

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Parasitária

Avaliação da antigenicidade de peptídeos sintéticos correspondentes
a região *nef* do HIV-1, obtidos a partir de sequências consensos e de
isolados dos subtipos B e F1

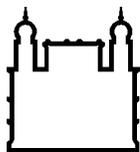
FERNANDA HELOISE CÔRTEZ

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

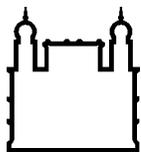
FERNANDA HELOISE CÔRTEZ

Avaliação da antigenicidade de peptídeos sintéticos correspondentes a região *nef* do HIV-1, obtidos a partir de sequências consensos e de isolados dos subtipos B e F1

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária, área de concentração: Imunologia e Patogenia.

Orientadora: Dr^a Mariza Gonçalves Morgado

Rio de Janeiro
2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: Fernanda Heloise Côrtes

Avaliação da antigenicidade de peptídeos sintéticos correspondentes a região *nef* do HIV-1, obtidos a partir de sequências consensos e de isolados dos subtipos B e F1

ORIENTADORA: Dr^a Mariza Gonçalves Morgado

Aprovada em: 31/03/2010

EXAMINADORES:

Dr^a Ana Carolina Paulo Vicente – IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Dr Dumith Chequer Bou-Habib – IOC/FIOCRUZ

Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi – CPqGM/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 31 de março de 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Mariza Gonçalves Morgado e colaboração do Dr Gonzalo Bello.

Para fazer perguntas, para procurar por respostas, para fazer pesquisa – Eu penso que temos que procurar na natureza o que já está lá, mas até o momento não foi revelado, isto é a coisa mais excitante com a qual podemos sonhar e é o que queremos continuar fazendo. (Rolf M. Zinkernagel, Prêmio Nobel de Medicina 1996).

Dedico esse trabalho a minha querida avó Maria Luiza, que é muito mais que minha “vó Luiza”, é uma mãe, um colo, uma força.

Agradeço

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

A minha “vó Luiza”, que me protegeu, me mimou, cuidou de mim com muita dedicação, que enquanto eu estudava para a prova do mestrado decretou ordem de silêncio no quintal e brigava com todos que me atrapalhavam.

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

A Dr^a Mariza Morgado, minha orientadora, pela confiança, orientação, ensinamentos e conselhos, não só científicos. Por todas as tardes que seguiam pelas noites dedicadas a este trabalho e por me fazer compreender um pouco mais o que é fazer pesquisa.

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

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

A minha Tia Vera, por tanta paciência e dedicação, pelos seus conselhos, por sua calma, obrigada por me mostrar que Deus nunca desiste daqueles que Nele confia.

Ao meu namorado Thiago, por todo apoio e compreensão, por me ensinar a ser mais paciente e confiar mais em mim, pelos conselhos e dicas, por ler vários trechos da dissertação.

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

A Dr^a Carla Vorsatz e ao Dr José Henrique Pilotto por toda cooperação e recrutamento dos voluntários desse estudo. E a toda equipe dos Ensaio Clínicos do IPEC que deu apoio ao recrutamento.

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

As minhas amigas, Cleice, Vivi, Andreza, pela amizade, torcida, apoio e momentos compartilhados.

Aos novos amigos do mestrado que dividiram esta caminhada, obrigada pela companhia e pelos momentos de descontração, churrascos e amigo-oculto.

A todos os voluntários que aceitaram participar desse estudo.

Ao pessoal do 4º andar do pavilhão 26, pelas divertidas conversas na copa.

Enfim, a todos aqueles que fizeram parte destes dois anos muito **OBRIGADA**.

Resumo

Sequências virais centrais, incluindo consenso, ancestral e centro-da-árvore, vêm sendo propostas para o desenho de potenciais imunógenos para o desenho de uma vacina anti-HIV/Aids, por minimizarem a distância genética em relação aos vírus circulantes. No Brasil a epidemia de Aids é causada primariamente pelo subtipo B, seguido dos subtipos F1 e C, em adição a recombinantes B/F1 e B/C.

Este estudo teve como objetivo avaliar o uso potencial de sequências consenso comparadas a sequências de isolados virais mais próximos, na definição de antígenos vacinais. Bem como determinar o impacto do polimorfismo viral na resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV-1. Esta avaliação da resposta imune foi realizada com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos infectados pelo subtipo B e F1, incluindo um grupo de controladores da carga viral e indivíduos não progressores de longo termo, usando o ensaio de ELISpot IFN- γ .

