

VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA

***SUBTIPOS E POLIMORFISMO DA REGIÃO POL DO HIV-1, EM
PACIENTES IMUNIZADOS COM UMA VACINA TERAPÊUTICA DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS.***

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2005**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Mestrado de Medicina Tropical

VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA

***SUBTIPOS E POLIMORFISMO DA REGIÃO POL DO HIV-1, EM
PACIENTES IMUNIZADOS COM UMA VACINA TERAPÊUTICA DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADOR

LUIZ CLÁUDIO ARRAES DE ALENCAR
Professor do Departamento de Medicina Tropical do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco

**RECIFE
2005**

Ferreira, Valéria Oliveira de Melo

Subtipos e polimorfismo da região *Pol* do HIV-1, em pacientes imunizados com uma vacina terapêutica de células dendríticas / Valéria Oliveira de Melo Ferreira. – Recife : O Autor, 2005.

xiv, 79 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. HIV (Vírus) – Região *Pol* – Subtipos. 2. Polimorfismo. 3. Vacina terapêutica. 4. Células dendríticas. I. Título.

**616.98
616.9792**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-076**



RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA

No dia 09 de novembro de 2005, às 08h00, no Auditório Prof. Marcionilo Lins – do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.B./UFPE, os Professores: Prof^ª. Dr^ª. **Heloísa Ramos Lacerda de Melo** (Depto. de Medicina Clínica – UFPE – Membro Interno), Prof. Dr. **Jailson de Barros Correia** (Diretoria de Pesquisa – IMIP – Membro Externo) e a Prof^ª. Dr^ª. **Vera Magalhães da Silveira** (Depto. de Medicina Tropical – UFPE – Membro Interno), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram a mestranda **VALÉRIA OLIVEIRA DE MELO FERREIRA** sobre a sua Dissertação intitulada **”SUBTIPOS E POLIMORFISMO DA REGIÃO POL DO HIV-1 EM PACIENTES IMUNIZADOS COM UMA VACINA TERAPÊUTICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS”**. Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. **Heloísa Ramos Lacerda de Melo**

Aprovada

Prof. Dr. **Jailson de Barros Correia**

APROVADA.

Prof^ª. Dr^ª. **Vera Magalhães da Silveira**

Aprovada.

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Jailson de Barros Correia

Prof. Dr. Jailson de Barros Correia

Vera Magalhães

Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

PROFESSOR AMARO HENRIQUE PESSOA LINS

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROF. CELSO PINTO DE MELO

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROF. JOSÉ TADEU PINHEIRO

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

PROF. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENDES

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

CORPO DOCENTE

PROFA. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

PROFA. ELIZABETH MALAGUENO DE SANTANA

PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

PROFA. GERUSA DREYER VIEIRA

PROF. JOAQUIM ALFREDO ALVES NORÕES

PROFA. MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL

PROFA. MARIA DE FÁTIMA MILITÃO DE ALBUQUERQUE

PROFA. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO

PROF. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENDES

PROFA. SÍLVIA MARIA DE LEMOS HINRICHSEN

PROFA. VERA MAGALHÃES DA SILVEIRA

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho ao meu pai, exemplo de coragem, honestidade e determinação, que mesmo no final da sua vida, lutou para ficar entre nós até o último minuto, deixando a lição que nunca devemos desistir de viver.

*À minha mãe, meu referencial
intelectual com quem compartilho
minhas conquistas.*

*Aos meus filhos Guga e Pedro
que iluminam todos os dias da
minha vida.*

*A Augusto meu porto seguro.
Com quem compartilho todos
os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luiz Cláudio Arraes**, fonte de estímulo e generosidade. Obrigada por tudo principalmente pela oportunidade de trabalhar em um projeto tão importante.

À **Profa. Patrícia Moura** a quem tenho muitos motivos para agradecer; sua amizade, seu entusiasmo científico que é contagiante, sua generosidade que é incalculável, sua perseverança que é inspiradora... Obrigada por tudo!

Ao **Prof. Amílcar Tanuri** por compartilhar da idéia deste trabalho e proporcionar sua realização.

Ao **Prof. Rodrigo Brindeiro** por permitir a realização dos testes moleculares no Laboratório de Virologia Molecular da UFRJ.

À **Angélica, Mônica , Celina, Ana Flávia, Renatinho, Adriana** e a todos que fazem parte da equipe do Laboratório de Virologia Molecular da UFRJ, pela ajuda na realização dos testes moleculares.

A **Luydson**, pela disponibilidade e paciência para analisar os dados através dos programas de bioinformática.

Aos meus **colegas do LACEN**, pela ajuda e apoio constante.

Ao **Prof. José Luiz** e a toda equipe do LIKA, pelo apoio e incentivo.

Ao **Dr. Ernesto Marques** pelas boas idéias.

Aos funcionários do Mestrado, **Walter e Jupira** por serem sempre tão solícitos.

A **Mozart** sempre tão prestativo e bem humorado.

Aos **meus irmãos**, pelo incentivo constante.

Ao meu tio **Antônio Campos de Melo**, que sempre estendeu o tapete vermelho quando precisei ficar em sua residência no Rio de Janeiro. Seu carinho, apoio e incentivo foram essenciais para a concretização deste trabalho.

A **Augusto**, meu companheiro de todas as horas, pela dedicação, paciência, compreensão, cuidados e carinho..

A **Guga e Pedro**, meus filhos queridos, que esperaram ansiosamente o término deste trabalho.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

-AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
-APC	Célula apresentadora de antígeno
-ARV	Antiretroviral
-CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças (EUA)
-Céls.	Células
-CV	Carga viral
-CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
-CTL	Linfócito T citotóxico
-CCR5	Receptores de quimiocinas
-DCs	Células dendríticas
-DNA	Ácido desoxiribonucleico
-HAART	Terapia antiretroviral de alta atividade
-HIV	Vírus da imunodeficiência humana
-HLA	Antígeno leucocitário Humano
-IFN	Interferon
-IP	Inibidor da protease
-INRT	Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa
-INNRT	Inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa
-IPIPE	Instituto de Pesquisa em Imunoterapia de Pernambuco
-kb	1000 nucleotídeos, em RNA, ou, 1000 pares de nucleotídeos, em DNA
-Log	Logaritmo
-LTRs	Repetições terminais longas
-LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
-MIP-1α	Quimiocinas secretadas pelos CTLs
-MIP-1β	Quimiocinas secretadas pelos CTLs
-MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
-mL	mililitro
-MRRD	Mutação relacionada à resistência as drogas
-NF-κB	Fator de ativação nuclear Kappa-beta
-PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

-PCR	Reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
-pb	pares de bases
-PR	Protease
-RNA	Ácido ribonucléico
-RT	Enzima transcriptase reversa
-SIV	Vírus da imunodeficiência símia
-TNF	Fator de necrose tumoral
-T CD4⁺	Célula T linfocitária CD4 positiva
-TCD8⁺	Célula T linfocitária CD8 positiva
-TCR	Receptor de células T
-Th1	Célula T auxiliar tipo 1
-Th2	Célula T auxiliar tipo 2
- UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	16
2. ARTIGO I	
Subtipos do HIV-1 e evolução clínica de pacientes submetidos à vacina terapêutica de células dendríticas.....	20
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Pacientes e Métodos.....	25
Resultados.....	27
Discussão.....	29
Conclusões.....	35
Referências Bibliográficas.....	37
Lista de legendas de tabela e figuras.....	42
3. ARTIGO II	
Avaliação de polimorfismo na região <i>pol</i> do HIV-1 em pacientes imunizados com uma vacina terapêutica de células dendríticas	48
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Pacientes e Métodos.....	54
Resultados.....	56
Discussão.....	57
Conclusões.....	62
Referências Bibliográficas.....	63
Lista de legendas de quadro, tabela e figuras.....	68
4. CONCLUSÕES GERAIS	75
5. REFERÊNCIAS GERAIS	77
6. ANEXOS	79

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

O HIV-1 causa uma das doenças emergentes mais importantes do século, a **AIDS**. Atualmente, essa epidemia mundial está se disseminando de modo alarmante, especialmente em países menos desenvolvidos, através dos contatos heterossexuais (UNAIDS, 2004). De acordo com o último boletim epidemiológico da UNAIDS, estima-se que uma média de 39,4 milhões de pessoas estão infectadas com o HIV, em todo o mundo, dos quais 19,5 milhões são mulheres e 2,6 milhões são crianças infectadas com menos de 15 anos. No ano de 2004, ocorreram em torno de 6,4 milhões de novas infecções entre adultos e crianças e 3.5 milhões de óbitos (UNAIDS, 2004).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz anti-HIV/AIDS, pouparia enormes sofrimentos. Durante as duas últimas décadas a perspectiva de desenvolver vacinas anti-HIV/AIDS, tornou-se um alvo perseguido por vários grupos de pesquisa. Sendo provavelmente um dos desafios científicos mais difíceis que a ciência biomédica está enfrentando.

Aproximadamente 30 ensaios fase1/2 de diferentes vacinas candidatas já foram conduzidos durante este período. A estratégia clássica de usar vírus inativado ou vírus atenuado foi usada em estudos preliminares com macacos utilizando o vírus SIV (Simian Immunodeficiency Vírus) (KAUFFMAN, 2004). A imunização de primatas não humanos com o SIV atenuado foi capaz de protegê-los da ação do vírus vivo (JOHNSON & DESROISERS, 1998). Administração passiva de anticorpos neutralizantes protegeu chipanzés contra o HIV. Entretanto estas abordagens não foram testadas em seres humanos por razões ligadas a segurança e a bioética (KAUFFMAN, 2004). Vacinas

convencionais baseadas na indução de resposta contra proteína do envelope viral até o momento não parecem ser promissoras e as vacinas indutoras de anticorpos neutralizantes que surgem como alternativa aos fracassos das vacinas de subunidades estão ainda sob investigação.

A descoberta dos antiretrovirais (ARV) foi um grande avanço no tratamento de pacientes HIV/AIDS reduzindo a morbi-mortalidade. Porém o aparecimento dos efeitos colaterais posteriores, a má adesão ao tratamento, a manutenção dos reservatórios virais, assim como a seleção de mutações no genoma viral que conferem resistência a determinadas drogas, impulsionaram a busca de novas alternativas de tratamento.

Uma alternativa que está sendo estudada é a imunoterapia. Esta abordagem está baseada no fato de indivíduos infectados por HIV evoluírem de forma lenta com contagem de linfócitos T CD4+ sem declínio e ausência de AIDS (progressores lentos) ou diminuição de linfócitos T CD4+ e progressão rápida para AIDS (progressores rápidos) sugerindo a possibilidade de controle do vírus pelo sistema imune (RUBBERT & OSTROWSKI, 2005).

Abordagens imunoterápicas experimentais realizadas *in vitro* utilizando células dendríticas autólogas carregadas com vírus inativados (LU *et al.*,2001) e *in vivo* utilizando em macacos, apresentaram resultados significativos no controle da replicação viral. A referida estratégia mostrou-se promissora para utilização desta abordagem em humanos. Em janeiro de 2003 a revista Nature Medicine publicou o artigo de LU *et al.*, "Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS", descrevendo o primeiro experimento imunoterápico com sucesso em macacos, no qual foram utilizadas células dendríticas, próprias dos macacos, para combater o vírus SIV . Esses achados abriram a possibilidade de tratamento da infecção pelo HIV usando células imunes que atenuam a ação do vírus.

Os resultados das pesquisas com células dendríticas in vitro e em modelos de primatas não humanos levaram a formação de um consórcio franco-brasileiro. O Instituto de Pesquisa em Imunoterapia de Pernambuco (IPIPE-UFPE) iniciou em setembro de 2003 após aprovação da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), uma pesquisa com humanos em um grupo de pacientes HIV+ virgens de tratamento os quais foram submetidos a imunização com células dendríticas autólogas carregadas com vírus HIV autólogos inativados.

Os resultados animadores desse estudo foram publicados na Revista Americana, Nature em dezembro de 2004. Dos 18 pacientes que participaram do estudo, 8 conseguiram controlar a replicação viral, o que foi extremamente promissor para esta abordagem terapêutica. Porém há necessidade de maiores investigações nesta população, a fim de melhorar o protocolo vacinal e estudar os mecanismos protetores ou de falha nos hospedeiros.

A necessidade de tentarmos entender um pouco mais a ação dessa imunoterapia no grupo de pacientes vacinados por Lu *et al.* (2004) nos levou a realizar este estudo, o qual foi composto por 2 artigos; em um primeiro artigo verificamos a associação dos subtipos do HIV-1 com a evolução clínica dos pacientes levando em consideração que os diferentes subtipos podem apresentar comportamentos diferentes diante dos ARV, contudo não se sabe se isto também ocorre na imunoterapia.

No segundo artigo analisamos as várias seqüências dos isolados virais desses pacientes objetivando verificar se a vacina foi capaz de induzir ou não o aumento do polimorfismo viral e se isto estaria relacionado ao controle viral observado.

ARTIGO I

Título

Subtipos do HIV-1 e evolução clínica de pacientes submetidos à vacina terapêutica de células dendríticas

Autores

Valéria Oliveira de Melo Ferreira

Mestrado de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Fone/Fax: (81) 3412-6333

Email: vomferreira@yahoo.com.br

Patrícia Moura

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco,

R. Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, PE, Brasil.

Fone/Fax: (81) 3421-1769

Email: thita6@yahoo.com.br

Luiz Cláudio Arraes

Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Email: lularraes@terra.com.br

RESUMO

Neste trabalho investigamos a associação de subtipos do HIV-1 com evolução clínica dos pacientes submetidos à vacina com células dendríticas (CD). O vírus autólogo inativado foi usado para pulsar as células dendríticas, as quais foram utilizadas posteriormente como vacina. Os isolados virais dos pacientes foram seqüenciados e suas seqüências foram usadas para análise filogenética. Para análise clínica os níveis de células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram monitorados por um ano assim como a quantificação da carga viral (CV). Dos 19 pacientes, 13/19 apresentaram subtipo B, 5/19 subtipo F e 1/19 subtipo D. Dos pacientes com subtipo F 4/5 mostraram queda média de 1,5 Log na CV enquanto apenas 4/13 com subtipo B apresentaram queda média de 1,16 Log. Os pacientes que controlaram a carga viral também tiveram uma forte resposta celular considerando os parâmetros imunológicos. Aos 112 dias de imunização 14/19 pacientes apresentaram aumento significativo de linfócitos TCD4⁺ e diminuição de 0,5 Log de carga viral (CV) inicial. Destes 8/19 sustentaram a resposta virológica (CV \geq 1.0Log) no período de 360 dias de imunização. Devido à pequena população não foi possível associar a resposta virológica com os subtipos, embora tenha sido observada uma tendência dos pacientes subtipo F serem capazes de mostrar um melhor controle viral após imunização. Dos pacientes do subtipo F, apenas um não foi capaz de controlar a carga viral durante um ano. Todavia, outros fatores além do subtipo viral parecem desenvolver importante papel na sustentação das respostas imunológica e virológica, tais como a imunidade inata, polimorfismo viral, ativação de linfócitos T reguladores entre outros mecanismos ainda não conhecidos.

