. Essa transdução do sinal é mediada pela molécula CD3 e depende de diferentes enzimas celulares (em sua maior parte quinases). A proliferação celular do

linfócito T é o resultado de uma transformação blástica, ou seja, a entrada no ciclo celular. A célula passa da fase G0 do ciclo celular para a fase G1. O linfócito, então, desencadeia uma secreção de IL-2, que é seu próprio fator de crescimento. A ativação através de IL-2 permite, então, a passagem da fase S do ciclo celular (síntese de DNA) para a fase G2, e depois para a fase M (mitose). Dessa forma, ocorre a divisão celular com expansão clonal de uma população de linfócitos T levando a mesma especificidade antigênica.

A ativação dos linfócitos T CD4⁺ estimulados por antígenos permite sua diferenciação em duas subpopulações de células efetoras produtoras de citocinas (Figura 10):

* *Os auxiliares do tipo 1 (T_H1, para T helper 1), que, pela sua secreção de IL-2 e de IFN- γ , estimulam a resposta celular a patógenos intracelulares mediada pelos linfócitos T citotóxicos.*

* *Os auxiliares do tipo 2 (T_H2, para T helper 2), que, pela sua secreção de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), estimulam a resposta humoral mediada pelos linfócitos B, direcionada primordialmente a patógenos extracelulares.*

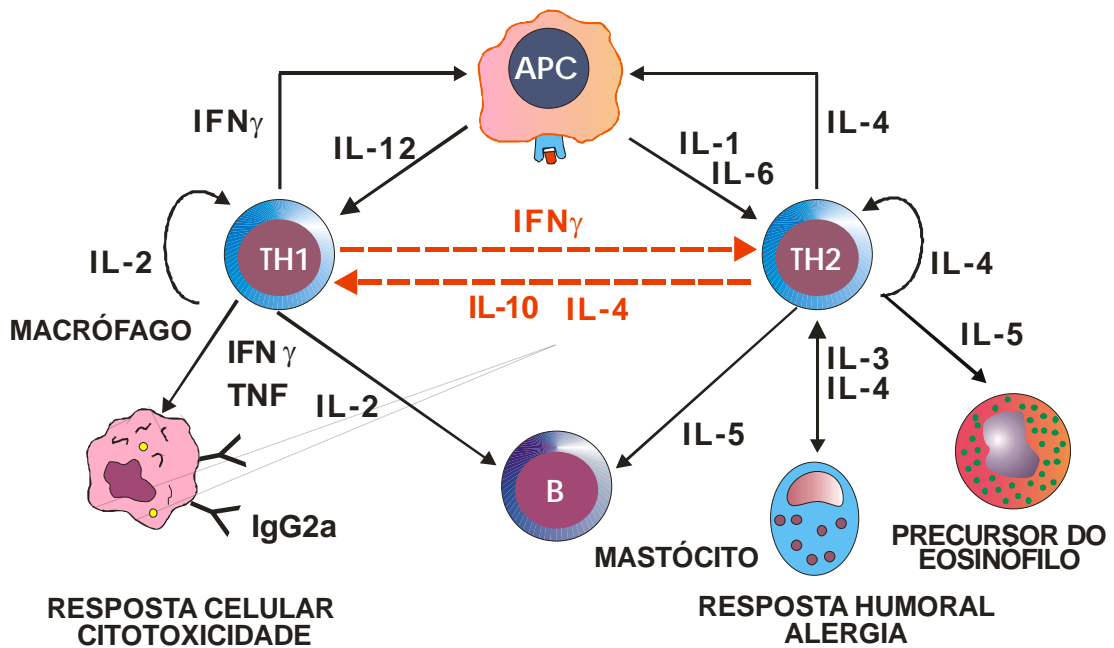


Figura 10. Regulação da resposta imunológica por citocinas

B) Resposta humoral

Depois do contato de um antígeno associado ao vírus e do receptor dos linfócitos B (*B Cell Receptor* – BCR), uma transdução de sinal por meio de fosforilações em cascata conduz à ativação do linfócito B, que então produz diferentes citocinas e aumenta a expressão, na sua superfície, de moléculas que permitem a interação com os linfócitos T (CD40 / CD154 e B7 / CD28).

O linfócito B, tendo internalizado o antígeno por endocitose, apresenta-o ao linfócito T por intermédio de moléculas HLA de classe II, e uma ativação recíproca pelo linfócito T provoca a expansão clonal do linfócito B. A fase terminal da diferenciação do linfócito B é a fase de plasmócito, célula produtora e secretora de anticorpos. Os anticorpos sintetizados em um primeiro tempo são do tipo IgM. Em seguida, os anticorpos do tipo IgG aparecem após uma comutação isotípica. No caso de uma infecção viral, a produção de anticorpos é feita com certo "atraso", e esses anticorpos parecem ter um papel mínimo na resolução da infecção primária.

C) Resposta celular

Após o reconhecimento de um peptídeo antigênico apresentado pelo MHC de classe I na célula-alvo infectada, e graças à cooperação dos linfócitos T auxiliares, a proliferação clonal dos linfócitos T permite inicialmente a geração em alguns dias de linfócitos T CD8⁺ de memória específica, que circularão entre o sangue e os órgãos linfóides (linfonodos e baço) durante o resto da vida do indivíduo, à procura de eventuais células dendríticas que expressem os mesmos peptídeos virais que aqueles pelos quais foram

inicialmente estimulados. Então, os linfócitos T CD8⁺ de memória poderão ser ativados rapidamente.

A diversidade do repertório T permite a co-existência de várias populações de CTLs reconhecendo o mesmo epítopo. Paralelamente à geração de linfócitos T CD8⁺ de memória, a expansão clonal dos linfócitos T permite gerar linfócitos T CD8⁺ efetores, que migram em direção aos tecidos periféricos não-linfóides e são capazes de produzir um grande número de moléculas implicadas na citotoxicidade (Figura 11).

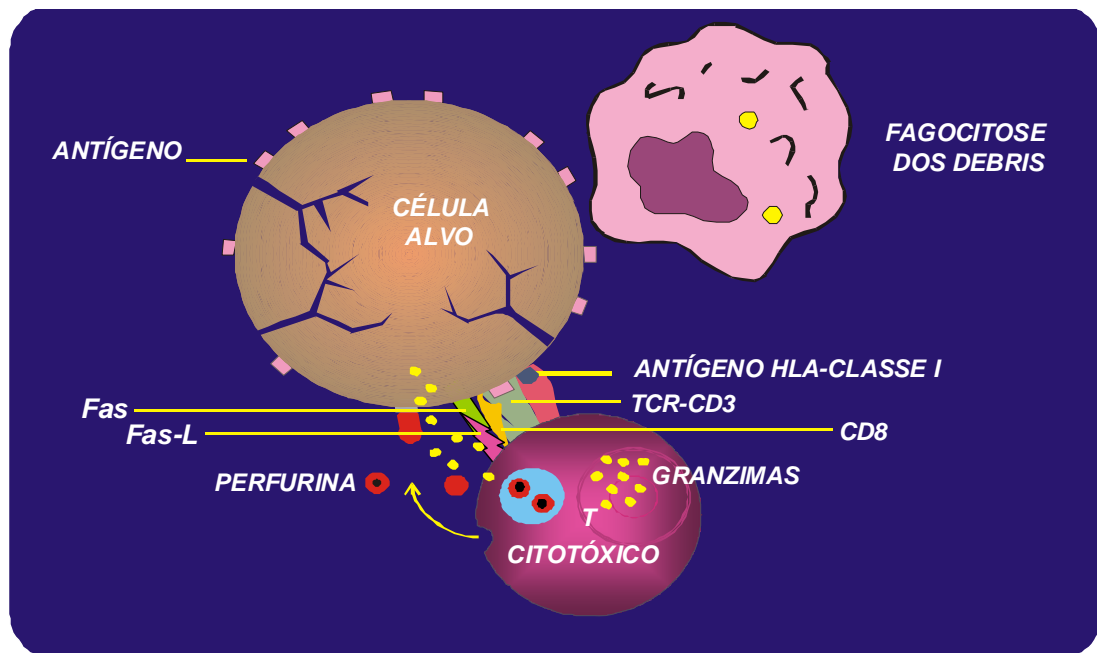


Figura 11. Mecanismos de citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ efetores

A citotoxicidade pode intervir antes mesmo da produção de novos vírions na célula infectada, o que permite uma limitação eficaz da propagação da infecção viral. Os mecanismos que têm origem na citotoxicidade dos linfócitos T CD8⁺ efetores são de dois tipos:

** Modo secretório dependente de cálcio:*

Grânulos líticos presentes no citoplasma do linfócito T (lisossomos modificados) são secretados rapidamente depois da estimulação, por exocitose dependente de cálcio. O conteúdo desses grânulos, perforina e granzimas, é liberado no espaço intercelular. A perforina gera poros na membrana da célula-alvo, pelos quais as granzimas (proteases de serina) passam e desencadeiam a apoptose desta célula infectada por meio de uma cascata enzimática implicando certas caspases celulares.

** Modo não secretório independente de cálcio:*

As moléculas Fas (CD95) na superfície da célula-alvo reconhecem o ligante de Fas (Fas-L – CD178) presente na superfície do linfócito T, o que induz uma cascata de ativação na célula-alvo e

leva a uma proteólise e a uma degradação do DNA desta célula infectada pela ação de endonucleases.

Esses sinais de morte (perfurina / granzimas ou interação Fas / Fas-L) originam o "suicídio" da célula infectada por apoptose, reconhecível por redução do tamanho da célula, perda das vilosidades da membrana e condensação da cromatina.

O conjunto dos mecanismos da resposta imunológica específica está sob a dependência das comunicações intercelulares via citocinas. As principais produções de citocinas podem ser resumidas da seguinte maneira: paralelamente à apresentação de um epítipo, as células fagocíticas recrutam e ativam os linfócitos T auxiliares CD4⁺ graças à secreção de interleucina 12 (IL-12). Esses linfócitos secretam à sua volta citocinas com função regulatória (IL-2) ou efetora (IFN- γ), assim como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que permite o aumento da atividade bactericida dos macrófagos.

A subpopulação dos linfócitos T_H2 ativa, pela produção de IL-5, IL-6 e IL-10, a proliferação dos linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos produtores de anticorpos, enquanto que a produção de IL-4 permite uma regulação negativa na

ativação dos linfócitos T_H1 . Esses últimos provocam o desencadeamento da resposta celular pelos CTLs via secreção de IL-2 e IFN- γ . Os mecanismos da citotoxicidade dos CTLs correlacionam-se à secreção de TNF- α e IFN- γ .

3.2.2 Especificidades da resposta imunológica anti-HIV

A patogênese da infecção pelo HIV é muito variável segundo os indivíduos, e isto ocorre por causa da heterogeneidade do vírus assim como pelo *status* imunológico inicial do indivíduo infectado. Mecanismos inespecíficos podem também contribuir para esta variabilidade. Certas pessoas regularmente expostas ao vírus não são infectadas. Esses indivíduos geralmente apresentam mutações nos genes das suas moléculas CCR5 ou CCR2, que limita sua utilização como co-receptores para a entrada do vírus nas células (Stewart *et al.*, 1997⁹⁴; Visco-Comandini *et al.*, 1998⁹⁵; Mazzucchelli *et al.*, 2001⁹⁶; Singh *et al.*, 2003⁹⁷). Trabalhos realizados no Instituto Pasteur de Paris colocam em evidência nesses indivíduos uma atividade particularmente elevada das células NK, conferido-lhes uma imunidade inata mais eficaz (Scott-Algara *et al.*, 2003⁹⁸). Estudos também mostraram uma diminuição da atividade das células

NK em indivíduos progressores rápidos (Mendila *et al.*, 1999⁹⁹; O'Connor *et al.*, 2007¹⁰⁰).

No curso da infecção pelo HIV, particularidades da resposta imunológica devem ser observadas, tanto no que se refere à resposta humoral quanto à resposta celular (Letvin e Walker, 2003¹⁰¹). Para desencadear uma resposta imunológica específica, os antígenos derivados do vírus são apresentados pelas células dendríticas, que são essenciais ao vírus para sua penetração no organismo, para sua produção, disseminação e provavelmente na patogenia da Aids. O controle da infecção pelo HIV necessita em primeiro lugar de uma resposta anti-HIV intensa dos linfócitos T CD4⁺, que são fundamentais na formação, manutenção e na eficácia da resposta humoral e celular anti-HIV. Declínios nas contagens globais de linfócitos T CD4⁺ auxiliares estão claramente associados à progressão do HIV, e respostas vigorosas de linfócitos T CD4⁺ anti-HIV estão associadas a uma progressão retardada para Aids (Rosenberg *et al.*, 1997¹⁰²; Ostrowski *et al.*, 2000¹⁰³; Hogan e Hammer, 2001¹⁰⁴; Kitchen *et al.*, 2004¹⁰⁵).

3.2.2.1 Resposta humoral anti-HIV

Anticorpos neutralizantes são produzidos no curso da infecção pelo HIV, e são dirigidos contra dois domínios distintos do envelope viral: os sítios de ligação à molécula CD4 da gp120 e a glicoproteína transmembrana gp41.

Estudos realizados em animais de laboratório mostraram a capacidade desses anticorpos em atenuar a patogenicidade do vírus ou mesmo em bloquear o estabelecimento da infecção, na condição que os anticorpos neutralizantes estejam presentes antes do contato com o vírus (Baba *et al.*, 2000¹⁰⁶). Anticorpos são produzidos igualmente contra a terceira alça hipervariável (V3) da glicoproteína gp120, mas não são neutralizantes contra isolados primários.

Contudo no curso da infecção crônica humana, esses anticorpos se revelam, por várias razões, muito pouco eficazes no controle do vírus. Seu aparecimento é “atrasado” em relação à disseminação do vírus no organismo (em média três semanas depois do contágio). A grande variabilidade viral provoca mudanças constantes na seqüência das glicoproteínas do envelope, particularmente no nível das alças hipervariáveis.

A presença de anticorpos exerce uma pressão de seleção sob a qual o vírus produz preferencialmente epitopos modificados que não são mais reconhecíveis. Além disso, o variável grau de glicosilação das glicoproteínas do envelope torna os epitopos dificilmente acessíveis a esses anticorpos. Enfim, pelo fato de a atividade neutralizante dos anticorpos anti-HIV ser bastante fraca, a maioria dos anticorpos produzidos ao curso da infecção não são neutralizantes e direcionam-se a “restos” virais (Poignard *et al.*, 1999¹⁰⁷).

Com um objetivo terapêutico, o melhor alvo para a obtenção de anticorpos neutralizantes eficazes é a gp41, muito conservada nos diferentes isolados virais. A estimulação da produção de anticorpos neutralizantes, associada a uma estimulação da resposta citotóxica, é o racional de todas as estratégias existentes de vacinação com vacinas inativas, como por exemplo, a vacina da gripe, e por proteínas recombinantes do envelope, como o antígeno HBs do vírus da hepatite B.

3.2.2.2 Resposta celular anti-HIV

Contrariamente às observações precedentes referindo-se à resposta humoral, e como os experimentos de depleção dos linfócitos T CD8⁺ em primatas demonstram (Schmitz *et al.*, 1999¹⁰⁸), os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos para o vírus estão implicados no controle da replicação viral (Borrow *et al.*, 1994¹⁰⁹). Estudos *in vitro* mostraram a capacidade dos CTLs em inibir a replicação viral (Walker *et al.*, 1987¹¹⁰). Essas células estão presentes em numerosos compartimentos anatômicos no indivíduo infectado pelo HIV: sangue periférico, espaços bronco-alveolares, gânglios linfáticos, baço, pele, líquido céfalo-raquidiano, secreções seminais, mucosas vaginal e gastrointestinal (Plata *et al.*, 1987¹¹¹; Voisset *et al.*, 1999¹¹²).

Os linfócitos T CD8⁺ têm importante papel no controle da infecção pelo HIV e progressão da doença, seja pela destruição das células infectadas por mecanismo citolítico ou pela inibição da disseminação viral sem alterar a função celular não-citotóxica (Ferbas, 1998¹¹³; Migueles e Connors, 2001¹¹⁴).

O mecanismo citolítico envolvido é a lise das células infectadas (exocitose) via perforina / granzimas e Fas / Fas-ligante, o que leva à morte programada decorrente da ação direta por interação das células infectadas e linfócitos T CD8⁺ específicos (Mackewicz *et al.*, 1998¹¹⁵). O mecanismo não-citolítico por sua vez é em geral associado à secreção de fatores solúveis como as β -quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Cocchi *et al.*, 1995¹¹⁶; Paroli *et al.*, 2001¹¹⁷).

Existe um fator solúvel ainda mal identificado chamado fator antiviral de células CD8⁺ (*CD8⁺ Cell Antiviral Factor – CAF*), que participaria igualmente do controle da infecção pelo HIV pelos CTLs (Levy, 2003¹¹⁸).

O controle parcial da infecção, observado após a infecção primária, está bem correlacionado no tempo com a emergência de uma resposta citotóxica específica do vírus (Koup *et al.*, 1994¹¹⁹). Os CTLs específicos para o HIV aparecem precocemente, cerca de uma semana depois do contágio. Nos primatas, CTLs anti-SIV estão presentes desde o quarto dia após uma inoculação intravenosa. É difícil avaliar precocemente essas respostas no homem, contudo admite-se um pico de atividade CTL que seria concomitante ao pico da carga viral, cerca de duas semanas depois da infecção (Koup *et al.*, 1994¹¹⁹).

As respostas anti-HIV mediadas por linfócitos T CD8⁺ são caracterizadas por sua forte intensidade e a diversidade de seu repertório (Altfeld *et al.*, 2001¹²⁰). O conjunto das proteínas virais é orientado para os CTLs, incluindo as pequenas proteínas reguladoras e acessórias (Addo *et al.*, 2003¹²¹). Os melhores epitopos para CTLs identificados nas proteínas virais situam-se nas regiões protéicas mais conservadas. Com efeito, o estudo dos epitopos presentes nas regiões mais variáveis é mais difícil. A proteína Gag é portadora de epitopos reconhecidos pelos linfócitos T CD8⁺ na maioria dos casos (Chouquet *et al.*, 2002⁷²).

A eficácia da resposta por CTLs anti-HIV é comparável à de um tratamento anti-retroviral potente. Essa resposta permite o controle relativo da infecção durante a fase assintomática, contudo é insuficiente para a erradicação total do vírus do organismo.

A progressão para a fase de Aids traduz-se por uma diminuição drástica dos linfócitos T CD4⁺, alvos principais do vírus, mas também por uma queda final nas taxas de linfócitos T CD8⁺ sangüíneos, levando a um estado de imunodeficiência progressiva, o que demonstra uma profunda alteração do sistema imunológico.

Com efeito, o bom funcionamento da resposta mediada por CTLs requer sinais de ativação e de co-estimulação fornecidos pelos linfócitos T CD4⁺ auxiliares, e, devido ao *deficit* progressivo dessas células, observa-se um defeito de diferenciação e de maturação dos CTLs, associado a deficiências funcionais, como a diminuição da produção de perforina e de citocinas (Appay *et al.*, 2000¹²²).

A resposta mediada por CTLs é constantemente solicitada pela replicação viral e é forçada a adaptar-se ao surgimento constante de novas variantes virais. Isso contribui para um fenômeno de “esgotamento das CTLs”, que se traduz por uma diminuição da eficácia da lise das células infectadas e por uma diminuição das secreções de fatores solúveis e, conseqüentemente, uma menor proteção dos linfócitos T sadios.

A resposta mediada por CTLs anti-HIV é crucial no curso da infecção pelo HIV. Com um objetivo terapêutico, a estimulação da resposta mediada pelos CTLs específicos contra o vírus parece ser um elemento chave. Esse aspecto deve ser levado nos ensaios atuais de imunoterapia e de vacinação anti-HIV.

Os métodos de detecção dos CTLs evoluíram consideravelmente nos últimos anos. O método de referência

utilizado antigamente era o teste de citotoxicidade por liberação de cromo radiativo. Esse teste com análise em diluição limitante mostrava importantes freqüências de CTLs anti-HIV (Hoffenbach *et al.*, 1989¹²³). No entanto, esse ensaio apresentava vários inconvenientes, como o fato de ser pouco quantitativo ou a introdução de um viés ligado à cultura, e assim foi progressivamente substituído por novos métodos, mais quantitativos e mais próximos da realidade *in vivo*, devido ao fato de não introduzirem viés ligado à cultura prolongada de linfócitos (Sun *et al.*, 2003¹²⁴).

Através da citometria de fluxo, é possível visualizarmos a fixação sobre o TCR de linfócitos T CD8⁺, de complexos tetraméricos de moléculas do MHC de classe I carregadas de peptídeos “ótimos”. A utilização desses tetrâmeros oferece várias vantagens, mas a sensibilidade da técnica é relativamente fraca e esse método não permite quantificar os linfócitos T CD8⁺ funcionais.

A produção de IFN- γ é provavelmente representativa da capacidade funcional dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. É possível detectar moléculas de IFN- γ ao nível intracelular por citometria de fluxo após estimulação das células pelos peptídeos e retenção de IFN- γ nas células com auxílio de brefeldina-A ou de monensina.

O ensaio de ELISPOT para determinação da secreção de IFN- γ , derivado do teste ELISA, foi desenvolvido para permitir a detecção das moléculas de IFN- γ secretadas por cada clone de células após estimulação pelos peptídeos, capturadas sobre uma membrana recoberta com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ . Inicialmente, ele foi desenvolvido para análise de células secretoras de anticorpos específicos, entretanto tem sido adaptado para enumeração de células que secretam outras moléculas efetoras, tais como citocinas, quimiocinas e granzimas (Miyahira *et al.*, 1995¹²⁵; Herr *et al.*, 1996¹²⁶).

O ELISPOT para IFN- γ mede a habilidade de linfócitos T de memória de secretar IFN- γ em resposta a um antígeno específico, permitindo a detecção, enumeração e caracterização das células secretoras desta citocina (Schmittel *et al.*, 2001¹²⁷; Sun *et al.*, 2003¹²⁴). Este ensaio tem sido amplamente empregado como um método para detecção de células antígeno-específicas por vários grupos no estudo da resposta imune específica em infecções virais e por parasitas (Yang *et al.*, 2000¹²⁸; Flanagan *et al.*, 2001¹²⁹; Chapman *et al.*, 2002¹³⁰), e no monitoramento de ensaios clínicos de vacinas candidatas anti-HIV, pois apresenta uma alta especificidade e uma alta sensibilidade, além de permitir uma avaliação detalhada de regiões exatas do HIV, bem como o número de epitopos

reconhecidos, utilizando um número limitado de CMSP (Novitsky *et al.*, 2001¹³¹; Mashishi e Gray, 2002¹³²; Draenert *et al.*, 2003¹³³; Addo *et al.*, 2003¹²¹).

A escolha dos peptídeos que permitem essa ativação das células é muito importante a fim de obtermos um resultado representativo dos antígenos efetivamente reconhecidos pelos linfócitos T CD8⁺ de cada indivíduo. Esses peptídeos devem ser peptídeos “ótimos” restritos ao HLA do indivíduo. Peptídeos sobrepostos abrangendo o conjunto da seqüência de uma proteína viral são bastante utilizados atualmente, de maneira a restringir o número de células necessárias ao estudo e a livrar-se da restrição ao HLA.

3.3 Indivíduos não progressores por longo tempo (LTNP)

Uma minoria dos indivíduos infectados pelo HIV, cerca de 1 a 3%, possui uma progressão mais lenta no curso da evolução da doença. A infecção nesses indivíduos pode ser controlada durante 15, às vezes 20 anos, antes de entrar na condição de Aids propriamente dita (Buchbinder e Vittinghoff, 1999¹³⁴).

Coortes desses indivíduos particulares, denominados na literatura “Não Progressores por Longo Tempo” (LTNP) ou “Sobreviventes por Longo Tempo” (LTS) têm sido constituídas em vários países com o objetivo de identificar quais fatores ligados ao hospedeiro, seu ambiente e ao agente infeccioso determinam esse tipo de evolução clínica. A identificação de possíveis fatores de proteção contra a evolução da doença pode esclarecer as razões de sua progressão lenta e é importante para futuras opções terapêuticas para o tratamento da infecção pelo HIV.

Na França, indivíduos LTNP foram incluídos desde 1994 na coorte nacional de pacientes assintomáticos por longo tempo (*Patients Asymptomatiques à Long Terme – ALT*). No Brasil, até o momento não temos registro de uma coorte desse porte, apenas encontramos grupos de pesquisas que estudam alguns desses indivíduos, isoladamente.

O conjunto dos estudos realizados na França com os indivíduos da coorte ALT, em acordo com os dados da literatura sobre os indivíduos LTNP, não permite concluir que exista um único mecanismo que explique a progressão lenta da infecção pelo HIV nesses indivíduos. Contudo é possível distinguir três mecanismos que parecem estar particularmente implicados no controle eficaz da infecção pelo HIV nos indivíduos LTNP:

A) Infecção por isolados virais atípicos:

Deleções ou mutações em genes do próprio vírus, diminuindo a virulência do HIV, têm sido sugeridas como prováveis causas para a não progressão em indivíduos LTNP. Os determinantes dos vírus que infectam esses indivíduos LTNP foram pesquisados. A frequência de mutações nos genes das proteínas virais acessórias (*nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* e *vpu*) parece mais elevada nos indivíduos LTNP (Walker *et al.*, 1986¹³⁵; Schwartz *et al.*, 1996¹³⁶).

Os isolados virais dos indivíduos LTNP da coorte francesa ALT apresentaram mutações específicas na seqüência do gene *vif* (Hassaine *et al.*, 2000¹³⁷). Pesquisadores também encontraram em indivíduos LTNP do Canadá e dos EUA mutações freqüentes na seqüência do gene *vpr*, associadas a uma diminuição da apoptose dos linfócitos infectados (Lum *et al.*, 2003¹³⁸). A diminuição da apoptose também foi observada anteriormente nos indivíduos LTNP (Liegler *et al.*, 1998¹³⁹).

A presença nos indivíduos LTNP de mutações no gene *nef*, envolvido na modulação por endocitose das moléculas CD4 e HLA de classe I, além de ser essencial para as altas cargas virais necessárias para uma infecção importante, foi particularmente

estudada (Saksena *et al.*, 1996¹⁴⁰; Visco-Comandini *et al.*, 1998¹⁴¹; Brambilla *et al.*, 1999¹⁴²; Gómez-Roman *et al.*, 2000¹⁴³; Birch *et al.*, 2001¹⁴⁴). Ao escapar do sistema imunológico do hospedeiro, o HIV conta com a participação de Nef. Um dos papéis desta proteína viral é a *down-regulation* das moléculas do MHC de classe I, a fim de limitar a apresentação dos antígenos virais na superfície das células infectadas. A presença de deleções em *nef* é, portanto, deletéria para o vírus, e a infecção é então mais bem controlada pelo indivíduo infectado. No curso de ensaios de vacinação com primatas, utilizaram-se isolados virais atenuados por deleções no gene *nef*, que permitiram proteger o animal de uma infecção por um vírus “selvagem” (Almond *et al.*, 1995¹⁴⁵).

B) Haplótipos HLA particulares:

As moléculas do MHC (pertencendo no homem ao sistema Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigen* – *HLA*)) permitem a apresentação de um grande número de antígenos diferentes às células efectoras do sistema imunológico. O polimorfismo dos genes do MHC é favorecido por uma transmissão autossômica co-dominante sob forma de haplótipos. Certas associações de alelos

são mais freqüentes que outras (desequilíbrio de ligação). Na infecção pelo HIV, a apresentação de peptídeos antigênicos derivados do vírus pode ser mais ou menos eficaz segundo os alelos HLA do hospedeiro (Kaslow *et al.*, 1996¹⁴⁶).

Existem, por conseguinte, determinantes genéticos condicionando a evolução da doença. Certos alelos HLA, geralmente alelos pouco freqüentes na população geral, estão associados na literatura a uma progressão mais lenta no curso da infecção pelo HIV. Assim, a presença dos alelos A24, B35, B37, B56 e Cw4 está correlacionada a um risco de progressão mais rápido para a fase de Aids, enquanto que os alelos A3, A32, B14, B27, B57, Cw8 e DPB1 são, ao contrário, encontrados mais freqüentemente nos indivíduos não progressores por longo tempo (Carrington *et al.*, 1999¹⁴⁷; Hendel *et al.*, 1999¹⁴⁸; Migueles *et al.*, 2000¹⁴⁹; Carrington e O'Brien, 2003¹⁵⁰; Letvin e Walker, 2003¹⁰¹; Trachtenberg *et al.*, 2003¹⁵¹; Jansen *et al.*, 2005¹⁵²).

Uma análise estatística multivariada dos indivíduos incluídos na coorte francesa ALT permitiu determinar a probabilidade para esses indivíduos de conservar seu *status* LTNP em função dos seus haplótipos HLA e do genótipo de seus receptores de quimiocinas (CCR5 e CCR2) ou da quimiocina SDF-1 (Magierowska *et al.*, 1999¹⁵³).

No que se refere ao alelo HLA DR1, os dados da literatura são contraditórios: a presença deste alelo parece antes ligada a uma progressão rápida da doença (Mann *et al.*, 1988¹⁵⁴; Just, 1995¹⁵⁵), porém isso é demonstrado sobretudo no conjunto de um haplótipo HLA que comporta igualmente o alelo B35 (Roger, 1998¹⁵⁶). A equipe da Dra. Brigitte Autran mostrou, ao contrário, que o alelo HLA DR1 é associado a uma resposta específica para o HIV mediada por linfócitos T CD4⁺ e uma carga viral baixa, nos indivíduos da coorte francesa ALT (Autran *et al.*, 2001¹).

Vários epitopos antigênicos virais são descritos como sendo apresentados por moléculas DR1 do MHC de classe II (Korber *et al.*, 2001¹⁵⁷). Assim sendo, parece ser particularmente interessante estudar os indivíduos LTNP portadores do alelo HLA DR1 com mais detalhes. Colaborações estabelecidas com o laboratório da Dra. Brigitte Autran, em Paris, têm permitido uma confrontação com dados obtidos *in vivo* no camundongo transgênico humanizado HLA A2-DR1, e a obtenção de resultados com auxílio de tetrâmeros HLA DR1 apresentando epitopos da proteína p24 do HIV-1.