Duas regiões em Nef (R1 e R3) apresentaram alta frequência de resposta, 84% e 73% para o *pool* de peptídeos referente ao consenso B e 65% e 69% para o consenso F1, respectivamente. Em indivíduos infectados pelo subtipo B a frequência de resposta tanto para o *pool* de peptídeos baseados na sequência do isolado quanto na sequência consenso foi igual na R1 (93%) e muito próxima na região 2, 28% para o consenso contra 21% do isolado. Na R3, as sequências do consenso e do isolado no subtipo B são idênticas, e 71% dos indivíduos responderam ao *pool* dessa região. Nos indivíduos infectados pelo subtipo F1 foram encontrados valores similares na frequência de resposta para a R1, 44% e 55%, e idênticos na R3, 66%, para o consenso e o isolado, respectivamente. A magnitude de resposta não foi significativamente diferente entre o consenso e isolado ($P > 0,05$) para ambas as regiões tanto para os indivíduos infectados pelo subtipo B quanto pelo F1.

Foi demonstrada uma forte reatividade cruzada frente aos peptídeos derivados dos consensos dos subtipos B e F1 e do grupo M. Nos indivíduos infectados pelo subtipo B, 79% das respostas foram detectadas tanto com peptídeos do consenso B, como F1 e M, nos indivíduos infectados pelo subtipo F1 essas respostas representaram 68%.

Juntos esses dados indicam que tanto a estratégia do consenso, quanto a do isolado mais próximo é capaz de estimular uma resposta HIV específica. Além disso, nosso estudo aponta que sequências referentes tanto ao subtipo B quanto ao F1 poderiam servir como base para o desenho de imunógenos pautados na proteína Nef.

Abstract

Centralized viral sequences, including consensus, ancestral and center-of-tree have been proposed as potential immunogens for an anti-HIV/Aids vaccine design in order to reduce the genetic distance from circulating viruses. In Brazil, Aids epidemic is primarily caused by clade B, followed by clade F1 and C, with additional B/F and B/C recombinants.

The goal of this study was to evaluate the potential use of consensus sequences compared with close viral isolate sequences in order to define vaccine antigens, as well as to determine the impact of polymorphism on immune response from HIV-1 infected subjects. Evaluation of the immune response was carried out with PBMCs from subjects infected with clade B and F1, including a cohort of HIV viral load controllers and Long Term Non Progressors, using an IFN- γ ELIspot assay.

Two regions in Nef (R1 and R3) demonstrated high frequency of response, 84% and 73% for the *pool* of peptides based on consensus B, and 65% and 69% for consensus F1, respectively. In clade B-infected subjects, the frequencies of response for both, *pool* of peptides based on consensus and isolate sequence, were the same in R1 (93%) and very close in R2, 28% to consensus and 21% to isolate. In R3, the sequences from consensus and isolate were identical, and 71% of subjects responded to peptides in this region. In clade F-infected subjects, the frequencies of responses were similar in R1, 44% and 55%, and identical in R3, 66%, to consensus and isolate, respectively. No statistically significant differences were observed for the magnitude of response between consensus and isolate ($P>0,05$) for both regions in clade B- and F1-infected subjects.

Clade B- and F1-infected subjects were able to recognize peptides based on B-, F1- and group M-consensus, showing a strong cross-clade response. In clade B-infected subjects, 79% of positive response was detected both with consensus from clade B, F1 and group M peptides. In clade F1-infected subjects this cross-clade response represented 68%.

Together, these data suggests that both, B and F1 consensus and their closest isolates are able to detect similar HIV Nef specific responses. Our results show that sequences based on clade B or F1 could equally serve for the design of immunogens corresponding to the Nef protein.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças infectadas HIV em 2008.	1
Figura 2: Municípios com pelo menos um caso de Aids por período de diagnóstico. Brasil, 1980 a 2009.	2
Figura 3: Papel das células dendríticas (DCs) na infecção e disseminação do HIV.	4
Figura 4: Curso clínico, imunológico e virológico típico da infecção pelo HIV-1	6
Figura 5: Esquema representativo de um CRF.	9
Figura 6: Distribuição regional dos subtipos e Formas Recombinantes Circulantes do HIV-1 em 2004.	11
Figura 7: Distribuição dos subtipos de HIV-1 por região no Brasil.	12
Figura 8: Análise filogenética da região do gene <i>nef</i> de 50 sequências brasileiras classificadas como subtipo B, incluindo as sequências consenso e ancestral.	27
Figura 9: Análise filogenética da região do gene <i>nef</i> de 38 sequências brasileiras classificadas como subtipo F, incluindo as sequências consenso e ancestral.	28
Figura 10: Cálculo da distância genética média entre a sequência dos consensos do subtipo B e F e as sequências dos isolados B e F mais próximos e mais distantes ao grupo de sequências utilizadas para o alinhamento.	29
Figura 11: Análise filogenética da região do gene <i>nef</i> de 24 amostras estudadas e amostras de referências do subtipo B, C e F1.	30
Figura 12: Regiões cobertas pelos <i>pools</i> de peptídeos.	31
Figura 13: Identificação de regiões imunodominantes por ELISpot IFN γ .	32
Figura 14: Comparação da antigenicidade entre <i>pool</i> de peptídeos derivados da sequência consenso e de isolado viral por ELISpot IFN γ em indivíduos infectados pelo subtipo B.	33
Figura 15: Comparação da antigenicidade entre <i>pool</i> de peptídeos derivados a partir da sequência consenso e de isolado viral por ELISpot IFN γ em indivíduos infectados pelo subtipo F1.	34