ABSTRACT

In this work we investigated the association of the HIV-1 subtypes with the clinical evolution of patients submitted to the dendritic cell (DC) therapeutic vaccine for HIV. The autologous inactivated virus was used to pulse the DC which was subsequently used as a vaccine. Viral isolates of the patients were sequenced and their sequence used for filogenetic analysis. To the clinical analysis the levels os TCD8+ and TCD4+ cells were followed for 1 year as well as the viral load (VL). From the 19 patients vaccinated 13 showed subtype B, 5 subtype F and 1 subtype D. Among the patients with subtype F the VL had decreased 1,5 Log and while the subtype B patients the decrease was 1,16 Log. Regarding the immunological parameters the patients who controlled the VL also had a strong cellular response. However some patients who had an significant increase of cellular response at 112 days of immunization and partially controlled the VL (VL < 0,5) did not sustained this response and the virus returned at initial levels after 360 days. Due to small population we could not associate the virological response with the subtypes although there was a tendency of patients harbouring subtype F be able to show a better control of the virus after immunization. All patients of subtype F, but one, were the able to control the VL load for one year. Nevertheless, other factors besides the virus subtypes seem to be playing a role in driving a sustained response, such as innate immune and virus polymorphisms, activation of the antiviral state regulated by T reg lymphocytes among others not well known mechanisms.

INTRODUÇÃO

A disfunção das células dendríticas é considerada uma das razões para a perda progressiva de um adequado estímulo imunológico (DONAGHY *et al.*, 2004). Na infecção crônica pelo HIV as células dendríticas (DCs) que são as mais importantes células apresentadoras de antígeno (APC) e ativadoras do sistema imune sofrem apoptose significativa e disfunção relacionadas com a replicação viral comprometendo a ativação normal da resposta imunológica. Além disso, as DCs são capazes de produzir fatores que inibem a resposta específica ao HIV (BEURIA *et al.*, 2005). Foi observado que nos indivíduos infectados cronicamente pelo HIV-1, a resposta CTL (Linfócitos T Citotóxicos) específica para o vírus vai progressivamente sendo perdida (SALERNO-GONÇALES *et al.*, 2000) e isto provavelmente é devido à disfunção na apresentação específica de antígenos do HIV pelas células dendríticas (LU & ANDRIEU, 1995; DONAGHY *et al.*, 2004).

Na tentativa de contornar esta disfunção, LU *et al.* (2004) ativaram células dendríticas *in vitro* e re-introduziram nos pacientes como uma forma de imunoterapia. Esse estudo foi realizado no Brasil/UFPE por um consórcio franco-brasileiro, usando células dendríticas autólogas pulsadas com vírus autólogos inativados quimicamente pelo aldrithiol-2 (AT2) em 18 pacientes virgens de tratamento dos quais 8 apresentaram diminuição significativa igual ou maior que 1 Log da carga viral inicial durante o período de 1 ano de seguimento (LU *et al.*, 2004). A resposta anti-HIV foi investigada através da produção e ativação de linfócitos T e desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Entretanto características moleculares dos isolados virais como a determinação dos subtipos de HIV-1 não foi analisada nesta primeira fase do estudo.

Embora os pacientes tivessem sido imunizados com o repertório de vírus do seu próprio organismo, o subtipo do HIV-1 poderia influenciar no sucesso da terapia. Os subtipos apresentam diferenças quanto à capacidade de replicação (*fitness* viral), transmissibilidade e patogênese (SPIRA *et al.*, 2003). Quanto a associação entre

diferenças moleculares e patogênese pode-se destacar a região LTR das duas espécies de HIV (1 e 2) a qual está relacionada com a maior capacidade de indução de $TNF\alpha$ do HIV-1 em relação ao HIV-2. O $TNF\alpha$ parece induzir mais fracamente o *enhancer* do HIV-2 (LAWN *et al.*, 2001). O HIV-1 apresenta três grupos distintos M (main), O (outlier) e N(new). O grupo M é o responsável pela pandemia de HIV-1, enquanto os demais ficaram restritos ao oeste africano. O grupo M apresenta 10 subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, J e K).

De acordo com Morgado *et al.* (2002) e Brindeiro *et al.* (2003), a distribuição de subtipos no Brasil é complexa e dinâmica com variações em diferentes regiões havendo uma predominância do subtipo B (89,5%). O segundo mais prevalente é o subtipo F (18%), sendo mais encontrado nas regiões Norte, Nordeste e centro do país (DUMANS *et al.*, 2002). Um estudo realizado por Soares *et al.* (2003) com amostras procedentes da região Sul mostrou uma alta prevalência do subtipo C no Rio Grande do Sul e Paraná (45% e 30% respectivamente). No Sudeste os estados do Rio de Janeiro e São Paulo também apresentaram um aumento de casos com subtipo C quando comparado com estudos anteriores (DUMANS *et al.*, 2002). Os subtipos A e D são encontrados esporadicamente e as cepas recombinantes B/F, B/C e B/D também têm sido encontradas no Brasil (SABINO *et al.*, 1996; TANURI *et al.*, 1999).

O subtipo C do HIV-1, por exemplo, exibe particularidades moleculares como a presença de um sítio de ligação adicional para o NF-kB na LTR, a produção de uma proteína Rev truncada e a inserção de aminoácido no gene *vpu*, características tais que podem influenciar a expressão do genoma viral alterando a transmissibilidade e patogênese deste subtipo (SPIRA *et al.*, 2003). Devido às diferenças genéticas dos promotores dos subtipos do HIV-1 é de se esperar respostas diferenciadas a fatores de transcrição como o NF-kB (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Estudos sobre a protease do subtipo C evidenciaram uma assinatura molecular distinta, o que parece conferir uma atividade catalítica mais eficiente, além disso, essa região catalítica mostra-se altamente conservada em relação aos subtipos A, B e D (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os subtipos B e C devido à alta prevalência são os mais estudados, sendo as drogas disponíveis desenhadas para o subtipo B (VELASQUEZ *et al.*, 2001), o qual é responsável pelo maior número de casos positivos nos países desenvolvidos (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Uma importante questão a ser explorada é a eficácia destas drogas para os diferentes subtipos. Estudos realizados sobre análise genotípica têm identificado mudanças entre seqüências virais dos diversos subtipos definidas como assinaturas moleculares que podem gerar respostas diferentes quando submetidos aos antiretrovirais disponíveis (VALASQUEZ *et al.*, 2001; SPIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003). A seleção de mutações no genótipo viral pode ser induzida pelos antiretrovirais o que leva a resistência aos mesmos, este tem sido um dos grandes problemas no tratamento dos pacientes HIV⁺.

O subtipo parece ter relevância em vários estudos em que se evidenciam diferentes comportamentos clínico-evolutivos da infecção, entretanto mais estudos são necessários para se estabelecer a influência do subtipo na evolução da infecção. Por isto torna-se importante a determinação dos subtipos do HIV-1 nos pacientes submetidos a imunoterapia com células dendríticas descrita por LU *et al.* (2004) para se verificar a existência de quaisquer associações entre os subtipos do HIV-1 e o controle virológico obtido por esta abordagem terapêutica. Portanto este estudo teve como objetivos verificar os subtipos do HIV-1 dos pacientes imunizados com vacina de células dendrítica e sua associação com a evolução virológica e imunológica no período de 1 ano de observação. O seguimento inédito de dois anos destes pacientes também será discutido.

PACIENTES E MÉTODOS

Amostragem

A população estudada foi constituída de 19 (dezenove) pacientes HIV⁺ virgens de tratamento, adultos com idade ≥ 21 anos e ≤ 65 anos, com sorologia positiva em um período médio de 3 anos, participantes do ensaio clínico Fase 1/2 realizado pelo IPIPE, no LIKA-UFPE, submetidos ao processo de imunização com células dendríticas

autólogas carregadas com HIV autólogo inativado, iniciado em setembro de 2003 (LU *et al.*, 2004). Adicionalmente neste estudo foi incluído mais um voluntário (paciente 9) vacinado posteriormente pelo mesmo protocolo.

Evolução clínica

A evolução clínica dos pacientes foi monitorada através de exames físicos e das contagens dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, que foram realizadas por citometria de fluxo de acordo com o protocolo do equipamento FACSCalibur (BD Biosciences) e pela quantificação da carga viral para qual foi utilizado o teste Monitor Kit (Roche Diagnostics). O seguimento de dois anos foi feito através das informações obtidas nos prontuários disponibilizados pelo serviço médico no qual o paciente está sendo atendido desde o término do ensaio clínico.

Definição de sucesso virológico

A quantificação da carga viral e contagem dos linfócitos TCD4⁺/TCD8⁺ de cada paciente foram analisadas por um período de um ano em três momentos no tempo (0= antes da imunização; 112 e 360 dias após imunização). Foi possível caracterizar perfis de resposta virológica onde foi considerado sucesso o grupo de pacientes que alcançou uma queda na carga viral \geq a 1Log aos 360 dias após imunização e os pacientes que não atingiram estes critérios foram considerados grupo de insucesso virológico

Amplificação e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído das Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizando o protocolo de extração da QIAGEN. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificar a região *pol* (RT/PR) do pró-vírus utilizando primers específicos. Esta reação de PCR foi realizada em 2 etapas com “primers” aninhados (TANURI *et al.*, 1999). O sequenciamento dos produtos

amplificados foi realizado utilizando o kit BigDye® (Applied Biosystems, Foster City, CA), no sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análise filogenética

O subtipo do HIV-1 de cada amostra, foi obtido por filogenia molecular. Seqüências de nucleotídeos foram alinhadas pelo programa Bioedit (versão 6.0.7 Pharmaceuticals, Inc 2004), após serem editadas no programa Seq Man do pacote DNASTAR (CDC). A construção da árvore filogenética foi realizada usando os métodos paramétricos de distância: kimura 2 parâmetros com uma matriz de distância executada no programa MEGA versão 3.0 (Arizona State University, Tempe)); e o método de neighbor-joining (Saitou,1987).

Análise estatística

A análise estatística da associação dos subtipos com a evolução clínica foi feita utilizando o teste exato de Fisher bicaudal com tabelas de contingência 2X2.

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. Número do protocolo: 300/2004 CEP/CCS

RESULTADOS

Determinação de subtipos

A figura 1 mostra os subtipos encontrados e suas distribuições na população estudada que foram de: 68,4% B (13/19), 26,3% F (5/19) e 5,3% D (1/19). Apenas o paciente 14 não foi incluído na apresentação da árvore filogenética devido à ausência de amplificação do DNA relativo aos 112 dias após a imunização, provavelmente pelo

fato da baixa CV. Contudo foi possível determinar o subtipo a partir das outras amostras (tempo 0 e 360 dias).

Resposta virológica e imunológica geral

O percentual de pacientes que apresentou sucesso virológico foi de 42,1% (8/19) (Figura 2a) contra 57,9% (11/19) (Figura 2b e 2c) de pacientes com insucesso. Entretanto os pacientes 21 e 33 apresentaram queda logarítmica de 0,91 e 0,84 respectivamente, o que os agrupa em um perfil próximo ao limite de critério de sucesso que foi a queda de ≥ 1 Log na CV (Fig. 2b).

A variação individual da contagem absoluta de TCD4⁺ e TCD8⁺, não apresentou diferença significativa entre os pacientes que apresentaram sucesso ou insucesso virológico no período de um ano (ponto 1: antes da imunização; ponto 2: 112 dias após imunização e ponto 3: 360 dias após imunização) como mostrado nas figuras 3 e 4. Ao longo do período de um ano foi observado um declínio $\geq 25\%$ de TCD4⁺ a partir do número inicial em alguns pacientes. No grupo de sucesso apenas o paciente 2 apresentou queda $\geq 25\%$ de TCD4⁺ enquanto no grupo de insucesso os pacientes 16, 27, 31, 32 e 33 apresentaram esta perda. Foi observada uma queda média de 30 céls/mm³ de TCD4⁺ nos pacientes 3, 10 e 18 do grupo de sucesso e nos pacientes 9 e 19 do grupo de insucesso foi mostrando uma manutenção de TCD4⁺. Nos pacientes restantes foi observado um aumento médio de 40 céls/mm³ na contagem de TCD4⁺ que corresponde a 50% dos pacientes do grupo de sucesso (pacientes 13, 14, 17 e 24) 18,2% do grupo de insucesso (pacientes 21 e 29).

Quanto aos TCD8⁺ todos os pacientes apresentaram uma manutenção sem perda maior que 25% e destes 11 pacientes apresentaram aumento médio de 180 céls/mm³ sendo 62,5% do grupo de sucesso (pacientes 2, 10, 13, 17 e 24) e 54,5% no grupo de insucesso (pacientes 4, 21, 29, 31, 32 e 33).

DISCUSSÃO

Nossos resultados quanto à determinação dos subtipos do HIV-1 nos 19 pacientes estudados mostrou uma diversidade de subtipos comparável à encontrada no país (BRINDEIRO *et al.*, 2003). Apesar da pequena população, 19 pacientes, foi possível identificar três subtipos distintos pelo sequenciamento da RT e PR: subtipo B 68,4%, subtipo F 26,3% e subtipo 5,3% D representando os subtipos encontrados no Brasil, mais especificamente na região Nordeste (Figura 1). Embora os genes *gag* e *env* sejam mais empregados para a subtipagem, estudos têm mostrado que a subtipagem baseada na região *pol* (RT e PR) apresenta geralmente uma alta concordância com a subtipagem da região *gag* (GONZÁLES *et al.*, 2001). Contudo os resultados referentes à subtipagem não excluem a possibilidade da presença de algum mosaico, uma vez que, o sequenciamento das outras regiões destes isolados virais ainda não foi determinado.

Análise virológica e imunológica individual

A abordagem analítica deste estudo difere da utilizada por Lu *et al.* (2004) para determinar o impacto da vacina terapêutica sobre o controle da replicação viral. Enquanto esses últimos analisaram a significância da variação geométrica média do número de cópias de RNA/mL ou de DNA/10⁶ céls (pró-virus) dos pacientes, nosso estudo considerou nestes mesmos pacientes, uma resposta anti-viral significativa quando ocorreu uma queda de pelo menos 1 Log na CV aos 360 dias. O critério de se estabelecer a queda ≥ 1 Log como resposta anti-viral significativa foi baseado no consenso terapêutico brasileiro para o uso de ARV, que considera este parâmetro determinante de sucesso terapêutico.