¹ Autran B, Bonduelle O, Theodorou I, Goubar A, Alatrakchi N, Agut H, Debré P, Costagliola D (Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France). Apresentado na *the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*; 2001; Chicago, EUA.

C) Resposta imunológica celular anti-HIV eficaz:

O reconhecimento do HIV ou de células infectadas com o HIV pelo sistema imunológico é freqüentemente tido como defeituoso em razão da grande variabilidade do vírus (Phillips *et al.*, 1991¹⁵⁸; Harcourt *et al.*, 1998¹⁵⁹). Linfócitos T CD8⁺ específicos anti-HIV estão presentes, portanto, em forte proporção no sangue dos indivíduos infectados (Migueles e Connors, 2001¹¹⁴). Em indivíduos LTNP, as respostas dos linfócitos T CD8⁺ anti-HIV são muito importantes: numerosos trabalhos mostram respostas de forte amplitude e dirigidas contra uma diversidade grande de epitopos (Haas *et al.*, 1996¹⁶⁰; Harrer *et al.*, 1996a¹⁶¹; Harrer *et al.*, 1996b¹⁶²; Pedersen *et al.*, 1997¹⁶³; Propato *et al.*, 2001¹⁶⁴).

A resposta celular no seu conjunto parece mais eficaz nos indivíduos LTNP, uma vez que eles apresentam igualmente respostas mais fortes contra outros antígenos virais como os da hepatite C (Alatrakchi *et al.*, 2002¹⁶⁵; Valdez *et al.*, 2002¹⁶⁶). Pontesilli *et al.*¹⁶⁷, em 1998, afirmaram que as respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ anti-HIV dos indivíduos LTNP são persistentes com o tempo e parecem ser particularmente dirigidas contra epitopos da proteína viral Gag.

Os linfócitos T CD8⁺ dos indivíduos LTNP seriam igualmente capazes de atingir os “reservatórios” virais do organismo, como os órgãos linfóides, no intuito de eliminar os linfócitos T CD4⁺ infectados através de sua ação citotóxica (Chun *et al.*, 2001¹⁶⁸). Infelizmente, esta toxicidade mediada pelos linfócitos T CD8⁺, associada à ação citolítica própria do vírus, provoca a eliminação massiva dos linfócitos T CD4⁺ infectados, dando origem em longo prazo à imunossupressão grave dos indivíduos HIV soropositivos (Yamada e Iwamoto, 2000¹⁶⁹).

A resposta imunológica celular anti-HIV parece ser, assim, um dos principais parâmetros que permite prolongar a duração da fase assintomática. Dessa forma, uma caracterização precisa dessa resposta é primordial, a fim de se pesquisarem os meios para reforçá-la.

Outros mecanismos que participariam na progressão lenta dos indivíduos LTNP na infecção pelo HIV também foram citados: uma diminuição da apoptose espontânea (Liegler *et al.*, 1998¹³⁹); uma atividade neutralizante dos anticorpos anti-HIV mais importante que nos indivíduos progressores (Djordjevic *et al.*, 2007¹⁷⁰); uma proporção mais importante de linfócitos T CD8⁺ portadores de um TCR $\gamma\delta$ (Bodman-Smith *et al.*, 2001¹⁷¹); a manutenção ao longo do tempo da utilização do co-receptor CCR5 (Masciotra *et al.*, 2002¹⁷²).

Dessa forma, acreditamos que o controle particularmente eficaz da infecção pelo HIV, permitindo a manutenção desses indivíduos em um *status* LTNP, parece ter uma origem multiparamétrica. Portanto, são necessários estudos mais elaborados do *status* LTNP, incluindo: avidéz, repertório de epitópos, intensidade da resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ etc. (Maecker e Maino, 2003¹⁷³).

Na coorte francesa ALT, os trabalhos realizados colocaram em evidência uma correlação do *status* LTNP com uma viremia e uma carga viral associada às células reduzidas (Candotti *et al.*, 1999a¹⁷⁴). No sangue periférico dos indivíduos LTNP, as células infectadas são menos numerosas que nos indivíduos progressores (Candotti *et al.*, 1999b¹⁷⁵). Os linfócitos T CD4⁺ do tipo T_H1 são capazes de respostas importantes contra antígenos do HIV, mas também contra outros antígenos, como os derivados do vírus da hepatite C (Alatrakchi *et al.*, 2002¹⁶⁵). Além disso, a presença de uma taxa elevada de imunoglobulinas do tipo IgG2 dirigidas contra a glicoproteína gp41 do envelope do HIV, revelou-se favorável na coorte ALT (Ngo-Giang-Houong *et al.*, 2001¹⁷⁶).

Dentre os diferentes mecanismos evocados, a resposta imunológica celular anti-HIV mediada por linfócitos T CD8⁺ parece ser de importância capital para o controle “ótimo” da infecção pelo HIV nos indivíduos LTNP (Betts *et al.*, 2006¹⁷⁷).

Ela tem sido relativamente pouco estudada até o presente momento na coorte francesa ALT e no Brasil.

Novas tecnologias de exploração dessa resposta, notadamente o teste de ELISPOT para IFN- γ , utilizando peptídeos sobrepostos representativos de regiões do HIV potencialmente antigênicas, e a citometria de fluxo estão atualmente disponíveis no Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do Hospital Pitié-Salpêtrière de Paris-França, e permitiram a realização deste trabalho.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

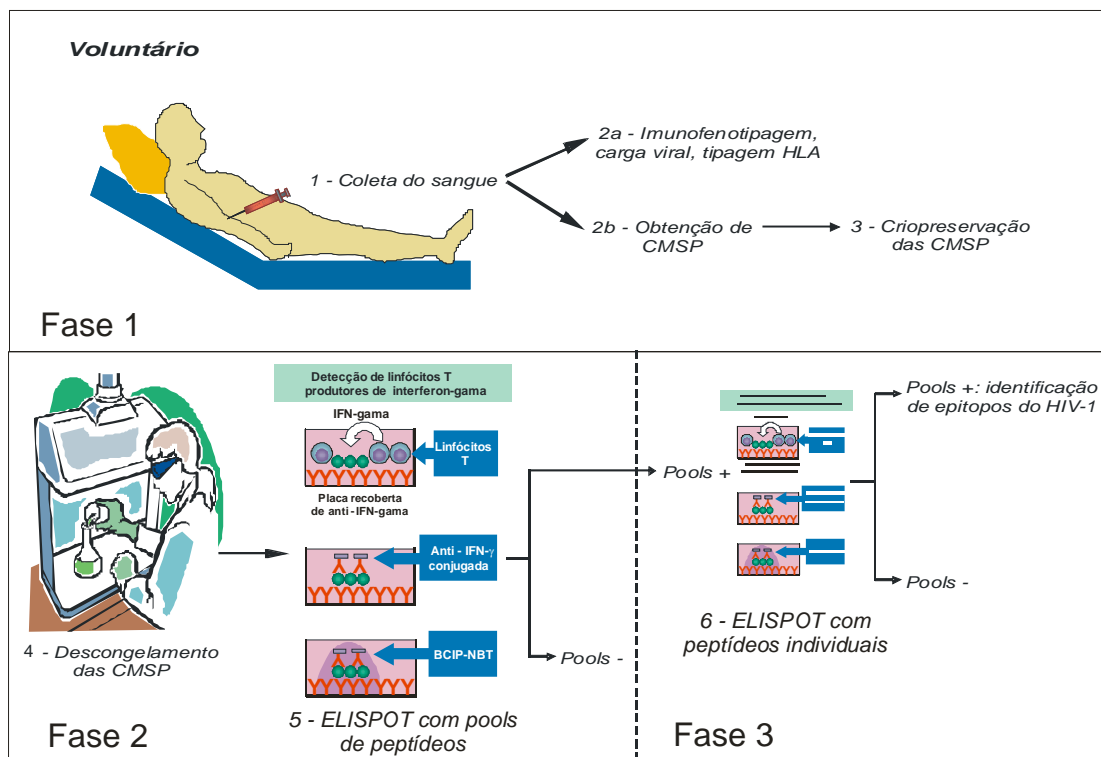


Figura 12. Delineamento experimental do projeto

4.2 Pacientes

Em 1994, foi criada na França uma coorte nacional com o objetivo de estudar indivíduos infectados pelo HIV com um *status* particular, dentre os soropositivos que eram acompanhados nos hospitais da rede de saúde pública francesa. Esta coorte foi denominada: “Assintomáticos por Longo Tempo” (*Asymptomatiques à Long Terme* – ALT), e foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas.

Cada indivíduo, para ser incluído na coorte ALT, deveria responder aos seguintes critérios:

- a) Infecção pelo HIV-1 diagnosticada por métodos sorológicos e ser assintomático em relação ao vírus por pelo menos oito anos;
- b) Contagem de linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico superiores a 500 células/mm³ no momento da avaliação para entrada no estudo e em todas as imunofenotipagens anteriores, por no mínimo cinco anos;
- c) Ausência de terapia anti-retroviral desde o diagnóstico até o início do estudo, independentemente da carga viral.

Todos os indivíduos selecionados e incluídos na coorte ALT foram convidados a participar voluntariamente deste estudo, e forneceram seu consentimento assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após lerem o documento e discutirem eventuais dúvidas com os pesquisadores envolvidos no projeto.

4.2.1 Características da população estudada

Dos 26 indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, 92% (24 indivíduos) preenchem os requisitos para participar deste estudo (coorte ALT), tendo sido selecionados e estudados. Dois indivíduos foram selecionados e incluídos como controles da reação: o indivíduo 4073, infectado pelo HIV-2, previamente testado, que não apresentava resposta aos peptídeos utilizados, e o indivíduo 5007, infectado pelo HIV-1 com rápida progressão para Aids. Os voluntários tinham entre 29 e 65 anos, sendo 21 (81%) do sexo masculino e 5 (19%) do feminino.

De modo geral, o comportamento de risco predominante foi o sexual. Dos indivíduos estudados, 77% (20/26)

eram homo ou heterossexuais promíscuos. Entre os homens, 67% (14/21) eram homossexuais. Três indivíduos (12%; dois homens e uma mulher), entre os 26 estudados, foram contaminados por transfusão sangüínea. Dois participantes deste estudo (8%; um homem e uma mulher), eram usuários de drogas endovenosas.

As características dos indivíduos estão agrupadas na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Sexo	Idade	Comportamento de Risco	Status Imunológico	Haplótipo HLA classe I			Linfócitos T CD4 ⁺ / mm ³					Carga Viral (cópias / mL)				
					A	B	Cw	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5
2002	M ¹	40	Homossexual	ALT ⁶	A2/A31	B21/B57	Cw6/Cw7	1286	1895	1432			350	830	1205		
2009	M		Homossexual	ALT	A1/A3	B51/B57	Cw6/Cw8	902					210	200	200		
2014	M		Homossexual	ALT	A1/A2	B8/B13	Cw6/Cw7		902				2400	1472	1015		
4030	F ²	32	UDE ³	ALT	A2/A31	B44/B51	Cw5	715		827	686	1011	36		800	200	200
4034	F	33	Transfusão ⁴	ALT	A2/A68	B27/B35		559	528	559	634	438	20	800	800	200	200
4035	M		Homossexual	ALT	A2/A23	B14/B18	Cw7/Cw8						50	800	800	200	200
4046	M	65	Homossexual	ALT	A28/A32	B14/B44	Cw5/Cw8	679	728	589	690		50	800	800	200	
4050	M		Homossexual	ALT	A1/A2	B51/B57	Cw7						135	1460	840		
4053	M	40	Homossexual	ALT	A2/A3	B27/B57	Cw2Cw6	613	655	465			1980	2400	1239		
4054	M		Homossexual	ALT	A3/A32	B14/B27	Cw2/Cw8		642	574			30	800	2000	200	517
4065	M		Homossexual	ALT	A3/A28	B8/B57	Cw6/Cw7						115	800	943	201	1246
4073	M		ND ⁵	Controle -	A2/A29	B44/B72	Cw2	677					200				
4075	M	44	Homossexual	ALT	A32/A33	B27/B65	Cw1	575	585	498			120	800	200		
5002	M	29	Transfusão	ALT	A3/A33	B65	Cw4	730	543	949	742	540	132000	180000	54000	46000	70290
5007	M		UDE	Controle -	A2/A33	B56/B65	Cw1	279					15600				
5012	M	34	Homossexual	ALT	A1/A3	B14/B57	Cw6	423	501				11800	22000			
6002	M	39	Hemofílico	ALT	A3/A11	B27/B38	Cw2	664	828	440	320	274	210	800	15000	845	872
8005	M	38	Homossexual	ALT	A1/A11	B8/B35	Cw4/Cw7	790					60				
8011	M	32	Heterossexual	ALT	A11/A32	B27	Cw1/Cw2	780	655	701			20	800	310	200	
8021	M	35	Homossexual	ALT	A26/A29	B35/B36	Cw4	733	694				3800	9800			
9015	M	49	Homossexual	ALT	A2/A24	B7/B57	Cw4/Cw7	600	496	463	522		110	800	200	200	
11012	M	36	Homossexual	ALT	A23/A68	B27/B44		505	465	513	531		220000	92000	112000	1795	
11018	F	38	Heterossexual	ALT	A1/A26	B18/B57	Cw5/Cw6	669	712				20	800			
11021	M	31	Heterossexual	ALT	A24/A26	B14/B57	Cw6	639	719				520	330			
11024	F	39	Heterossexual	ALT	A11/A33	B14/B61		848	828	861	807		90	800	465	200	
13010	F	41	Heterossexual	ALT	A2/A69	B14/B51		818	635	910			30	800	200		

¹ Masculino; ² Feminino; ³ Usuário de droga endovenosa; ⁴ Transfusão de sangue; ⁵ Não determinada; ⁶ Assintomático por longo tempo.

Dos indivíduos infectados pelo HIV-1, LTNP, 83,3% (20/24) possuíam pelo menos um dos antígenos HLA de classe I associados na literatura à progressão lenta e/ou proteção para Aids: A3, A32, B14, B27, B57 e Cw8 (Tabela 1). O indivíduo 5007, com rápida progressão para Aids, apresentava, ao contrário, o antígeno B56, associado à rápida progressão para Aids.

4.3 Processamento das amostras, imunofenotipagem e carga viral

Amostras de sangue heparinizado foram coletadas de todos os participantes selecionados para fracionamento em plasma e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e de sangue em EDTA para realização de imunofenotipagem de linfócitos e quantificação da carga viral. As amostras foram processadas até 12 horas após a coleta.

O exame de quantificação da carga viral foi efetuado pela rotina do Laboratório de Virologia do Hospital Pitié-Salpêtrière depois da extração do RNA viral (técnica Qiagen) através da técnica de PCR quantitativo após a etapa de

retrotranscrição do RNA em cDNA, em equipamento automatizado Amplicor HIV® (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA).

A quantificação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sangüíneos (imunofenotipagem) foi realizada na rotina do Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do Hospital Pitié-Salpêtrière. Após marcação tripla com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD3 e anti-CD45, ou anti-CD8, anti-CD3 e anti-CD45, seguida de lise das hemácias, as células marcadas foram quantificadas em citômetro de fluxo BD FacsCalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.4 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMSP)

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através de punção venosa em tubos estéreis (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram coletados de cada indivíduo 70,0 mililitros (mL) de sangue periférico em heparina e 10,0 mL de sangue em EDTA para os testes dependentes de PCR (carga viral) e citometria de fluxo (imunofenotipagem).

4.5 Separação de CMSP

Amostras de sangue periférico foram diluídas 1:2 em meio RPMI estéril (Meio RPMI 1640 sem L-Glutamina; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) em tubos Falcon de 50,0 mL estéreis (Corning B.V. Life Sciences®, Schiphol-Rijk, The Netherlands) e, em seguida, separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/L; Amersham, Les Ulis, France). Usualmente, foram utilizados 30,0 mL de amostra de sangue periférico diluído em RPMI mais 15,0 mL de Ficoll-Hypaque. Após centrifugação a 2200 rpm (rotações por minuto) equivalentes a 840 vezes a aceleração gravitacional (840 x g) por 20 minutos à temperatura de 20-25 °C, os anéis de células mononucleares foram coletados, transferidos para tubos de polipropileno de 50,0 mL (Falcon®, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) estéreis, completados a 45,0 mL com RPMI estéril, homogeneizados para lavar as células e centrifugados a 1700 rpm (500 x g) por 10 minutos à temperatura de 20 °C. O meio RPMI foi desprezado e os botões celulares foram ressuspensos em meio RPMI estéril (q.s.p. 45,0 mL). Foi realizada nova centrifugação a 1500 rpm (390 x g) por 10 minutos a 20 °C visando eliminar as plaquetas.

O RPMI foi, então, totalmente desprezado e os botões celulares foram ressuspensos em 2,0 mL (ou mais, quando o botão celular era muito espesso) de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado e estéril (RPMI-SBF) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Para a preparação de 500,0 mL de meio RPMI suplementado, foram utilizados 450,0 mL de meio RPMI (Meio RPMI 1640 sem L-Glutamina; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescidos de 1% de aminoácidos não essenciais 10,0 milimolar (mM) 1% de piruvato de sódio 100,0 mM, 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B e 1% de L-glutamina 200,0 mM e 50,0 mL de SBF (todos obtidos de Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Malassez (PROLABO®, Fontenay-Sous-Bois, France).

4.6 Criopreservação de CMSP

As células coletadas durante todo o período de acompanhamento após a inclusão dos indivíduos na coorte ALT foram criopreservadas para utilização posterior.

As suspensões de CMSP foram centrifugadas a 1200 rpm (153 x g) durante oito minutos, ressuspensas em solução de

congelamento constituída de 50% de SBF, 40% de meio RPMI suplementado e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Quentin, France) e transferidas para tubos de criopreservação de 1,8 mL (Nalgene®, NUNC, Roskilde, Denmark) em um volume final de 1,0 mL por tubo.

Os tubos com as suspensões de CMSP foram, então, colocados para serem resfriados em recipientes apropriados contendo isopropanol (Cryo 1 °C Freezing Container, "Mr. Frosty", Nalgene®, NUNC, Roskilde, Denmark), que foram transferidos para freezer a -20 °C por 30 minutos, em seguida para freezer a -80 °C por 24 horas, e então transferidos para serem conservados em nitrogênio (N₂) líquido (-196 °C). Os tubos continham cinco, 10 ou 15 x 10⁶ de células, conforme a quantidade total de CMSP obtida de cada indivíduo.

4.7 Descongelamento de CMSP

As suspensões de CMSP criopreservadas em N₂ líquido foram rapidamente descongeladas em banho-Maria a 37 °C (tempo máximo: 10 minutos); em seguida, transferidas para tubos Falcon de 15,0 mL contendo 10,0 mL de meio RPMI suplementado

com 20% de SBF (um tubo Falcon para cada tubo criopreservado). Após centrifugação por oito minutos a 1400 rpm (208 x g) a 4 °C (Megafuge 2.0R HERAEUS®), os botões celulares foram ressuspensos e lavados com 10,0 mL de RPMI suplementado com 20% de SBF, em seguida centrifugados novamente [oito minutos a 1400 rpm (208 x g) a 4 °C] e ressuspensos em 2,0 mL de RPMI suplementado com 5% de SBF e homogeneizados.

A viabilidade das CMSP foi avaliada de acordo com a contagem das células após homogeneização, em câmaras de Malassez após diluição 1:10 com corante azul de Tripán (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), previamente diluído 1:6 em cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril.

As suspensões de CMSP foram, então, ajustadas para 1×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 5% de SBF, e transferidas para frascos de 25 cm² (Corning B.V. Life Sciences®, Schiphol-Rijk, The Netherlands) e, posteriormente, incubadas por 16 horas (preferencialmente no período noturno - *overnight*) em estufa com 5% de gás carbônico (CO₂).

Em seguida, as suspensões de CMSP foram coletadas e transferidas para tubos Falcon de 15,0 mL contendo 10,0 mL de meio RPMI suplementado com 20% de SBF.

Após centrifugação por oito minutos a 1400 rpm (208 x g) a 25 °C, os botões celulares foram ressuspensos e lavados com 10,0 mL de RPMI suplementado com 20% de SBF, depois centrifugados novamente [oito minutos a 1400 rpm (208 x g) a 25 °C] e ressuspensos em 2,0 mL de RPMI suplementado com 20% de SBF.

A viabilidade funcional das CMSP foi avaliada após incubação das células a 37 °C *overnight* através dos ensaios de ELISPOT IFN- γ com *pools* de peptídeos do HIV-1.

Um bom procedimento de congelamento e descongelamento garantiu uma viabilidade das CMSP igual ou superior a 85%, necessário para a realização dos ensaios.

4.8 Peptídeos sintéticos do HIV-1

A resposta de linfócitos T aos antígenos virais foi estimada pela caracterização da reatividade de linfócitos T em CMSP isoladas de cada participante do estudo a *pools* de peptídeos sintéticos, derivados do HIV-1, isolado HXB2 (NeoMPS®, Strasbourg, France). Os peptídeos utilizados, no total de 192, correspondem à seqüência protéica completa de Gag e regiões imunodominantes

das proteínas transcriptase reversa (RT) e Nef do vírus. Foram sintetizados 18 *pools* de peptídeos compostos por 15 aminoácidos (aa) cada, com sobreposição de 11 aa: 11 *pools* da proteína Gag (10 *pools* de 11 peptídeos e um *pool* de 15 peptídeos), quatro *pools* da proteína RT (um *pool* de 13 peptídeos, um *pool* de 12 peptídeos e dois *pools* de oito peptídeos) e três *pools* da proteína Nef (dois *pools* de 10 peptídeos e um *pool* de seis peptídeos) (Tabela 2). Em seguida, o estudo foi refinado pela análise de cada peptídeo um a um. Os diferentes peptídeos e *pools* de peptídeos correspondentes à proteína Gag estão esquematizados na figura 13. O mesmo princípio foi aplicado para a síntese dos peptídeos de RT e Nef. A tabela 2 resume as seqüências produzidas pela totalidade dos peptídeos utilizados.

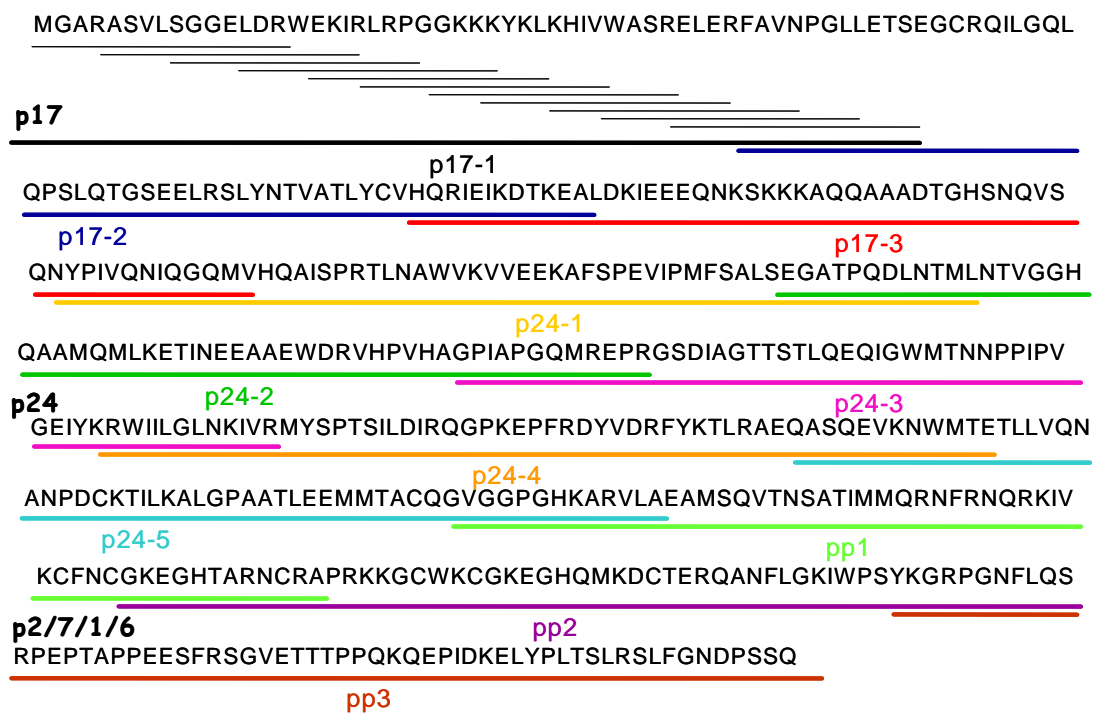


Figura 13. Representação esquemática dos peptídeos de Gag utilizados. Cada traço preto representa um peptídeo de 15 aminoácidos em extensão, com sobreposição de 11 aminoácidos, e a seqüência correspondente a cada *pool* de peptídeos está sublinhada com uma cor específica

Tabela 2 – *Pools* de peptídeos, seqüência dos aminoácidos reproduzidos pelos *pools* utilizados, número de peptídeos compondo cada *pool* e posição na proteína viral (HIV-1, HXB2)

Pool	Seqüência	N° de peptídeos	Posição na proteína
p17-1	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLBHIVWASRELERFAVNPGLLETSE	11	Gag 1-55
p17-2	AVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKE	11	Gag 45-99
p17-3	HQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQM	11	Gag 89-143
p24-1	PIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMF SALSEGATPQDLNTM	11	Gag 133-187
p24-2	EGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREP	11	Gag 177-231
p24-3	GPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIVGEIYKRWIILGLNKIVR	11	Gag 221-275
p24-4	WIILGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTE	11	Gag 265-319
p24-5	ASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL	11	Gag 309-363
pp1 ¹	VGGPGHKARVLAEAMSQVTNSATIMMQRNFRNQRKIVKCFNCGKEGHTARNCR	11	Gag 353-407
pp2	KEGHTARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQS	11	Gag 397-451
pp3	YKGRPGNFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ	15	Gag 441-512
RT-1	MPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGMEW	13	RT 293-352
Nef-1	PFKNLKTGMEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC	6	Nef 181-206
RT-2	ELHPEYFKNCKLMAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYQYMDL	8	RT 157-187
RT-3	DIVIYQYMDL YVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTMVG	8	RT 177-216
Nef-2	LLRWGLTTMVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQ	10	Nef 65-107
Nef-3	LEGLIHSQRRQDILD LWIYHTQGYFPDXQNYTPGPGVRYPLTFGW CYKLVP	10	Nef 97-147
RT-4	LTFGW CYKLVP MIETVPV KLPKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGP	12	RT 4-52

¹ Proteínas de Gag: p2, p7, p1, p6

Os peptídeos foram recebidos sob a forma liofilizada e subsequentemente dissolvidos em água para preparação injetável a uma concentração de 0,5 mg/mL (solução-estoque primária), aliquotados em 1,0 mL e conservados a -80 °C. Para a constituição dos *pools*, seis a 15 peptídeos (segundo o caso) foram misturados e ajustados a uma concentração de 40,0 µg/mL de cada peptídeo em água para preparação injetável (solução-estoque secundária) e conservados a -20 °C.

4.9 Ensaio ELISPOT Interferon-Gama (IFN- γ)

A quantificação de células produtoras de IFN- γ após uma estimulação pelos peptídeos do HIV pode ser esquematizada pela figura 14.

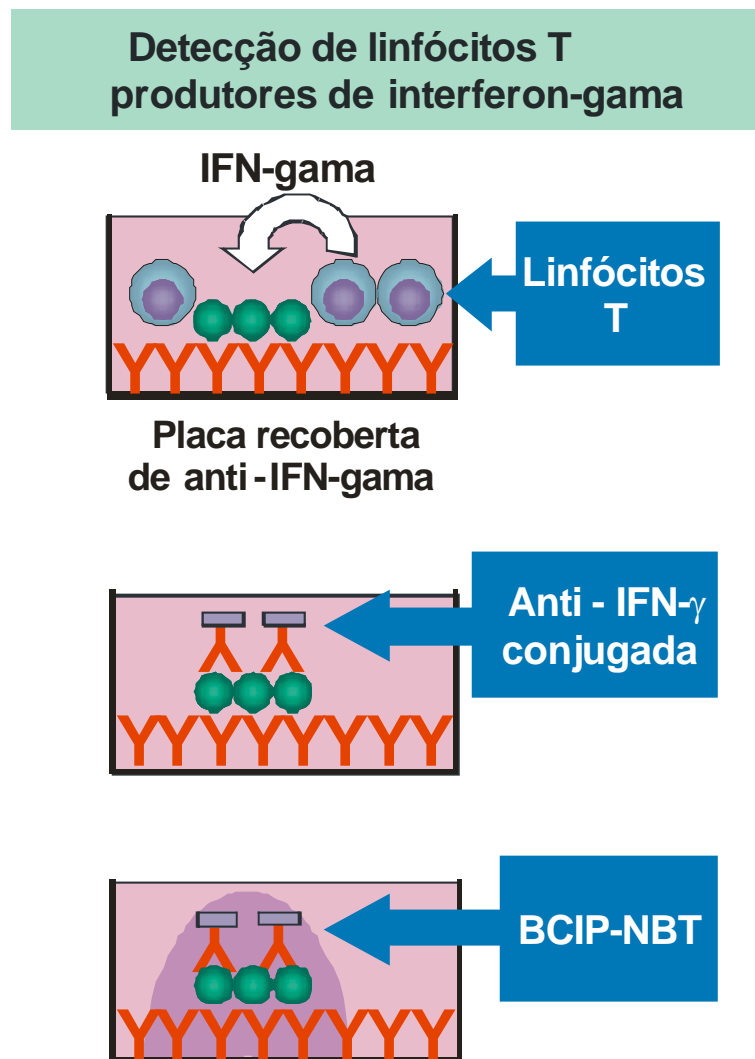


Figura 14. Etapas do ensaio ELISPOT IFN- γ

4.9.1 Sensibilização das placas

Os ensaios foram realizados em placas de filtração com 96 poços (Millipore Immobilon P membrane®, MAIPS 4510,

Molsheim, France). As placas foram previamente lavadas três vezes com tampão salina-fosfato 0,01 M, pH 7,4 (PBS; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) estéril (200,0 µL/poço) com auxílio de pipeta multicanal, sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN-γ humano (Diaclone®, Besançon, France) diluído a 1,0 µg/mL em PBS estéril (100,0 µL/poço) e incubadas por 18 horas (preferencialmente *overnight*) a 4 °C.