Figura 16: Reatividade cruzada entre <i>pool</i> de peptídeos derivados a partir das sequências consenso dos subtipos B e F e do grupo M avaliada por ELISpot IFN γ IFN γ em indivíduos infectados pelo subtipo B.	35
Figura 17: Reatividade cruzada entre os consensos dos subtipos B e F e o consenso do grupo M. ELISpot IFN γ em indivíduos infectados pelo subtipo F1.	36
Figura 18: Diagramas de Venn mostrando o número de respostas positivas detectadas utilizando cada conjunto de peptídeos referentes ao subtipo B, F1 ou grupo M em indivíduos infectados pelo subtipo b e pelo subtipo F1.	38
Figura 19: Comparação entre a sequência do vírus dos indivíduos infectados com subtipo B ou F1 e a sequências dos peptídeos referentes ao consenso do subtipo B, F1 e grupo M.	39
Figura 20: Identificação dos peptídeos alvos da resposta por ELISpot IFN γ .	41
Figura 21: Comparação entre distância genética de aminoácidos e a magnitude de resposta.	42
Figura 22: Correlação entre distância genética de aminoácidos e magnitude de resposta.	43
Figura 23: Relação entre controle da carga viral e magnitude e frequência de resposta por ELISpot IFN γ em grupo de controladores e não controladores da carga viral.	44
Figura 24: Relação entre controle da carga viral e magnitude e frequência de resposta por ELISpot IFN γ em grupos de controladores da carga viral.	45

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Vacinas em fase de teste clínicos segundo IAVI 2008.	15
Tabela 2: Valores da mediana da contagem de células T CD4 ⁺ e carga viral (CV) dos grupos de indivíduos, no momento de inclusão no estudo.	29

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

Aids	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
BCIP/NBT	5-bromo, 4-cloro, 3-indolilfosfato/ Cloreto Nitroazul Tetrazólio
BSA	Albumina Bovina Sérica
CD	Grupo de Diferenciação
CEP	Cômite de Ética em Pesquisa
CFS	Células Formadoras de Spots
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
COT	Centro-da-árvore
CRF	Forma Recombinante Única
CTL	Célula T Citotóxica
CV	Carga Viral plasmática
DC	Célula Dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
EC	Controladores de Elite
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISpot	Ponto Imunoabsorvente Ligado a Enzima (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>)
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
HC	Controladores da carga viral
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IAVI	Iniciativa Internacional de Vacinas contra a Aids (<i>International Aids Vaccine Initiative</i>)
IFN- γ	Interferon - γ
IL-2	Interleucina-2
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
LTNP	Não Progressores de Longo Termo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 β	Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 β
MRCA	Ancestral Comum Mais Recente
NC	Não controladores da carga viral
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salina

PCBN	<i>Pool</i> do Consenso do subtipo B Nef
PCFN	<i>Pool</i> do Consenso do subtipo F Nef
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PIBN	<i>Pool</i> do Isolado do subtipo B Nef
PIFN	<i>Pool</i> do Isolado do subtipo F Nef
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TBE	Tris-Ácido bórico -EDTA
URF	Forma Recombinante Única