Devido à ausência de um referencial padrão de imunoterapia na infecção por HIV-1 procuramos fazer uma analogia entre o efeito anti-viral da vacina a um

tratamento ARV convencional, pois as duas intervenções objetivam diminuir a replicação viral. Apesar da diferença nas abordagens de avaliação houve uma correspondência entre os resultados obtidos por nós e por Lu *et al.* (2004). Os pacientes com resposta antiviral forte e fraca definidos por Lu *et al.* (2004) corresponderam respectivamente ao sucesso e insucesso virológico definido neste trabalho (Figura 2). A Figura 3 mostra os 8 pacientes com sucesso virológico correspondentes ao estudo de Lu *et al.* (2004) e seus respectivos subtipos. Os pacientes de insucesso virológico corresponderam aos 10 pacientes com resposta fraca descritos por Lu *et al.* (2004) e mais um paciente que foi vacinado posteriormente sendo incluído no presente estudo, o qual apresentou insucesso totalizando 11/19. A Figura 4 mostra os pacientes de insucesso virológico e seus respectivos subtipos.

Com relação ao comportamento da resposta imunológica avaliada através da contagem total de TCD4⁺ e TCD8⁺, nossos resultados representam os mesmos descritos por Lu *et al.* (2004) onde foi observado em todos os pacientes um aumento ou manutenção das contagens totais tanto no grupo de sucesso como de insucesso aos 112 dias de imunização, o que sugere um efeito protetor uma vez que a evolução natural da infecção pelo HIV caracteriza-se por contínua replicação viral e depleção progressiva de TCD4⁺.

Esse efeito foi melhor evidenciado no grupo de sucesso virológico, no qual apenas o paciente 2 (1/8) apresentou uma perda $\geq 25\%$ de TCD4⁺ aos 360 dias de imunização. Apesar disso esse paciente manteve uma média de 550 céls/mm³ de TCD4⁺ após dois anos de seguimento e CV controlada sem terapia ARV sugerindo a produção de resposta antiviral duradoura desencadeada pela vacina. Um aumento significativo na produção de TCD4⁺Th1 e TCD8⁺memória vírus específicos foram observados ao longo de um ano neste paciente (LU *et al.*, 2004) demonstrando que apesar da relação de TCD4⁺/TCD8⁺ de 0,91 seis meses antes da vacina, baixar para 0,45 e 0,44 (TCD4⁺ 527 e TDC8⁺ 1186 céls/mm³) após um e dois anos respectivamente, a resposta imunológica parece ter sido capaz de estabilizar a infecção (Figura 3a).

Por outro lado no grupo de insucesso os pacientes 16, 27, 31, 32 e 33 (5/11) apresentaram uma perda $\geq 25\%$ de TCD4⁺ (Figura 4a). Os pacientes 16, 31 e 33 após dois anos de seguimento continuaram apresentando uma perda progressiva iniciando terapia ARV, demonstrando que a vacina não foi capaz de induzir uma resposta antiviral adequada. O paciente 16 apresentou uma diminuição progressiva da resposta TCD4⁺Th1 após a vacina com variação da ativação de TCD8⁺memória (LU *et al.*, 2004). A variação do delta Log CV de -0,7 aos 112 provavelmente foi devido à estimulação neste momento de CTL específicas que não foi acompanhada pela estimulação de TCD4⁺Th1 tornando talvez a resposta antiviral não sustentada neste paciente (SHEDLOCK & SHEN, 2003; HESS *et al.*, 2004).

Os paciente 27 e 32 dois anos após a vacina apresentaram contagem de TCD4⁺ e TCD8⁺ de 416 e 673 céls/mm³ e de 404 e 1124 céls/mm³ respectivamente. Ambos pacientes permanecem sem fazer uso de ARV. Esses achados sugerem que a imunoterapia retardou a perda progressiva dos linfócitos, uma vez que seis meses antes da terapia essa perda era de 100 céls/mm³ (LU *et al.*, 2004). A estimulação de TCD8⁺memória específica parece ter sido determinante para estabilizar a perda nestes pacientes, todavia como esta resposta não foi acompanhada pela ativação significativa de CD4⁺Th1 (LU *et al.*, 2004) o efeito antiviral se mostrou mais discreto (Figura 4a).

Os pacientes 3, 10 e 18 do grupo de sucesso (Figura 3) que se mantiveram sem perda $\geq 25\%$, apresentaram uma resposta concomitante específica e significativa de TCD4⁺Th1 e TCD8⁺memória (LU *et al.*, 2004). Contudo ao longo de dois anos os três pacientes apresentaram perfis variados. O paciente 3 mantém a relação TCD4⁺/TCD8⁺ em torno de 0,5 com a contagem absoluta após dois anos de TCD4⁺ e TCD8⁺ de 448 e 909 céls/mm³. O paciente 10 apresentou uma perda maior que 100 céls/mm³ mostrando uma contagem absoluta após dois anos de TCD4⁺ e TCD8⁺ de 374 e 442 céls/mm³. O paciente 18 manteve uma relação TCD4⁺/TCD8⁺ (733 e 1002 céls/mm³) em torno de 0,8. Esses achados mostram que a resposta induzida pela

vacina apresenta um efeito mantenedor de linfócitos trazendo o benefício de retardar a terapia ARV por pelo menos dois anos.

Em relação aos pacientes do grupo de insucesso que se mantiveram sem perda $\geq 25\%$ de TCD4⁺, os pacientes 4 e 11 apresentaram manutenção de TCD4⁺ ao longo de um ano (Figura 4a) entretanto no seguimento de dois anos ambos mostraram perda progressiva de TCD4⁺ paciente 4: 173 cels/mm³ e paciente 11: 256 cels/mm³ necessitando iniciarem terapia ARV. Contudo os pacientes 9 e 19 do grupo de insucesso com manutenção em um ano apresentaram perfis bem peculiares. O paciente 9 mostrou uma CV baixa em torno de 3,16 Log ao longo de um ano enquanto a contagem de TCD4⁺ e TCD8⁺ foi de 214 e 1185 céls/mm³ respectivamente. Após dois anos a contagem de TCD4⁺ e TCD8⁺ foi de 270 e 2807 céls/mm³ respectivamente com CV indetectável sem terapia ARV. Neste caso o efeito da vacina talvez não possa ser efetivamente avaliado no período de um ano, pois a CV inicial apresentava-se diminuída desde o primeiro ponto (3,35 Log). Entretanto com dois anos o paciente 9 apresentou um ganho de TCD4⁺ 56 céls/mm³ com CV indetectável, sugerindo uma resposta CTL efetora anti-viral induzida pela vacina capaz de controlar a viremia. Este achado mostra que pacientes com níveis de TCD4⁺ (<300 céls/mm³) e CV baixos, mas TCD8⁺ alto podem responder de forma significativa à vacina em longo prazo dependendo possivelmente do estado de ativação prévio dessas células.

Quanto ao paciente 19 foi observado um aumento significativo dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de 817 e 1670 céls/mm³ aos 112 dias, e delta Log CV -0,66 mostrando inicialmente um controle virológico. Aos 360 dias este perfil imunológico muda com a queda dos linfócitos TCD4⁺ 359 céls/mm³, porém a resposta TCD8⁺ é mantida assim como o delta Log CV -0,63 sugerindo talvez um controle viral baseado na resposta CTL. Contudo o percentual de CD4⁺Th1 diminui de 2,48% aos 112 para 1,57% com um ano o que pode ter influenciado negativamente na resposta anti-viral e levado a uma perda importante de TCD4⁺ $\geq 25\%$ aos 360 dias (359 céls/mm³) em relação aos 112 dias, enquanto a resposta TCD8⁺ memória foi mantida (LU et al., 2004). Dois anos após a imunização o referido paciente tem mostrado declínio da

resposta imunológica em valores absolutos (TCD4⁺ 214 e CD8⁺ 1911 céls/mm³) e aumento da CV confirmando a necessidade da ativação de TCD4⁺ para manter a resposta CTL funcional.

Os pacientes 13, 14, 17 e 24 de sucesso (Figura 3), que apresentaram ganho absoluto ou manutenção de TCD4⁺ e TCD8⁺, bem como ativação específica significativa de CD4⁺Th1 e TCD8⁺memória concomitantemente controlaram de forma eficiente a viremia. O seguimento de dois anos do paciente 13 não foi possível, pois este abandonou o estudo. Após dois anos os pacientes 14, 17 e 24 apresentaram contagem de TCD4⁺ de 705, 780 e 502 céls/mm³ e de TCD8⁺ de 855, 1022 e 1480 céls/mm³ respectivamente. Assim como os pacientes 2, 3, 10 e 18, que apresentaram controle virológico significativo os pacientes 13, 14, 17 e 24 apresentaram o mesmo perfil de ativação CD4⁺Th1 de TCD8⁺memória específicas (LU *et al.*, 2004) apoiando a hipótese da dependência de resposta Th1 para ativação e manutenção da resposta CTL específica. Da mesma forma que os outros pacientes de sucesso os pacientes 14, 17 e 24 não fazem uso de terapia ARV até o presente.

O paciente 21 do grupo de insucesso apresentou um perfil próximo de sucesso com contagem absoluta de TCD4⁺ e TCD8⁺ alta aos 112 e 360 dias, enquanto que as respostas CD4⁺Th1 e TCD8⁺memória específicas mostraram percentuais baixos (LU *et al.*, 2004), sendo talvez a causa da resposta virológica tardia, com variação de delta log CV de -0,91 aos 360 dias. Entretanto o seguimento de dois anos não pode ser feito. Quanto ao paciente 29 apesar da contagem absoluta de TCD4⁺ e TCD8⁺ terem aumentado ao longo do período de observação, as respostas CD4⁺Th1 e TCD8⁺memória foram suprimidas principalmente aos 112 dias (0,21% e 0,63% respectivamente; supl Tabela 6, LU *et al.*, 2004), não controlando a viremia de forma eficiente, reforçando mais uma vez a hipótese que a qualidade da resposta imunológica é essencial para impedir a constante replicação viral. Contudo no seguimento de dois anos a contagem de TCD4⁺ foi de 509 e TCD8⁺ de 1203 céls/mm³ permanecendo sem terapia ARV.

Nossos resultados sugerem que a ativação de CTL foi importante para o controle da viremia nos pacientes de sucesso, entretanto pacientes como o 9 demonstram que esta ativação não deve estar relacionada diretamente com a contagem absoluta de TCD4⁺ pois este apresentou níveis muito baixos (<300 céls/mm³) porém conseguiu controlar a CV baixa, que atualmente está indetectável. Sugerindo que o seguimento dos pacientes não seja baseado apenas na contagem absoluta, mas também na atividade funcional destes linfócitos.

Estudos recentes sugerem que a resposta CTL é extremamente importante para o controle imunológico da infecção, porém, a persistência e a permanência funcional desta resposta é altamente dependente da presença de TCD4⁺Th1 (SHEDLOCK & SHEN, 2003; HESS *et al.*, 2004), os quais são encontrados principalmente em pacientes com progressão lenta para AIDS (COSIMI & ROSEMBERG, 2000). O mecanismo mais importante pelo qual o CTL exerce suas funções efetoras contra o vírus ainda não está bem esclarecido. A produção de IFN γ e TNF α secretadas por estas células modulam a replicação viral, o IFN γ inibindo e o TNF α aumentando. As quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES secretadas pelas CTL suprimem a replicação por competição e modulação negativa do co-receptor viral CCR5 (MCMICHEL & ROWLAND-JONES, 2001).

Portanto os CTL através da liberação de citocinas são responsáveis pela ativação do sistema imunológico que muitas vezes provocam uma superativação resultando em uma maior replicação viral e conseqüente depleção de linfócitos TCD4⁺ exercendo papel importante na imunopatogênese do HIV-1(LAWN *et al.*, 2001). Os pacientes que responderam bem a vacina devem ter ativado um balanço ideal entre as citocinas moduladoras beneficiando o controle viral e impedindo a superativação, além disso, não foi observada depleção significativa nos pacientes que não controlaram a viremia sugerindo que o fenômeno da superativação não foi induzido pela vacina (LAWN *et al.*, 2001).

Associação dos subtipos com a evolução clínica

Os pacientes 3, 13, 17 e 24 de sucesso virológico apresentaram isolados virais do subtipo B e os pacientes 2, 10, 14 e 18 subtipo F. Os demais pacientes de insucesso (4, 11, 16, 19, 27, 29, 31, 32 e 33) apresentaram subtipo B com exceção dos pacientes 9 e 21 que apresentaram subtipos F e D respectivamente. A associação entre o sucesso virológico e os subtipos B e F (Tabela 1) não apresentou significância estatística ($p=0,1176$).

Quanto aos 8 pacientes de sucesso virológico foi observada uma queda média do delta log de -1,5 nos pacientes do subtipo F (4/8) enquanto nos pacientes com subtipo B (4/8) a média de queda do delta log foi de -1,16 mostrando talvez uma tendência de melhor resposta virológica dos pacientes que apresentavam subtipo F do que subtipo B ($p=0,1176$). Todavia como a população estudada foi muito reduzida não se pôde estabelecer uma associação definitiva entre o subtipo específico com a resposta virológica e imunológica.

CONCLUSÕES

Os subtipos encontrados na população estudada foram semelhantes aos encontrados na região Nordeste brasileira (MORGADO *et al.*, 2002; DUMANS *et al.*, 2002; BRINDEIRO *et al.*, 2003;) A tendência dos pacientes portadores do subtipo F em apresentar ao longo de um ano uma diminuição média de CV 0,36 Log maior que o subtipo B e conseqüentemente melhor resposta virológica induzida pela vacina precisa ser confirmada em uma amostragem mais representativa. Os próximos passos do estudo deste tipo de intervenção imunológica devem levar em conta a separação dos grupos de acordo com os subtipos.

Várias hipóteses podem ser aventadas para se explicar a falha de alguns pacientes à vacina, como polimorfismo de moléculas do sistema imunológico inato, a diversidade do HLA dos pacientes, variabilidade genética do vírus, polimorfismo viral e população de linfócitos TCD4⁺ reguladores entre outros fatores ainda não totalmente esclarecidos (LETVIN & WALKER, 2003, SHEDLOCK & SHEN, 2003, BELKAID & ROUSE, 2005).