4.9.2 Bloqueio das placas

As placas foram em seguida lavadas de maneira estéril três vezes com PBS (200,0 µL/poço) a fim de eliminar o excesso de anticorpos de captura não fixados à membrana. Para saturar os sítios, as placas foram bloqueadas com RPMI-SBF estéril (100,0 µL/poço) com auxílio de pipeta multicanal e incubadas por 30 minutos a 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

4.9.3 Depósito e estimulação das suspensões celulares com estímulos antigênicos

Após a eliminação do RPMI-SBF, as suspensões de células (CMSP) foram distribuídas nas placas de filtração com 96 poços em uma concentração final de 1×10^5 células/poço (100,0 μL /poço) e estimuladas com 18 *pools* de peptídeos sintéticos do HIV-1, diluídos a uma concentração final de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por *pool* de peptídeo (100,0 μL /poço). Assim, cada poço continha 100.000 células estimuladas pelos *pools* de peptídeos a 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sob um volume final de 200,0 μL de RPMI-SBF. As placas foram então incubadas por 20 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 . Os ensaios foram realizados em triplicata, e seis poços suplementares foram utilizados como controles: três poços contendo apenas a suspensão celular em meio RPMI-SBF (controle negativo) e três poços contendo a suspensão celular estimulada pela fitohemaglutinina P (Phytohemagglutinin P, PHA) (Murex, Paris, France) a uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo).

Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS (200,0 μL /poço), três vezes com PBS contendo 0,05% de

Tween 20 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany) (PBS-Tween; 200,0 μ L/poço) e novamente três vezes com PBS (200,0 μ L/poço), com auxílio de lavador automático para placas de filtração com 96 poços (TECAN Hydroflex®, Zürich, Switzerland).

Nos casos em que observamos respostas positivas, desmembramos os *pools* através de um segundo ensaio de ELISPOT IFN- γ , utilizando dessa vez os peptídeos individuais constituintes dos *pools*, diluídos a uma concentração final de 5,0 μ g/mL (concentração inicial: 40,0 μ g/mL) por peptídeo (100,0 μ L/poço).

4.9.4 Revelação e leitura

O IFN- γ produzido pelas células estimuladas pelos peptídeos do HIV-1, e capturado na membrana pelo primeiro anticorpo (de captura), foi detectado por um segundo anticorpo de revelação, específico e biotinizado.

Após a etapa de lavagem, alíquotas de um anticorpo anti-IFN- γ biotinizado (Diaclone®, Besançon, France) diluído a 1:500 em PBS adicionado de 5,0 g de albumina sérica bovina e 1,0 g de azida de sódio por litro (PBS-BSA 0,5%) foram adicionadas às

placas (100,0 μL /poço). As placas foram novamente incubadas por quatro horas a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 .

Seguiram-se três novas lavagens em PBS (200,0 μL /poço), e então uma solução de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (GE Amersham, Piscataway, NJ, USA), diluída a 1:1000 em PBS-BSA 0,5% foi distribuída nos poços de cada placa (100,0 μL /poço). As placas foram incubadas novamente por 1 hora a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 e, subseqüentemente, lavadas três vezes em PBS (200,0 μL /poço). A seguir, o substrato da enzima: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), associado ao agente catalisador *nitroblue tetrazolium* (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), foi adicionado às placas (50,0 μL /poço).

Após 10-15 minutos de nova incubação a 25 °C, *spots* (pontos de cor violeta) correspondentes à produção de $\text{IFN-}\gamma$ pelas células estimuladas foram evidenciados nos poços das placas, que foram novamente lavadas três vezes em água destilada (200,0 μL /poço), a fim de interromper as reações enzimáticas, e colocadas para secar durante 24-48 horas, totalmente protegidas de luminosidade. Os *spots* presentes em cada poço foram contados em um leitor automatizado de ELISPOT: um microscópio (Axioplan-2 Imaging ZEISS®. Jena, Germany) auxiliado por uma câmara (Sony®,

Tokyo, Japan) ligado a um microcomputador, permitindo uma leitura automática graças ao *software* KS ELISpot. O número de *spots* induzido por um peptídeo/ 10^6 CMSP foi calculado como o número médio de *spots* da triplicata subtraído do número médio de *spots* dos poços que serviram como controle negativo e multiplicado por 10. Uma resposta positiva foi identificada como sendo o mínimo de 50 células formadoras de *spots* (SFC)/ 10^6 de CMSP, com base em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa e de maneira consensual com estudos internacionais.

4.10 Estudo longitudinal

Células mononucleares de sangue periférico de 11 indivíduos LTNP foram estudadas através de ELISPOT IFN- γ ao longo do tempo (mínimo de dois e máximo de seis). Este estudo ocorreu de acordo com a quantidade disponível de CMSP criopreservadas de cada indivíduo. Dessa forma, CMSP de seis indivíduos puderam ser estudadas por dois anos; de dois indivíduos por três anos; de dois indivíduos por quatro anos, enquanto que as CMSP de um indivíduo foram testadas por seis anos.

4.11 Identificação de epitopos das proteínas Gag e Nef do HIV-1

Para identificarmos os epitopos das proteínas Gag e Nef do HIV-1, testamos o reconhecimento de cada peptídeo que compunha o *pool* de peptídeos de HIV-1 e que provocaram uma resposta positiva sobre CMSP total (≥ 80 SFC/ 10^6 CMSP). CMSP de 10 indivíduos da coorte ALT foram utilizadas para identificação dos determinantes antigênicos do HIV-1, com o objetivo de confrontar os epitopos identificados com os epitopos já descritos na literatura em função das moléculas HLA de classe I expressas em cada indivíduo (Los Alamos, 2005¹⁷⁸), bem como identificar novos epitopos ainda não descritos. No caso onde uma resposta positiva foi observada em dois peptídeos consecutivos, consideramos que o epitopo estava situado na parte comum a esses dois peptídeos.

4.12 Análise estatística

Neste trabalho, para a análise dos resultados, dividimos a análise estatística em duas partes:

1. Estatística descritiva
2. Estatística probabilística

A estatística descritiva está representada pela média, desvio padrão e mediana. O estudo das freqüências de resposta aos *pools* de peptídeos das diferentes proteínas do HIV-1 e entre diferentes *pools* para cada proteína é apresentado em média, desvio padrão e mediana para cada parâmetro avaliado.

Os dados representados foram inicialmente confrontados com a curva de Gauss e determinados como paramétricos pelo teste de distância de Kolmogorov-Smirnov (K-S); estes foram representados na forma de média e desvio padrão da amostra. Os dados também foram categorizados (através de notas de corte) e expressos na forma de freqüência absoluta (n) ou relativa (%) para melhor interpretação casuística do estudo.

A análise probabilística foi realizada pela técnica da estatística exaustiva na tentativa de se criar um modelo matemático que explicasse as variações dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e de carga viral em decorrência da resposta aos diversos *pools* de peptídeos das proteínas Gag, Nef e RT do HIV-1. A abordagem da análise probabilística foi inicialmente longitudinal. Para tanto, a variação temporal foi analisada através do teste de Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Diferença Mínima Significativa (DMS). Para determinação dos *pools* de peptídeos que tinham evidência de variação frente a variação de linfócitos T CD4⁺ e da carga viral,

utilizamos a Regressão Multilinear, dentre outros modelos de Regressão Não-Lineares, por apresentar maior linearidade.

As variáveis que foram preditoras (*pools* de peptídeos) no modelo não linear foram categorizadas através da média e confrontadas com a variação do linfócito CD4⁺ e da carga viral através do teste T de *Student* não pareado, para evidenciar padrões de resposta ao longo do tempo. Pelo mesmo teste, a resposta dos linfócitos T CD4⁺ e a carga viral também foram avaliadas frente ao HLA.

Também foi realizado o Teste de Correlação de *Pearson*, interpretado utilizando-se dois critérios: a significância (p) e o índice de correlação, ou linearidade (r); quanto a este último, quando apresentava valor de $r < 0,5$ foi indicador de baixa linearidade e quando $r \geq 0,5$, de boa linearidade.

Para todo o estudo foi considerado risco $\alpha \leq 0,05$ para Erro tipo I e risco $\beta \leq 0,20$ para Erro tipo II.

Os testes foram executados com o programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 13.0 para Windows da SPSS Inc. Chicago, Illinois (USA) e GraphPad Prism 3.0 para Windows da GraphPad Software Inc. San Diego, CA (USA).

5 RESULTADOS

Avanços tecnológicos têm sido implementados para o estudo da resposta de linfócitos T contra o HIV; em particular, a utilização de peptídeos sobrepostos cobrindo a totalidade dos epitopos eventualmente presentes em determinadas regiões protéicas do vírus. Essa metodologia permitiu a realização deste estudo em CMSP de indivíduos infectados pelo HIV-1 e incluídos na coorte francesa ALT. As células produtoras de IFN- γ foram quantificadas *in vitro* após estimulação com *pools* de peptídeos e detectadas pela técnica de ELISPOT. Os resultados foram expressos em células formadoras de spots (*Spot Forming Cells* – SFC) por milhão de CMSP (SFC/10⁶ CMSP).

5.1 Condições de validação dos ensaios ELISPOT

5.1.1 Disponibilidade das amostras e viabilidade celular

Dos 26 indivíduos selecionados para este estudo, CMSP criopreservadas no primeiro ano de inclusão neste estudo

(ano 1) estavam disponíveis para 19 deles (73%). Para a realização dos ensaios ELISPOT, era necessário que, após o descongelamento, a viabilidade celular fosse igual ou superior a 85%. As CMSP provenientes de cinco indivíduos (19%) apresentaram uma viabilidade celular entre 66 e 78%, ou seja, inferior à recomendada para o ensaio ELISPOT e não puderam ser utilizadas.

Durante o estudo do ano 1, as quantidades de CMSP de seis pacientes (32%) mostraram-se reduzidas durante o descongelamento celular e foram testadas parcialmente, seguindo-se a seguinte ordem preferencial: Gag (todos os 19 indivíduos foram testados, sendo 17 LTNP), Nef (18 indivíduos testados, sendo 16 LTNP) e RT (13 indivíduos testados, todos LTNP).

5.1.2 Controles da reação

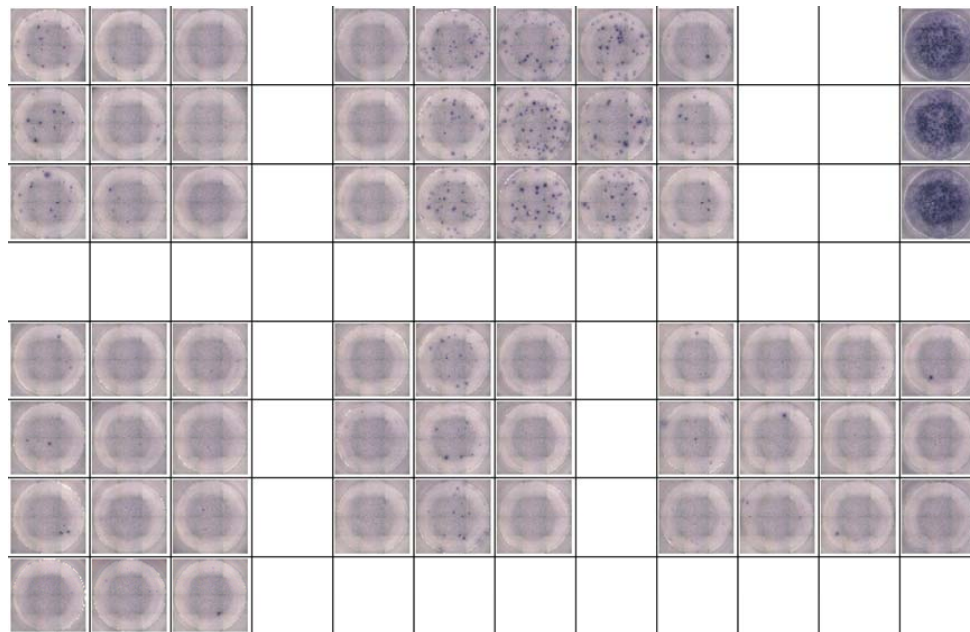
A validação dos ensaios pela técnica de ELISPOT é assegurada pelos *spots*, conhecidos como “controles de ativação” ou seja, o controle positivo da reação, nos quais as CMSP dos indivíduos são estimuladas pela PHA, um agente mitogênico. Dados prévios do Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do Hospital Pitié-Salpêtrière mostraram que a produção de IFN- γ pelas

células deve ser superior ou igual a 2.000 SFC/10⁶ CMSP nos controles de ativação positivos, conhecidos como pontos saturados (SAT). Em nossa pesquisa, essa condição foi verificada em todos os ensaios realizados.

O controle negativo é assegurado por poços preenchidos com células sozinhas em meio de cultura, isto é, poços onde as CMSP não são submetidas a qualquer estimulação. O número de *spots* nesses poços deve ser igual ou próximo de zero. Em nossos ensaios, o número médio do controle negativo foi de $6,5 \pm 6,44$ SFC para 100.000 CMSP. O valor médio do controle negativo foi calculado em cada indivíduo testado e em cada ensaio realizado, e o valor obtido foi subtraído de cada valor bruto obtido.

Controles também foram efetuados previamente no laboratório, a fim de validar a utilização dos peptídeos: nenhuma resposta foi detectada quando se estimulou CMSP de indivíduos soronegativos para o HIV-1 com peptídeos sintéticos do HIV-1 em ensaios realizados com oito indivíduos soronegativos (voluntários) no conjunto de controle de qualidade da Agência Nacional de Pesquisas sobre a Aids e as Hepatites Virais (*Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales-ANRS*; dados não mostrados).

Todos os ensaios e todas as condições testadas foram feitos em triplicata. A figura 15 ilustra um exemplo de resultados de um ensaio de ELISPOT IFN- γ .



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P17-1	P17-2	P17-3		P24-1	P24-2	P24-3	P24-4	P24-5			PHA
B	P17-1	P17-2	P17-3		P24-1	P24-2	P24-3	P24-4	P24-5			PHA
C	P17-1	P17-2	P17-3		P24-1	P24-2	P24-3	P24-4	P24-5			PHA
D												
E	PP-1	PP-2	PP-3		NEF-1	NEF-2	NEF-3		RT-1	RT-2	RT-3	RT-4
F	PP-1	PP-2	PP-3		NEF-1	NEF-2	NEF-3		RT-1	RT-2	RT-3	RT-4
G	PP-1	PP-2	PP-3		NEF-1	NEF-2	NEF-3		RT-1	RT-2	RT-3	RT-4
H	Cel seules	Cel seules	Cel seules									

Figura 15. Resultado de um teste ELISPOT IFN- γ do indivíduo 6002 (ano 2) com CMSP estimuladas pelos 18 *pools* de peptídeos do HIV-1

5.1.3 Limite de positividade (*Cut-off*)

O limite de positividade foi fixado no laboratório onde a pesquisa foi realizada de acordo com resultados preliminares e de maneira consensual com os estudos internacionais a um valor de 50 SFC/10⁶ CMSP subtraindo-se o valor do controle negativo.

Este limite foi utilizado para a interpretação dos resultados dos ensaios com ELISPOT em CMSP total. Testes complementares utilizando os peptídeos individuais foram realizados posteriormente com os *pools* de peptídeos que induziram respostas superiores a 80 SFC/10⁶ CMSP, denominadas fortemente positivas.

5.2 Resultados descritivos

5.2.1 Ensaios ELISPOT IFN- γ em CMSP total (ano 1)

A análise da resposta imune nos 17 indivíduos LTNP com os *pools* de peptídeos sobrepostos do HIV-1 (HXB2) no ano 1

mostrou que 94% dos *pools* de peptídeos do HIV-1 utilizados (17 de 18 *pools*) foram reconhecidos pelas CMSP de pelo menos um indivíduo testado (*cut off* = 50 SFC/10⁶ CMSP; Tabela 3, Figura 16, Anexo 1). O número de *pools* reconhecidos por indivíduo testado foi em média de $6,1 \pm 3,22$ e mediana de 5,0 nos 18 *pools* testados (min 2, máx 12). Por outro lado, o número de indivíduos que reconheceram cada *pool* de peptídeos apresentou média de $5,8 \pm 3,78$ e mediana de 5,0 (min 0, máx 12).

Os *pools* de peptídeos situados nos pequenos peptídeos de Gag (pp) e na RT foram freqüentemente pouco reconhecidos. Por outro lado, a estimulação pelos peptídeos dos *pools* p17-1 (seqüência correspondente aos aminoácidos 1 a 55 da proteína Gag), p24-1 (Gag 133-187), p24-3 (Gag 221-275), p24-4 (Gag 265-319), Nef-2 (Nef 65-107), e Nef-3 (Nef 97-147) originaram uma resposta positiva em mais de 50% dos indivíduos testados (Tabela 3, Figura 16, Anexo 1). Nesses indivíduos, as seguintes respostas foram observadas: Gag-p17-1 (71%, 12/17), Gag-p24-1 (59%, 10/17), Gag-p24-3 (53%, 9/17), Gag-p24-4 (65%, 11/17), Nef-2 (69%, 11/16) e Nef-3 (56%, 9/16), as quais foram superiores quando comparadas com as respostas contra Gag-p17-2 (29%, 5/17), Gag-p17-3 (6%, 1/17), Gag-p24-2 (41%, 7/17), Gag-p24-5 (35%, 6/17), Gag-pp-1 (0), Gag-pp-2 (24%, 4/17), Gag-pp-3 (18%, 3/17), Nef-1 (19%,

3/16), RT-1 (38%, 5/13), RT-2 (31%, 4/13), RT-3 (23%, 3/13) e RT-4(8%, 1/13) (Figura 16).

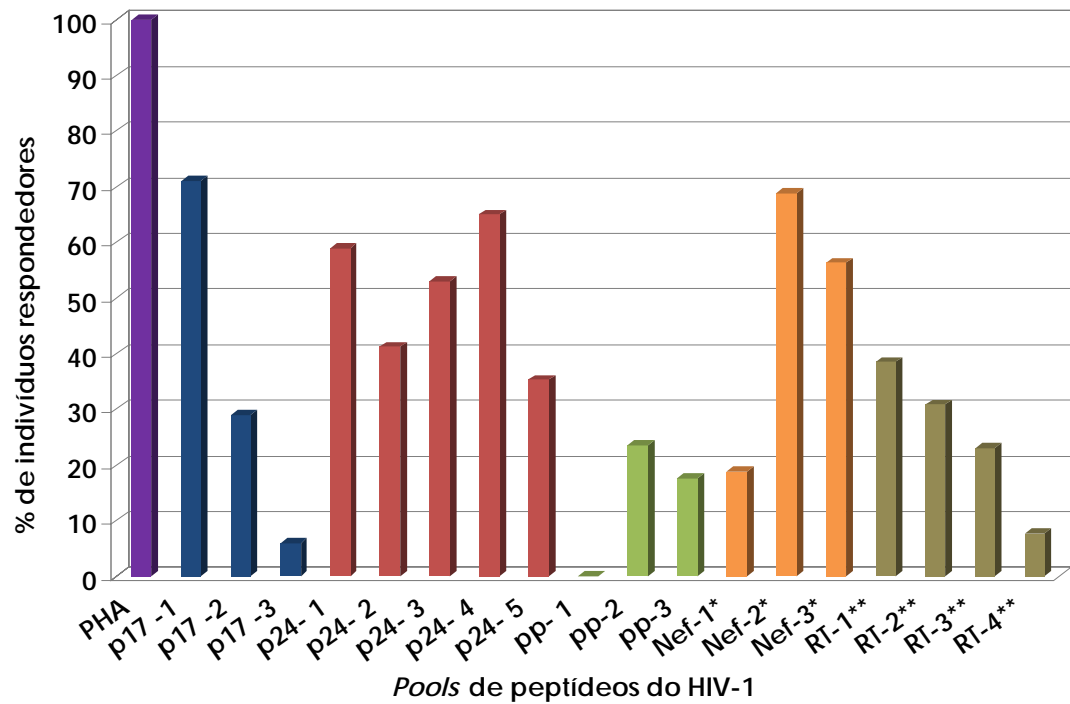


Figura 16. Frequência de indivíduos HIV-1+ LTNP com respostas positivas para cada *pool* de peptídeos do HIV-1, determinadas por ELISPOT IFN- γ (ano 1). *Nef: foram testados 16 indivíduos; **RT: foram testados 13 indivíduos.

Tabela 3 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP dos pacientes avaliados no estudo (ano 1)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	p172	p173	P241 ³	p242	p243	P244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	Pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
2002	3	SAT ⁷	0	0	0	740	0	0	142	0	0	0	0	0	0	53	0	0	0	0
2009	0	SAT	77	0	0	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4030	7	SAT	1697	1683	107	0	1690	0	1677	1347	0	613	53	0	57	1323	60	0	0	2000
4034	13	SAT	63	170	0	0	0	1043	0	0	0	0	0	0	77	0	127	0	0	0
4046	17	SAT	360	0	0	560	517	0	947	73	0	0	0	0	330	0	137	0	0	0
4053	5	SAT	2000	2000	0	2000	0	2000	690	0	0	1250	0	0	310	2000	ND ⁸	ND	ND	ND
4075	0	SAT	0	0	0	0	0	2000	575	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5002	13	SAT	2000	0	0	67	853	0	1307	233	0	0	203	0	1990	1947	0	1123	87	0
5012	0	SAT	843	0	0	67	0	0	743	0	0	0	0	0	83	0	0	0	0	0
6002	17	SAT	593	87	0	0	1397	1467	0	290	0	0	0	0	653	0	67	0	0	0
8005	7	SAT	0	0	0	0	0	200	0	67	0	0	0	563	217	230	0	60	50	0
8011	13	SAT	693	103	0	183	77	2000	0	0	0	792	0	107	697	517	0	1117	147	0
8021	13	SAT	193	0	0	230	327	0	777	0	0	0	112	90	223	1493	83	680	0	0
9015	5	SAT	265	0	0	675	0	435	0	0	0	65	0	0	0	585	ND	ND	ND	ND
11012	5	SAT	0	0	0	0	0	695	115	0	0	0	0	0	0	70	ND	ND	ND	ND
11024	0	SAT	167	0	0	0	70	0	157	73	0	0	0	0	143	0	0	0	0	0
13010	13	SAT	0	0	0	523	0	550	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4073 ⁹	10	SAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
5007 ¹⁰	0	SAT	0	170	0	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado; ⁹ e ¹⁰ Controles da reação.

De maneira geral, pudemos igualmente calcular a freqüência de respostas por proteína viral, isto é, a proporção de indivíduos na população testada para os quais as CMSP produziram IFN- γ em resposta à estimulação de pelo menos um epitopo em cada proteína.

A freqüência de indivíduos com respostas positivas no ELISPOT IFN- γ para Gag-p24 (100%, 17/17) , Gag-p17 (71%, 12/17) e Nef (88%, 14/16) foi significativamente mais alta do que para os pequenos peptídeos de Gag (Gag-pp) (35%, 6/17) (Figura 17).

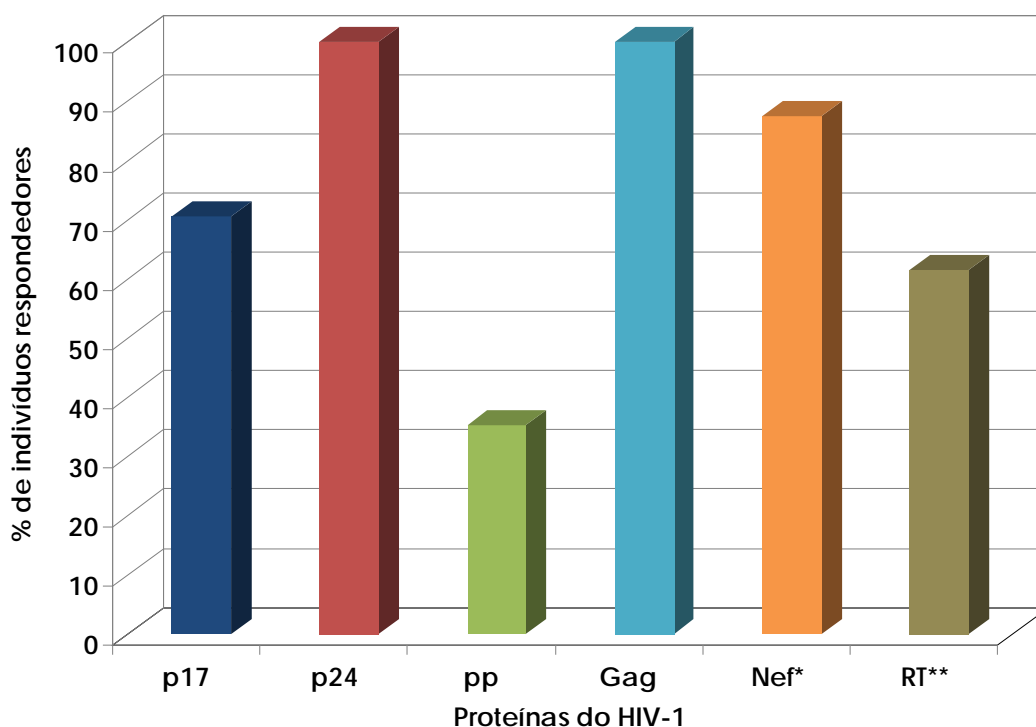


Figura 17. Freqüência de indivíduos HIV-1⁺ LTNP com respostas positivas às proteínas do HIV-1, determinadas por ELISPOT IFN- γ (ano 1). *Nef: foram testados 16 indivíduos; **RT: foram testados 13 indivíduos.

Os *pools* de peptídeos representativos da seqüência das proteínas de Gag estimularam pelo menos uma resposta positiva na totalidade dos indivíduos (100%, 17/17), enquanto que apenas 62% (8/13) dos *pools* de peptídeos de RT provocaram resposta nas CMSP dos indivíduos testados (Figura 17).

5.2.2 Intensidade das respostas

A intensidade das respostas específicas para o HIV-1 (soma do número de SFC/10⁶ CMSP de todos os *pools* de peptídeos que induziram uma resposta positiva) está apresentada na figura 18.

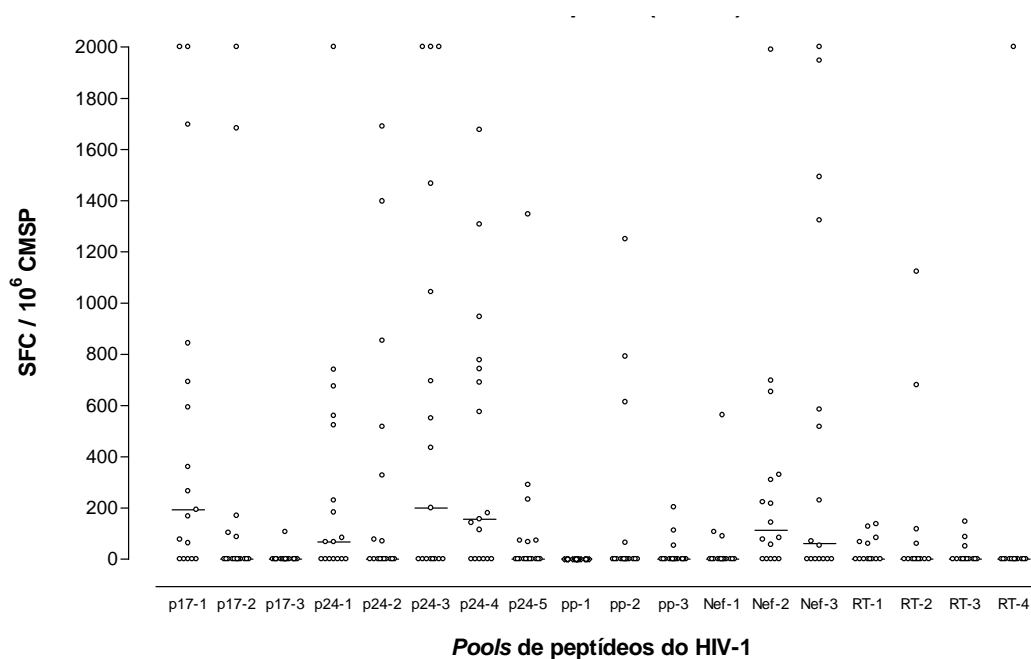


Figura 18. Intensidade de resposta imune celular para cada *pool* de peptídeos do HIV-1 em indivíduos HIV-1+ LTNP pela técnica de ELISPOT IFN- γ (ano 1)

Observamos que os *pools* de peptídeos correspondentes às proteínas Gag-p17, Gag-p24 e Nef apresentaram respostas mais intensas na maioria dos indivíduos testados (Figura 18). Alguns indivíduos apresentam grande intensidade de respostas a vários *pools* de peptídeos (Figura 18).

O *pool* Gag-pp-1 de pequenas proteínas de Gag não foi reconhecido pelas CMSP de nenhum dos indivíduos testados. Os *pools* de peptídeos do HIV-1 que foram reconhecidos com maior intensidade de resposta foram: Gag-p17-1, Gag-p24-1, Gag-p24-3,

Gag-p24-4, Nef-2 e Nef-3, com medianas de intensidade de resposta por *pool* de peptídeo de 477 (min 63, máx 2000) para Gag-p17-1, 377 (min 67, máx 2000) para Gag-p24-1, 1043 (min 200, máx 2000) para Gag-p24-3, 690 (min 115, máx 1677) para Gag-p24-4, 223 (min 57, máx 1990) para Nef-2 e 585 (min 53, máx 2000) para Nef-3 (Figura 18).

Os indivíduos selecionados como controles negativos (4073 e 5007) apresentaram respostas negativas ou de muito baixa intensidade a um número muito reduzido de *pools* de peptídeos do HIV-1. Apenas o indivíduo progressor (5007, Tabela 3, Anexo 1) apresentou resposta a três *pools* de peptídeos de Gag: 170 SFC/10⁶ CMSP a p17-2, 50 SFC/10⁶ CMSP a p24-1 e 50 SFC/10⁶ CMSP a p24-4, respectivamente. Esse indivíduo não foi testado com os *pools* de peptídeos de RT, uma vez que suas CMSP encontravam-se reduzidas após o descongelamento celular.