Sumário

	Página
1. Introdução	1
1.1. A pandemia de Aids	1
1.1.1. A epidemia de Aids no Brasil	2
1.2. A infecção pelo HIV	3
1.3. Resposta imune celular	6
1.3.1. Resposta imune celular e velocidade de progressão para doença	6
1.3.2. Resposta imune celular e evolução viral	8
1.4. Diversidade Genética do HIV-1	9
1.4.1. Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo	10
1.4.2. Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil	11
1.5. Vacinas anti-HIV e diversidade viral	13
2. Justificativa	17
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. Material e Métodos	19
4.1. Casuística	19
4.2. Reconstrução de Sequências Centrais e desenhos dos peptídeos	19
4.3. Coleta de sangue e obtenção de PBMCs	20
4.4. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	21
4.5. Extração de DNA e amplificação por <i>nested</i> PCR do gene <i>nef</i>	21
4.6. Purificação e quantificação dos produtos de PCR pra sequenciamento	22
4.7. Reação de sequenciamento	23
4.8. Edição, alinhamento e determinação do subtipo viral	23
4.9. ELISpot	24
4.10. Análises estatísticas	25
5. Resultados	26
5.1. Definição das sequências consenso e ancestral e escolha de sequências de isolados virais dos subtipos B e F do HIV-1	26
5.2. Caracterização da população estudada	29

5.3. Determinação do subtipo viral do gene <i>nef</i>	30
5.4. Confirmação de regiões imunodominantes	31
5.5. Análise comparativa da antigenicidade de peptídeos derivados de sequências consenso B e F e de isolados virais destes subtipos	32
5.6. Reatividade cruzada em os subtipos B e F e o grupo M	35
5.7. Identificação dos peptídeos alvos da resposta	40
5.8. Relação entre distância genética e magnitude de resposta	41
5.9. Relação entre magnitude e frequência de resposta e controle da carga viral	43
6. Discussão	46
6.1. Mapeamento das regiões imunodominantes	46
6.2. Comparável frequência e magnitude de resposta frente a peptídeos derivados dos consensos e isolados	47
6.3. Detecção de reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 e o grupo M	48
6.4. Relação entre carga viral e resposta Nef específica	51
7. Conclusões	53
8. Perspectivas	54
9. Referências Bibliográficas	55
10. Anexos	75

1. Introdução

1.1. A pandemia de Aids

A pandemia do HIV é a infecção emergente mais importante das últimas décadas. Embora importantes progressos tenham sido alcançados na prevenção de novas infecções e na diminuição do número anual de mortes relacionadas à Aids, o número de pessoas infectadas com HIV continua crescendo. Em 2008, chegou a uma estimativa de 33.4 milhões (31.1-35.8 milhões) e 2.7 milhões de novas infecções (Figura 1). A pandemia foi responsável por 2 milhões de mortes neste mesmo ano, sendo 280.000 crianças menores de 15 anos (UNAIDS/WHO, 2009). Nesse mesmo ano, das 2.7 milhões de novas infecções estima-se que 170.000 (150.000-200.000) ocorreram na América Latina, com 77.000 mortes relacionadas à Aids, chegando a um número estimado de 2 milhões de pessoas vivendo com HIV nesta região (Figura 1) (UNAIDS/WHO, 2009).



Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças infectados pelo HIV em 2008 (Aids Epidemic Update 2009, UNAIDS/WHO).

1.1.1. A epidemia de Aids no Brasil

No Brasil, desde 1980 até junho de 2009, já foram identificados aproximadamente 545.000 casos da doença e cerca de 217.000 óbitos devido à Aids. Mais da metade dos casos de Aids notificados (60%) estão na região sudeste, seguida pela região sul (19%), nordeste (12%), centro-oeste (6%), e por último a região norte (4%) (Ministério da Saúde, 2009). Nas regiões sudeste e sul observam-se um lento processo de estabilização na taxa de incidência de Aids desde 1998, acompanhado mais recentemente pela região centro-oeste. As regiões Norte e Nordeste mantêm a tendência de crescimento do número de casos. Como resultado dessa dinâmica regional da epidemia, a taxa de incidência de Aids no país mantém-se estabilizada, ainda que em patamares elevados (Ministério da Saúde, 2009). Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento antirretroviral observou-se uma importante queda na taxa de mortalidade e morbidade, a qual desde 1998 apresenta valores próximos a 11.000 óbitos/ano (Boletim Epidemiológico 2007 e 2008; *Briefing* Boletim Epidemiológico, 2009).