O sucesso virológico parece está relacionado com a ativação de TCD4⁺Th1 e CTL geradas pelo protocolo da vacina (HESS *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2004). O seguimento de dois anos dos pacientes mostrou que a imunização possibilitou que 12 pacientes permanecessem livres de terapia ARV sendo 8 do grupo que controlou efetivamente a CV e 4 do grupo de insucesso. Desta forma a vacina terapêutica com células dendríticas mostra-se uma alternativa promissora, para o tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HIV-1. Quanto aos 4 pacientes que estão em terapia ARV todos apresentaram sucesso virológico e imunológico (Arraes, Com. pessoal) após o início do tratamento, sugerindo que a vacina não induziu seleção de mutantes, porém é necessária uma análise de polimorfismo para confirmar esta observação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRINDEIRO R.M., DIAZ R.S., SABINO E.C., MORGADO M.G., PIRES I.L., BRÍGIDO L., DANTAS M.C., BARREIRA D., TEIXEIRA P.R., TANURI A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-B ResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, 2;17(7):1063-9, 2003

BEURIA P., CHEN H., TIMONEY M., SPERBER K. Impaired accessory cell function in a human dendritic cell line after human immunodeficiency virus infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, 12(3):453-64, 2005

BELKAID Y., ROUSE BT. Natural regulatory T cells in infectious disease **Nat Immunol**, 6(4):353-60, 2005

COSIMI, L.A & ROSENBERG, E.S. The characterization of HIV-1 specific CD4+ T helper epitopes. Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, 2000

DONAGHY, H., STEBBING, J., PATTERSON, S. Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. **Infectious Diseases**, 17(1):1-6, 2004

DUMANS A.T., SOARES M.A., PIENIAZEK D., KALISH M.L., DE VROEY V., HERTOOGS K., TANURI A. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naive human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, 46(9):3075-9. 2002

GONZALES MJ, MACHEKANO RN, SHAFER RW. Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a northern California clinic-based population. **J Infect Dis**, 15; 184(8):998-1006, 2001

HESS, C., ALTFELD,M.,THOMAS, S.Y.,ADDO,M.M. ET AL. HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. **Lancet**, 363: 863-66, 2004

HOSMALIN, A., SAMRI A., DUMAURIER MJ., DUDOIT Y., OKSENHENDLER E., KARMOCHKINE M., AUTRAN .,WAIN-HOBSON S., CHEYNIER R. HIV-specific effector cytotoxic T lymphocytes and HIV-producing cells colocalize in white pulps and germinal centers from infected patients. **Blood** **97**, 2695-701, 2001

KUMAR K. MEGA2: Molecular Evolutionary genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001

KIMURA M. Preponderante of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. **Nature**, 267:275-27, 1977

LAWN, STEPHEN D., BUTERA, SALVATORE T., AND FOLKS, THOMAS M. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Clinical Microb. Reviews**, vol. 14, n. 4, 753-777, 2001

LETVIN, N. L. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. **Science** 280, 1875-80, 1998.

LU, W & ANDRIEU, J. M. Prospective views of HIV pathology. Clues for therapeutic strategies. **Adv Exp Med Biol** 374, 235-42, 1995.

LU, W., ARRAES LC., FERREIRA WT., ANDRIEU JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1infection. **Nat Med.** (12):1359-65,2004

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Programa de DST e AIDS. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Brasília, 2004,140p.

MORGADO, M.G, GUIMARÃES, M .L., GALVÃO, C.B. HIV-1 polymorphphism: a challenge for vaccine development. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 97 (2): 143-150, 2002

NOVITSKY, V., P GILBERT *ET AL.* Association between Virus-Specific T Cell Responses and Plasma Viral Load Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. **J Virol**, vol 77, p. 882-890, 2003

OLIVEIRA T, ENGELBRECHT S, JANSE VAN RENSBURG E, GORDON M, BISHOP K, ZUR MEGEDE J,BARNTETT SW, CASSOL S. Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness? **J Virol**, 77(17): 9422-30, 2003

PLANZ O, SEILER P, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM. Specific cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies. *Nature*, 27; 426(6965):474, 2003

RUBBERT & OSTROWSKI. Pathogenesis of HIV Infection 2005. **HIV Medicine**, 2005

SALERMO-GONCALVES, R., W. LU, AND ANDRIEU, J. M. Quantitative analysis of the antiviral activity of CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-positive asymptomatic patients with different rates of CD4+ T-cells decrease. **J. Virol.** 74, 6648-6651, 2000.

SPIRA S, WAINBERG MA, LOEMBA H, TURNER D, BRENNER BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. **J Antimicrob Chemother**, 51(2): 229- 40,2003.

SOARES E A, SANTOS RP, PELLEGRINI JA, SPRINZ E, TANURI A, SOARES MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 15;34(5):520-6, 2003

SHEDLOCK DJ, SHEN H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. **Science**, 11; 300(5617):337-9, 2003

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**, 10(13):1579-84, 1996

TANURI A, VICENTE AC, OTSUKI K ET AL. Genetic variation susceptibilities to protease inhibitors among subtypes B and F isolates in Brazil. **Antimicrob agents Chemother**,43:253-258,1999

VELAZQUEZ A, TODD J M, VEGA S, FREIRE E. Catalytic efficiency and vitality of HIV proteases from African viral subtypes. **PNAS**, 98(11): 6062-6067, 2001

YAMADA & IWAMOTO. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection.

Archives of virology, 145(5):1021-7, 2000

LEGENDAS DAS FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Árvore filogenética com os subtipos encontrados em 18 pacientes do estudo.

Figura 2A. Pacientes imunizados que apresentaram queda $\geq 1\log$ na CV no momento 0, 112, 360 dias.

Figura 2B. Pacientes imunizados que apresentaram queda da CV próximo a $1\log$ no momento 0, 112, 360 dias.

Figura 2C. Pacientes imunizados apresentaram queda $< 1\log$ na CV no momento 0, 112, 360 dias.

Figura 3. Pacientes com subtipo F (**3A**) e subtipo B (**3B**) que apresentaram sucesso virológico com a queda da CV $\geq 1\log$ após 360 dias de imunização com vacina terapêutica de células dendríticas (1= 0, 2= 112dias e 3= 360dias). Carga viral (\blacktriangle), linfócito CD4⁺ (\blacklozenge) e linfócito T CD8⁺ (\blacklozenge).

Figura 4. Pacientes com subtipo B (**4A**) que apresentaram insucesso virológico queda da CV $< 1\log$ após 360 dias de imunização com vacina terapêutica de células dendríticas (1= 0, 2= 112dias e 3= 360dias). Pacientes com subtipo F e D (**4B**) que apresentaram insucesso virológico após 360 dias de imunização vacina terapêutica com células dendríticas. Carga viral (\blacktriangle), linfócito CD4⁺ (\blacklozenge) e linfócito T CD8⁺ (\blacklozenge).

Tabela 1. Associação da resposta virológica e os subtipos encontrados na população dos 19 pacientes imunizados (Fisher $p=0,1176$). (*) Pacientes que apresentaram decréscimo da CV próximo de 1 Log no período de um ano. (**) Paciente que apresentou CV indetectável no período de dois anos.