A média da intensidade das respostas de cada indivíduo foi de $3854,5 \pm 3992,49$ e a mediana foi de 2025 SFC/10⁶ CMSP (min 160, máx 12307), com médias e medianas de intensidades de resposta por proteína de $2707,7 \pm 2841,06$ e 1639 para Gag (min 160, máx 9940), $859,9 \pm 1091,04$ e 458 para Nef (min 0, máx 3937) e $441,4 \pm 671,22$ e 110 para RT (min 0, máx 2060) (Figura 19).

peptídeos testados (17 de 18 *pools*), mas perdeu sua polirreatividade no quinto ano de acompanhamento, e que os indivíduos 8021 e 5002 apresentaram respostas a 83% (15 de 18 *pools*) e 78% (14 de 18 *pools*) dos *pools* testados. Observamos igualmente nesses indivíduos respostas preferenciais e intensas a determinados *pools* de peptídeos, que usualmente foram mantidas ao longo do tempo (Figuras 20-30; Anexos 2-12).

Outros indivíduos avaliados longitudinalmente também apresentaram o mesmo padrão de resposta. Assim sendo, os *pools* de peptídeos do HIV-1 que induziram respostas fortemente positivas (≥ 80 SFC/ 10^6 CMSP) ao longo do tempo e de maneira constante em vários indivíduos avaliados, foram, respectivamente: p17-1 em 45% (5/11) dos indivíduos (4030, 4054, 5002, 6002, e 8021), p24-1 em 36% (4/11) dos indivíduos (2002, 2009, 4050 e 8021), p24-2 em 36% (4/11) dos indivíduos (4030, 5002, 6002 e 8021), p24-4 em 36% (4/11) dos indivíduos (4030, 4054, 5002 e 8021), Nef-2 em 36% (4/11) dos indivíduos (5002, 6002, 8011 e 8021) e Nef-3 em 40% (4/10) dos indivíduos (4054, 5002, 8011 e 8021).

Podemos ressaltar ainda que alguns indivíduos apresentaram queda da intensidade da resposta temporária, recuperando-a posteriormente (indivíduos 2002 e 4034), enquanto

outros indivíduos apresentaram aumento evidente de resposta (2014 e 2009).

Por outro lado, os indivíduos 8011, 6002, 4030 e 4050 apresentaram perda, ao menos parcial, da responsividade aos peptídeos previamente reconhecidos. O indivíduo 8011, citado acima; o indivíduo 6002, que respondia fortemente a quatro *pools* de peptídeos, apresentou diminuição da intensidade da resposta; o indivíduo 4030 apresentou nítida redução da reatividade a todos os *pools* de peptídeos, enquanto o indivíduo 4050 reduziu a intensidade da resposta, mantendo apenas aos *pools* de peptídeos de Gag-p24.

Essas respostas foram estatisticamente avaliadas e correlacionadas com os níveis de linfócitos T CD4⁺ e a carga viral (Anexos 13 a 27). Pudemos observar que, quando utilizamos como variável dependente a contagem de células T CD4⁺ (Anexos 13 e 14), temos como constantes preditoras a resposta aos *pools* p24-1 e RT-1 ($R^2= 0,781$, $F=41,086$ e $p<0,001$); quando avaliamos a carga viral como variável dependente (Anexos 13 e 15) temos como melhores preditores as respostas aos *pools* Nef-2, RT-2, pp-2, p24-1, RT-1, PP-1 e p24-3, respectivamente ($R^2=0,962$, $F=72,573$ e $p<0,001$) (Anexo 13). A análise no decorrer do tempo (em anos) está expressa nos anexos de 16 a 27.

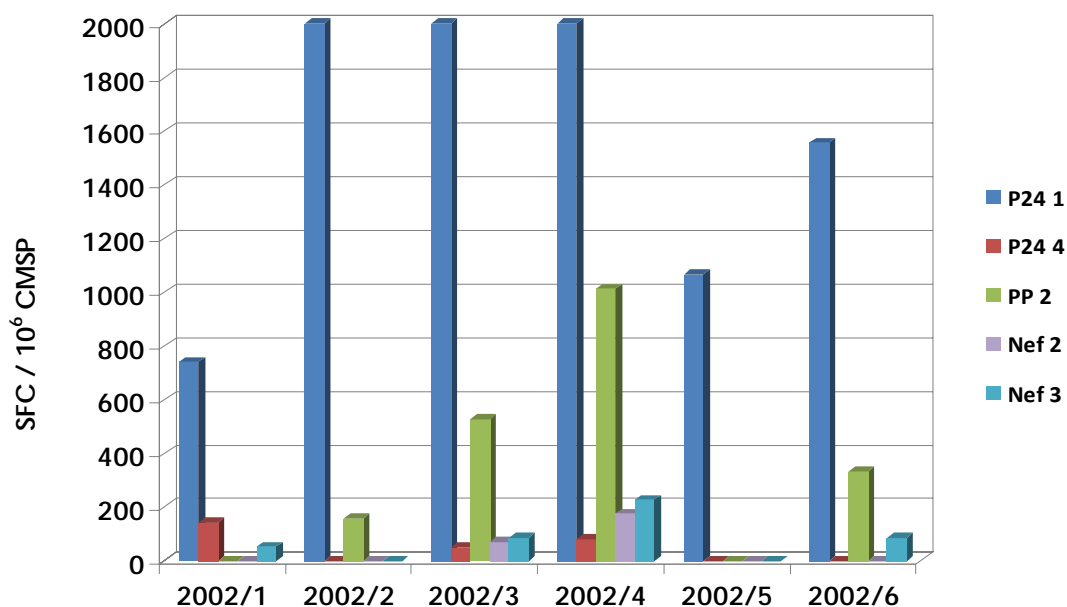


Figura 20. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2002 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

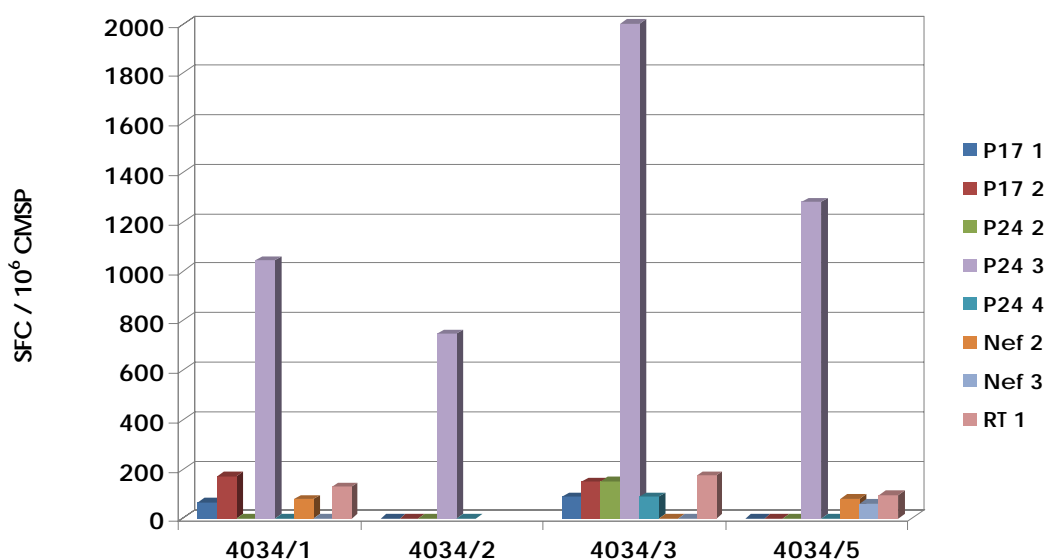


Figura 21. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4034 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

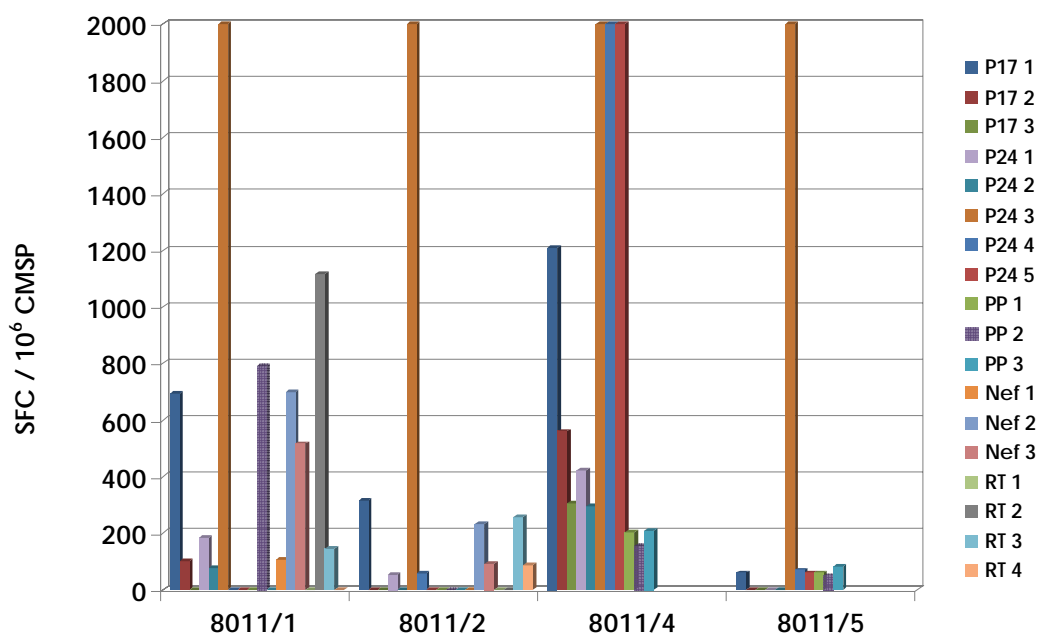


Figura 22. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 8011 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10⁶ CMSP

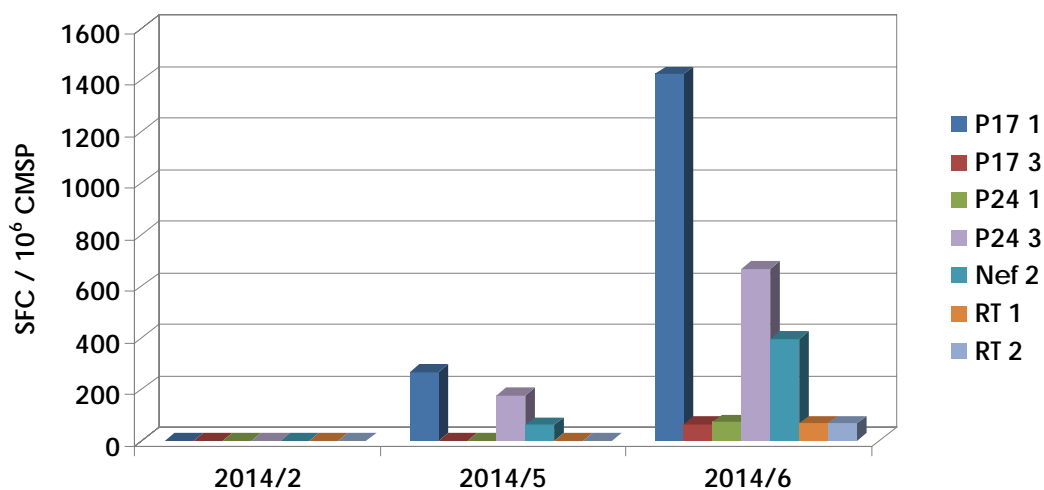


Figura 23. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2014 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10⁶ CMSP

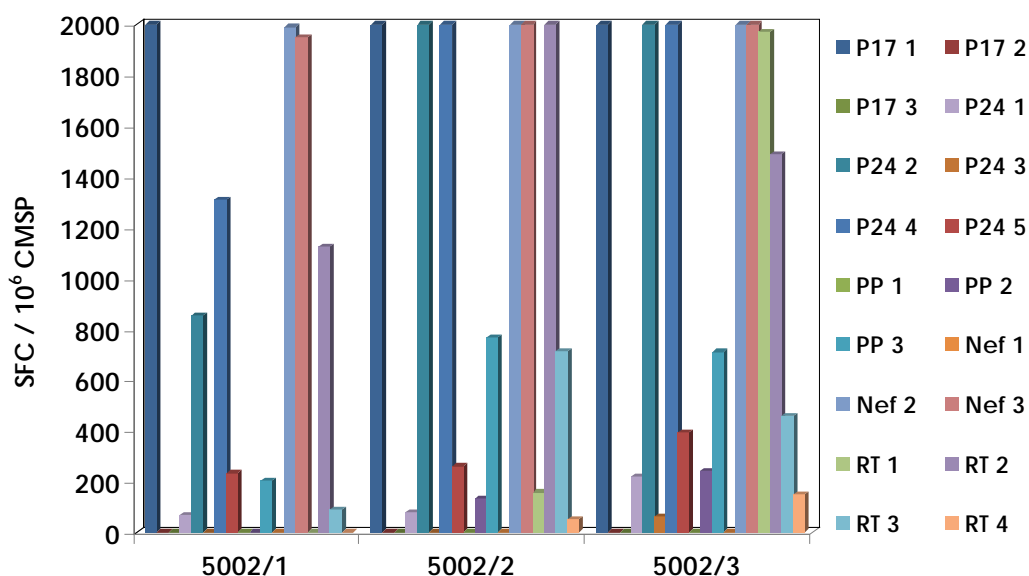


Figura 24. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 5002 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10⁶ CMSP

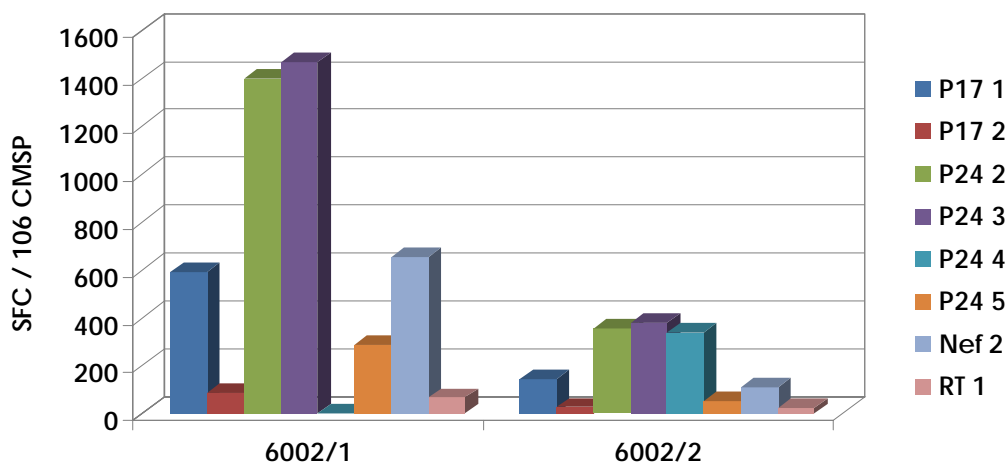


Figura 25. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 6002 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10⁶ CMSP

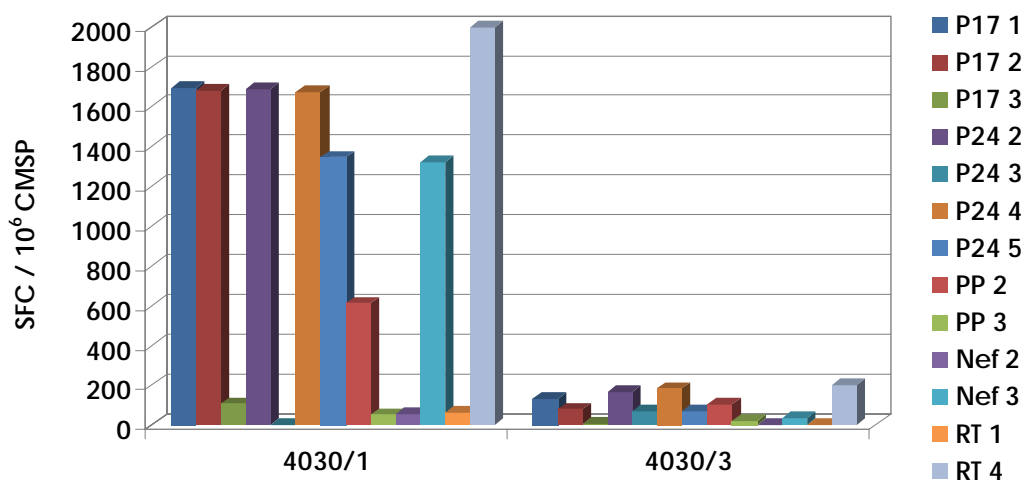


Figura 26. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4030 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

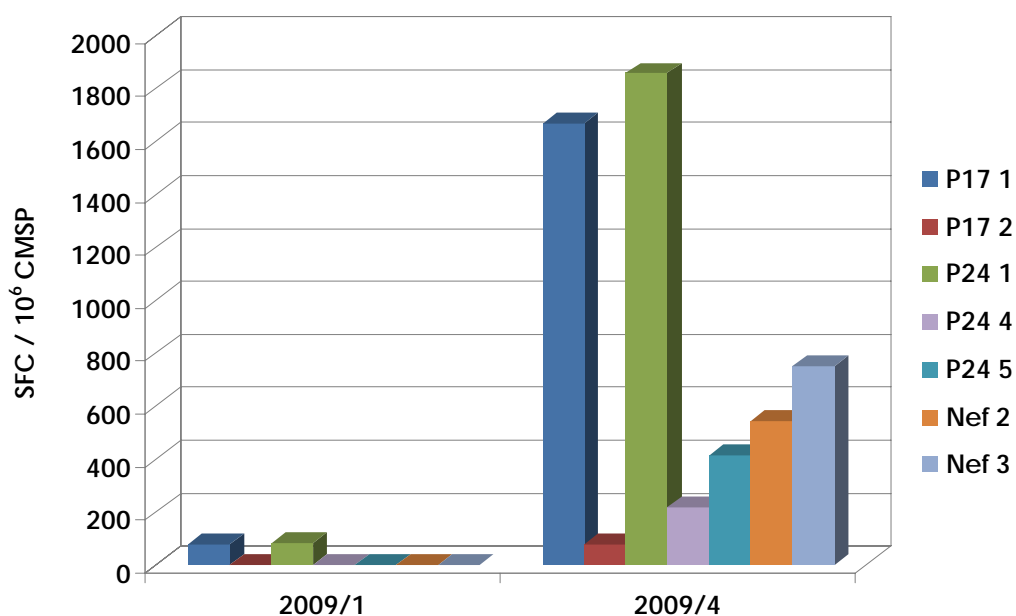


Figura 27. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 2009 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

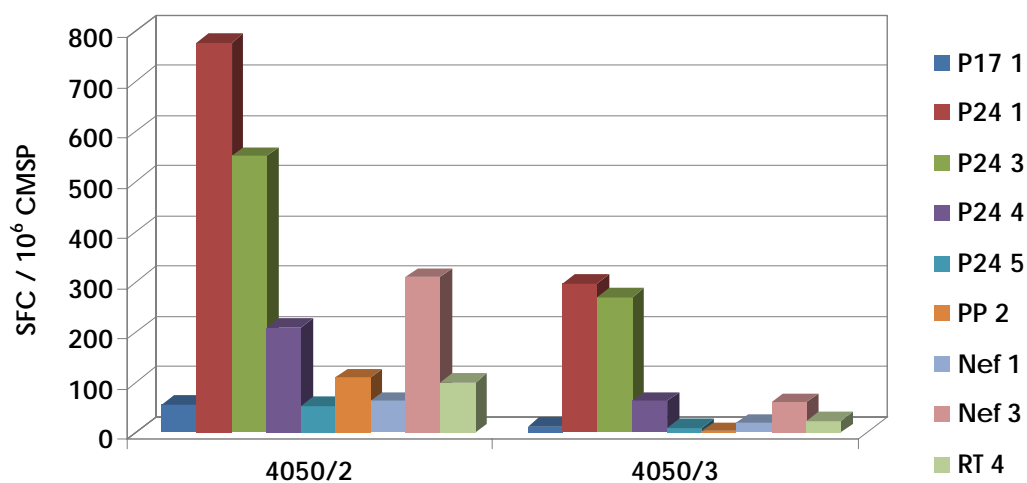


Figura 28. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4050 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

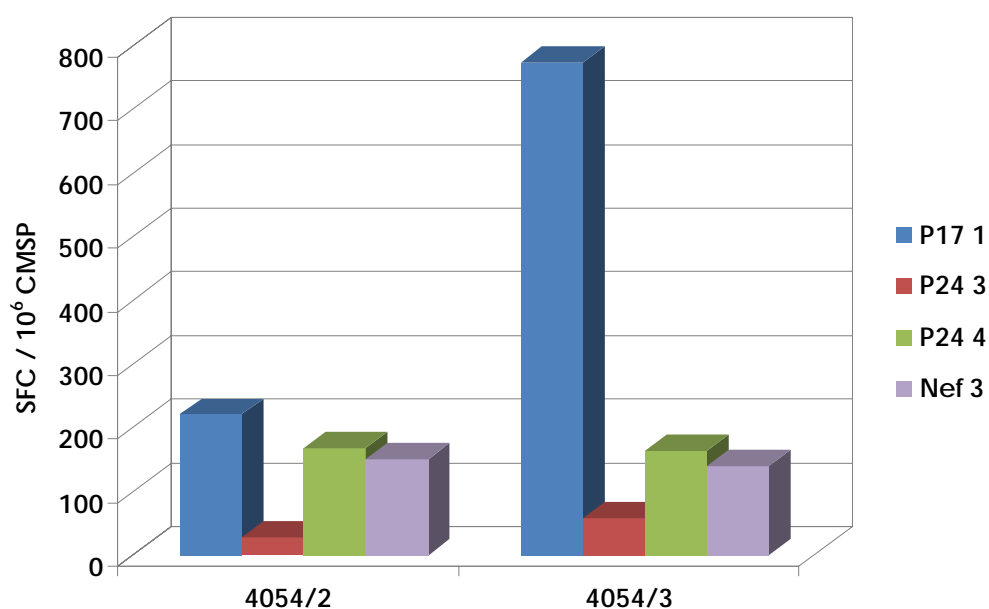


Figura 29. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 4054 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10^6 CMSP

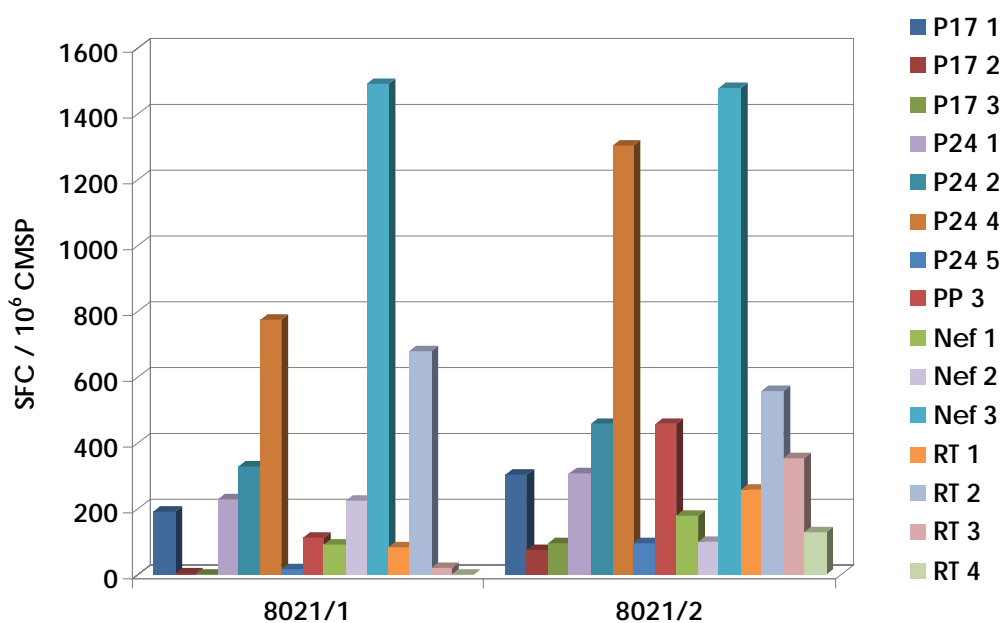


Figura 30. Intensidade de resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 pela técnica de ELISPOT IFN- γ do indivíduo 8021 no decorrer do tempo. No eixo x temos os anos e no eixo y a intensidade em SFC / 10⁶ CMSP

5.2.4 Reconhecimento específico dos epitopos

Como vimos anteriormente, a resposta imune nos 17 indivíduos LTNP com os *pools* de peptídeos sobrepostos do HIV-1 (HXB2) mostrou que 94% dos *pools* de peptídeos do HIV-1 utilizados (17 de 18 *pools*) foram reconhecidos pelas CMSP de pelo menos um indivíduo testado. Quanto aos peptídeos reconhecidos, existiu uma clara dominância de alguns peptídeos, a saber: p17-1 12/17 (70%); p24-4 e Nef-2 11/17 (65%); p24-1 10/17 (59%); p24-3 e Nef-3 9/17 (53%);

p24-2 7/17 (41%); p24-5 6/17 (35%); p17-2 e RT-1 5/17 (29%); RT-2 4/17 (23%); pp-3, Nef-1 e RT-3 3/17 (18%); p24-3 e RT-4 1/17 (6%) e finalmente pp-1, sem reconhecimento (0/17) (Figura 31, Tabela 3, Anexo 1).

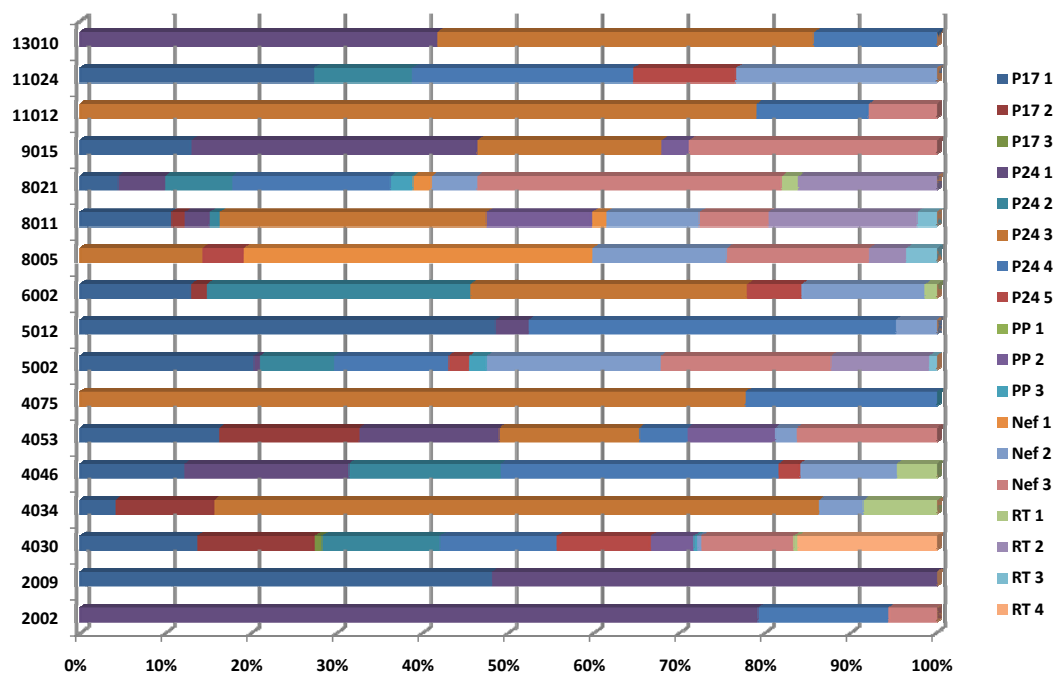


Figura 31. Análise da dominância clonal: No eixo x observamos a porcentagem de resposta das CMSP frente aos diferentes epitopos do HIV-1; no eixo y temos os 17 indivíduos LTNP estudados. Na legenda temos os *pools* de peptídeos avaliados, caracterizados de acordo com a cor

5.3 Correlação das respostas com os parâmetros avaliados

Em geral, a intensidade das respostas específicas para o HIV-1 para cada indivíduo LTNP avaliado contra os *pools* de peptídeos do HIV-1 testados, medidas pelo ensaio de ELISPOT IFN- γ , não apresentou correlação com as taxas de linfócitos T CD4⁺ sangüíneos, com a carga viral plasmática e com os parâmetros avaliados, quando se utilizou o coeficiente de correlação de Pearson (*r* de *Pearson*), durante três anos de seguimento de alguns indivíduos na coorte ALT. Uma correlação positiva ($p < 0,05$) foi verificada, entre os seguintes parâmetros, respectivamente (Tabela 4):

a) ano 1: carga viral e *pool* RT-2; *pool* Nef-2 e *pool* RT-2; *pool* p24-1 e *pool* pp-2; *pool* RT-2 e *pool* pp-2; *pool* p24-3 e *pool* pp-1; *pool* p24-3 e *pool* pp-2.

b) ano 2: carga viral e *pool* Nef-2; carga viral e *pool* RT-2; *pool* RT-2 e *pool* Nef-2; *pool* p24-1 e linfócitos T CD4⁺; *pool* p24-1 e *pool* pp-2.

c) ano 3: carga viral e *pool* Nef-2; linfócitos T CD4⁺ e *pool* pp-2; linfócitos T CD4⁺ e *pool* p24-1, *pool* pp-1 e *pool* RT-1; *pool* p24-1

e *pool* RT-2; *pool* p24-1 e *pool* pp-2; *pool* p24-3 e *pool* RT-1; *pool* p24-3 e *pool* pp-1.