FIGURA 1

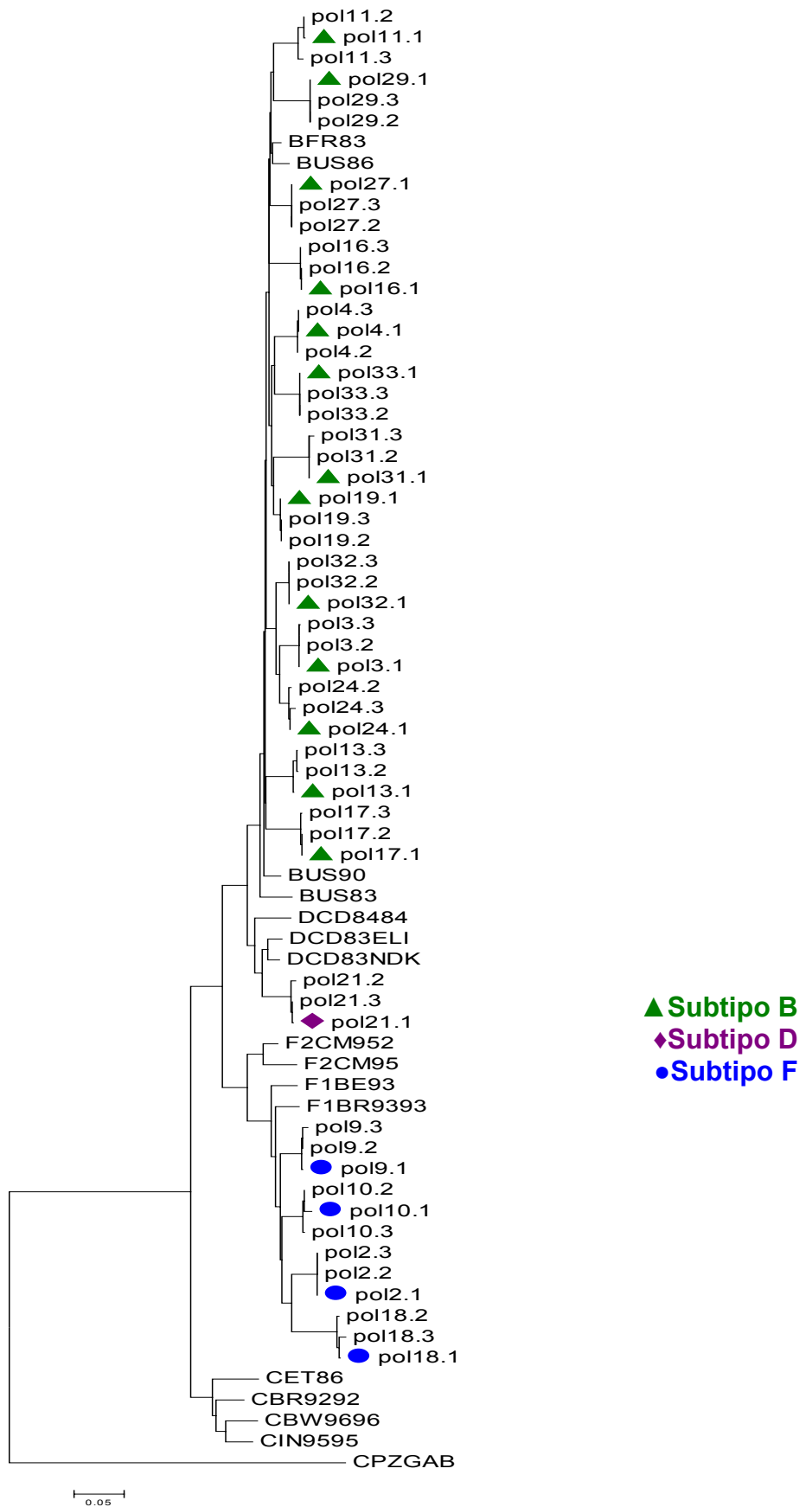


FIGURA 2

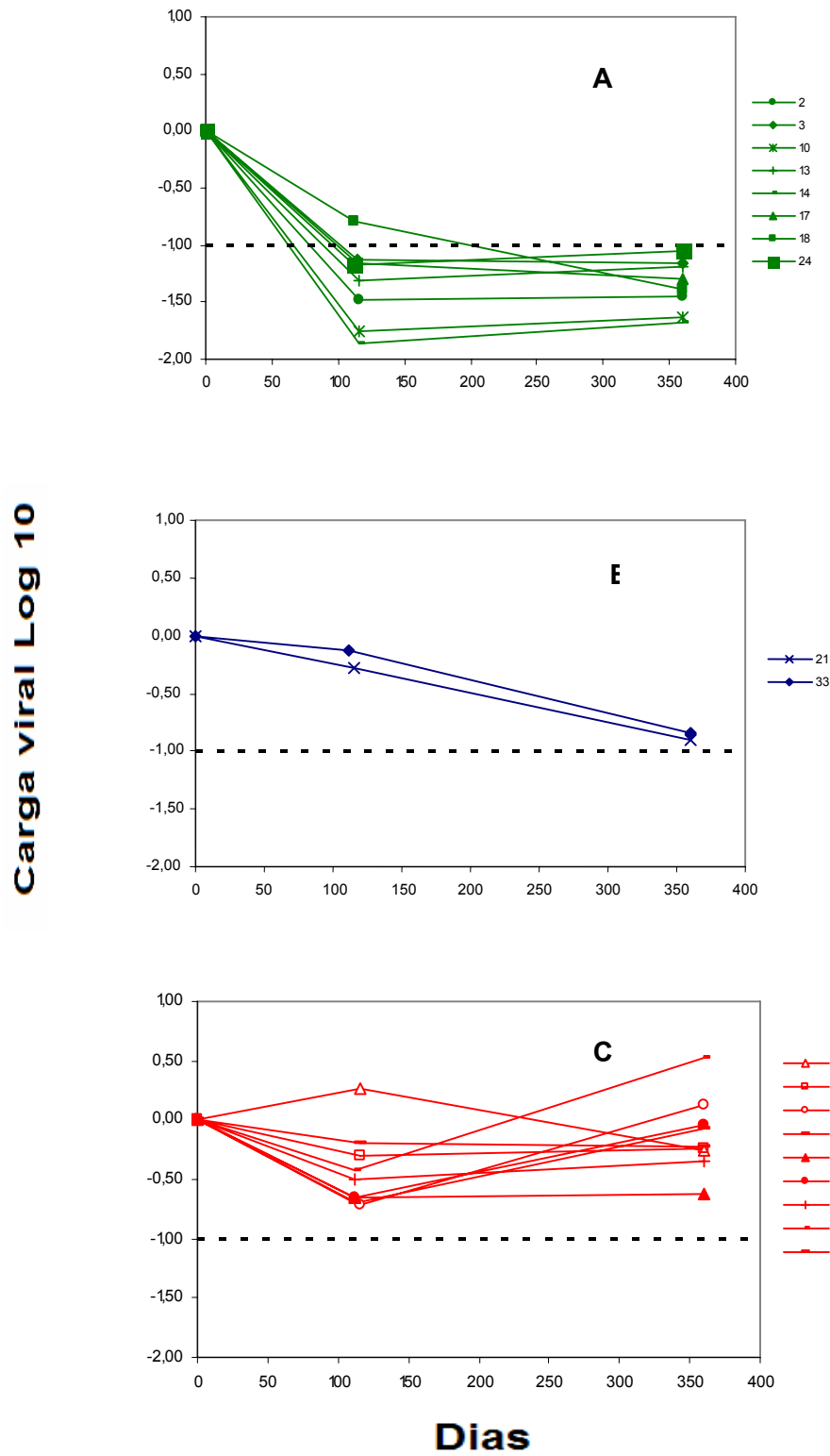


FIGURA 3

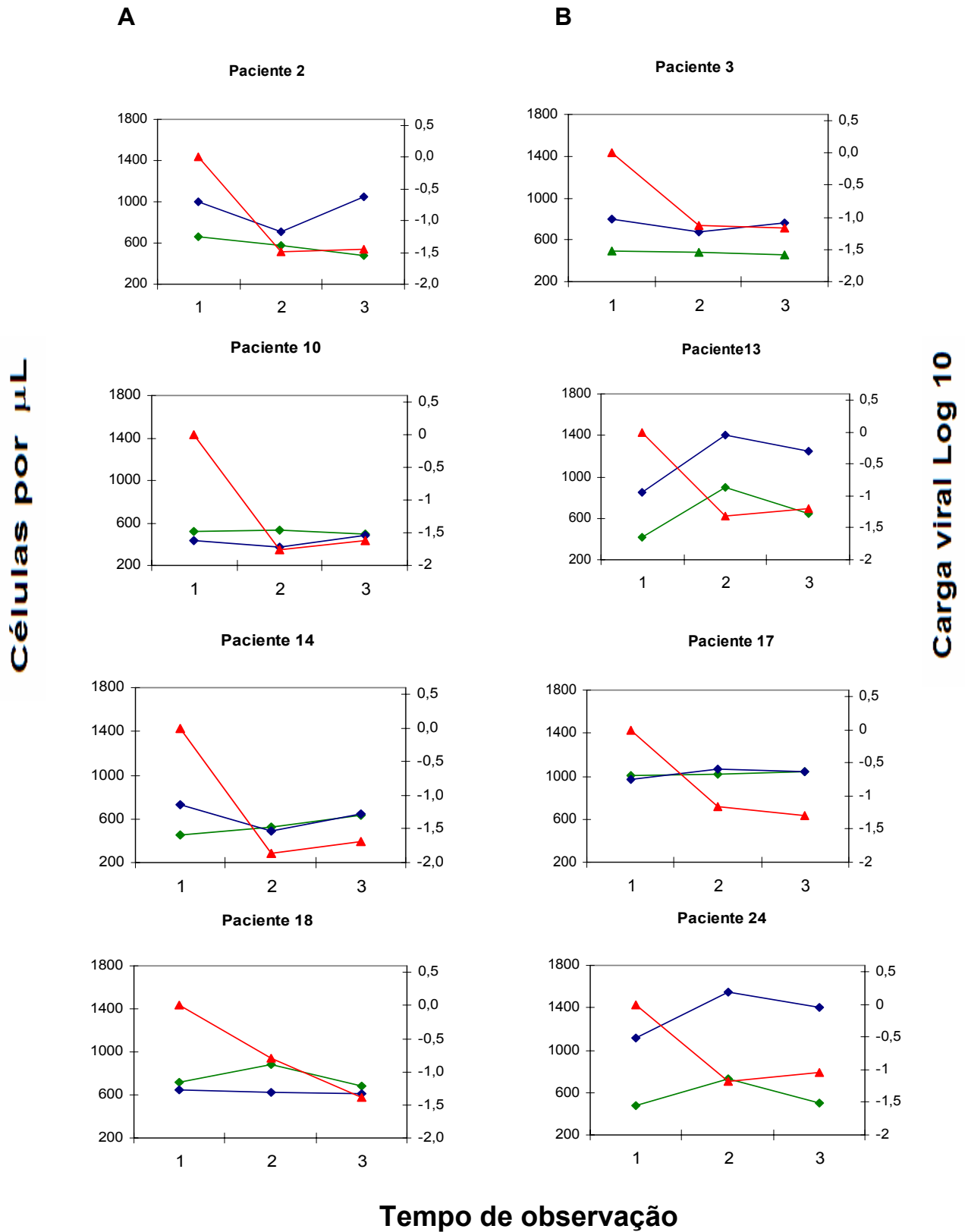


FIGURA 4

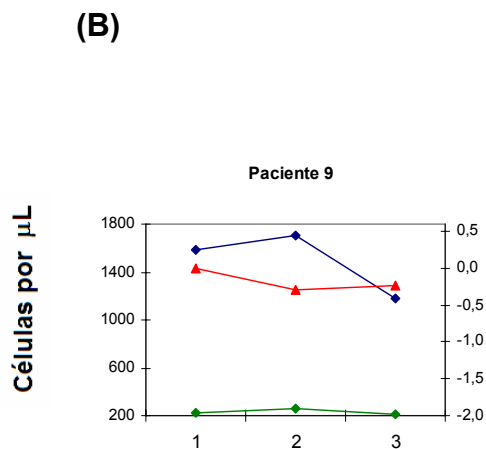
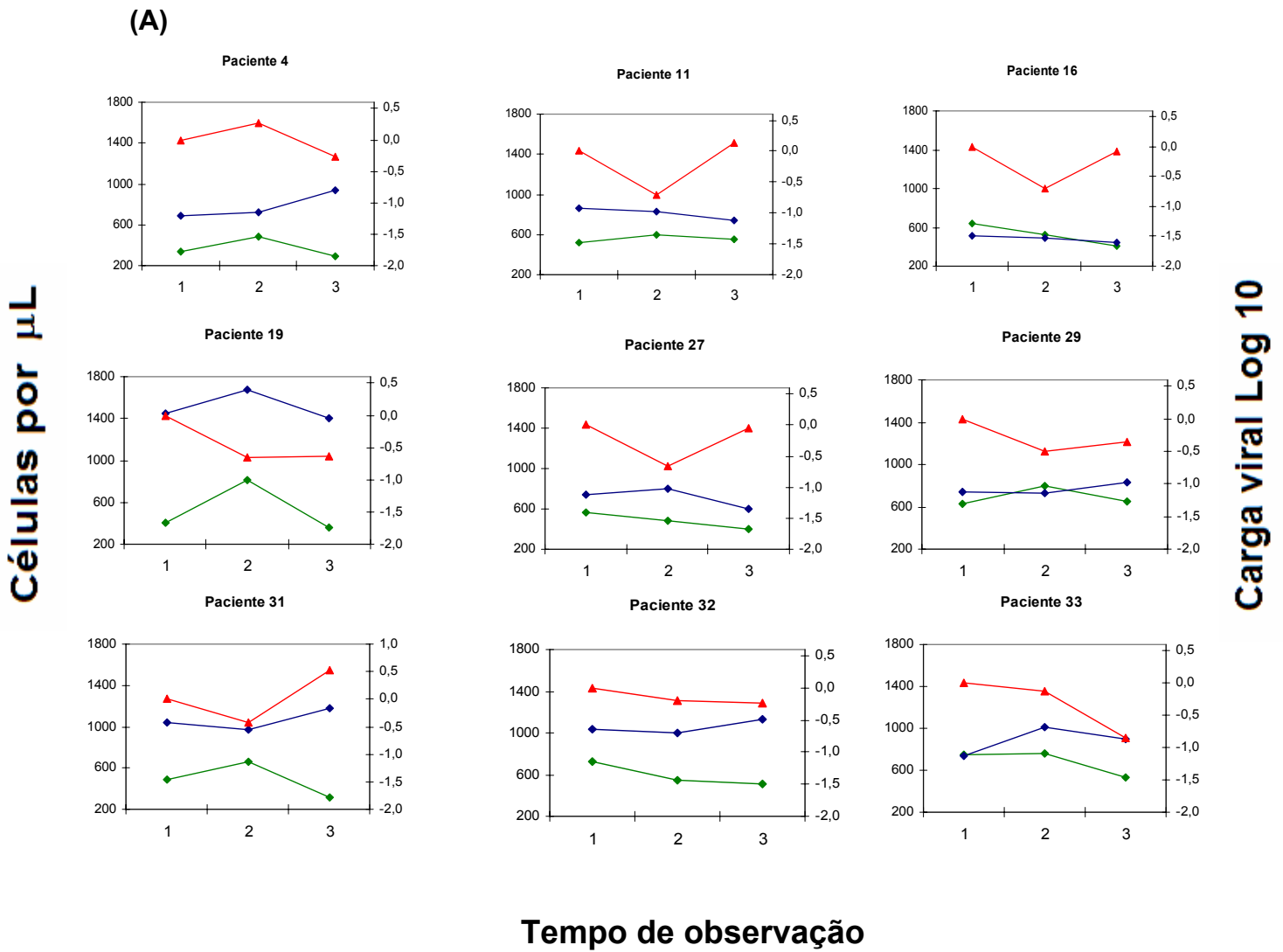


TABELA 1

Resposta Viroológica (seguimento 1 ano)	SUBTIPOS DO HIV-1 (Paciente)		
	B	F	D
(Redução CV \geq 1Log)	3, 13, 17, 24	2, 10, 14, 18	–
(Redução CV $<$ 1Log)	4, 11, 16, 19, 27, 29, 31, 32, 33*	9**	21*
Total de pacientes	13	5	1

ARTIGO II

Título

Avaliação de polimorfismo na região *pol* do HIV-1 em pacientes imunizados com uma vacina terapêutica.

Autores

Valéria Oliveira de Melo Ferreira

Mestrado de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Fone/Fax: (81) 3412-6333 Email: vomferreira@yahoo.com.br

Patrícia Moura

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco,

R. Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, PE, Brasil.

Fone/Fax: (81) 3421-1769 Email: thita6@yahoo.com.br

Luiz Cláudio Arraes

Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco,

Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Email: lularraes@terra.com.br

RESUMO

A primeira demonstração em humanos de uma vacina terapêutica de células dendríticas para HIV foi descrita com sucesso numa população de 18 pacientes brasileiros virgens de tratamento. Devido a falha na sustentação do controle da carga viral (CV) mesmo com a produção de altos níveis de linfócitos, o escape imunológico pode ter ocorrido associado ao polimorfismo viral. Variações na frequência de polimorfismo do vírus neste grupo de pacientes antes e após a vacina poderiam ter influenciado de forma distinta na evolução dos isolados virais de pacientes que sustentaram o controle da viremia. Portanto este estudo procurou verificar a frequência de polimorfismo viral na região *pol* do HIV-1 antes e após a imunização dos 18 pacientes descritos anteriormente e a presença de mutações relacionadas aos antiretrovirais (ARV) descritas no banco de dados de seqüência de HIV. A vacina terapêutica de células dendríticas quanto à evolução da região *pol* do HIV-1 induziu uma diminuição no polimorfismo dos isolados virais dos pacientes. Em 83% dos pacientes ocorreram mutações acessórias primárias para a protease, comuns em pacientes virgens de tratamento. Para a transcriptase reversa um paciente apresentou mutação principal antes e após imunização e outro apresentou uma mutação acessória antes da vacina. O controle da viremia poderia estar relacionado à estabilização de epítomos importantes para CTL e linfócitos CD4⁺Th1. Desta forma pode-se concluir que a vacina não aumenta o risco de polimorfismo viral nem induz mutações relacionadas à resistência aos ARV atualmente empregados consistindo numa alternativa promissora para a imunoterapia em pacientes infectados cronicamente por HIV.

ABSTRACT

The first demonstration of a therapeutic vaccine for HIV in humans was described by in 18 Brazilian chronically infected patients and drug naïve. By the fact that some patients did not reach significant suppression of viral load (VL) in spite of high lymphocytes count, immunological escape associated to induction of viral polymorphism may be occurred. Therefore this study aimed to investigate the variation in the frequency of polymorphism in the *pol* region of the HIV-1 before and after immunization of the 18 patients reported previously. Also mutations of resistance related to antiretroviral drugs (MRRD) were evaluated for protease (PR) and reverse transcriptase (RT). It was demonstrated that the virus isolates of the 18 patients submitted to the therapeutic vaccine had decreased in the initial polymorphism. This could render the CTL and CD4⁺Th1 epitopes stable to the efficient immune response which represents the main anti-viral mechanism in those patients. It was found primary accessory mutations for PR in 83% of the patients. Regarding the RT only 1 patient had primary principal mutation and other had shown a primary accessory mutation. Thus the dendritic cell vaccine doesn't enhance the viral polymorphism nor induces MRRD to the ARV consisting in a successful immunotherapy for patients chronically infected with HIV.

INTRODUÇÃO

Polimorfismos gerados por substituições de bases no genoma viral assim como deleções e inserções no mesmo conferem ao HIV uma grande flexibilidade para responder a pressões seletivas *in vivo* e é responsável pela geração rápida de mutantes que possibilitam o escape imunológico e resistência aos antiretrovirais nos indivíduos infectados (SAAG *et al.* 1993; KARLSSON *et al.*, 2003). Estes representam, portanto importantes obstáculos no desenvolvimento de vacinas e drogas eficientes para deter este vírus (LETVIN,1993; JAMIESON *et al.*, 2003). Além disso, o HIV é capaz de se replicar em todos os estágios clínicos da infecção (PIATAK *et al.*,1993; PANTALEO *et al.*,1993).

O HIV-1 está classificado em três grupos filogeneticamente distintos (M,O e N) sendo o M o mais diversificado deles com dez subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, J e K), que diferem entre si na região do envelope (*env*) em torno de 15 a 30% (MOORE *et al.*,1996; SPIRA., 2003). As regiões *env* e a do capsídeo (*gag*) viral possuem características antigênicas e imunogênicas importantes, tornado-as menos conservadas principalmente a *env* sendo hoje uma grande fonte de estudo para desenvolvimento de vacinas e medicações. Embora a região codificadora das enzimas virais (*pol*) do HIV-1 seja a mais conservada ao nível de aminoácidos, variações consideráveis de nucleotídeos podem ser observadas. Substituições sinônimas são mais comuns que as não sinônimas nesta região, como resultado da pressão seletiva para manter a integridade da seqüência e a transcriptase reversa (RT) funcional (DUMANS, 2004). As enzimas RT e protease (PR), localizadas nesta região, desempenham papel importante no ciclo replicativo do vírus sendo os principais alvos das drogas antiretrovirais (ARV) disponíveis.

Essas drogas ao longo do tempo podem gerar efeitos adversos no organismo dos pacientes, assim como seleção de mutantes que levam a resistência (SAAG *et al.*,

1993). Esta falha torna extremamente importante a investigação de outras estratégias terapêuticas para conduzir o tratamento dos pacientes HIV+.

A primeira demonstração em humanos de uma vacina terapêutica de células dendríticas para HIV foi descrita com sucesso por Lu *et al.* (2004) num grupo de 18 pacientes brasileiros virgens de tratamento. A vacina consistia de células dendríticas autólogas pulsadas com vírus inativados autólogos, a qual foi capaz de induzir resposta de linfócitos T específica associada com uma supressão viral forte e sustentada. Antes da vacina esses pacientes apresentavam uma perda progressiva de linfócitos TCD4⁺ e carga viral (CV) alta, porém um ano após a imunização ocorreu uma diminuição significativa da CV e manutenção dos linfócitos TCD4⁺.