Tabela 4 - Correlação entre os diversos parâmetros relacionados à evolução clínica dos indivíduos infectados pelo HIV-1: quantificação de linfócitos T CD4 (CD4⁺), carga viral do HIV-1 (CV) e os diversos *pools* de peptídeos: Correlação de Pearson (r) > 0,5 (boa correlação); > 0,8 (forte correlação); $p < 0,05$ (Significativa)

ANO 1		CD4 ⁺	CV	Nef-2	pp-1	pp-2	RT-1	RT-2
RT-2	Correlação de Pearson (r)		0,626	0,767		0,648		
	Significância (bicaudal) (p)		0,029	0,004		0,023		
	N		12	12		12		
p24-1	Correlação de Pearson (r)					0,731		
	Significância (bicaudal) (p)					0,001		
	N					18		
p24-3	Correlação de Pearson (r)				0,589	0,645		
	Significância (bicaudal) (p)				0,010	0,004		
	N				18	18		
ANO 2								
Nef-2	Correlação de Pearson (r)		0,992					
	Significância (bicaudal) (p)		<0,001					
	N		9					
RT-2	Correlação de Pearson (r)		0,974	0,961				
	Significância (bicaudal) (p)		<0,001	<0,001				
	N		9	9				
p24-1	Correlação de Pearson (r)	0,941				0,732		
	Significância (bicaudal) (p)	<0,001				0,016		
	N	9				10		
ANO 3								
p24-1	Correlação de Pearson (r)	0,912				0,858		0,774
	Significância (bicaudal) (p)	0,031				0,013		0,041
	N	5				7		7
pp-2	Correlação de Pearson (r)	0,992						
	Significância (bicaudal) (p)	0,001						
	N	5						
Nef-2	Correlação de Pearson (r)		0,999					
	Significância (bicaudal) (p)		<0,001					
	N		6					
pp-1	Correlação de Pearson (r)						0,927	
	Significância (bicaudal) (p)						0,003	
	N						7	
p24-3	Correlação de Pearson (r)				0,928		0,966	
	Significância (bicaudal) (p)				0,003		<0,001	
	N				7		7	

5.4 Identificação dos epitopos de Gag e Nef do HIV-1

Visando identificar os determinantes antigênicos do HIV-1, testamos o reconhecimento de peptídeos individuais componentes dos *pools* de peptídeos de HIV-1 que apresentaram respostas fortemente positivas (≥ 80 SFC/ 10^6 CMSP), em um subgrupo de 10 indivíduos, em função do número de CMSP disponíveis e com viabilidade igual ou superior a 85%. Isso foi feito no intuito de confrontar os epitopos identificados nesta pesquisa com os já descritos na literatura e identificar possíveis novos epitopos do HIV-1, em função das moléculas HLA de classe I expressas em cada indivíduo. Um exemplo de resposta contra cada peptídeo individual dando origem a uma resposta mediada provavelmente por linfócitos T CD8⁺ é apresentado na figura 32.

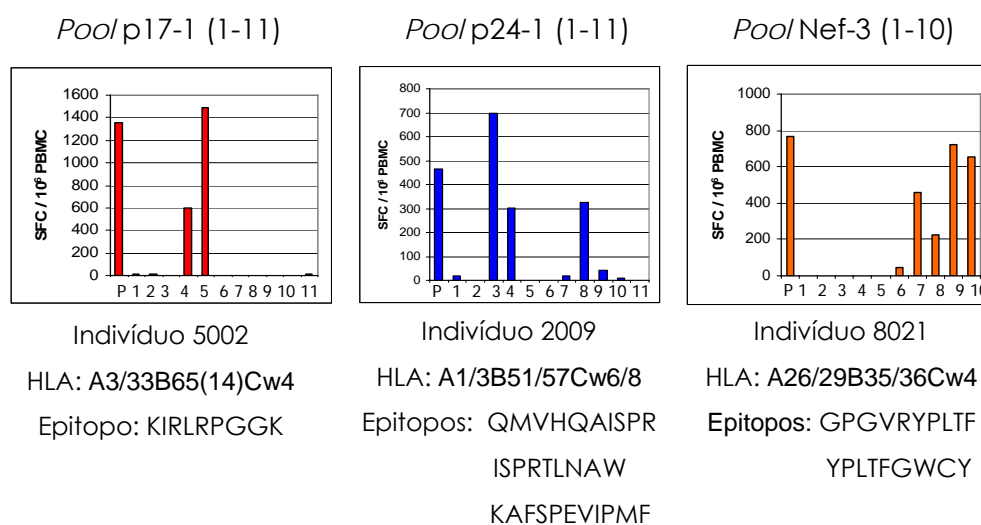


Figura 32. Exemplo de resposta a peptídeos individuais em teste de ELISPOT IFN- γ . Observar a intensidade da resposta, o haplótipo HLA e os epitopos reconhecidos. P: Respostas específicas para o HIV-1 a partir de CMSP; 1 a 11: Respostas contra cada peptídeo individual componente do *pool* de peptídeos

Foi possível verificar uma predominância de certos peptídeos individuais, tais como: p24-1-8, p17-1-5 e p24-4-9, que estimularam uma resposta positiva em 50% (5/10), 30% (3/10) e 30% (3/10) dos indivíduos testados, respectivamente (Tabela 5). Observamos o reconhecimento de três epitopos já descritos na literatura contidos na proteína Gag-p17, 11 na Gag-p24, e oito em Nef do HIV-1, restritos a moléculas HLA de classe I expressas pelos indivíduos respondedores (Tabela 6). A maioria desses epitopos (14/22, 64%) ligava-se a moléculas HLA associadas à progressão lenta para a Aids ou “protetoras” (Tabela 6).

Comparamos as respostas com o número de epitopos do HIV-1 descritos na literatura e sua restrição ao HLA, em função dos HLAs expressos pelos indivíduos estudados e peptídeos reconhecidos individualmente. As seqüências identificadas foram comparadas com os epitopos já descritos para as proteínas do HIV-1 arquivados na base de dados americana de Los Alamos (Los Alamos, 2005¹⁷⁸).

Observamos que, das 83 respostas possíveis apresentadas pelas moléculas HLA de classe I “protetoras” expressas pelos indivíduos testados, 17 ocorreram (20%), enquanto que das 71 respostas possíveis apresentadas por moléculas HLA de classe I não associadas à proteção, apenas sete ocorreram (10%). Oito peptídeos reconhecidos, contidos em Gag e Nef, continham epitopos descritos a HLAs de classe I não expressos pelos indivíduos estudados. Também foi observado o reconhecimento de quatro novos epitopos de Gag ainda não descritos na literatura até o momento: Gag 9 – 23, do indivíduo 11021, e Gag 37 – 51, Gag 41 – 55 e Gag 97 – 111, do indivíduo 4030, respectivamente. O epitopo KAFSPEVIPMF foi reconhecido por 30% (3/10) dos indivíduos, enquanto que os epitopos KIRLRPGGK, EVIPMFSAL e QVPLRPMTYK foram reconhecidos por 20% (2/10) dos indivíduos estudados (Figura 33).

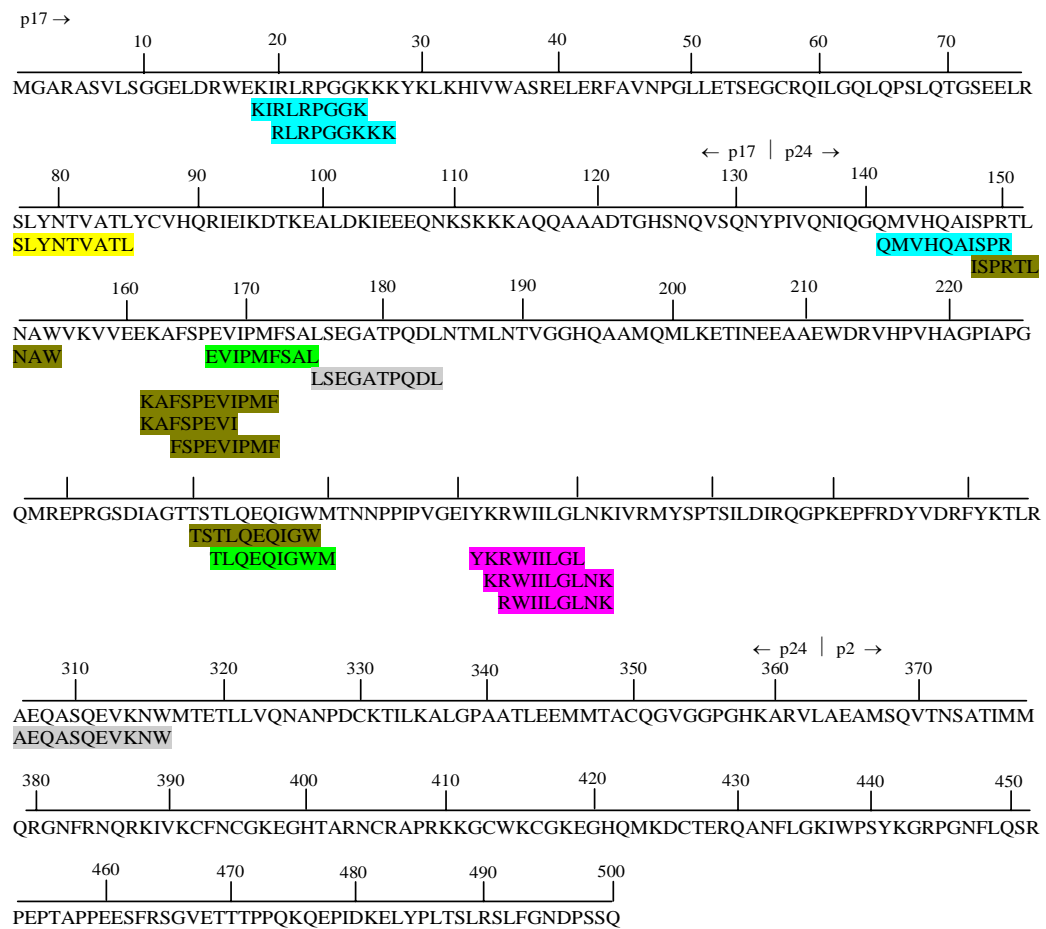


Figura 33. Localização dos epitopos (classe I) identificados na seqüência da proteína Gag do HIV-1 (HXB2), nos complexos peptídeo-HLA: A2, A3, A26, B27, B44, B57.

Tabela 5 – Reconhecimento de peptídeos individuais componentes dos *pools* de peptídeos de HIV-1 que estimularam respostas em 10 indivíduos HIV-1+ LTNP, pela técnica de ELISPOT IFN- γ , e suas respectivas seqüências. Em amarelo, pode-se observar os HLAs de classe I associados à progressão lenta para Aids; em preto, regiões que contém epitopos do HIV-1 já descritos na literatura; em cinza, regiões que contém epitopos do HIV-1 ainda não descritos na literatura.

HLA		2002	2009	2014	4030	4034	4050	5002	8011	8021	11021
A		2-31	1-3	1-2	2-31	2-68	1-2	3-33	11-32	26-29	24-26
B		21-57	51-57	8-13	44-51	27-35	51-57	65	27	35-36	14-57
Cw		6-7	6-8	6-7	5		7	4	1-2	4	6
Peptídeo	Seqüência de aa										
p17-1-3	SGELDRWEKIRLRP										
p17-1-4	LDRWEKIRLRPGGKK										
p17-1-5	EKIRLRPGGKKKYKL										
p17-1-7	GKKKYKLVHIVWASR										
p17-1-10	ASRELERFAVNPGLL										
p17-1-11	LERFAVNPGLLETSE										
p17-2-9	SLYNTVATLYCVHQR										
p24-1-3	GQMVHQAISPRTLNAW										
p24-1-4	HQAISPRTLNAWVKVV										
p24-1-8	EKAFSPEVPMFSAL										
p24-1-9	SPEVPMFSALSEGA										
p24-2-1	EGATPQDLNTMLNTV										
p24-2-2	PQDLNTMLNTVGGHQ										
p24-2-9	AAEWDRVHPVHAGPI										
p24-2-10	DRVHPVHAGPIAPGQ										
p24-3-3	REPRGSDIAGTTSTL										
p24-3-5	AGTTSTLQEQIGWMT										
p24-3-11	IYKRWILGLNKIVR										
p24-4-9	VDRFYKTLRAEQASQ										
p24-4-11	RAEQASQEVKNWMTE										
p24-5-1	ASQEVKNWMTETLLV										
p24-5-2	VKNWMTETLLVQANAN										
p24-5-3	MTETLLVQANANPDCK										
Nef-2-5	PQVPLRPMTYKAAVDL										
Nef-2-6	RPMTYKAAVDLSHFL										
Nef-2-7	YKAAVDLSHFLKEKG										
Nef-2-8	VDSLHFLKEKGGLEG										
Nef-3-5	WIYHTQGYFPDWQNY										
Nef-3-6	TQGYFPDWQNYTPGP										
Nef-3-7	FPDWQNYTPGPGVRY										
Nef-3-8	WQNYTPGPGVRYPLTF										
Nef-3-9	PGPGVRYPLTFGWYCY										
Nef-3-10	VRYPLTFGWYCYKLV										

Tabela 6 – Epitopos do HIV-1 reconhecidos por 10 indivíduos HIV-1+ LTNP no ensaio de ELISPOT IFN- γ . Os epitopos são apresentados por moléculas HLA de classe I expressas pelos indivíduos respondedores.

Epitopo	Proteína	Indivíduos respondedores	Alelo HLA classe I
KIRLRPGGK	p17	2009; 5002	A3
SLYNTVATL	p17	4030	A2
GGKKKYKL	p17	2014	B8
GQMVHQAIISP	p24	2002	B57
QMVHQAIISPR	p24	2009	A3
KAFSPEVIPMF	p24	2002; 2009; 4050	B57
ISPRTLNAW	p24	2009	B57
KAFSPEVI	p24	11021	B57
KRWIILGLNK	p24	4034	B27
RWIILGLNK	p24	8011	B27
EVIPMFSAL	p24	8021; 11021	A26
AEQASQEVKNW	p24	4030	B44
TSTLQEQIGW	p24	4050	B57
TLQEQIGWM	p24	4050	A2
HTQGYFPDW	Nef	2009	B57
FLKEKGGL	Nef	2014	B8
QVPLRPMTYK	Nef	5002; 8021	A3, B35
AVDLSHFL	Nef	5002	A3
DLSHFLKEK	Nef	5002	A3
PLTFGWCYK	Nef	5002	A3
GPGVRYPLTF	Nef	8021	B35
YPLTFGWCY	Nef	8021	B35

6 DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado a partir de CMSP de indivíduos infectados pelo HIV-1 e incluídos na coorte nacional francesa de indivíduos LTNP (ALT). A quantificação de células produtoras de IFN- γ após uma estimulação por peptídeos do HIV foi efetuada através da técnica de ELISPOT. Essa técnica mostrou uma boa reprodutibilidade, com um coeficiente de variação comparável aos obtidos de forma geral no Laboratório de Imunologia Celular e Tissular do Hospital Pitié-Salpêtrière de Paris.

No presente estudo, mostramos que indivíduos LTNP apresentaram uma alta frequência de respostas específicas para o HIV-1, sobretudo para as proteínas Gag-p24 e Nef. Estas respostas foram de grande magnitude e tiveram intensidades de resposta variadas. Conseguimos identificar epitopos do HIV-1 já descritos na literatura, outros epitopos descritos para outras moléculas HLA de classe I, não portadas pelos indivíduos estudados, e também identificamos quatro novos epitopos ainda não descritos. A maior parte dos epitopos identificados era restrito a moléculas HLA de classe I, descritas como associadas à progressão lenta para Aids.

A metodologia utilizada pôde ser validada no conjunto da exploração de uma resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ (Schnuriger, 2008¹⁷⁹). Todos os *pools* de peptídeos utilizados em nossos ensaios foram reconhecidos, pelo menos uma vez, pelos paratopos expressos pelos linfócitos T. O fato de termos encontrado epitopos já identificados e descritos na literatura, quando testamos os peptídeos individualmente, confirma a validação da metodologia utilizada.

A metodologia dos peptídeos sobrepostos utilizada permite teoricamente a estimulação das CMSP por todos os epitopos presentes nas regiões protéicas do HIV-1 estudadas, isto é, a proteína Gag e seus produtos de clivagem p17, p24, p1, p2, p6 e p7, assim como regiões imunodominantes da RT e Nef. O fato de 17 dos 18 *pools* de peptídeos testados terem sido reconhecidos pelas CMSP de pelo menos um indivíduo testado, dentre os estudados, atesta que essa metodologia foi uma ferramenta eficaz para observarmos a resposta imune celular específica para o HIV-1, bem como para a identificação de determinantes antigênicos do HIV-1.

Em nosso estudo, respostas de CMSP para o HIV-1 foram observadas em todos os indivíduos testados. Propato *et al.*¹⁶⁴ (2001) sugerem que indivíduos LTNP são capazes de controlar a progressão para Aids devido a uma resposta imune mediada por

linfócitos T CD8⁺ mais potente que em indivíduos progressores. A análise da resposta imune em 20 indivíduos LTNP com *pools* de peptídeos sobrepostos a partir da estimulação com CMSP mostrou uma alta frequência de indivíduos respondedores (Figuras 16, 20-30).

Em mediana, as CMSP de cada indivíduo responderam contra cinco *pools* de peptídeos dentre os 18 testados, o que sugere respostas contra pelo menos cinco epitopos do HIV-1, se considerarmos que cada *pool* de peptídeos, que cobre uma região com cerca de 50 aminoácidos (em comprimento), contém pelo menos um epitopo do HIV-1.

O fato de que todos os indivíduos da coorte ALT estudados reconheceram múltiplos *pools* de peptídeos indica que a diversidade de resposta específica para o HIV-1 era alta. Esse achado sugere que pacientes LTNP controlam a replicação viral por meio do bloqueio imune-mediado das funções virais. Além disso, a diversidade da resposta garantiria a superioridade da resposta imunológica sobre a replicação viral, impedindo o escape de isolados (*quasispecies*) resistentes à resposta imunológica celular. Nossos dados concordam com Addo *et al.*¹²¹ (2003) que também encontraram uma alta frequência de indivíduos respondedores ao estudarem 57 indivíduos infectados pelo HIV-1 em diferentes estágios da infecção. Isso sugere

que, na infecção pelo HIV-1, todas as proteínas são potencialmente reconhecidas por linfócitos T CD8⁺ específicos para o HIV-1.

Nossos dados demonstram também que ocorreu uma grande amplitude de resposta específica para o HIV-1 nos indivíduos LTNP estudados. Entretanto, observamos uma diferença quantitativa grande na intensidade de resposta entre os indivíduos (Figuras 18 e 19). Onze indivíduos (Figuras 20-30; Anexos 2 a 12) também foram avaliados longitudinalmente, e os dados obtidos mostraram persistência e níveis constantes de respostas específicas para o HIV-1 mediadas por linfócitos T ao longo de vários anos para 54% (6/11) dos indivíduos, enquanto que três indivíduos (27%) apresentaram diminuição / perda da resposta. Nossos dados concordam com Klein *et al.*¹⁸⁰ (1995) e Pontesilli *et al.*¹⁶⁷ (1998), que, ao estudarem indivíduos infectados pelo HIV-1, LTNP e progressores, através de uma análise longitudinal, obtiveram resultados semelhantes; ambos os grupos apresentaram respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ contra todas as principais proteínas do HIV-1, e os indivíduos LTNP apresentaram ainda persistência e contínua expansão de clones desses linfócitos por seis ou sete anos. Isso sugere que, mesmo na presença de uma carga viral baixa, um estímulo antigênico contínuo mantém um *pool* amplo de linfócitos T específicos para o HIV-1, e que o controle imunológico pode

contribuir para a manutenção da fase assintomática da infecção pelo HIV-1.

A intensidade de resposta verificada foi variável segundo os indivíduos. Em nossa amostra, observamos a presença de indivíduos considerados respondedores fortes, com freqüências de células respondedoras elevadas contra um ou mais *pools* de peptídeos do HIV-1. Essa freqüência manteve-se constante durante o estudo longitudinal em determinados indivíduos (Tabela 3; Anexos 2 a 12). Os indivíduos estudados não pareciam apresentar características particulares em termos de carga viral ou níveis de linfócitos T CD4⁺ sanguíneos, por ocasião de suas inclusões na coorte ALT, conforme demonstra a tabela 1.

Entre os indivíduos LTNP testados no primeiro ano (ano 1), a mediana das intensidades de respostas foi de 1639 SFC/10⁶ CMSP após estimulação pelos *pools* de peptídeos de Gag, mostrando ser mais elevada que as intensidades de respostas observadas de maneira geral nos indivíduos progressores estudados pela equipe da Dra. Aufran (dados não mostrados). Dessa forma, as respostas anti-HIV na população incluída na coorte ALT testada seriam mais intensas que nos indivíduos progressores.

Pudemos observar, em mais da metade dos indivíduos testados, respostas superiores a 1000 SFC/10⁶ CMSP contra pelo menos um *pool* de peptídeos testado. Isso significa que, nesses indivíduos, pelo menos 0,2% dos linfócitos T CD8⁺ circulantes são específicos para HIV-1, se considerarmos que os linfócitos T CD8⁺ representam por volta de 50% das CMSP em indivíduos imunossuprimidos pelo HIV. As mais fortes intensidades de respostas de linfócitos CD8⁺ específicas para HIV-1 foram observadas após estimulação das células pelos peptídeos dos *pools* das proteínas de Gag e Nef: Gag-p17-1, Gag-p24-1, Gag-p24-3, Gag-p24-4, Nef-2 e Nef-3. Esses resultados preliminares confirmam os resultados obtidos por outras equipes (Pontesilli *et al.*, 1998¹⁶⁷; Addo *et al.*, 2003¹²¹). Infelizmente, não temos dados relativos a outras citocinas importantes na ativação e efetuação de uma resposta imunológica celular eficaz, sabidamente relacionadas à manutenção de um estado de resistência à replicação viral.

O reconhecimento de epitopos das proteínas Gag-p17, Gag-p24 e Nef do HIV-1, restritos a moléculas HLA de classe I por linfócitos T CD8⁺ de CMSP em indivíduos LTNP (Tabela 6), sugere que a infecção pelo HIV-1 induz expansão de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos nos indivíduos infectados, em particular nos LTNP, que conseguem controlar a infecção por longo período.

A identificação de determinantes antigênicos já descritos na literatura como imunodominantes em indivíduos que portam o alelo HLA-B57, tais como o KAFSPEVIPMF (Altfeld *et al.*, 2003¹⁸¹; Currier *et al.*, 2005¹⁸²), reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ nos indivíduos LTNP, sugere um papel relevante desses linfócitos e a influência deste alelo no controle da infecção e na imunopatologia da infecção pelo HIV-1. A maioria dos epitopos reconhecidos em nosso estudo (14/22, 64%) ligava-se às seguintes moléculas HLA associadas à progressão lenta para Aids ou “protetoras”: A3, B27 e B57. Interessante constatar que, dos 24 indivíduos HIV-1⁺ LTNP estudados, 20 (83%) possuíam pelo menos um dos antígenos HLA de classe I: A3, A32, B14, B27, B57 e Cw8, associados à progressão lenta para Aids (Tabela 1).

Na infecção pelo HIV-1, a apresentação de epitopos derivados do vírus pode ser mais ou menos eficaz, segundo os alelos HLA do hospedeiro (Kaslow *et al.*, 1996¹⁴⁶). Nossos dados corroboram com os dados da literatura, na qual observamos que diversos alelos HLA de classe I têm sido associados à baixa ou ausência de progressão para Aids (Hendel *et al.*, 1999¹⁴⁸; Magierowska *et al.*, 1999¹⁵³; Letvin and Walker, 2003¹⁰¹; Trachtenberg *et al.*, 2003¹⁵¹; Kiepiela *et al.*, 2004¹⁸³; Jansen *et al.*, 2005¹⁵²).

As respostas contra os epitopos contidos em Gag parecem ser particularmente freqüentes nos indivíduos LTNP, uma vez que neste estudo 100% (17/17) dos indivíduos testados no primeiro ano (ano 1) reconheceram a proteína Gag-p24, e praticamente 71% (12/17) reconheceram a Gag-p17. Por outro lado, pequenos peptídeos de Gag (Gag-pp) foram reconhecidos por apenas 35% (6/17) dos indivíduos LTNP avaliados. Nossos dados discordam com os obtidos por Yu *et al.*¹⁸⁴ (2002), que ao estudarem respostas CTLs específicas para a Gag-p15 em 57 indivíduos infectados pelo HIV-1, encontraram L-T CD8⁺ específicos para a p15 em 46% (26/57) do total dos indivíduos testados.

Os peptídeos de Gag utilizados nesse estudo cobrem 512 aminoácidos, ou seja, 63% das seqüências protéicas acumuladas, utilizadas para a estimulação das células. A clivagem de Gag no curso da maturação do vírus resulta na produção de p17, a proteína da matriz, de p24, a proteína do capsídeo e outras pequenas proteínas estruturais, que são apresentadas nos vírions em numerosos exemplares. Essas proteínas originadas a partir do gene *gag* são então sintetizadas em grandes quantidades nas células infectadas, e como para todas as proteínas endógenas, uma fração dessas proteínas é apresentada na superfície dos linfócitos T CD4⁺ infectados

do organismo pelas moléculas HLA de classe I, após fragmentação em peptídeos pelo proteassoma.

Assim sendo, é natural que numerosos linfócitos T CD8⁺ sejam específicos para os fragmentos de Gag largamente apresentados na superfície dos linfócitos T CD4⁺ infectados do organismo e que respostas CTLs sejam dirigidas de maneira predominante contra os epitopos de Gag, as quais também já foram demonstradas na literatura para os indivíduos LTNP (Pontesilli *et al.*, 1998¹⁶⁷; Propato *et al.*, 2001¹⁶⁴).

Por outro lado, 62% (8/13) dos indivíduos testados apresentaram respostas contra RT, ao passo que os peptídeos que representam a seqüência da RT constituem 22% das seqüências protéicas utilizadas para a estimulação das células. A transcriptase reversa está presente em cada vírion através de dois exemplares, associadas às duas cópias do genoma viral. Assim, ela é produzida em quantidade muito menor que Gag, e menos fragmentos dessa enzima são aparentemente apresentados à superfície das células infectadas.

As respostas observadas com menor intensidade contra RT poderiam se explicar por uma “tolerização” contra essa proteína, devido a uma forte similaridade de sua seqüência com as

seqüências das RTs de retrovírus endógenos previamente integrados no genoma celular do hospedeiro (Wain-Hobson *et al.*, 1985³⁴). Essas respostas contra a RT poderiam eventualmente provir de uma fraca similaridade de seqüência entre os peptídeos sintetizados a partir da seqüência de referência (HXB2) do HIV-1 e a seqüência precisa da RT dos vírus circulantes (infectantes) nos indivíduos infectados. Nossos resultados na RT seriam, neste caso, falsamente subestimados. Com efeito, já foi mostrado a necessidade de se utilizar epitopos idênticos aos do vírus *index*, para quantificar de maneira exata as respostas obtidas (Stevenson, 2003¹⁸⁵).

Oitenta e oito por cento (88%, 14/16) dos indivíduos testados apresentaram respostas aos *pools* de peptídeos da proteína Nef. Essa proteína está presente nos vírions através de poucos exemplares e, assim, seus fragmentos são pouco apresentados à superfície das células infectadas. Uma vez que os peptídeos que representam a seqüência de Nef constituem apenas 14% do total das seqüências protéicas utilizadas para a estimulação das células, as respostas de linfócitos T específicas para Nef observadas em nosso estudo parecem mostrar que a proporção de linfócitos T específicos para Nef é importante nos indivíduos LTNP estudados, o que também já foi encontrado (Addo *et al.*, 2003¹²¹). Nef é uma proteína produzida precocemente pelo HIV-1, e respostas celulares contra essa proteína

podem permitir a destruição de células infectadas antes da produção de vírions infecciosos, o que é importante na perspectiva do desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1 (Haas *et al.*, 1996¹⁶⁰; Visco-Comandini *et al.*, 1998¹⁴¹).

Estudos complementares realizados posteriormente pela equipe da Dra. Autran neste mesmo grupo de indivíduos e mais alguns da coorte ALT, com ensaios de depleção de linfócitos T CD8⁺, citometria de fluxo e seqüenciamento, mostraram que as respostas detectadas em CMSP nos indivíduos infectados pelo HIV-1 LTNP avaliados, estimuladas experimentalmente com *pools* de peptídeos do HIV-1, foram majoritariamente atribuídas aos linfócitos T CD8⁺ (Schnuriger, 2004¹⁷⁹; Almeida *et al.*, 2007¹⁸⁶; Lu *et al.*, 2008²).

Esses pesquisadores demonstraram uma fraca percentagem de produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺, através da comparação de testes utilizando CMSP total dos indivíduos da coorte ALT e testes com células residuais após ensaios com depleção de linfócitos T CD8⁺ (Schnuriger, 2004¹⁷⁹). Foram realizados ainda ensaios de avidéz e ensaios com marcação de citocinas intracelulares, tendo sido verificado que os linfócitos T CD8⁺ dos indivíduos LTNP mantêm o controle da replicação do HIV-1 através de

² Lu W, Schnuriger A, da Silva BCM, Autran B *et al.*, 2008 [submetido].

sua alta avidéz funcional, polifuncionalidade e *turnover* clonal (Almeida *et al.*, 2007¹⁸⁶). Lu *et al.*² (2008) verificaram também que linfócitos T CD8⁺ de memória central e efetora direcionados aos epitopos de Gag apresentam um estágio de diferenciação mais precoce do que as células direcionadas a epitopos de Nef.

Uma vez que os indivíduos que participaram deste estudo também foram posteriormente avaliados, e com os resultados obtidos, podemos dizer que as respostas observadas em nossos experimentos foram mediadas por linfócitos T CD8⁺, confirmando a importância do marcador CD8⁺ em indivíduos infectados pelo HIV-1, LTNP, o que também já foi demonstrado por outros pesquisadores (Cao *et al.*, 1995¹⁸⁷; Klein e Miedema, 1995¹⁸⁸; Barker *et al.*, 1998¹⁸⁹; Gea-Banacloche *et al.*, 2000¹⁹⁰; Ferrari *et al.*, 2004¹⁹¹)

Realizamos a cartografia precisa dos epitopos que originaram uma estimulação dos linfócitos T CD8⁺ de alguns indivíduos LTNP estudados. Pudemos identificar epitopos do HIV-1 apresentados especificamente pelas moléculas do MHC dos indivíduos estudados (epitopos restritos ao HLA) já descritas na literatura, bem como peptídeos contidos em Gag e Nef reconhecidos, mas que continham epitopos descritos a HLAs de classe I não presentes nos indivíduos estudados.

Também identificamos o reconhecimento de quatro novos peptídeos ainda não descritos na literatura. Todos esses peptídeos provocaram respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺, entretanto não podemos eliminar a possibilidade de reconhecimento de epitopos por linfócitos T CD4⁺ em alguns casos, após a estimulação de CMSP por alguns *pools* de peptídeos situados principalmente na proteína Gag-p24 do HIV-1, como foi comprovado nos experimentos de depleção realizados subsequentemente na coorte ALT. Dessa forma, a interpretação dos resultados dos testes ELISPOT IFN- γ com CMSP deve em alguns casos ser modulada (Schnuriger, 2004¹⁷⁹). Em relação aos peptídeos identificados e ainda não descritos na literatura, os resultados obtidos são preliminares e precisam ser confirmados com novos ensaios de Elispot-IFN- γ com depleção dos linfócitos T CD8⁺ e ensaios de tetrâmeros HLA-peptídeos.