Entretanto os pacientes apresentaram perfis marcantes de resposta imunológica e virológica, sendo classificados como respondedores fortes e fracos. Os respondedores fracos não conseguiram suprimir significativamente a replicação viral no período de um ano, enquanto os respondedores fortes apresentaram uma resposta virológica sustentada neste período de observação. A resposta sustentada foi associada com a ativação de linfócitos CD4⁺Th1 assim como resposta CTL mediada por perforina (LU *et al.*, 2004). Devido alguns pacientes não ter conseguido controlar a CV mesmo com a produção de altos níveis de linfócitos TCD8⁺, o escape imunológico pode ter ocorrido associado ao polimorfismo viral. Variações na frequência de polimorfismo do vírus do paciente antes e após a vacina podem ter influenciado de forma distinta na evolução dos isolados virais de pacientes que responderam forte ou fracamente.

A avaliação da frequência intrínseca do polimorfismo viral poderia fornecer informações importantes sobre o impacto desta imunoterapia na evolução do vírus e auxiliar no entendimento da falha de resposta virológica que ocorreu em 10 dos 18 pacientes. Portanto este estudo procurou verificar a frequência de polimorfismo viral na região *pol* antes e após a imunização dos 18 pacientes descritos por Lu *et al.* (2004) e a presença de mutações relacionadas aos antiretrovirais (ARV) descritas no banco de dados de seqüência de HIV.

PACIENTES E MÉTODOS

Amostragem

O grupo em estudo foi constituído por 19 (dezenove) pacientes HIV+, virgens de tratamento, adultos com idade \geq a 21 anos e \leq a 65 anos, participantes do ensaio clínico fase 1 realizado pelo IPIPE, no LIKA-UFPE, submetidos ao processo de imunização com células dendríticas autólogas carregadas com HIV autólogo inativado (LU et al., 2004). Porém das 57 amostras de DNA extraídas das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), obtidas em três momentos (0, 112, 360 dias) dos 19 (dezenove) pacientes imunizados, três amostras referentes a um dos pacientes (nº14) imunizado, não foram analisadas devido a problemas na amplificação por possuir baixa concentração de DNA do provírus. Os pacientes foram imunizados em setembro de 2003.

Amplificação e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído das Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizando o protocolo de extração da QIAGEN. A técnica de reação em cadeia da polimerase foi usada em todas as amostras (DNA) para amplificar a região *pol* utilizando primers específicos (Quadro 1). Esta reação de PCR foi realizada em 2 etapas com “primers” aninhados (TANURI *et al.*, 1999). O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado utilizando o kit BigDye® (Applied Biosystems, Foster City, CA), no seqüenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Alinhamento das seqüências

Os cromatogramas das seqüências obtidas foram analisados e editados no SeqMan do programa DNASTAR (CDC, 1999) . Posteriormente as seqüências foram alinhadas, traduzidas e analisadas quanto a substituição de aminoácidos resultando na presença de polimorfismos no programa BioEdit (versão 6.0.7 Pharmaceuticals, Inc 2004).

Determinação de polimorfismo relacionado à resistência viral

Para analisar se a imunização induziu seleção de mutações de resistência viral, foi analisada a evolução genética do vírus em três momentos antes (0) e após imunização (112 e 360 dias) dos isolados virais dos pacientes. A região *pol* tanto no gene da protease quanto da transcriptase reversa do HIV-1 nas seqüências obtidas das 54 amostras foram seqüenciadas após edição para retirar as ambigüidades no SeqMan do programa DNASTAR (CDC,1999), posteriormente foram comparadas as seqüências do banco de dados norte americano “Stanford Drug Resistance Database” através do site <http://hivdb.stanford.edu/hiv>. Os percentuais de polimorfismo dos isolados virais obtidos foi calculado interseqüências sendo usado como parâmetro o isolado anterior, porém no caso dos isolados antes da vacina foram considerados os números de substituições de aminoácidos entre o vírus original (vírus do paciente tempo 0) e seu respectivo padrão B (HXB2), F (F1BR9393) e D (DCD8484) utilizados também na análise de filogenia. A significância entre os percentuais foi calculada pelo teste exato de Fisher ou pelo teste do X^2 com nível de significância de 5%.

Análise filogenética

Os subtipos da população estudada, foram determinados através das análises filogenéticas baseadas na seqüência completa de nucleotídeos referentes à protease e a transcriptase reversa do HIV-1. Os subtipos virais foram estabelecidos a partir do

agrupamento das seqüências dos isolados virais e de seqüências prototípicas de cada subtipo em nódulos internos, na topologia obtida das árvores filogenéticas através do método de “neighbor-joining” após estabelecimento de distâncias filogenéticas pelo método paramétrico de Kimura (dois parâmetros: d=distância ou divergência; e p= taxa de transição pela taxa de transversão). A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 3.

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. Número do protocolo: 300/2004 CEP/CCS

RESULTADOS

Os subtipos do HIV do grupo em estudo foram determinados através das análises filogenéticas baseadas na seqüência completa de nucleotídeos referentes à protease e a transcriptase reversa do HIV-1. A figura 1 mostra a árvore filogenética com os subtipos encontrados nos 18 pacientes do estudo. Subtipos B(72,2%), F(22,2%) e apenas um dos indivíduos possuía o subtipo D (5.6%) .

Nenhuma mutação de resistência principal foi detectada para inibidores de protease (IP), entretanto foram encontradas mutações acessórias em 83,3% dos pacientes. A mais prevalente nas 54 seqüências analisadas foi a L63P/S/V (55,6%) seguida pela M36I (27,8%), I93L (27,8%), V77IV (14,8%), A71VT (14,8%), K20R (11,1%), D60E (11,1%) e L10IV (5,55%) (Figura 2). Quanto às mutações de resistência principal para os inibidores da transcriptase reversa análogos e não análogos de nucleosídeos (ITRN e ITRNN) foi encontrada apenas a mutação G190A nas três seqüências analisadas do paciente 32 (5,6%). Em relação às mutações acessórias para

RT, apenas o paciente 11 apresentou a mutação V118I (1,8%) na sequência do vírus original (tempo 0).

Quanto aos resultados da associação dos subtipos com mutações relacionadas às drogas para PR e RT, foram encontradas mutações comuns aos subtipos B, F e D na população estudada, sendo a mutação M36I encontrada em todos os subtipos F (Tabela 1). A ocorrência de mutações M36I em subtipos F, na verdade representa a assinatura molecular deste subtipo (CALAZANS et al., 2005). Três pacientes não apresentaram quaisquer mutações, sendo dois deles do grupo de sucesso, os pacientes 3 e 17, e o paciente 19 do grupo de insucesso. Nenhum paciente do grupo de sucesso apresentou mutações para RT, enquanto os pacientes 11 e 32 apresentaram as mutações V118I e G190A, respectivamente (Tabela 1).

O polimorfismo, ou número de substituições de aminoácidos interseqüências dos três momentos avaliados; (1) dia 0, (2) 112 e (3) 360 dias após imunização em cada paciente, foram analisados entre si e entre os vírus padrão (Figura 3 e 4). Foi observada uma diminuição significativa no percentual de substituições de aminoácidos dos isolados virais dos pacientes quando comparados antes e após imunização. O grupo que controlou a carga viral mantendo durante o período de 360 dias uma queda $\geq 1\text{Log}$, apresentou um percentual de substituições semelhante ao grupo de insucesso (Figura 3 e 4). Apenas o paciente 3 apresentou um aumento significativo no percentual de substituição de aminoácido aos 112 dias, mas retornou a apresentar o vírus selvagem aos 360 dias, esse paciente faz parte do grupo de sucesso virológico (Figura 3).

DISCUSSÃO

Apesar de nosso estudo mostrar a freqüência de polimorfismo genético natural apenas na região *pol* do HIV-1, referentes à PR e RT nos pacientes submetidos à vacina terapêutica de células dendríticas (LU et al., 2004) foi possível observar

associações importantes destes parâmetros com a resposta virológica à vacina. A região *pol* é a região mais conservada ao nível de substituição de aminoácidos no genoma do vírus, e por estar relacionada com a produção das proteínas alvo das drogas ARV disponíveis também é a mais bem estudada para mutações de resistência (KARLSSON *et al.*, 2003; DUMANS *et al.*, 2004; MAKEDONAS *et al.*, 2005). Adicionalmente estudos têm demonstrado que mutações relacionadas à resistência aos ARV coincidem com regiões de epítomos CTL específicas para o HIV-1 (MASON *et al.*, 2004; BOBERG *et al.*, 2005) sugerindo uma interface entre a terapia ARV e a resposta imune.

A pressão dos ARV leva a um alto grau de polimorfismo viral e, por conseguinte, a seleção de mutações que conferem resistência a esses medicamentos. Desta forma a região *pol* foi escolhida neste estudo para medir o impacto da imunoterapia com células dendríticas na indução de uma maior frequência de polimorfismos que pudessem ou não estar relacionados com a ocorrência de mutações principais e acessórias de resistência relacionadas à droga (MRRD) descritas na literatura (JOHNSON *et al.*, 2005). A mutação G190A (Figura 1), que confere resistência a nevirapina e resistência intermediária ao efavirenz, foi a única mutação principal encontrada, contudo nas três seqüências dos isolados virais do paciente 32 (5,6%), demonstrando que esta mutação não foi selecionada pela imunização, uma vez que estava presente no vírus antes da vacina. Portanto este paciente representa um caso de resistência primária aos ITRNN que ocorre em 2,06% dos pacientes brasileiros virgens de tratamento (BRINDEIRO, *et al.*, 2003). Uma explicação para essa resistência do paciente 32 poderia ter sido a aquisição do vírus por contato sexual desprotegido com o conjugue que faz uso de nevirapina (Arraes, com pessoal).

Quanto às mutações acessórias para RT foi encontrada no paciente 11, apenas na seqüência original, a mutação V118I, que ocorre em pacientes não tratados acarretando baixos níveis de resistência para 3TC e para outras drogas quando associada à mutação E44D (KANTOR *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2005). Em uma

coorte brasileira a V118I foi encontrada em baixa prevalência de 0,6-2,4% (BRINDEIRO *et al.*, 2003).

A L63P/S/V foi a mutação acessória para IP mais freqüente nos pacientes deste estudo (55,6%). Esta mutação foi encontrada por Brindeiro *et al.* (2003) em 44,3% de um total de 535 pacientes, por Dumans *et al.* (2004) em 59% das 152 seqüências estudadas e por Medeiros *et al.* (2005) em 47,6% de um total de 101 pacientes.

O Consenso brasileiro das seqüências para PR e RT difere do consenso global do subtipo B obtido no banco de dados de seqüências de HIV do Laboratório Nacional de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>) na posição 63 da PR onde uma leucina foi substituída por uma prolina em 59% das seqüências e na posição 135 da RT onde a isoleucina é substituída por treonina (I135T) em 72% das seqüências (DUMANS *et al.*, 2004), nos pacientes da vacina o percentual desta última mutação foi de 63% (resultados não mostrados). A região ¹²⁸TAFITIPSI¹³⁵ da RT consiste em um epítipo CTL restrito ao HLA-A2 e HLA-B51. Contudo a importância destas substituições no reconhecimento pelo CTL não foi possível ser estudada, pois seria necessária a informação sobre o HLA dos pacientes.

A mudança de metionina na posição 36 da PR para isoleucina (M36I) nos pacientes do subtipo F consiste na assinatura molecular deste subtipo. E, portanto, parece não ser relacionada à indução por drogas ou vacina neste grupo de pacientes (CALAZANS *et al.*, 2005).

Várias regiões imunodominantes têm sido caracterizadas para a RT de subtipos B e C (NOVITSKY *et al.* 2002; SPIRA *et al.*, 2003). Mutações geradas durante a terapia ARV podem também diminuir a resposta imunológica para RT, no caso de substituições de aminoácidos nos epítipos que são normalmente conhecidos por CTLs e linfócitos TCD4⁺ (WEINBERG & CAMERON, 1998; DALOD *et al.*, 1998; JAMIESON *et al.*, 2003). A maior diversidade de mutações acessórias no grupo de insucesso poderia estar associada à resposta imunológica menos eficiente. Porém devido ao pequeno grupo

estudado não foi possível fazer uma associação entre esta diversidade e a resposta virológica (Tabela 1). Por outro lado a diversidade inicial de polimorfismo geral pode na verdade ter auxiliado na contenção de mutantes que pudessem surgir após a vacina supondo-se que estes vírus polimórficos tivessem estimulado anteriormente clones CTL específicos para os mesmos (Figuras 3 e 4). Protocolos vacinais utilizando regiões da *pol* que apresentam MRRD têm sido sugeridos para complementar o tratamento com ARV e conter a replicação e geração de mutantes (O'CONNOR et al., 2001).

Nossos resultados demonstraram que o polimorfismo das seqüências dos isolados virais dos pacientes não aumentou de acordo com a comparação dos isolados antes e após a imunoterapia (Figura 3 e 4). Todavia foi observado um alto grau de polimorfismo do isolado viral do paciente no tempo 0 quando comparados as seqüências padrão do banco de dados de HIV do Laboratório Nacional de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). Entretanto após a vacina este percentual diminuiu significativamente em 61,1% dos pacientes em relação ao dia 0 de imunização ($p < 0,05$) e permaneceram baixos até os 360 dias do estudo.

O paciente 3 (subtipo B) foi o único que apresentou um aumento significativo de substituições em relação ao vírus original aos 112 dias ($p = 0,0309$). Interessantemente algumas substituições relacionadas à resistência a drogas para o subtipo B têm mostrado um aumento de imunogenicidade em regiões da RT (SAMRI et al., 2000). O polimorfismo observado neste caso foi na região da RT com as substituições K104R e D123N, esta última está associada ao epítipo CTL restrito ao HLA-B35. Manson et al. (2004) demonstraram que MRRD na região *pol* estavam relacionadas à manutenção da resposta CTL ou até mesmo a um aumento na imunogenicidade desta região estudando HLA-A2, A3, HLA-B35 e B44. A vacina parece ter sido capaz de conter este polimorfismo, o qual na verdade, para o paciente 3, pode ter representado um estímulo importante para a manutenção da resposta uma vez que, este paciente conseguiu controlar a carga viral por um ano com diminuição maior que 1 Log da CV inicial (LU et al., 2004). Entretanto para se confirmar esta observação seria necessário dispor do HLA deste paciente o que está sendo investigado no momento.

A vacina utilizando a célula dendrítica carregada com vírus HIV-1 inativado consiste numa abordagem inédita para estimular o sistema imunológico de pacientes cronicamente infectados, e seu sucesso parece estar relacionado com o estímulo adequado e específico contra o vírus (GARCIA *et al.*, 2005). A referida vacina pode disponibilizar um grande número de epítomos associados provavelmente ao MHC I e II, o que difere das vacinas convencionais de subunidades que direcionam a resposta para um número restrito de epítomos alvo. Protocolos com camundongos mostram que vacinas baseadas em células dendríticas conseguem estimular cruzadamente clones de CTL específicos para o HIV-1 (ABDEL-MOTAL *et al.*, 2001). Isto parece ter permitido um aumento no repertório de linfócitos envolvidos no controle significativo da viremia. Esta hipótese parece ser verdadeira, pois esta vacina conseguiu suprimir a replicação viral periférica de 8/18 pacientes por um ano, principalmente através da resposta de linfócitos CD4⁺Th1 e CTL (LU *et al.*, 2004).

Nos pacientes, em que a resposta não foi capaz de controlar de forma sustentada a CV, pode-se especular que os vírus desses pacientes, devido à sua plasticidade natural, tenham aumentado seu polimorfismo e escapado do controle imunológico. Contudo nossos resultados não apóiam tal suposição, pelo menos para a região *pol* do HIV-1, na qual foi possível determinar um decréscimo do polimorfismo em 61,1% dos pacientes aos 112 dias após a imunoterapia e a manutenção de uma baixa frequência do mesmo ao final de um ano de observação. Coincidentemente no período de 112 dias ocorreu um decréscimo médio de 0,5 Log da CV em 14 pacientes, sendo que oito destes aumentaram a redução da carga viral em 1 Log ou mais e o restante retornou aos níveis iniciais de CV no período de um ano.

O surgimento de escape imunológico está associado ao equilíbrio de diversos fatores que são pouco compreendidos *in vivo*. O balanço entre a pressão CTL seletiva e o custo da mutação ao *fitness* viral são fatores determinantes para o escape. A frequência de CTL, a especificidade dos epítomos, as propriedades do receptor de linfócitos T (TCR) e o estado funcional do CTL devem modular esse fenômeno (YANG

et al., 2005). Entretanto, Yang *et al.* (2005) sugerem que a pressão exercida pelos CTL *in vivo* seja subótima. Partindo desse pressuposto um dos motivos para o controle significativo da CV nos pacientes de resposta sustentada deve envolver a diminuição do polimorfismo de forma eficiente sem indução de pressão imunológica seletiva. Embora a estabilização na frequência deste polimorfismo, possa ter auxiliado na resposta adequada contra a replicação viral nos pacientes de sucesso virológico, não foi possível estabelecer uma associação independente entre resposta sustentada e nível de polimorfismo (Figuras 3 e 4).

CONCLUSÕES

Demonstramos que a vacina terapêutica de células dendríticas quanto à evolução da região *pol* do HIV-1 induziu uma possível estabilização do polimorfismo dos isolados virais dos pacientes imunizados. A importância deste fato para o controle viral pode estar relacionada à manutenção de epítopos importantes para CTL e linfócitos CD4⁺Th1 envolvidos na resposta celular antiviral. Adicionalmente a presença de mutações acessórias primárias para a PR, comuns em pacientes virgens de tratamento, pode influenciar na resposta a esta vacina, porém esta observação necessita ser confirmada. Verificamos também que a imunoterapia com células dendríticas não induziu mutações de resistência aos ARVs sendo segura para posteriores esquemas de tratamento o que consolida o protocolo da vacina como uma alternativa terapêutica promissora. Todavia mais estudos serão necessários para a adequação da complexa logística e custo elevado do procedimento para que este seja instituído na prática clínica para a maioria dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL-MOTAL, UM, FRIEDLINE R, POLIGONE B, POGUE-CALEY RR, FRELINGER JA, TISCH R. Dendritic cell vaccination induces cross-reactive cytotoxic T lymphocytes specific for wild-type and natural variant human immunodeficiency virus type 1 epitopes in HLA-A*0201/Kb transgenic mice. **Clin Immunol.**101(1):51-8, 2001.

BRINDEIRO RM, DIAZ RS, SABINO EC, MORGADO MG, PIRES IL, BRÍGIDO L, DANTAS MC, BARREIRA D, TEIXEIRA PR, TANURI A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, 2;17(7):1063-9, 2003.

BOBERG A, SJOSTRAND D, ROLLMAN E, HINKULA J, ZUBER B, WAHREN B. Immunological cross-reactivity against a drug mutated HIV-1 protease epitope after DNA multi-CTL epitope construct immunization. **Vaccine 2005** (in press).

CALAZANS A, BRINDEIRO R, BRINDEIRO P, VERLI H, ARRUDA MB, GONZALEZ LM, GUIMARAES JA, DIAZ RS, ANTUNES OA, TANURI A. Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. **J Infect Dis**, 1;191(11):1961-70, 2005

DUMANS AT, SOARES MA, PIENIAZEK D, KALISH ML, DE VROEY V, HERTOOGS K, TANURI A. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naive human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, 46(9):3075-9. 2002

DUMANS AT, SOARES MA, MACHADO ES, HUE S, BRINDEIRO RM, PILLAY D, TANURI A. Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian human immunodeficiency virus Type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. **J Infect Dis**. Apr 1;189(7):1232-8,2004.

DALOD M, HARZIC M, PELLEGRIN I, DUMON B, HOEN B, SERENI D. ET AL. Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. **J Infect Dis**, 178, 61-9, 1998

GARCIA F, LEJEUNE M, CLIMENT N, GIL C, ALCAMI J, MORENTE V, ALOS L, RUIZ A, SETOAIN J, FUMERO E, CASTRO P, LOPEZ A, CRUCETA A. ET AL. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. **J Infect Dis**, 15;191(10):1680-5,2005.

JAMIESON BD, YANG, OO, HULTIN L *et al.* Epitope Escape Mutation and Decay of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CTL Responses The Journal of Immunology, 171: 5372–5379, 2003.

JOHNSON, V A, BRUN-VÉZINET F, BONAVENTURA C, BRIAN, DANIEL R. KURITZKES D P, JONATHAN S, AMALIO T, RICHMAN D. Drug Resistance Mutations in HIV-1. **International AIDS Society – USA- Topics in HIV Medicine** Volume 13 Issue 1 March/April 2005

LU, W, ARRAES LC, FERREIRA WT, ANDRIEU JM. Trapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1infection. **Nat Med**. (12):1359-65,2004.

LETVIN NL. Vaccines against human immunodeficiency virus--progress and prospects. **N Engl J Med**. 4;329(19):1400-5,1993.

MEDEIROS, L B. Resistência primária do HIV-1 em pacientes atendidos no serviço de referência HIV/AIDS do Hospital das Clínicas da UFPE. **Tese de Doutorado – Doutorado em Medicina Tropical, UFPE, 2005.**

KARLSSON, CA, DEEKS, SG, BARBOUR, JD et al. Dual Pressure from Antiretroviral Therapy and Cell-Mediated Immune Response on the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Gene. *J Virol*, June, p. 6743–6752, 2003.

KANTOR R, MACHEKANO R, GONZALES MJ, DUPNIK K, SCHAPIRO JM, SHAFER RW. Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database: an expanded data model integrating natural language text and sequence analysis programs. *Nucleic Acids Res* 1;29(1):296-9, 2001.

KUMAR K. **MEGA3**: Molecular Evolutionary genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.

KIMURA M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature*, 267:275-27, 1977.

LETVIN NL, WALKER BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med*, 9(7):861-6, 2003.

MAKEDONAS G, BRUNEAU J, ALARY M, TSOUKAS CM, LOWNDES CM, LAMOTHE F, BERNARD NF. Comparison of HIV-specific CD8 T-cell responses among uninfected individuals exposed to HIV parenterally and mucosally. *AIDS*, 19:251–259, 2005.

MANSON RD, BOWMER MI, HOWLEY CM, GALLANT M, MYERS JC, GRANT MD. Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *J Immunol*, Jun 1;172(11):7212-9, 2004.

MOORE, J P, CAO, Y., ET AL. Inter and intra-clade neutralization of Human Immunodeficiency Virus type-1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. **J Virol.**, 70:427, 1996.

O'CONNOR D, ALLEN T, WATKINS DI. Vaccination with CTL epitopes that escape: an alternative approach to HIV vaccine development? *Immunology Letters* 79, 77–84, 2001.

PIATAK M JR, SAAG MS, YANG LC, CLARK SJ, KAPPES JC, LUK KC, HAHN BH, SHAW GM, LIFSON JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. **Science**, 19;259(5102):1749-54, 1993.

PANTALEO G, GRAZIOSI C, DEMAREST JF, BUTINI L, MONTRONI M, FOX CH, ORENSTEIN JM, KOTLER DP, FAUCI AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**. 25;362(6418):355-8, 1993.

SAAG MS, EMINI EA, LASKIN OL, DOUGLAS J, LAPIDUS WI, SCHLEIF WA, WHITLEY RJ, HILDEBRAND C, BYRNES VW, KAPPES JC, *et al.* A short-term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. L-697,661 Working Group. **N Engl J Med**, 7;329(15):1065-72, 1993 .

SAMRI A, HAAS G, DUNTZE J, BOULEY JM, CALVEZ V, KATLAMA C, AUTRAN B. Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. **J Virol**, 74(19):9306-12, 2000.

SPIRA S, WAINBERG MA, LOEMBA H, TURNER D, BRENNER BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. **J Antimicrob Chemother**, 51(2):229-40, 2003.

TANURI A, VICENTE AC, OTSUKI K *et al.* Genetic variation susceptibilities to protease inhibitors among subtypes B and F isolates in Brazil. **Antimicrob agents Chemother**,43:253-258,1999.

WAINBERG M A, & CAMERON D W. HIV resistance to antiviral drugs: public health implications. **Drug Resistance Updates** 1, 104-8, 1998.

YANG OO, SARKIS PTN, ALI A, HARLOW DN, BRANDER C, KALAMS SA, WALKER BD. Determinants of HIV-1 Mutational Escape From Cytotoxic T Lymphocytes. **J Exp Med** 197 (10): 1365–1375, 2003.

LISTA DE LEGENDAS DE QUADRO, FIGURAS E TABELA

Quadro1. Primers (iniciadores) utilizados para amplificação por PCR para a região, *pol* (RT/PRT) Forward (F)/Reverse (R).

Figura 1. Árvore filogenética com os subtipos encontrados em 18 pacientes do estudo.

Figura 2. Percentagens das mutações de resistência nas 54 seqüências de isolados virais dos 18 pacientes imunizados com vacina terapêutica com DCs analisados em três momentos (0, 112 e 360 dias).

Figura 3. Variação do percentual de substituições na PR e RT dos pacientes com sucesso virológico no período de 0, 112 e 360 dias de imunização. O percentual obtido no dia 0 foi calculado a partir do vírus padrão B (HXB2), F (F1.BR.93.93) e D (DCD8484).

Figura 4. Variação do percentual de substituições na PR e RT dos pacientes com insucesso virológico no período de 0, 112 e 360 dias de imunização. O percentual obtido no dia 0 foi calculado a partir do vírus padrão B (HXB2), F (F1.BR.93.93) e D (DCD8484).

Tabela 1. Mutações principais e acessórias associadas com resistência aos ARVs as quais ocorreram antes da imunização e que foram mantidas ou não após a vacina.

QUADRO 1

Região	Etapa	Primer	Seqüências 5-----3`	Tamanho
POL (RT/PRT)	1º	K1(F)	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	1000pb
		K2(R)	GTCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGAAAA	
	2º	Dp10(F)	CAACTCCCTATCAGAAGCAGGAGAAG	
		RT4(R)	CTTTGGATGGGTTATGAACT	

FIGURA 1

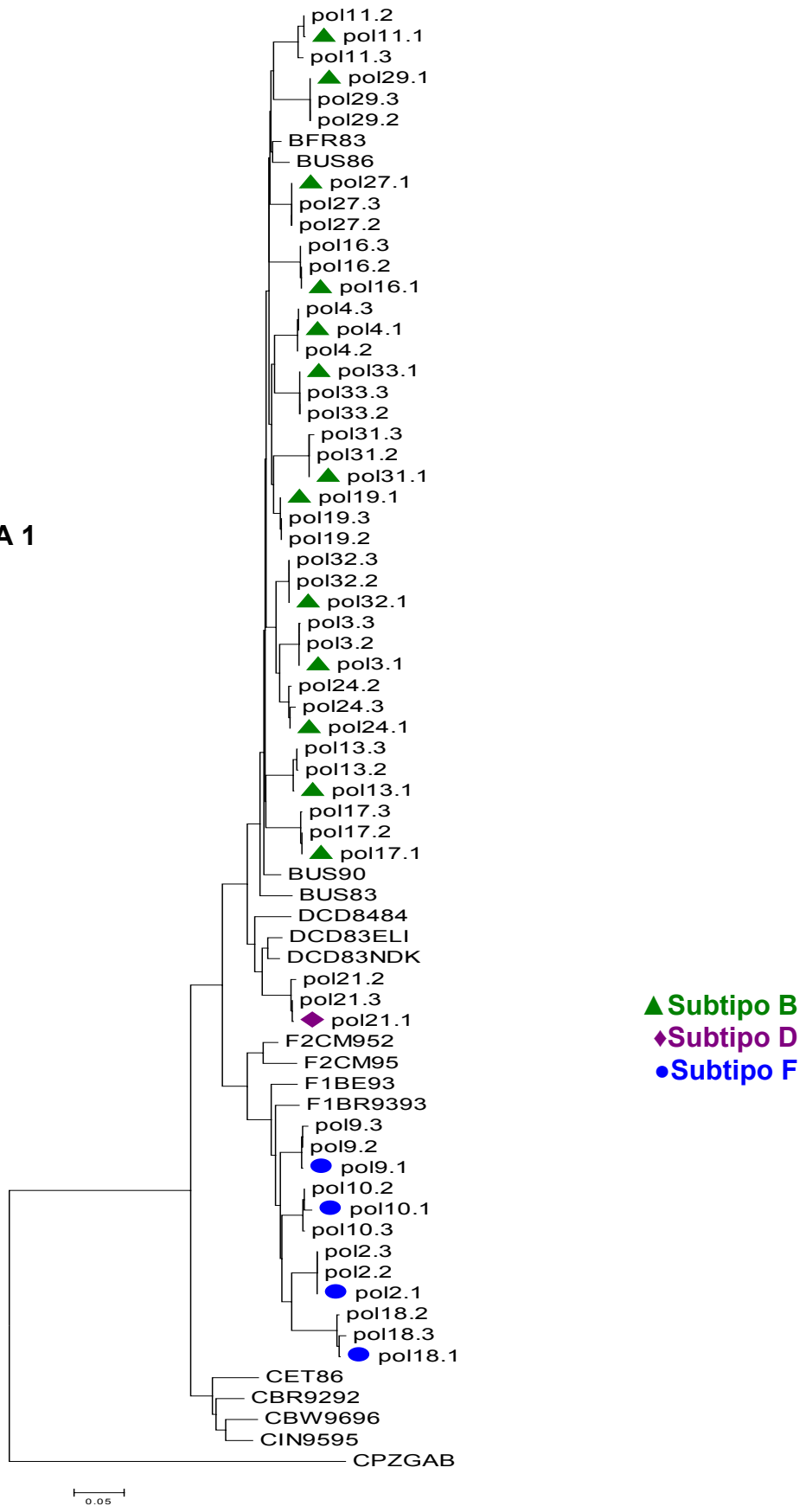


TABELA 1

Pacientes	Subtipos		Genótipos em posições associadas à resistência	
	PR	RT	PR	RT
Sucesso				
2	F		M36I , D60E,	-
3	B		-	-
10	F		M36I , I93L	-
13	B		L63PS, I93L	-
17	B		-	-
18	F		M36I , L63PS, L10IV	-
24	B		L63PS, V77I	-
Insucesso				
4	B		L63PS, I93L	-
9	F		M36I , K20R, L63V	
11	B		L63PS	V118I
16	B		D60E	-
19	B		-	-
21	D		L63PS, I93L, A71V, V77I	-
27	B		L63PS, V77I	-
29	B		I93L, K20R, A71V, V77I	-
31	B		L10IV	-
32	B		L63PS, A71T	G190A
33	B		L63PS, M36I	-