O epitopo KAFSPEVIPMF foi reconhecido por 30% (3/10) dos indivíduos estudados que portavam o HLA-B57 e apresentavam uma carga viral abaixo de 1.500 cópias. Nossos dados concordam com Jansen *et al.*¹⁵² (2005), os quais mostraram que linfócitos T CD8⁺ específicos para KAFSPEVIPMF e restritos a HLA-B57 apresentam alta avidéz, que pode contribuir para o efeito protetor do HLA-B57 na infecção pelo HIV-1.

A observação que os epitopos do HIV-1 reconhecidos eram muito mais freqüentemente restritos por alelos associados à proteção, e não pelos outros alelos HLA expressos pelos indivíduos – mesmo após correção pela ocorrência desses alelos HLA – sugere uma preferência na apresentação de epitopos por tais alelos, quando presentes. Nossos resultados corroboram com Altfeld *et al.*¹⁹² (2006), que ao estudarem 104 indivíduos de uma coorte com infecção primária do HIV-1, demonstraram que linfócitos T CD8⁺ são direcionados para epitopos do vírus durante a infecção primária e que essas células provêm uma explanação para o efeito protetor de alelos de classe I específicos, na progressão para a doença.

O mecanismo da proteção associada ao HLA na infecção pelo HIV-1, e da preferência de apresentação, pode ser explicado por uma apresentação peculiar por essas moléculas HLA de classe I de certos fragmentos antigênicos específicos do vírus, que dão origem a uma resposta imune particularmente eficaz, sobretudo no *locus* HLA-B (Kiepiela *et al.*, 2004¹⁸³). Esses autores, estudando as respostas de linfócitos T CD8⁺ específicas para HIV-1 em 375 indivíduos infectados pelo HIV-1 na África do Sul, observaram melhores respostas restritas ao *locus* HLA-B, sugerindo ser esse *locus* o principal foco da atividade específica para o HIV-1. Esses dados concordam com nossos achados, nos quais encontramos que 79% (19/24) dos

indivíduos HIV-1⁺ LTNP estudados possuíam pelo menos um dos antígenos HLA de classe I restrito ao *locus* HLA-B: B14, B27 e B57.

Os resultados obtidos nesse estudo colocam em evidência, para a maioria dos indivíduos estudados, respostas específicas para o HIV-1 mediadas em sua maioria por linfócitos T CD8⁺, eficazes e dirigidas contra um amplo painel de epitopos do HIV-1. Uma proporção importante dos clones de linfócitos T estimulados por esses epitopos foi capaz de gerar respostas de forte amplitude, em peculiar contra Gag-p24 e Nef. Essas respostas, corroborando com diversos trabalhos citados neste estudo, poderiam ser um dos parâmetros que permitem explicar o controle da infecção pelo HIV-1, particularmente eficaz nos indivíduos LNTP. No entanto, para atestarmos essa hipótese, precisaríamos comparar nossa amostra com um grupo de indivíduos progressores rápidos para Aids.

A possibilidade de que os alelos HLA de classe I associados à proteção em indivíduos LTNP apresentem epitopos reconhecidos por linfócitos T com alta avidéz também pode ser um mecanismo para explicar a sua proteção e explicaria a maior prevalência de respostas a essa classe. Outro fator importante que

deve ser avaliado parece ser a polirreatividade no contexto da expressão de citocinas, principalmente MIP-1 α e CD107 (Koup, 2007³).

Embora em nossa pesquisa não tenhamos estudado um grupo de indivíduos HIV-1 soropositivos progressores, mas concordando com diversos trabalhos citados na literatura (Pontesilli *et al.*, 1998¹⁶⁷; Propato *et al.*, 2001¹⁶⁴; Keoshkerian *et al.*, 2003¹⁹³; Schnuriger, 2004¹⁷⁹; Saéz-Ciri3n *et al.*, 2007¹⁹⁴; Almeida *et al.*, 2007¹⁸⁶), nossos resultados mostraram que as respostas anti-HIV-1 mediadas provavelmente por linf3citos T CD8⁺ s3o primordiais na prote3o3o dos indiv3duos infectados contra uma r3pida progress3o3o para Aids. A cria3o3o de um modelo matem3tico que permitiu correlacionar os valores de carga viral e da quantidade de linf3citos T CD4⁺ com a resposta caracterizada pela produ3o3o de IFN- γ induzida pela estimula3o3o com os diversos pept3deos das diversas regi3o3es do proteoma do HIV pode ser de fundamental import3ncia para a escolha racional dos pept3deos que componham uma vacina experimental contra o HIV, seja ela profil3tica ou terap3utica. No contexto de uma vacina terap3utica, podemos supor que a apresenta3o3o desses pept3deos em c3lulas apresentadoras de ant3genos eficazes que levassem 3 ativa3o3o de linf3citos T de forma

³ Koup RA. (Vaccine Research Center, NIH). *Immunoassessment in HIV: Lessons from Elite Non-Progressors*. [Presented at Immunoassessment satellites symposia, Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS); 2007 June 7-11; San Diego, USA. Abstracts]

correta, com a sinalização que permita a geração de uma resposta citotóxica e citocinas protetoras, nos permitiria mudar o comportamento imunológico dos pacientes progressores normais ou rápidos, possibilitando mudança substancial na terapia dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1.

Nossa abordagem estatística foi inicialmente longitudinal, tendo sido analisada a variação temporal, visando determinar os epitopos que apresentavam evidência de influência sobre as variações dos linfócitos T CD4⁺ e da carga viral. Dessa forma, as variáveis que se mostraram melhores preditoras no modelo não linear utilizado, quando confrontado com a variação do número de linfócitos T CD4⁺ foram os *pools* p24-1 e RT-1. Por outro lado, quando confrontamos os *pools* de peptídeos com a carga viral, as preditoras com maior significado foram, respectivamente: Nef-2, RT-2, pp-2, p24-1, RT-1, pp-1, e o *pool* p24-3.

Concordando com nossos resultados, onde encontramos os *pools* de Gag-p24 (1 e 3), além de outros *pools* de Gag, Nef e RT, com evidência estatisticamente significativa de influência sobre as variações dos linfócitos T CD4⁺ e da carga viral, muitos epitopos de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) dentro das proteínas p17 e p24 de Gag e epitopos de linfócitos T CD4⁺ dentro da

proteína p24 de Gag, assim como sua restrição aos antígenos HLA, têm sido descritos.

O estudo detalhado destes epitopos é fundamental para investigarmos a influência da resposta imune celular específica para o HIV-1 na carga viral e na progressão da doença, assim como a análise funcional dessas respostas (Autran *et al.*, 1996¹⁹⁵; Addo *et al.*, 2003¹²¹; Borghan *et al.*, 2005¹⁹⁶; Jansen *et al.*, 2005¹⁵²). Alguns desses epitopos podem, inclusive, vir a ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina candidata anti-HIV-1. Nesse sentido, esforços no desenvolvimento de uma vacina candidata contra o HIV-1 têm sido focados na indução de respostas de linfócitos T citotóxicos específicos para o HIV-1.

Esses aspectos devem ser levados em conta na perspectiva do desenvolvimento de uma vacina candidata contra o HIV-1.

7 CONCLUSÕES

1. Linfócitos T de indivíduos infectados pelo HIV-1, LTNP, reconhecem epitopos do HIV-1 e produzem IFN- γ contra o vírus com grande freqüência;

2. As respostas mediadas por linfócitos T contra o HIV-1 em indivíduos LTNP são dirigidas contra amplo painel de epitopos do HIV-1, sobretudo de Gag e Nef;

3. Essas respostas são de grande amplitude e magnitude;

4. Linfócitos T controlam a infecção pelo HIV-1 nos indivíduos LTNP através de respostas vigorosas com intensa produção de IFN- γ . Esse controle se mantém por muitos anos;

5. Linfócitos T de indivíduos infectados pelo HIV-1, LTNP, reconhecem com maior freqüência epitopos do HIV-1 restritos a HLA-classe I associados à proteção da doença;

6. Linfócitos T produtores de IFN- γ e antígenos HLA de classe I associados à proteção nos indivíduos LTNP são primordiais na proteção desses indivíduos contra uma rápida progressão para Aids.

Anexo 1 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP dos pacientes avaliados no estudo. Dados brutos (ano 1)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	p172	p173	p241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
2002	3	SAT ⁷	3	3	13	740	7	13	142	17	0	30	20	27	43	53	7	0	0	30
2009	0	SAT	77	17	3	83	3	0	10	10	0	0	7	5	5	25	0	0	0	5
4030	7	SAT	1697	1683	107	0	1690	0	1677	1347	0	613	53	0	57	1323	60	0	0	2000
4034	13	SAT	63	170	0	23	7	1043	27	13	27	10	20	3	77	13	127	0	0	3
4046	17	SAT	360	0	0	560	517	0	947	73	0	0	0	0	330	0	137	0	0	0
4053	5	SAT	10020	2345	15	2550	0	6685	690	0	5	1250	25	0	310	2575	ND ⁸	ND	ND	ND
4075	0	SAT	30	10	5	40	10	2245	575	45	35	10	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5002	13	SAT	2487	17	7	67	853	7	1307	233	3	30	203	7	1990	1947	7	1123	87	33
5012	0	SAT	843	17	0	67	0	3	743	3	3	0	7	0	83	0	0	3	0	0
6002	17	SAT	593	87	0	0	1397	1467	0	290	0	0	0	0	653	0	67	0	0	0
8005	7	SAT	0	0	0	0	0	200	0	67	0	0	0	563	217	230	0	60	50	0
8011	13	SAT	693	103	0	183	77	10773	0	43	12	792	47	107	697	517	0	1117	147	0
8021	13	SAT	193	3	0	230	327	10	777	17	0	2	112	90	223	1493	83	680	0	0
9015	5	SAT	265	5	0	675	0	435	35	10	5	65	30	5	0	585	ND	ND	ND	ND
11012	5	SAT	5	0	0	5	25	695	115	30	5	0	0	5	0	70	ND	ND	ND	ND
11024	0	SAT	167	0	0	0	70	0	157	73	0	0	0	0	143	0	0	0	0	0
13010	13	SAT	0	0	0	523	20	550	180	0	0	0	0	0	47	7	0	0	0	0
4073 ⁹	10	SAT	0	20	0	10	10	20	10	30	10	0	0	10	30	0	ND	ND	ND	ND
5007 ¹⁰	0	SAT	10	170	10	50	20	30	50	20	0	30	10	0	20	10	ND	ND	ND	ND

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 2 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 2002 . Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
2002/1	3	SAT ⁷	3	3	13	740	7	13	142	17	0	30	20	27	43	53	7	0	0	30
2002/2	0	SAT	7	23	3	2263	10	20	17	7	7	157	13	13	23	23	7	7	3	7
2002/3	0	SAT	13	40	43	3710	10	23	50	7	7	527	17	10	70	87	3	17	3	3
2002/4	7	SAT	17	40	23	6793	27	30	80	37	3	1013	23	23	177	227	3	0	0	0
2002/5	3	SAT	7	17	0	1067	0	0	0	0	0	47	3	2	17	12	2	0	2	ND ⁸
2002/6	0	SAT	0	10	7	1557	5	7	17	3	0	333	3	7	23	87	7	13	0	0

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 3 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 4034. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	p172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
4034/1	13	SAT ⁷	63	170	0	23	7	1043	27	13	27	10	20	3	77	13	127	0	0	3
4034/2	0	SAT	20	25	0	0	27	745	5	5	5	0	5	ND ⁸	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4034/3	7	SAT	87	147	0	43	150	2127	87	7	43	7	17	33	43	20	173	0	3	0
4034/5	0	SAT	13	17	0	0	23	1280	23	0	10	0	20	7	80	60	93	5	0	0

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 4 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 8011. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	p172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
8011/1	13	SAT ⁷	693	103	0	183	77	10773	0	43	12	792	47	107	697	517	0	1117	147	0
8011/2	20	SAT	313	3	0	53	10	2823	57	3	0	0	23	0	233	93	27	27	257	87
8011/4	0	SAT	1210	560	305	420	295	4020	2195	2210	205	155	210	ND ⁸	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8011/5	0	SAT	60	20	30	40	0	2105	70	60	60	50	80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 5 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 2014. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	p172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
2014/2	3	SAT ⁷	13	7	10	3	0	20	13	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
2014/5	0	SAT	265	20	0	0	10	175	40	5	0	0	40	20	60	0	25	0	0	10
2014/6	0	SAT	1423	13	63	70	20	667	13	3	7	3	17	25	395	45	65	65	0	20

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 6 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 5002. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
5002/1	13	SAT ⁷	2487	17	7	67	853	7	1307	233	3	30	203	7	1990	1947	7	1123	87	33
5002/2	3	SAT	4250	3	10	77	2663	10	3110	260	10	133	767	0	7017	6877	157	2432	712	52
5002/3	7	SAT	3013	17	13	220	2090	63	3140	393	0	240	710	0	2890	3307	1970	1490	457	150

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 7 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 6002. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
6002/1	17	SAT ⁷	593	87	0	0	1397	1467	0	290	0	0	0	0	653	0	67	0	0	0
6002/2	23	SAT	143	27	3	0	357	377	340	53	13	0	3	10	110	0	23	0	7	0

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 8 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 4030. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4	
4030/1	7	SAT ⁷	1697	1683	107	0	1690	0	1677	1347	0	613	53	0	57	1323	60	0	0	0	2000
4030/3	7	SAT	130	80	7	7	167	70	183	67	7	103	23	0	0	33	0	3	0	0	203

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 9 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 2009. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
2009/1	0	SAT ⁷	77	17	3	83	3	0	10	10	0	0	7	5	5	25	0	0	0	5
2009/4	20	SAT	1670	80	0	1857	10	17	217	413	0	0	7	13	543	753	0	0	7	0

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 10 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 4050. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
4050/2	7	SAT ⁷	57	27	7	777	30	550	210	53	7	110	33	63	13	310	47	3	17	100
4050/3	7	SAT	13	3	0	297	17	270	63	10	0	3	20	20	3	60	30	0	0	23

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 11 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 4054. Dados brutos (estudo longitudinal)

Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
4054/2	3	SAT ⁷	220	13	7	3	0	27	167	0	0	0	7	13	3	150	10	0	0	0
4054/3	3	SAT	773	20	0	17	10	57	163	10	3	3	7	20	10	140	17	7	23	3

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

Anexo 12 – Resultados do ensaio de ELISPOT – IFN- γ em CMSP do indivíduo 8021. Dados brutos (estudo longitudinal)

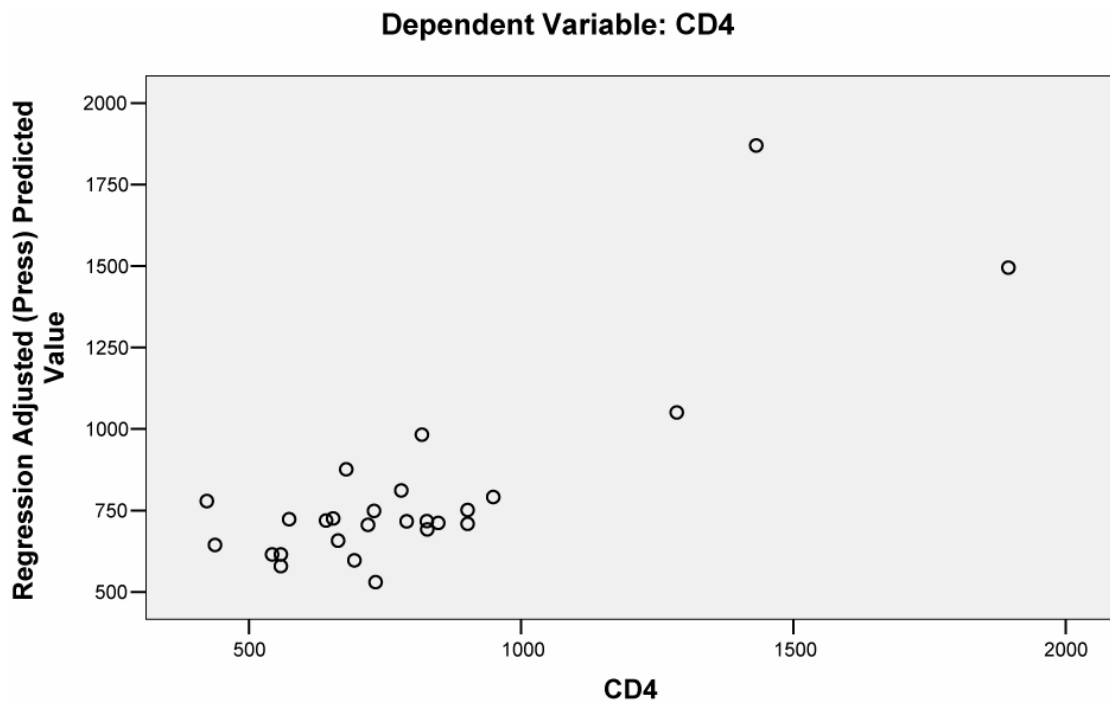
Paciente	Controle -	Controle + PHA ¹	p171 ²	P172	p173	P241 ³	p242	p243	p244	p245	pp 1 ⁴	pp 2	pp 3	Nef 1 ⁵	Nef 2	Nef 3	RT 1 ⁶	RT 2	RT 3	RT 4
8021/1	13	SAT ⁷	193	3	0	230	327	10	777	17	0	2	112	90	223	1493	83	680	0	0
8021/2	7	SAT	303	73	97	310	457	20	1303	97	20	3	460	177	100	1480	257	557	353	130

¹ PHA: Fitohemaglutinina P; ² Proteína Gag p17; ³ Proteína Gag p24; ⁴ Proteínas de Gag p2, p7, p1, p6; ⁵ Proteína Nef; ⁶ Proteína transcriptase reversa; ⁷ Saturada (>2000 SFC/10⁶ CMSP); ⁸ Não determinado.

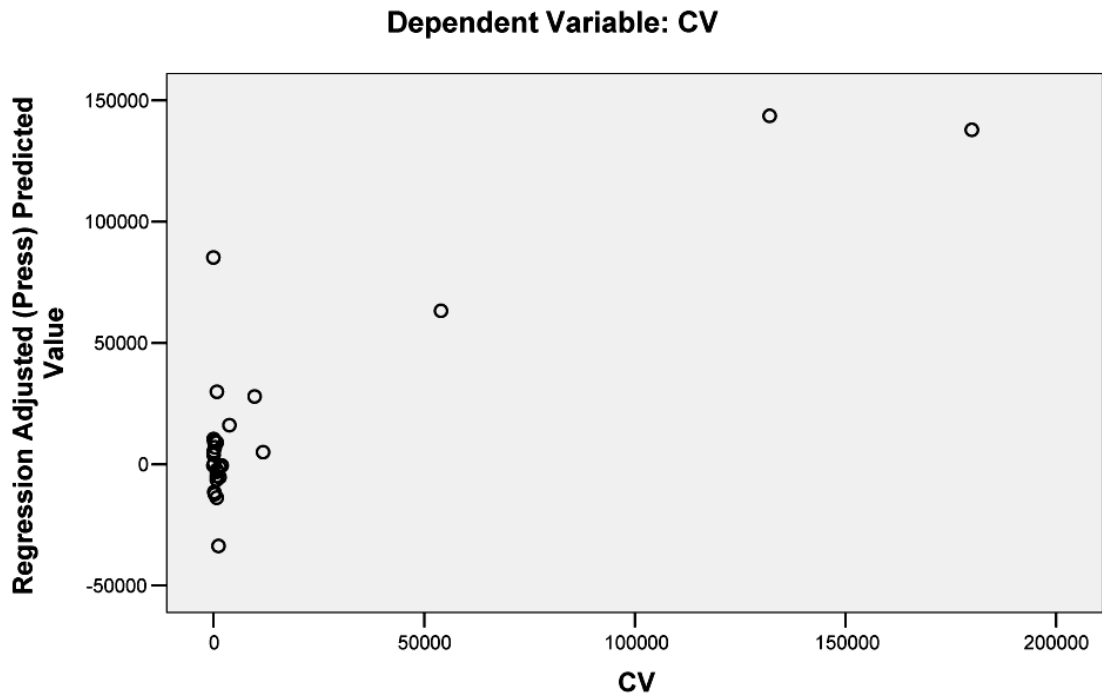
Anexo 13 – Análise probabilística: Regressão multilinear e análise de variância (ANOVA) com pós-teste de diferença mínima significativa (LSD)

CD4+ (Variável dependente)	R	R²	ANOVA	F	p
p24-1	0,849	0,721		61,892	<0,001
P24-1, RT-1	0,884	0,781		41,086	<0,001
Carga viral (Variável dependente)	R	R²	ANOVA	F	p
Nef-2	0,868	0,753		79,364	<0,001
Nef-2 RT-2	0,919	0,845		68,054	<0,001
Nef-2 RT-2 pp-2	0,949	0,901		72,699	<0,001
Nef-2 RT-2 pp-2 p24-1	0,961	0,924		69,636	<0,001
Nef-2 RT-2 pp-2 p24-1 RT-1	0,970	0,942		71,291	<0,001
Nef-2 RT-2 pp-2 p24-1 RT-1 pp-1	0,977	0,954		72,363	<0,001
Nef-2 RT-2 pp-2 p24-1 RT-1 pp-1 p24-3	0,981	0,962		72,573	<0,001

Anexo 14 - Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável dependente o número de linfócitos T CD4⁺ (CD4)



Anexo 15 - Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável dependente a carga viral plasmática (CV)



Anexo 16 – Tabela descritiva da estatística dos padrões de resposta ao longo do tempo. Valores em médias e desvios-padrão para os diversos anos.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
CD4	1	20	695,45	201,667	45,094	601,07	789,83
	2	17	730,94	324,900	78,800	563,89	897,99
	3	13	714,08	280,393	77,767	544,64	883,52
	4	8	616,50	154,334	54,565	487,47	745,53
	5	4	565,75	316,412	158,206	62,27	1069,23
	Total	62	690,53	256,515	32,577	625,39	755,67
CV	1	26	14998,31	49145,759	9638,276	-4852,09	34848,71
	2	22	14549,64	41864,517	8925,545	-4012,05	33111,32
	3	19	10158,79	27625,296	6337,678	-3156,18	23473,76
	4	12	4203,42	13171,153	3802,184	-4165,13	12571,97
	5	7	10503,57	26366,359	9965,547	-13881,24	34888,39
	Total	86	11942,22	37289,051	4020,982	3947,43	19937,01
NEF-1	1	17	48,35	136,412	33,085	-21,78	118,49
	2	9	31,78	57,823	19,274	-12,67	76,22
	3	7	11,86	12,941	4,891	-,11	23,83
	4	2	18,00	7,071	5,000	-45,53	81,53
	5	3	9,67	9,292	5,364	-13,41	32,75
	Total	38	33,05	95,145	15,434	1,78	64,33
NEF-2	1	17	286,35	488,545	118,490	35,17	537,54
	2	9	288,33	646,301	215,434	-208,46	785,12
	3	7	304,71	747,992	282,714	-387,06	996,49
	4	2	360,00	258,801	183,000	-1965,24	2685,24
	5	3	52,33	32,192	18,586	-27,64	132,30
	Total	38	275,61	539,259	87,479	98,36	452,86
NEF-3	1	17	408,82	700,428	169,879	48,70	768,95
	2	9	462,11	742,198	247,399	-108,39	1032,62
	3	7	370,43	722,928	273,241	-298,17	1039,03
	4	2	490,00	371,938	263,000	-2851,73	3831,73
	5	3	24,00	31,749	18,330	-54,87	102,87
	Total	38	388,26	657,798	106,709	172,05	604,48
P17-1	1	18	405,67	635,067	149,687	89,86	721,48
	2	11	303,27	574,524	173,225	-82,70	689,24
	3	7	436,57	740,470	279,871	-248,25	1121,39
	4	3	965,67	853,157	492,570	-1153,69	3085,03
	5	4	86,25	121,500	60,750	-107,08	279,58
	Total	43	393,86	625,105	95,328	201,48	586,24
P17-2	1	18	145,67	466,240	109,894	-86,19	377,52
	2	11	18,55	20,983	6,327	4,45	32,64
	3	7	43,86	52,982	20,025	-5,14	92,86
	4	3	226,67	289,367	167,066	-492,16	945,49
	5	4	18,50	1,732	,866	15,74	21,26
	Total	43	90,40	311,964	47,574	-5,61	186,40
P17-3	1	18	2,94	4,976	1,173	,47	5,42
	2	10	13,70	29,530	9,338	-7,42	34,82
	3	7	21,43	32,715	12,365	-8,83	51,69
	4	3	109,33	169,842	98,058	-312,58	531,24
	5	4	7,50	15,000	7,500	-16,37	31,37
	Total	42	16,62	50,071	7,726	1,02	32,22

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
P24-1	1	18	292,00	494,833	116,633	45,93	538,07
	2	10	348,60	629,156	198,957	-101,47	798,67
	3	7	436,71	710,339	268,483	-220,24	1093,67
	4	3	1425,67	873,863	504,525	-745,13	3596,46
	5	4	276,75	527,171	263,585	-562,10	1115,60
	Total	42	409,12	635,777	98,102	211,00	607,24
P24-2	1	18	185,72	379,251	89,390	-2,87	374,32
	2	10	303,80	617,953	195,414	-138,26	745,86
	3	7	351,57	729,967	275,902	-323,54	1026,68
	4	3	110,67	159,863	92,297	-286,46	507,79
	5	4	8,25	10,905	5,452	-9,10	25,60
	Total	42	219,21	482,833	74,503	68,75	369,68
P24-3	1	18	581,83	773,182	182,241	197,34	966,33
	2	10	380,90	628,263	198,674	-68,53	830,33
	3	7	420,00	714,096	269,903	-240,43	1080,43
	4	3	682,33	1141,151	658,844	-2152,44	3517,11
	5	4	863,75	946,004	473,002	-641,55	2369,05
	Total	42	541,05	747,833	115,393	308,01	774,09
P24-4	1	18	320,28	407,016	95,935	117,87	522,68
	2	10	449,50	667,942	211,222	-28,32	927,32
	3	7	409,43	707,469	267,398	-244,87	1063,73
	4	3	765,67	1071,157	618,433	-1895,23	3426,57
	5	4	33,25	29,477	14,739	-13,66	80,16
	Total	42	370,38	566,845	87,466	193,74	547,02
P24-5	1	18	54,11	79,654	18,775	14,50	93,72
	2	10	47,80	81,555	25,790	-10,54	106,14
	3	7	83,43	140,602	53,143	-46,61	213,46
	4	3	816,67	1041,898	601,540	-1771,55	3404,89
	5	4	16,25	29,262	14,631	-30,31	62,81
	Total	42	108,36	315,959	48,754	9,90	206,82
PP-1	1	18	5,83	9,937	2,342	,89	10,77
	2	10	6,20	6,730	2,128	1,39	11,01
	3	7	8,57	15,501	5,859	-5,76	22,91
	4	3	69,33	117,500	67,839	-222,55	361,22
	5	4	17,50	28,723	14,361	-28,20	63,20
	Total	42	12,02	33,019	5,095	1,73	22,31
PP-2	1	18	123,28	336,359	79,281	-43,99	290,55
	2	10	40,30	65,155	20,604	-6,31	86,91
	3	7	126,14	197,746	74,741	-56,74	309,03
	4	3	389,33	545,643	315,027	-966,12	1744,79
	5	4	24,25	28,028	14,014	-20,35	68,85
	Total	42	113,57	275,438	42,501	27,74	199,40
PP-3	1	18	26,72	51,809	12,212	,96	52,49
	2	10	133,50	263,286	83,258	-54,84	321,84
	3	7	115,86	262,038	99,041	-126,49	358,20
	4	3	80,00	112,867	65,164	-200,38	360,38
	5	4	35,75	33,150	16,575	-17,00	88,50
	Total	42	71,67	171,357	26,441	18,27	125,07

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
RT-1	1	12	50,17	82,756	23,890	-2,41	102,75
	2	9	75,00	90,345	30,115	5,55	144,45
	3	7	38,00	60,674	22,933	-18,11	94,11
	4	2	1,50	2,121	1,500	-17,56	20,56
	5	3	40,00	47,318	27,319	-77,54	157,54
	Total	33	50,48	74,756	13,013	23,98	76,99
RT-2	1	12	238,33	441,181	127,358	-41,98	518,65
	2	9	289,33	666,869	222,290	-223,27	801,93
	3	7	5,71	6,921	2,616	-,69	12,12
	4	2	,00	,000	,000	,00	,00
	5	3	1,67	2,887	1,667	-5,50	8,84
	Total	33	166,94	440,691	76,715	10,68	323,20
RT-3	1	12	53,08	105,517	30,460	-13,96	120,13
	2	9	150,22	248,711	82,904	-40,95	341,40
	3	7	4,14	8,435	3,188	-3,66	11,94
	4	2	3,50	4,950	3,500	-40,97	47,97
	5	3	,67	1,155	,667	-2,20	3,54
	Total	33	61,42	151,073	26,298	7,86	114,99
RT-4	1	12	16,75	37,606	10,856	-7,14	40,64
	2	9	42,11	51,564	17,188	2,48	81,75
	3	7	36,43	74,157	28,029	-32,16	105,01
	4	2	,00	,000	,000	,00	,00
	5	2	5,00	7,071	5,000	-58,53	68,53
	Total	32	26,41	49,587	8,766	8,53	44,28

Anexo 17 – Tabela da estatística dos padrões de resposta ao longo do tempo. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de diferença mínima significativa (LSD)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	141577,87	4	35394,468	,521	,721
	Within Groups	3872203,6	57	67933,396		
	Total	4013781,4	61			
CV	Between Groups	1E+009	4	296497467,6	,205	,935
	Within Groups	1E+011	81	1444496802		
	Total	1E+011	85			
NEF-1	Between Groups	9232,933	4	2308,233	,234	,917
	Within Groups	325708,96	33	9869,969		
	Total	334941,89	37			
NEF-2	Between Groups	173149,10	4	43287,275	,135	,968
	Within Groups	10586462	33	320801,878		
	Total	10759611	37			
NEF-3	Between Groups	477258,29	4	119314,574	,253	,905
	Within Groups	15532567	33	470683,851		
	Total	16009825	37			
P17-1	Between Groups	1464929,9	4	366232,463	,931	,456
	Within Groups	14946853	38	393338,245		
	Total	16411783	42			
P17-2	Between Groups	203321,03	4	50830,257	,497	,738
	Within Groups	3884171,3	38	102215,033		
	Total	4087492,3	42			
P17-3	Between Groups	29733,479	4	7433,370	3,765	,011
	Within Groups	73058,425	37	1974,552		
	Total	102791,90	41			
P24-1	Between Groups	3459053,2	4	864763,290	2,440	,084
	Within Groups	13113635	37	354422,574		
	Total	16572688	41			
P24-2	Between Groups	427738,73	4	106934,682	,433	,784
	Within Groups	9130498,3	37	246770,225		
	Total	9558237,1	41			
P24-3	Between Groups	865415,09	4	216353,772	,363	,833
	Within Groups	22064027	37	596325,049		
	Total	22929442	41			
P24-4	Between Groups	1041838,7	4	260459,666	,794	,536
	Within Groups	12132001	37	327891,925		
	Total	13173840	41			
P24-5	Between Groups	1633031,1	4	408257,784	6,140	,001
	Within Groups	2460010,5	37	66486,771		
	Total	4093041,6	41			
PP-1	Between Groups	11085,495	4	2771,374	3,050	,029
	Within Groups	33615,481	37	908,527		
	Total	44700,976	41			
PP-2	Between Groups	316536,30	4	79134,075	1,048	,396
	Within Groups	2793976,0	37	75512,864		
	Total	3110512,3	41			
PP-3	Between Groups	93631,615	4	23407,904	,780	,545
	Within Groups	1110265,7	37	30007,182		
	Total	1203897,3	41			
RT-1	Between Groups	11630,076	4	2907,519	,487	,745
	Within Groups	167202,17	28	5971,506		
	Total	178832,24	32			
RT-2	Between Groups	515625,12	4	128906,279	,633	,643
	Within Groups	5699058,8	28	203537,813		
	Total	6214683,9	32			
RT-3	Between Groups	112553,56	4	28138,391	1,275	,303
	Within Groups	617784,50	28	22063,732		
	Total	730338,06	32			
RT-4	Between Groups	6352,866	4	1588,216	,614	,656
	Within Groups	69872,853	27	2587,883		
	Total	76225,719	31			

Anexo 18 – Tabela da estatística de comparações múltiplas dos padrões de resposta ao longo do tempo. Apresentados apenas os dados com diferença significativa

Multiple Comparisons

LSD

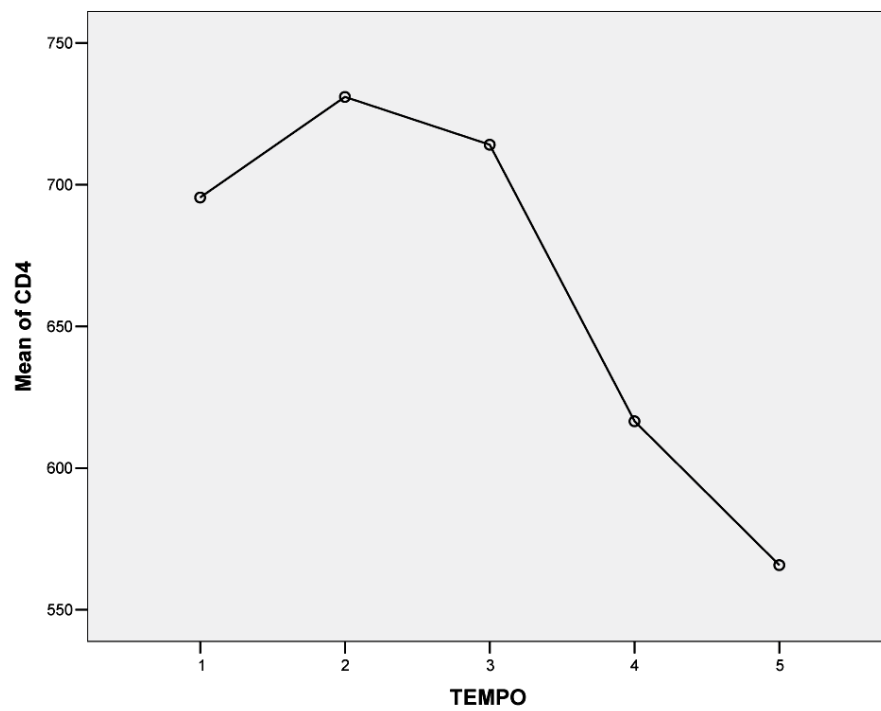
Dependent Variable	(I) TEMPO	(J) TEMPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P17-3	1	2	-10,756	17,526	,543
		3	-18,484	19,793	,356
		4	-106,389*	27,711	,000
		5	-4,556	24,563	,854
	2	1	10,756	17,526	,543
		3	-7,729	21,898	,726
		4	-95,633*	29,251	,002
		5	6,200	26,289	,815
	3	1	18,484	19,793	,356
		2	7,729	21,898	,726
		4	-87,905*	30,664	,007
		5	13,929	27,852	,620
	4	1	106,389*	27,711	,000
		2	95,633*	29,251	,002
		3	87,905*	30,664	,007
		5	101,833*	33,939	,005
	5	1	4,556	24,563	,854
		2	-6,200	26,289	,815
		3	-13,929	27,852	,620
		4	-101,833*	33,939	,005
P24-1	1	2	-56,600	234,803	,811
		3	-144,714	265,183	,589
		4	-1133,667*	371,256	,004
		5	15,250	329,083	,963
	2	1	56,600	234,803	,811
		3	-88,114	293,384	,766
		4	-1077,067*	391,897	,009
		5	71,850	352,204	,839
	3	1	144,714	265,183	,589
		2	88,114	293,384	,766
		4	-988,952*	410,819	,021
		5	159,964	373,145	,671
	4	1	1133,667*	371,256	,004
		2	1077,067*	391,897	,009
		3	988,952*	410,819	,021
		5	1148,917*	454,694	,016
	5	1	-15,250	329,083	,963
		2	-71,850	352,204	,839
		3	-159,964	373,145	,671
		4	-1148,917*	454,694	,016

Multiple Comparisons

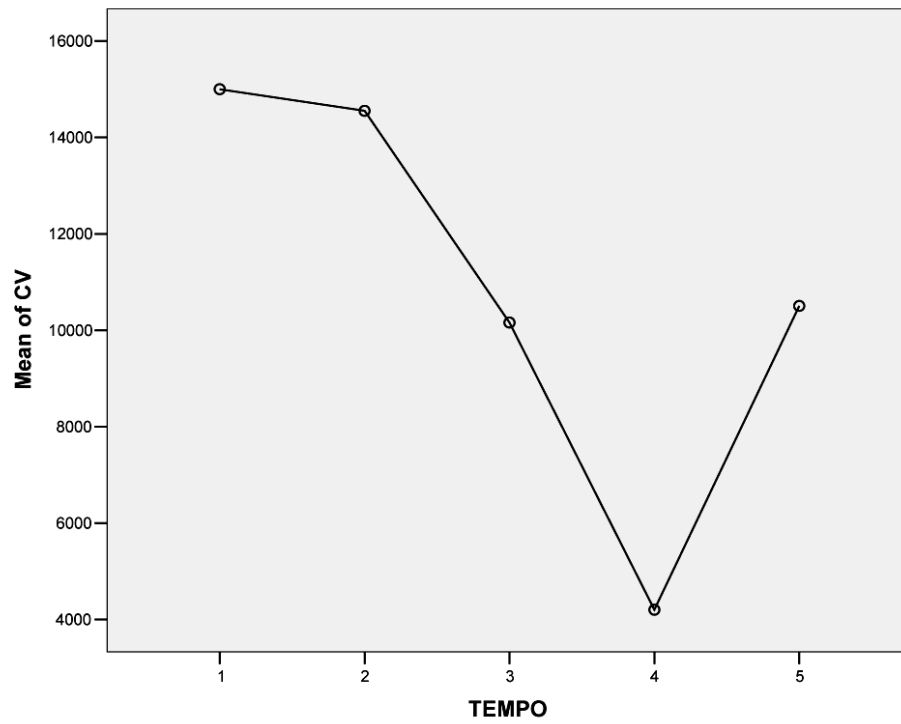
LSD

Dependent Variable	(I) TEMPO	(J) TEMPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P24-5	1	2	6,311	101,698	,951
		3	-29,317	114,856	,800
		4	-762,556*	160,798	,000
		5	37,861	142,532	,792
	2	1	-6,311	101,698	,951
		3	-35,629	127,070	,781
		4	-768,867*	169,738	,000
		5	31,550	152,546	,837
	3	1	29,317	114,856	,800
		2	35,629	127,070	,781
		4	-733,238*	177,934	,000
		5	67,179	161,616	,680
	4	1	762,556*	160,798	,000
		2	768,867*	169,738	,000
		3	733,238*	177,934	,000
		5	800,417*	196,936	,000
	5	1	-37,861	142,532	,792
		2	-31,550	152,546	,837
		3	-67,179	161,616	,680
		4	-800,417*	196,936	,000
PP-1	1	2	-,367	11,888	,976
		3	-2,738	13,426	,840
		4	-63,500*	18,797	,002
		5	-11,667	16,661	,488
	2	1	,367	11,888	,976
		3	-2,371	14,854	,874
		4	-63,133*	19,842	,003
		5	-11,300	17,832	,530
	3	1	2,738	13,426	,840
		2	2,371	14,854	,874
		4	-60,762*	20,800	,006
		5	-8,929	18,892	,639
	4	1	63,500*	18,797	,002
		2	63,133*	19,842	,003
		3	60,762*	20,800	,006
		5	51,833*	23,021	,030
	5	1	11,667	16,661	,488
		2	11,300	17,832	,530
		3	8,929	18,892	,639
		4	-51,833*	23,021	,030

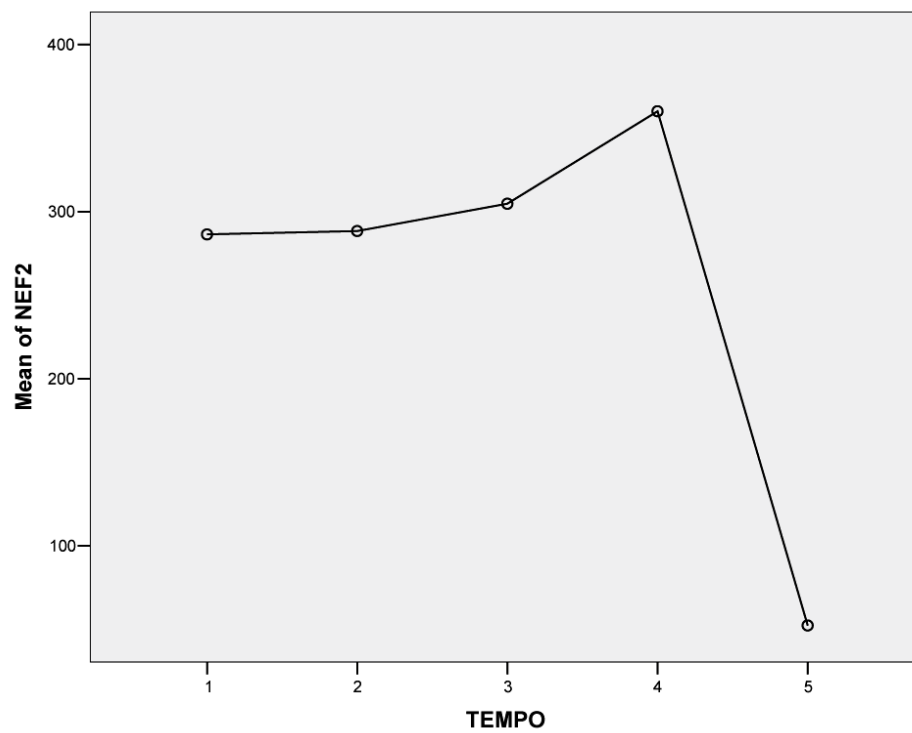
Anexo 19 - Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável dependente o número de linfócitos T CD4⁺ (CD4) em relação ao tempo (em anos)



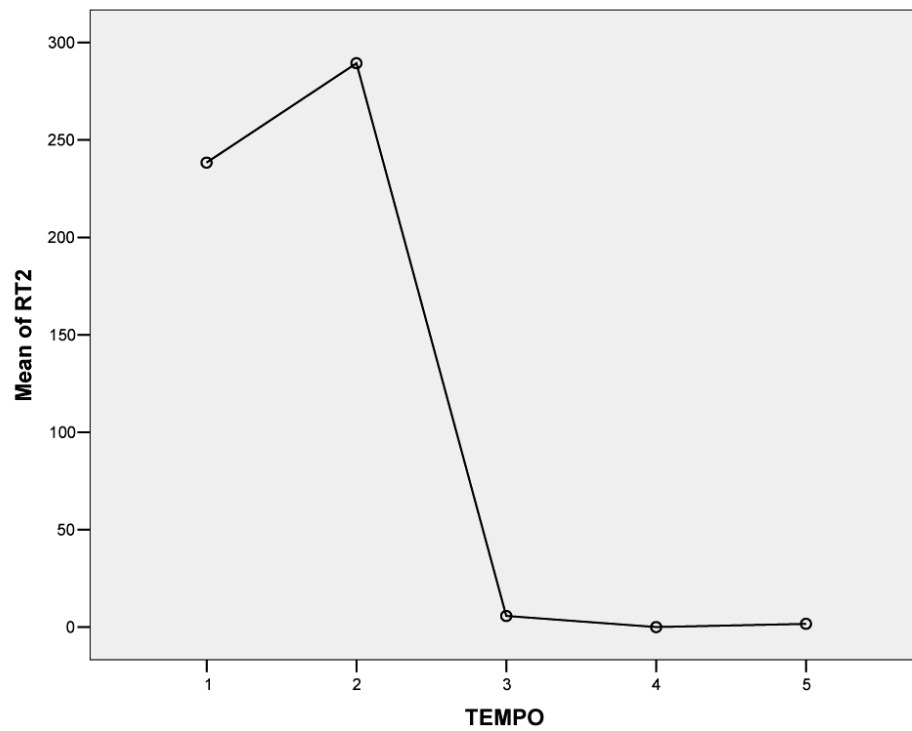
Anexo 20 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável dependente a carga viral plasmática (CV) em relação ao tempo (em anos)



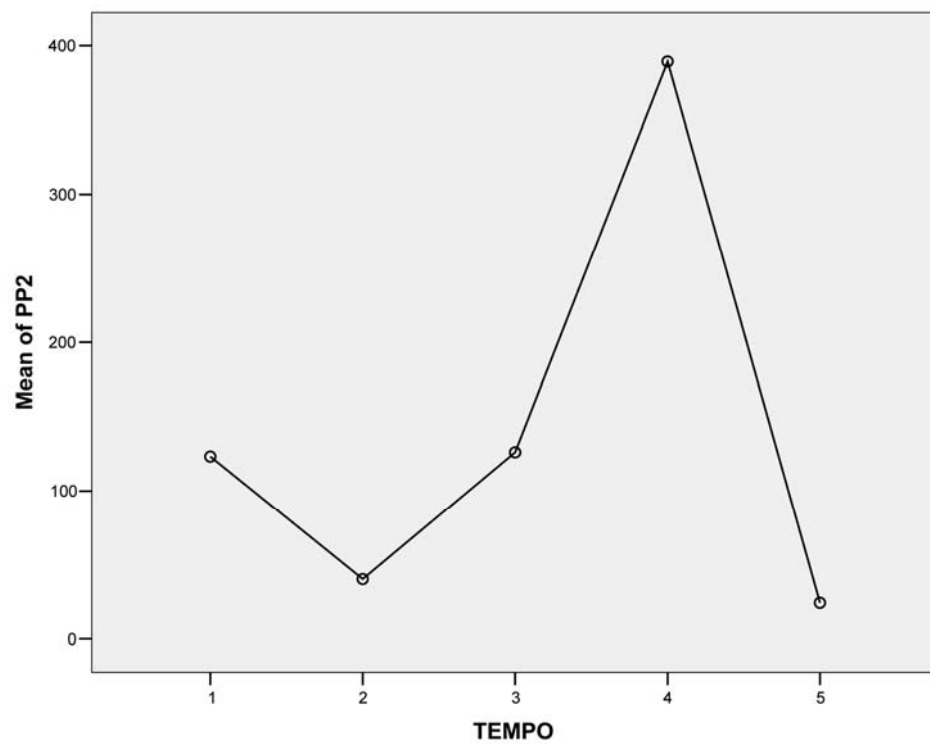
Anexo 21 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos Nef-2 em relação ao tempo (em anos)



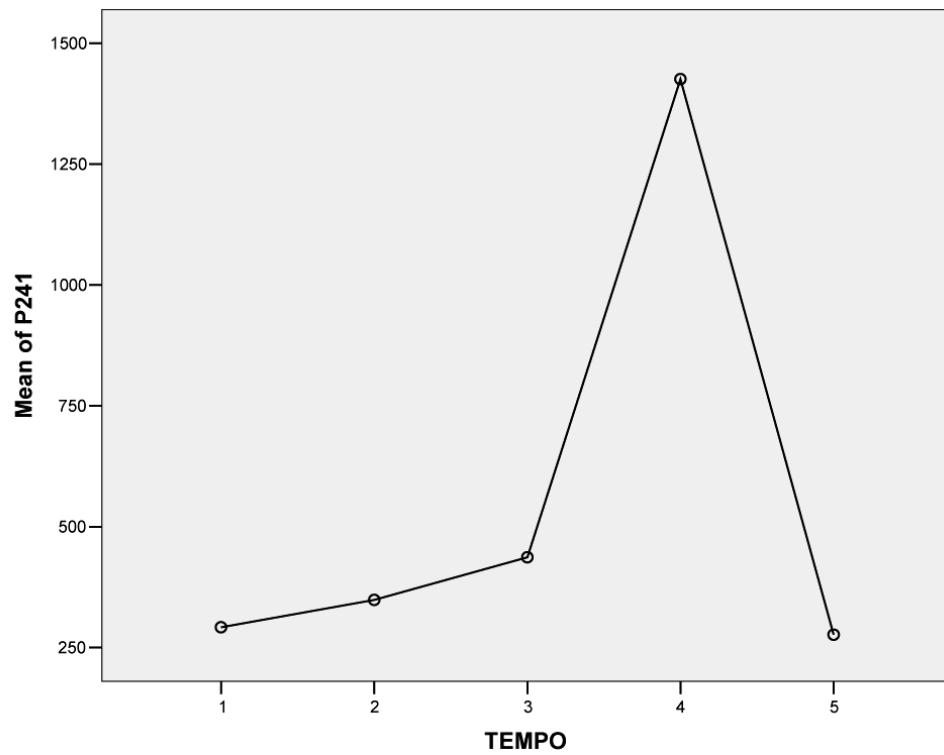
Anexo 22 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos RT-2 em relação ao tempo (em anos)



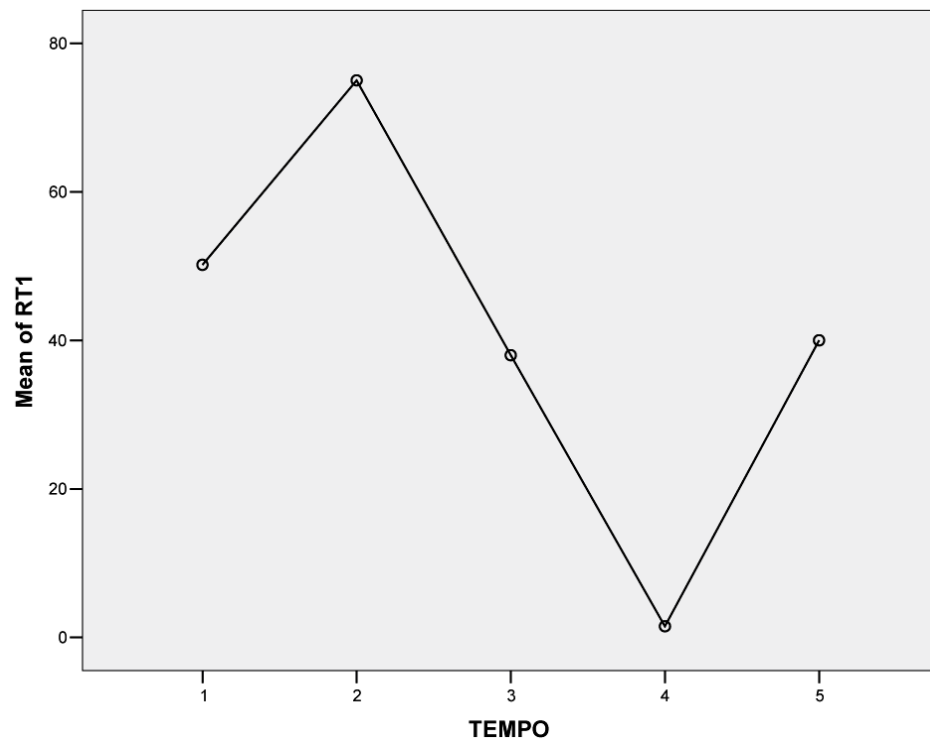
Anexo 23 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos pp-2 em relação ao tempo (em anos)



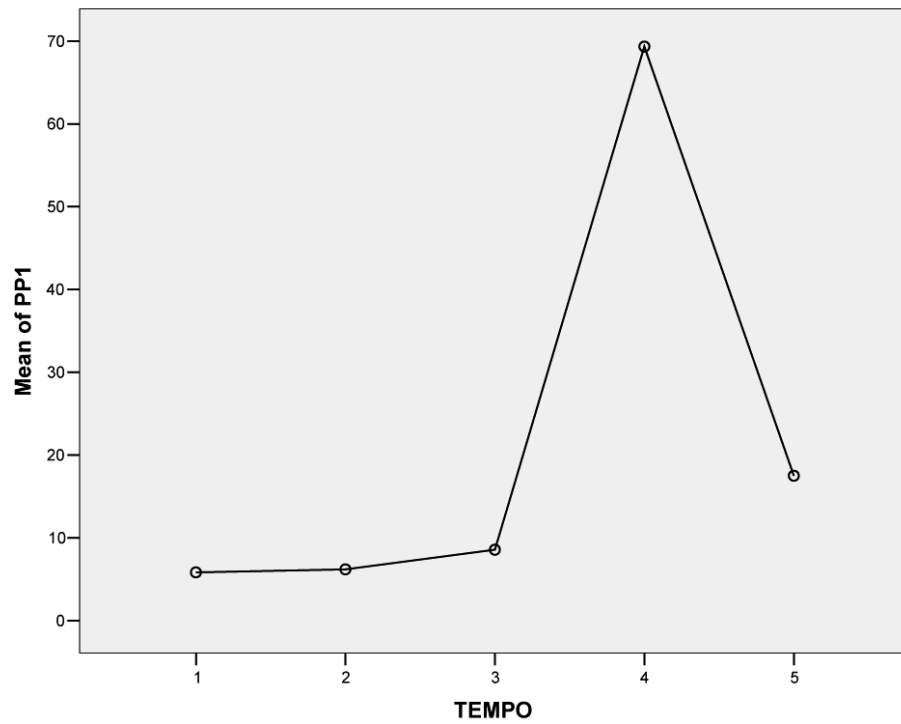
Anexo 24 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos p24-1 em relação ao tempo (em anos)



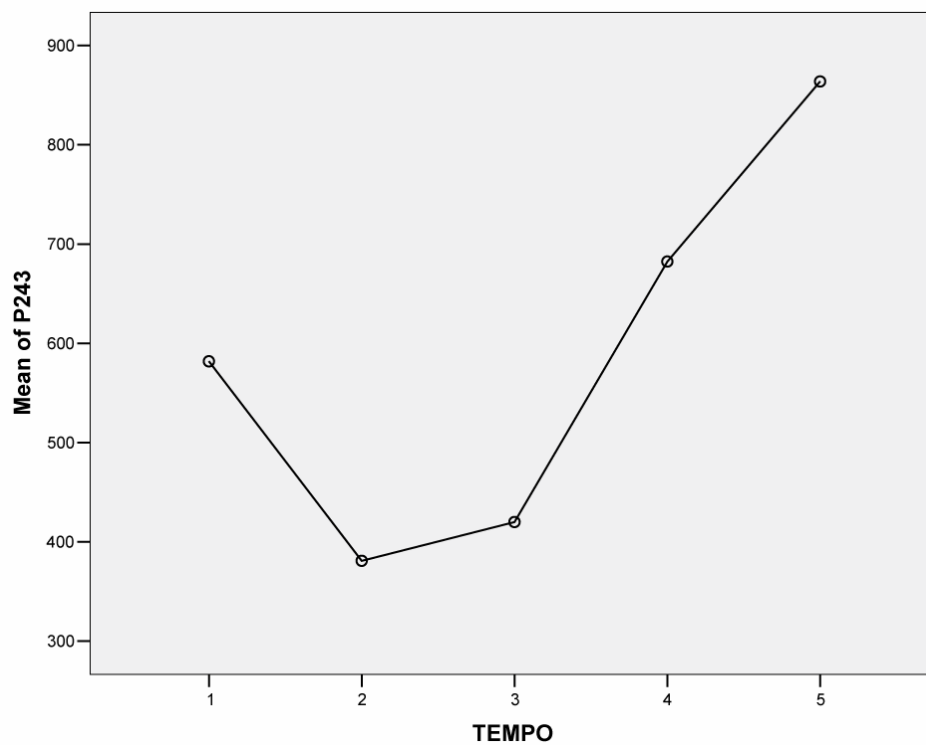
Anexo 25 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos RT-1 em relação ao tempo (em anos)



Anexo 26 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos pp-1 em relação ao tempo (em anos)



Anexo 27 – Curva representativa da regressão multilinear tendo como variável o *pool* de peptídeos p24-3 em relação ao tempo (em anos)



9 REFERÊNCIAS*

- ¹ UNAIDS-WHO – AIDS epidemic update: December 2007 [internet]. UNAIDS, Geneva; 2006 [cited 2008 Feb 18]. Available from: <http://www.unaids.org/en/>.
- ² Dowdle WR. The Epidemiology of AIDS. *Public Health Rep.* 1983; 98(4):308-12.
- ³ Gourevitch MN. The epidemiology of HIV and AIDS. Current trends. *Med Clin North Am.* 1996;80(6):1223-38.
- ⁴ Veronesi R, Focaccia R, Lomar AV. *HIV/AIDS: etiologia, patogenia e patologia clínica: tratamento e prevenção*. São Paulo: Atheneu; 2000.
- ⁵ Fauci AS. HIV and AIDS: 20 years of Science. *Nat Med.* 2003;9(7): 839-43.
- ⁶ Johnson RA. Dermatophyte infections in human immune deficiency virus (HIV) disease. *J Am Acad Dermatol*, 2000;43(5 Suppl):S135-42.
- ⁷ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Boletim epidemiológico – AIDS e*

* De acordo com:

Adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

DST. Ano IV – nº 1 - julho a dezembro de 2006/janeiro a junho de 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 18 fev. 2008.

⁸ São Paulo (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Programa Municipal de DST/Aids de São Paulo. *Boletim Epidemiológico de Aids/DST e Hepatites B e C do Município de São Paulo.* 2007. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/dstaid>. Acesso em 18 fev. 2008.

⁹ Sharp PM, Bailes E, Robertson DL, Gao F, Hahn BH. Origins and Evolution of AIDS Viruses. *Biol Bull.* 1999;196(36):338-42.

¹⁰ Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science.* 2000;287(5453):607-14.

¹¹ Hayami M, Ido E, Miura T. Survey of simian immunodeficiency virus among non human primate populations. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;188:1-20.

¹² Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* 1999;397(6718):436-41.

¹³ Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature.* 2006;444(7116):164.

¹⁴ Centers for Disease Control and Prevention. *Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles.* *Morb Mortal Wkly Rep.* 1981a;30(21):1-3.

¹⁵ Centers for Disease Control and Prevention. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1981b;30:305-8.

¹⁶ Centers for Disease Control and Prevention. Follow-up on Kaposi's and Pneumocystis Pneumonia. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1981c;30:409-10.

-
- 17 Durack DT. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1465-7.
- 18 Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1425-31.
- 19 Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Houzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1431-8.
- 20 Centers for Disease Control and Prevention. Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1982a;31:644-6.
- 21 Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – California. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1982b;31:652-4.
- 22 Centers for Disease Control and Prevention. Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants – New York, New Jersey, California. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1982c;31:665-7.
- 23 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.
- 24 Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 1984;225(4664):840-2.
- 25 Luciw PA, Potter SJ, Steimer K, Dina D, Levy JA. Molecular cloning of AIDS-associated retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):760-3.

-
- 26 Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*. 1986;322(6075):130-6.
- 27 Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. 2v.
- 28 Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
- 29 Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):399-405.
- 30 Kanki PJ, Hamel DJ, Sankalé JL, Hsieh C, Thior I, Barin F, Woodcock SA, Guèye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, NDoye I, Essex ME, MBoup S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis*. 1999;179(1):68-73.
- 31 Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*. 2002;83:1253-65.
- 32 Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet*. 1996;348(9019):31-5.
- 33 Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*. 2005;34(4):233-44.
- 34 Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*. 1985;40(1):9-17.
- 35 Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*. 2002;8(7):673-80.
- 36 Brun-Vézinet F, Damond F, Simon F. Variability of human immunodeficiency virus type 1. *Bull Soc Pathol Exot*. 1999;92(4):261-3.
- 37 Los Alamos. HIV Molecular Database [internet]. 2008 [cited 2008 Feb 25]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/>.

- ³⁸ WHO-UNAIDS. Approaches to the development of broadly protective HIV vaccines: challenges posed by the genetic, biological and antigenic variability of HIV-1. *AIDS*. 2001;15(6):W1-W25.
- ³⁹ Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F, Kimani J, Shi B, Kaul R, Bwayo J, Anzala O, Burger H. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS*. 2004;18(2):153-9.
- ⁴⁰ Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. 2002;296(5577):2354-60.
- ⁴¹ Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O, *et al*. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS*. 1993;7(9):1191-7.
- ⁴² Morgado MG, Sabino EC, Shpaer E, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, Mayer A. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(5):569-76.
- ⁴³ Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A, Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 2003;17(7):1063-9.
- ⁴⁴ World Health Organization Network for HIV Isolation and Characterization: HIV-1 type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(11):1327-43.
- ⁴⁵ Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Duarte AJ, Mayer A, Busch MP. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. *AIDS*. 1996;10(13):1579-84.