FIGURA 2

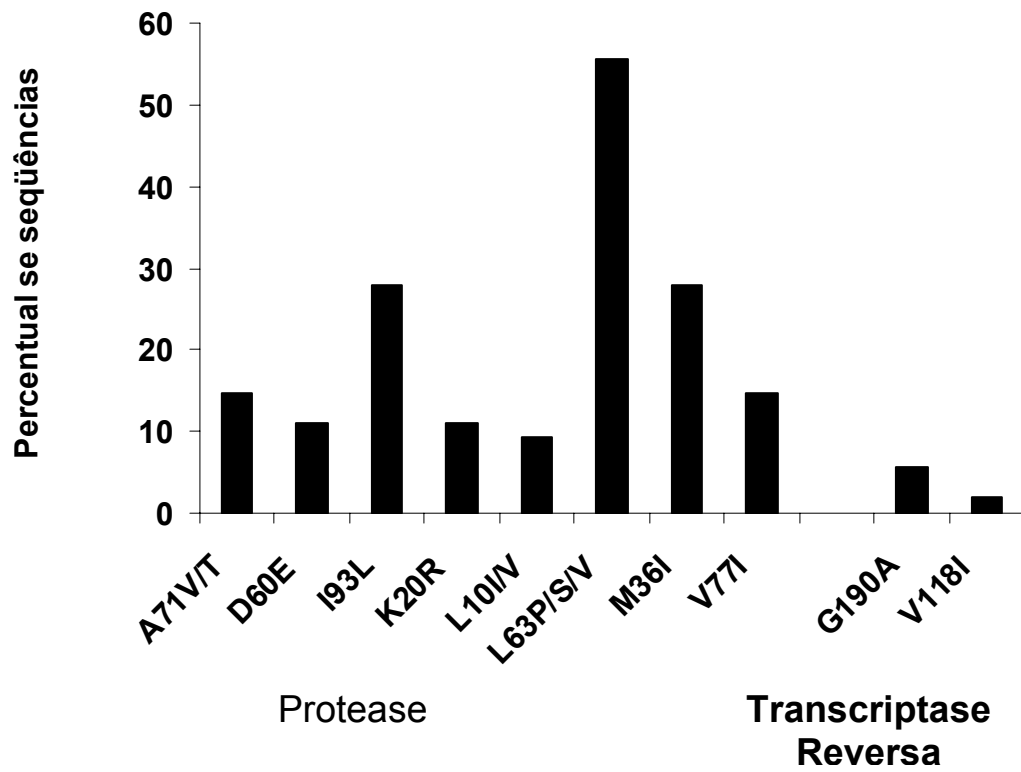


FIGURA 3

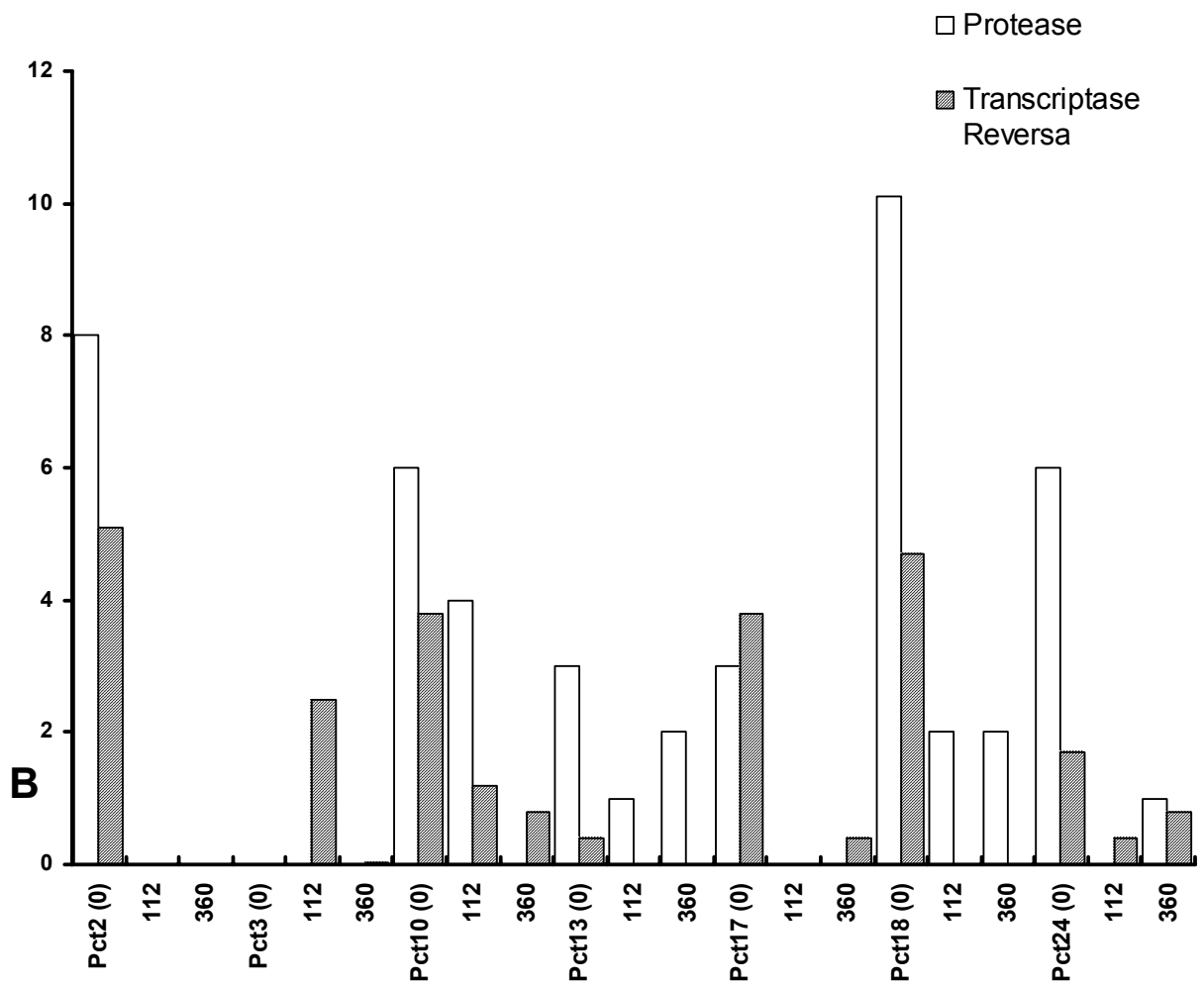
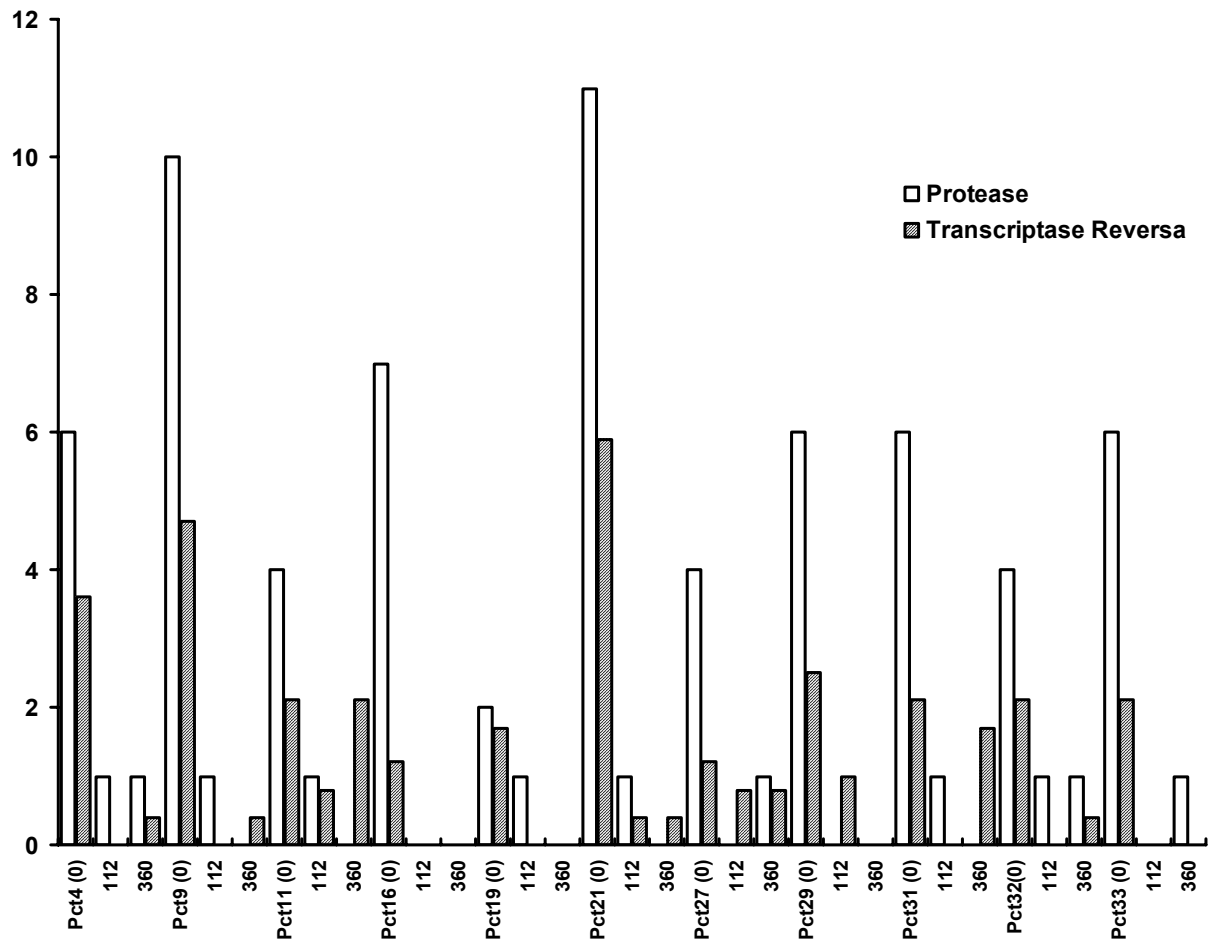


FIGURA 4



CONCLUSÕES GERAIS

Conclusões Gerais

- A tendência dos pacientes portadores do subtipo F apresentarem uma melhor resposta virológica a imunoterapia com células dendríticas, precisa ser confirmada em uma amostragem mais representativa.

- A imunoterapia com células dendríticas não induziu mutações de resistência aos ARVs.

-A imunoterapia com células dendríticas não foi capaz de produzir seleção de mutações de resistência nos pacientes vacinados nem aumento de polimorfismo genético mostrando que esta abordagem parece não oferecer risco na indução de seleção de mutantes pelo contrário, a vacina foi capaz de induzir uma possível estabilização do polimorfismo na região *pol* (RT/PR) do vírus dos isolados primários dos pacientes.

- Devido aos resultados obtidos neste trabalho, a vacina terapêutica com células dendríticas pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HIV-1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

LU, W., WU, X., LU, Y., GUO, W. AND ANDRIEU, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. **Nat Med**, vol. 9, nº 1, 2003.

LU, W & ANDRIEU J. M. In vitro human immunodeficiency virus eradication by autologous CD8(+) T cells expanded with inactivated-virus-pulsed dendritic cells. **J Virol**. 75(19):8949-56, 2001.

LU, W., ARRAES LC., FERREIRA WT., ANDRIEU JM. Trapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1infection. **Nat Med**. (12):1359-65, 2004.

KAUFMANN, S.H.E. Novel Vaccination Strategies. Cap 23, pág: 505-523, 2004

RUBBERT & OSTROWSKI. Pathogenesis of HIV Infection 2005. **HIV Medicine**, 2005

UNAIDS/WHO – 2004 Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) / World Health Organization (WHO) - AIDS epidemic update - December 2004.

ANEXOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 668/2004-CEP/CCS

Recife, 01 de dezembro de 2004.

Ref. Protocolo de Pesquisa n.º 300/2004-CEP/CCS
Titulo "Evolução de polimorfismos nas regiões ENV, GAG e POL do vírus HIV-1, em pacientes HIV+, antes e após imunização com células de vírus autólogos inativados."

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE registrou e analisou, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe aprovando e liberando-o para início da coleta de dados em 01 de dezembro de 2004, **com recomendação de inserir no texto de forma clara os risco e benefícios aos voluntários.**

Ressaltamos que ao pesquisador responsável deverá apresentar relatório, em 30/ 06/ 2005.

Atenciosamente,



Profª Maria Clara Albuquerque
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

À
Sra. Valeria de Melo Ferreira
Coordenação do Mestrado em Medicina Tropical CCS/UFPE

Registro CONEP do projeto principal:	Sub-Projeto: Evolução de polimorfismo nas regiões ENV, GAG, POL do HIV-1, em pacientes HIV+, antes e após imunização com células dendríticas pulsadas com vírus autólogos inativados.	Paciente n°
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido		Data:

Eu, _____

_____ RG n° _____ UF _____

Autorizo a utilização de meu sangue já estocado no Laboratório P3 no LIKA, como complemento da investigação da vacina de células dendríticas a qual fui submetido. Fui informado que este subprojeto tem como finalidade investigar a variação do vírus após a vacina para avaliação da eficiência da mesma. Eu estou ciente de que este termo também abrange as coletas futuras durante o período que a pesquisa vigorar. Serei informado dos meus resultados referentes a esta pesquisa.

Assim sendo concordo em participar do estudo.

Recife, _____ de _____ de 2004

Assinatura do Paciente

Testemunha 1

Testemunha 2

Pesquisador

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](#)