- ⁴⁶ Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V. 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.* 1998;18(5):488-94.
- ⁴⁷ Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvão-Castro B. HIV-1 Subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a City With African Sociodemographic Characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;22(3):288-93.
- ⁴⁸ Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LFM, Caseiro M, Chequer PJN, Couto-Fernandez JC, Ferreira PC, Galvão-Castro B, Greco D, Guimarães ML, Linhares de Carvalho MI, Morgado MG, Oliveira CAF, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A, Ueda M. HIV-1 Diversity in Brazil: Genetic, Biologic, and Immunologic Characterization of HIV-1 Strains in Three Potencial Vaccine Evaluation Sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;23(2):184-93.
- ⁴⁹ Brígido LFM, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CAF, Ferreira JLP, Eira M, Bergel F, Araújo F, Carvalheiro JR, Rodrigues R. Molecular Characteristics of HIV Type 1 Circulating in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005;21(7):673-82.
- ⁵⁰ Fenyö EM, Morfeldt-Månson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E, Åsjö B. Distinct Replicative and Cytopathic Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Isolates. *J Virol.* 1988;62(11):4414-9.
- ⁵¹ Coffin, JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 1995;267(5197):483-9.
- ⁵² Wain-Hobson S. Running the gamut of retroviral variation. *Trends Microbiol.* 1996;4(4):135-41.
- ⁵³ Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul

M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8.

⁵⁴ Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. CD4⁺ T Cell Depletion during all stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):749-59.

⁵⁵ Gartner S, Markovits P, Markovits DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*. 1986;233(4760):215-9.

⁵⁶ Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen Xuefei, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387(6629):183-8.

⁵⁷ Sipsas NV, Kalams SA, Trocha A, He S, Blattner WA, Walker BD, Johnson RP. Identification of Type-specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Homologous Viral Proteins in Laboratory Workers Accidentally Infected With HIV-1. *J Clin Invest*. 1997;99(4):752-62.

⁵⁸ Larsson M, Fonteneau JF, Lirvall M, Haslett P, Lifson JD, Bhardwaj N. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *AIDS*. 2002;16(10):1319-29.

⁵⁹ Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol*. 2002;3(10):975-83.

⁶⁰ Freed EO. HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*. 1998;251(1):1-15.

⁶¹ Goff P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Fields. *Virology*. 4a ed. Philadelphia: 2001.

⁶² Doms RW. Chemokine Receptors and HIV entry. *AIDS*. 2001;15 (Suppl 1):S34-5.

-
- ⁶³ Philpott SM. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr HIV Res.* 2003;1(2):217-27.
- ⁶⁴ Lochrie MA, Waugh S, Pratt DG Jr., Clever J, Parslow TG, Polisky B. *In vitro* selection of RNAs that bind to the human immunodeficiency virus type-1 gag polyprotein. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(14):2902-10.
- ⁶⁵ Dunfee R, Thomas ER, Gorry PR, Wang J, Ancuta P, Gabuzda D. Mechanisms of HIV-1 neurotropism. *Curr HIV Res.* 2006;4(3):267-78.
- ⁶⁶ Thomas ER, Dunfee RL, Stanton J, Bogdan D, Taylor J, Kunstman K, Bell JE, Wolinsky SM, Gabuzda D. Macrophage entry mediated by HIV Envs from brain and lymphoid tissues is determined by the capacity to use low CD4 levels and overall efficiency of fusion. *Virology.* 2007;360(1):105-19.
- ⁶⁷ Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: Mechanisms for Viral Persistence in the Presence of Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:665-708.
- ⁶⁸ Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T Cell Dynamics in HIV-1 Infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304.
- ⁶⁹ Gougeon ML, Montagnier L. Programmed Cell Death as a Mechanism of CD4 and CD8 T Cell Deletion in AIDS: Molecular Control and Effect of Highly Active Anti-retroviral Therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;887:199-212.
- ⁷⁰ Miedema F, Klein MR. AIDS pathogenesis: a finite immune response to blame? *Science.* 1996;272(5261):505-6.
- ⁷¹ Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999;5(5):512-7.
- ⁷² Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley JM, Calvez V, Katlama C, Costagliola D, Rivière Y, IMMUNOCO Study Group. Correlation

between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *AIDS*. 2002;16(18):2399-407.

⁷³ Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 1997;126(12):946-54.

⁷⁴ Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.

⁷⁵ Loveday C, Hill A. Prediction of progression to AIDS with serum HIV-1 RNA and CD4 count. *Lancet*. 1995;345(8952):790-1.

⁷⁶ Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272(5265):1167-70.

⁷⁷ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV: 2007/2008. Documento preliminar*. 2007a. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 05 mar. 2008.

⁷⁸ Pomerantz RJ, Horn DL. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med*. 2003;9(7):867-73.

⁷⁹ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV: 2005/2006*. 6a Ed. Brasília; 2007b. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 05 mar. 2008.

⁸⁰ Rodrigues R. *Avaliação da reconstituição do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV-1 em uso de terapia anti-retroviral combinada* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

-
- ⁸¹ Brigido L, Rodrigues R, Casseb J, Custodio RM, Fonseca LA, Sanchez M, Duarte AJ. CD4⁺ T Cell Recovery and Clinical Outcome in HIV-1-infected Patients Exposed to Multiple Antiretroviral Regimens: Partial Control of Viremia Is Associated with Favorable Outcome. *AIDS Patient Care STDS*. 2004;18(4):189-98.
- ⁸² Carcelain G, Saint-Mézard P, Altes HK, Tubiana R, Grenot P, Rabian C, de Boer R, Costagliola D, Katlama C, Debré P, Autran B. IL-2 therapy and thymic production of naive CD4 T cells in HIV-infected patients with severe CD4 lymphopenia. *AIDS*. 2003;17(6):841-50.
- ⁸³ Letvin NL. Vaccines Against Human Immunodeficiency Virus – Progress And Prospects. *N Engl J Med*. 1993;329(19):1400-5.
- ⁸⁴ Graham BS. Clinical Trials of HIV Vaccines. *Annu Rev Med*. 2002;53:207-21.
- ⁸⁵ Nabel GJ. HIV vaccine strategies. *Vaccine*. 2002;20(15):1945-7.
- ⁸⁶ Gotch FM, Imami N, Hardy G. Candidate vaccines for immunotherapy in HIV. *HIV Med*. 2001;2(4):260-5.
- ⁸⁷ Kinloch-de Loes S, Autran B. HIV-1 Therapeutic Vaccines. *J Infect*. 2002;44(3):152-9.
- ⁸⁸ Autran B, Debré P, Walker B, Katlama C. Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(6):503-8.
- ⁸⁹ Autran B, Carcelain G, Combadiere B, Debre P. Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. *Science*. 2004;305(5681):205-8.
- ⁹⁰ Gudmundsdóttir L, Sjödin A, Boström AC, Hejdeman B, Theve-Palm R, Alaeus A, Lidman K, Wahren B. Therapeutic immunization for HIV. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(3):221-30.
- ⁹¹ Walker BD. Elite Control of HIV Infection: Implications for Vaccines and Treatments. *Top HIV Med*. 2007;15(4):134-6.

- ⁹² Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.
- ⁹³ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing, Inc.;1994. Cap. 23, p.1195-254: The Immune System.
- ⁹⁴ Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, Ffrench RA, Bennets BH, Newcombe NR, Benson EM, Carr A, Cooper DA, Kaldor JM. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS*. 1997;11(15):1833-8.
- ⁹⁵ Visco-Comandini U, Hultgren C, Broström C, Birk M, Kim S, Sällberg M. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease Progression, CCR5 Genotype, and Specific Immune Responses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(4):463-6.
- ⁹⁶ Mazzucchelli R, Corvasce S, Violin M, Riva C, Bianchi R, Dehò L, Velleca R, Cibella J, Bada M, Moroni M, Galli M, Ballota C. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15(3):265-71.
- ⁹⁷ Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, Chen J, Raskino C, McKinney RE, Spector SA. Genetic Influence of CCR5, CCR2, and SDF1 Variants on Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)-Related Disease Progression and Neurological Impairment, in Children with Symptomatic HIV-1 Infection. *J Infect Dis*. 2003;188(10):1461-72.
- ⁹⁸ Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, David A, Luong TT, Nguyen NV, Theodorou I, Barré-Sinoussi F, Pancino G. Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users. *J Immunol*. 2003;171(11):5663-7.
- ⁹⁹ Mendila M, Heinken H, Becker S, Stoll M, Kemper A, Jacobs R, Schmidt RE. Immunologic and virologic studies in long-term nonprogressors with HIV-1 infection. *Eur J Med Res*. 1999;4(10):417-24.

- ¹⁰⁰ O'Connor GM, Holmes A, Mulcahy F, Gardiner CM. Natural killer cells from long-term non-progressor HIV patients are characterized by altered phenotype and function. *Clin Immunol*. 2007;124(3):277-83.
- ¹⁰¹ Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med*. 2003;9(7):861-6.
- ¹⁰² Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-Specific CD4⁺ T Cell Responses Associated with Control of Viremia. *Science*. 1997;278(5342):1447-50.
- ¹⁰³ Ostrowski MA, Justement SJ, Ehler L, Mizell SB, Lui S, Mican J, Walker BD, Thomas EK, Seder R, Fauci AS. The Role of CD4⁺ T Cell Help and CD40 Ligand in the In Vitro Expansion of HIV-1-Specific Memory Cytotoxic CD8⁺ T Cell Responses. *J Immunol*. 2000;165(11):6133-41.
- ¹⁰⁴ Hogan CM, Hammer SM. Host Determinants in HIV Infection and Disease. Part 1: Cellular and Humoral Immune Responses. *Ann Intern Med*. 2001;134(10):761-76.
- ¹⁰⁵ Kitchen SG, Jones NR, LaForge S, Whitmire JK, Vu BA, Galic Z, Brooks DG, Brown SJ, Kitchen CMR, Zack JA. CD4 on CD8⁺ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(23):8727-32.
- ¹⁰⁶ Baba TW, Liska V, Hoffmann-Lehmann R, Vlasak J, Xu W, Ayehunie S, Cavacini LA, Posner MR, Katinger H, Stiegler G, Bernacky BJ, Rizvi TA, Schmidt R, Hill LR, Keeling ME, Lu Y, Wright JE, Chou TC, Ruprecht RM. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med*. 2000;6(2):200-6.
- ¹⁰⁷ Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR. Neutralizing Antibodies Have Limited Effects on the Control of Established HIV-1 Infection In Vivo. *Immunity*. 1999;10(4):431-8.
- ¹⁰⁸ Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of

viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science*. 1999;283(5403):857-60.

¹⁰⁹ Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. Virus-Specific CD8⁺ Cytotoxic T-Lymphocyte Activity Associated with Control of Viremia in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 1994;68(9):6103-10.

¹¹⁰ Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987;328(6128):345-8.

¹¹¹ Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphaël M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debré P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature*. 1987;328(6128):348-51.

¹¹² Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccalà G. Phylogeny of a Novel Family of Human Endogenous Retrovirus Sequences, HERV-W, in Humans and Other Primates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999;15(17):1529-33.

¹¹³ Ferbas J. Perspectives on the role of CD8⁺ cell suppressor factors and cytotoxic T lymphocytes during HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14(Suppl 2):S153-60.

¹¹⁴ Migueles SA, Connors M. Frequency and function of HIV-specific CD8⁺ T cells. *Immunol Lett*. 2001;79(1-2):141-50.

¹¹⁵ Mackewicz CE, Garovoy MR, Levy JA. Compatibility Requirements for CD8⁺-T-Cell-Mediated Suppression of Human Immunodeficiency Virus Replication. *J Virol*. 1998;72(12):10165-70.

¹¹⁶ Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.

¹¹⁷ Paroli M, Propato A, Accapezzato D, Francavilla V, Schiaffella E, Barnaba V. The immunology of HIV-infected long-term non-progressors – a current view. *Immunol Letts*. 2001;79(1-2):127-9.

¹¹⁸ Levy JA. The search for the CD8⁺ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol.* 2003;24(12):628-32.

¹¹⁹ Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal Association of Cellular Immune Responses with the Initial Control of Viremia in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Syndrome. *J Virol.* 1994;68(7):4650-5.

¹²⁰ Altfeld M, Rosenberg ES, Shankarappa R, Mukherjee JS, Hecht FM, Eldridge RL, Addo MM, Poon SH, Phillips MN, Robbins GK, Sax PE, Boswell S, Kahn JO, Brander C, Goulder PJR, Levy JA, Mullins JI, Walker BD. Cellular Immune Responses and Viral Diversity in Individuals Treated during Acute and Early HIV-1 Infection. *J Exp Med.* 2001;193(2):169-80.

¹²¹ Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJR, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD. Comprehensive Epitope Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T-Cell Responses Directed against the Entire Expressed HIV-1 Genome Demonstrate Broadly Directed Responses, but No Correlation to Viral Load. *J Virol.* 2003;77(3):2081-92.

¹²² Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8⁺ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *J Exp Med.* 2000;192(1):63-75.

¹²³ Hoffenbach A, Langlade-Demoyen P, Dadaglio G, Vilmer E, Michael F, Mayaud C, Autran B, Plata F. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 1989;142(2):452-62.

¹²⁴ Sun Y, Iglesias E, Samri A, Kamkamidze G, Decoville T, Carcelain G, Autran B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods.* 2003;272(1-2):23-34.

-
- ¹²⁵ Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods*. 1995;181(1):45-54.
- ¹²⁶ Herr W, Schneider J, Lohse AW, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T. Detection and quantification of blood-derived CD8+ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Methods*. 1996;191(2):131-42.
- ¹²⁷ Schmittel A, Keilholz U, Bauer S, Kuhne U, Stevanovic S, Thiel E, Scheibenbogen C. Application of the IFN- γ ELISPOT assay to quantify T cell responses against proteins. *J Immunol Methods*. 2001; 247(1-2): 17-24.
- ¹²⁸ Yang J, Lemas VM, Flinn IW, Krone C, Ambinder RF. Application of the ELISPOT assay to the characterization of CD8+ responses to Epstein-Barr virus antigens. *Blood*. 2000;95(1):241-8.
- ¹²⁹ Flanagan KL, Lee EAM, Gravenor MB, Reece WHH, Urban BC, Doherty T, Bojang KA, Pinder M, Hill AVS, Plebanski M. Unique T Cell Effector Functions Elicited by *Plasmodium falciparum* Epitopes in Malaria-Exposed Africans Tested by Three T Cell Assays. *J Immunol*. 2001;167(8):4729-37.
- ¹³⁰ Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H, Reece WH, Mwinga A, Godfrey-Fausset P, Lalvani A. Rapide detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS*. 2002;16(17):2285-93.
- ¹³¹ Novitsky V, Rybak N, McLane MF, Gilbert P, Chigwedere P, Klein I, Gaolekwe S, Chang SY, Peter T, Thior I, Ndung'u T, Vannberg F, Foley BT, Marlink R, Lee TH, Essex M. Identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Gag-, Tat-, and Nef-Specific Elispot-Based Cytotoxic T-Lymphocyte Responses for AIDS Vaccine Design. *J Virol*. 2001;75(19):9210-28.

- ¹³² Mashishi T, Gray CM. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(9):903-10.
- ¹³³ Draenert R, Altfeld M, Brander C, Basgoz N, Corcoran C, Wurcel AG, Stone DR, Kalams SA, Trocha A, Addo MM, Gouder PJR, Walker BD. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cells responses. *J Immunol Methods.* 2003;275(1-2):19-29.
- ¹³⁴ Buchbinder S, Vittinghoff E. HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications. *Microbes Infect.* 1999;1(13):1113-20.
- ¹³⁵ Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science.* 1986;234(4783):1563-6.
- ¹³⁶ Schwartz DH, Viscidi R, Laeyendecker O, Song H, Ray SC, Michael N. Predominance of defective proviral sequences in an HIV+ long-term non-progressor. *Immunol Lett.* 1996;51(1-2):3-6.
- ¹³⁷ Hassaïne G, Agostini I, Candotti D, Bessou G, Caballero M, Agut H, Autran B, Barthalay Y, the French ALT Study Group, Vigne R. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 *vif* gene in long-term asymptomatic individuals. *Virology.* 2000;276(1):169-80.
- ¹³⁸ Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ, Lynch D, Pilon AA, Hawley N, Kim JE, Chen Z, Montpetit M, Sanchez-Dardon J, Cohen EA, Badley AD. *Vpr* R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1547-54.
- ¹³⁹ Liegler TJ, Yonemoto W, Elbeik T, Vittinghoff E, Buchbinder SP, Greene WC. Diminished Spontaneous Apoptosis in Lymphocytes from Human Immunodeficiency Virus-Infected Long-Term Nonprogressors. *J Infect Dis.* 1998;178(3):669-79.
- ¹⁴⁰ Saksena NK, Ge YC, Wang B, Xiang SH, Dwyer DE, Randle C, Palasanthiran P, Ziegler J, Cunningham AL. An HIV-1 infected long-

term non-progressor (LTNP): molecular analysis of HIV-1 strains in the *vpr* and *nef* genes. *Ann Acad Med Singapore*. 1996;25(6):848-54.

¹⁴¹ Visco-Comandini U, Yun Z, Paganelli R, Orlandi P, Salotti A, Johansson B, Vahlne A, Sonnerborg A. HIV *nef* mutations and clinical long-term nonprogression. A molecular epidemiology study. *J Hum Virol*. 1998;1(5):320-7.

¹⁴² Brambilla A, Turchetto L, Gatti A, Bovolenta C, Veglia F, Santagostino E, Gringeri A, Clementi M, Poli G, Bagnarelli P, Vicenzi E. Defective *nef* Alleles in a Cohort of Hemophiliacs with Progressing and Nonprogressing HIV-1 Infection. *Virology*. 1999;259(2):349-68.

¹⁴³ Gómez-Román VR, Vázquez JA, del Carmen Basualdo M, Estrada FJ, Ramos-Kuri M, Soler C. *nef*/Long Terminal Repeat Quasispecies from HIV Type 1-Infected Mexican Patients with Different Progression Patterns and Their Pathogenesis in hu-PBL-SCID Mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(5):441-52.

¹⁴⁴ Birch MR, Learmont JC, Dyer WB, Deacon NJ, Zaunders JJ, Saksena N, Cunningham AL, Mills J, Sullivan JS. An examination of signs of disease progression in survivors of the Sydney Blood Bank Cohort (SBBC). *J Clin Virol*. 2001;22(3):263-70.

¹⁴⁵ Almond N, Kent K, Cranage M, Rud E, Clarke B, Stott EJ. Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet*. 1995;345(8961):1342-4.

¹⁴⁶ Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann DL. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996;2(4):405-11.

¹⁴⁷ Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ. HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantage. *Science*. 1999;283(5408):1748-52.

¹⁴⁸ Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuanec H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, Schächter F, Zagury D, Rappaport J, Winkler C, Nelson

GW, Zagury JF. New Class I and II HLA Alleles Strongly Associated with Opposite Patterns of Progression to AIDS. *J Immunol.* 1999;162(11):6942-6.

¹⁴⁹ Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(6):2709-14.

¹⁵⁰ Carrington M, O'Brien SJ. The Influence of *HLA* Genotype on AIDS. *Annu Rev Med.* 2003;54:535-51.

¹⁵¹ Trachtenberg E, Korber B, Sollars C, Kepler TB, Hraber PT, Hayes E, Funkhouser R, Fugate M, Theiler J, Hsu YS, Kunstman K, Wu S, Phair J, Erlich H, Wolinsky S. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med.* 2003;9(7):928-35.

¹⁵² Jansen CA, Kostense S, Vandenberghe K, Nanlohy NM, De Guyper IM, Piriou E, Manting EH, Miedema F, van Baarle D. High responsiveness of HLA-B57-restricted Gag-specific CD8⁺ T cells *in vitro* may contribute to the protective effect of HLA-B57 in HIV-infection. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):150-8.

¹⁵³ Magierowska M, Theodorou I, Debré P, Sanson F, Autran B, Rivière Y, Charron D, French ALT and IMMUNOCO Study Groups, Costagliola D. Combined Genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA Genes Can Predict the Long-Term Nonprogressor Status in Human Immunodeficiency Virus-1 – Infected Individuals. *Blood.* 1999;93(3):936-41.

¹⁵⁴ Mann DL, Murray C, Yarchoan R, Blattner WA, Goedert JJ. HLA antigen frequencies in HIV-1 seropositive disease-free individuals and patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1988;1(1):13-7.

¹⁵⁵ Just JJ. Genetic Predisposition to HIV-1 Infection and Acquired Immune Deficiency Virus Syndrome: A Review of the Literature Examining Associations with HLA[corrected]. *Hum Immunol.* 1995;44(3):156-69.

¹⁵⁶ Roger M. Influence of host genes on HIV-1 disease progression. *Faseb J.* 1998;12(9):625-32.

¹⁵⁷ Korber B, Brander C, Haynes B, Koup R, Kuiken C, Moore J, Walker B, Watlins D. *HIV Molecular Immunology*. Los Alamos National Laboratory. New Mexico; 2001.

¹⁵⁸ Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, McMichael AJ. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature.* 1991;354(6353):453-9.

¹⁵⁹ Harcourt GC, Garrard S, Davenport MP, Edwards A, Phillips RE. HIV-1 Variation Diminishes CD4 T Lymphocyte Recognition. *J Exp Med.* 1998;188(10):1785-93.

¹⁶⁰ Haas G, Plikat U, Debré P, Lucchiari M, Katlama C, Dudoit Y, Bonduelle O, Bauer M, Ihlenfeldt HG, Jung G, Maier B, Meyerhans A, Autran B. Dynamics of Viral Variants in HIV-1 Nef and Specific Cytotoxic T Lymphocytes In Vivo. *J Immunol.* 1996, 157(9):4212-21.

¹⁶¹ Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP, Elbeik T, Feinberg MB, Buchbinder SP, Walker BD. Cytotoxic T Lymphocytes in Asymptomatic Long-Term Nonprogressing HIV-1 Infection. Breadth and Specificity of the Response and Relation to In Vivo Viral Quaspecies in a Person with Prolonged Infection and Low Viral Load. *J Immunol.* 1996a;156(7):2616-23.

¹⁶² Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Ylma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996b;12(7):585-92.

¹⁶³ Pedersen C, Katzenstein T, Nielsen C, Lundgren JD, Gerstoft J. Prognostic value of serum HIV-RNA levels at virologic steady state after seroconversion: relation to CD4 cell count and clinical course of primary infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997;16(2):93-9.

- ¹⁶⁴ Propato A, Schiaffella E, Vicenzi E, Francavilla V, Baloni L, Paroli M, Finocchi L, Tanigaki N, Ghezzi S, Ferrara R, Chesnut R, Livingston B, Sette A, Paganelli R, Aiuti F, Poli G, Barnaba V. Spreading of HIV-Specific CD8⁺ T-Cell Repertoire in Long-Term Nonprogressors and Its Role in the Control of Viral Load and Disease Activity. *Hum Immunol*. 2001;62(6):561-76.
- ¹⁶⁵ Alatrakchi N, Di Martino V, Thibault V, Autran B, ALT and IMMUNE-VIRC ANRS study groups. Strong CD4 Th1 responses to HIV and hepatitis C virus in HIV-infected long-term non-progressors co-infected with hepatitis C virus. *AIDS*. 2002;16(5):713-7.
- ¹⁶⁶ Valdez H, Carlson NL, Post AB, Asaad R, Heeger PS, Lederman MM, Lehmann PV, Anthony DD. HIV long-term non-progressors maintain brisk CD8 T cell responses to other viral antigens. *AIDS*. 2002;16(8):1113-8.
- ¹⁶⁷ Pontesilli O, Klein MR, Kerkhof-Garde SR, Pakker NG, de Wolf F, Schuitemaker H, Miedema F. Longitudinal Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 – Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses: A Predominant Gag-Specific Response Is Associated with Nonprogressive Infection. *J Infect Dis*. 1998;178(4):1008-18.
- ¹⁶⁸ Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, McLaughlin M, Dybul M, Mican JM, Fauci AS. Suppression of HIV replication in the resting CD4⁺ T cell reservoir by autologous CD8⁺ T cells: Implications for the development of therapeutics strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(1):253-8.
- ¹⁶⁹ Yamada T, Iwamoto A. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol*. 2000;145(5):1021-7.
- ¹⁷⁰ Djordjevic A, Veljkovic M, Antoni S, Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Zevgiti S, Dietrich U, Veljkovic N, Branch DR. The presence of antibodies recognizing a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 gp120 correlates with non-progressive HIV infection. *Curr HIV Res*. 2007;5(5):443-8.

- ¹⁷¹ Bodman-Smith MD, Williams I, Johnstone R, Boylston A, Lydyard PM, Zumla A. T cell receptor usage in patients with non-progressing HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 2002;130(1):115-20.
- ¹⁷² Masciotra S, Owen SM, Rudolph D, Yang C, Wang B, Saksena N, Spita T, Dhawan S Lal RB. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *AIDS*. 2002;16(14):1887-98.
- ¹⁷³ Maecker HT, Maino VC. T cell immunity to HIV: defining parameters of protection. *Curr HIV Res*. 2003;1(2):249-59.
- ¹⁷⁴ Candotti D, Costagliola D, Joberty C, Bonduelle O, Rouzioux C, Autran B, the French ALT Study Group, Agut H. Status of Long-Term Asymptomatic HIV-1 Infection Correlates With Viral Load but not With Virus Replication Properties and Cell Tropism. *J Med Virol*. 1999a;58(3):256-63.
- ¹⁷⁵ Candotti D, Calvez V, Autran B, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H. Decreased peripheral circulation of HIV-infected cells in a subset of long-term nonprogressors. The French ALT Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999b;21(3):253-5.
- ¹⁷⁶ Ngo-Giang-Houong N, Candotti D, Goubar A, Autran B, Maynard M, Sicard D, Clauvel JP, Agut H, Costagliola D, Rousioux C, The French Asymptomatic Long-Term Study Group. HIV Type 1-Specific IgG2 Antibodies: Markers of Helper T Cell Type 1 Response and Prognostic Marker of Long-Term Nonprogression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17(15):1435-46.
- ¹⁷⁷ Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-9.
- ¹⁷⁸ Los Alamos. HIV Molecular Immunology Database [internet]. 2005 [cited 2005 Nov 25]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/immunology>.

¹⁷⁹ Schnuriger A. *Etude des réponses immunes anti-VIH médiée par les lymphocytes T CD8+ dans La cohorte des patients Asymptomatiques à Long Term* [monografia]. Paris: Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris XI; 2004.

¹⁸⁰ Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftinck-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H, Miedema F. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med*. 1995;181(4):1365-72.

¹⁸¹ Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, Hecht FM, Lee PK, Vogel M, Yu XG, Draenert R, Johnston MN, Strick D, Allen TM, Feeney ME, Kahn JO, Sekaly RP, Levy JA, Rockstroh JK, Goulder PJR, Walker BD. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS*. 2003;17(18):2581-91.

¹⁸² Currier JR, Harris ME, Cox JH, McCutchan FE, Bix DL, Maayan S, Ferrari G. Immunodominance and cross-reactivity of B5703-restricted CD8 T lymphocytes from HIV type 1 subtype C-infected Ethiopians. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21(3):239-45.

¹⁸³ Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber LD, Szinger J, Day C, Klenerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD, Goulder PJ. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*. 2004;432(7018):769-75.

¹⁸⁴ Yu XG, Shang H, Addo MM, Eldridge RL, Phillips MN, Feeney ME, Strick D, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M; HIV Study Collaboration. Important contribution of p15 Gag-specific responses to the total Gag-specific CTL responses. *AIDS*. 2002;16(3):321-8.

¹⁸⁵ Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*. 2003;9(7):853-60.

- ¹⁸⁶ Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473-85.
- ¹⁸⁷ Cao Y, Qin L, Zhang L; Safrit J; Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1995;332(4):201-8.
- ¹⁸⁸ Klein MR, Miedema F. Long-term survivors of HIV-1 infection. *Trends Microbiol*. 1995;3(10):386-91.
- ¹⁸⁹ Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Terán G, Sato A, Stranford SA, Fujimura SH, Christopherson C, Chang SY, Levy JA. Virological and Immunological Features of Long-Term Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Who Have Remained Asymptomatic Compared With Those Who Have Progressed to Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Blood*. 1998;92(9):3105-14.
- ¹⁹⁰ Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, Ehler L, Prussin C, Stevens R, Lambert L, Altman J, Hallahan CW, de Quiros JCLB, Connors M. Maintenance of Large Numbers of Virus-Specific CD8⁺ T Cells in HIV-Infected Progressors and Long-Term Nonprogressors. *J Immunol*. 2000;165(2):1082-92.
- ¹⁹¹ Ferrari G, Currier JR, Harris ME, Finkelstein S, de Oliveira A, Barkhan D, Cox JH, Zeira M, Weinhold KJ, Reinsmoen N, McCutchan F, Birx DL, Osmanov S, Maayan S. HLA-A and -B Allele Expression and Ability to Develop Anti-Gag Cross-Clade Responses in Subtype C HIV-1-Infected Ethiopians. *Hum Immunol*. 2004;65(6):648-59.
- ¹⁹² Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, Johnston MN, Burgett N, Swartz ME, Yang A, Alter G, Yu XG, Meier A, Rockstroh JK, Allen TM, Jessen H, Rosenberg ES, Carrington M, Walker BD. HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med*. 2006;3(10):1851-64.

-
- ¹⁹³ Keoshkerian E, Ashton LJ, Smith DG, Ziegler JB, Kaldor JM, Cooper DA, Stewart GJ, French RA. Effector HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in long-term nonprogressors: associations with viral replication and progression. *J Med Virol.* 2003;71(4):483-91.
- ¹⁹⁴ Sáez-Cirión A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O; ANRS EP36 HIV CONTROLLERS study group. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol.* 2007;28(12):532-40.
- ¹⁹⁵ Autran B, Hadida F, Haas G. Evolution and plasticity of CTL responses against HIV. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:546-53.
- ¹⁹⁶ Borghan MA., Oka S, Takiguchi M. Identification of HLA-A*3101-restricted cytotoxic T-lymphocyte response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in patients with chronic HIV-1 infection. *Tissue Antigens.* 2005;66:305-13.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)