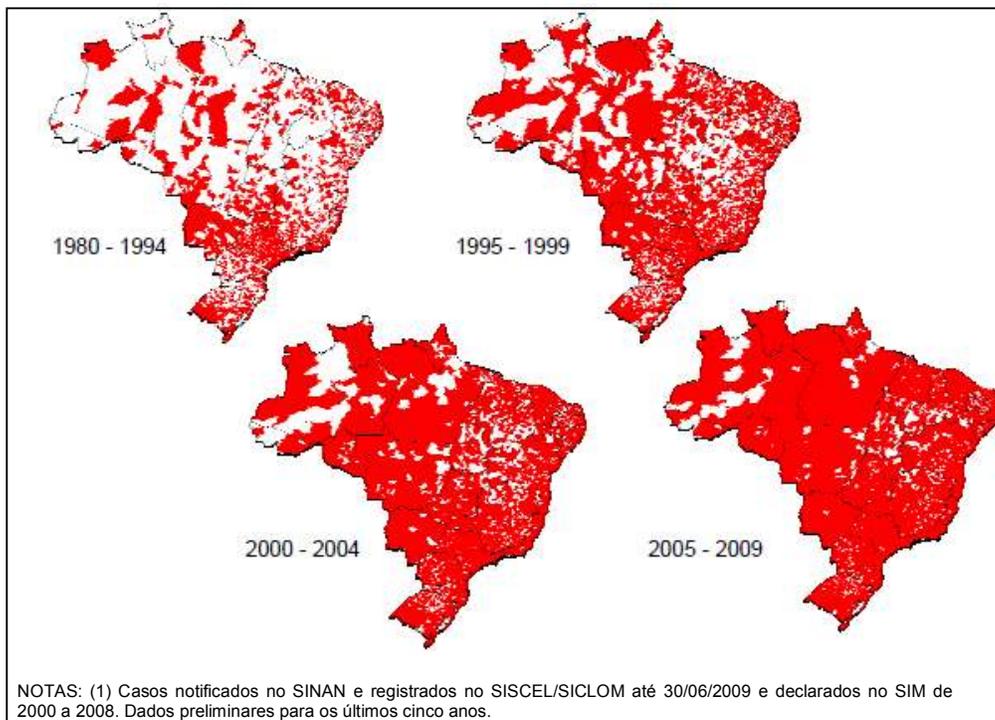


Figura 2: Municípios com pelo menos um caso de Aids por período de diagnóstico. Brasil, 1980 a 2009 (*Briefing* Boletim Epidemiológico, 2009).

No Brasil no início da década de 1980, a epidemia atingiu principalmente em homens que fazem sexo com homens, assim como os usuários de drogas injetáveis e indivíduos que receberam transfusão de sangue e hemoderivados. Já nos últimos anos da década de 1980 e início dos anos 1990, a epidemia assumiu outro perfil, a transmissão heterossexual passou a ser a principal via de transmissão do HIV, a qual vem apresentando maior tendência de crescimento em anos recentes, acompanhada de uma expressiva participação das mulheres na dinâmica da epidemia demonstrada pela queda na razão de sexo (M:F), que em 1986 era de e 15,1:1 para 1,5:1 em 2006. Os últimos anos são marcados também pelo processo de interiorização da epidemia como pode ser observado na Figura 2, sendo que dos 5.564 municípios brasileiros, 87,5% (4.867) registraram, pelo menos, um caso da doença no período de 2005-2009. Demonstrando assim, que apesar da estabilização no número de novos casos/ano a epidemia avança no país apontando para a necessidade de medidas de controle capazes de uma cobertura mais ampla.

1.2. A infecção pelo HIV

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, a qual é caracterizada pela presença da enzima transcriptase reversa, e ao gênero *Lentivirus*, que recebe esse nome devido ao longo período entre a infecção inicial e o desenvolvimento da doença (Haase, 1986). De fato, a média de tempo para o desenvolvimento dos sintomas da doença que definem o quadro de Aids é de aproximadamente 10 anos (Pantaleo, Graziosi e Fauci, 1993). No entanto, nos últimos anos tem se tornado claro que apesar da progressão da doença ocorrer, em geral, de forma lenta, os mecanismos que culminam no desenvolvimento da Aids iniciam-se logo nas primeiras semanas após a infecção (Brenchley, Price e Douek, 2006; Grossman *et al.*, 2006)

A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre pelo contato sexual através da exposição do trato genital ou mucosa retal. Embora os mecanismos utilizados pelo HIV-1 para cruzar a barreira epitelial ainda não estejam totalmente definidos, estudos demonstram que o vírus é capaz de fazer contato direto com células de Langerhans e células T CD4⁺ intraepiteliais (Hladik *et al.*, 2007; Wu e KewalRamani 2006), além disso, a transcitose também é uma via proposta (Stoddard *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que ocorre um aumento do risco de infecção quando a mucosa genital está com sua integridade afetada, seja por trauma mecânico ou infecções genitais

coexistentes (Galvin e Cohen, 2004; Haaland *et al.*, 2009). Após cruzar essa barreira, o vírus alcança a camada subepitelial de células T e células dendríticas (Figura 3), as quais são consideradas alvos iniciais de infecção (revisto por Wu e KewalRamani 2006).

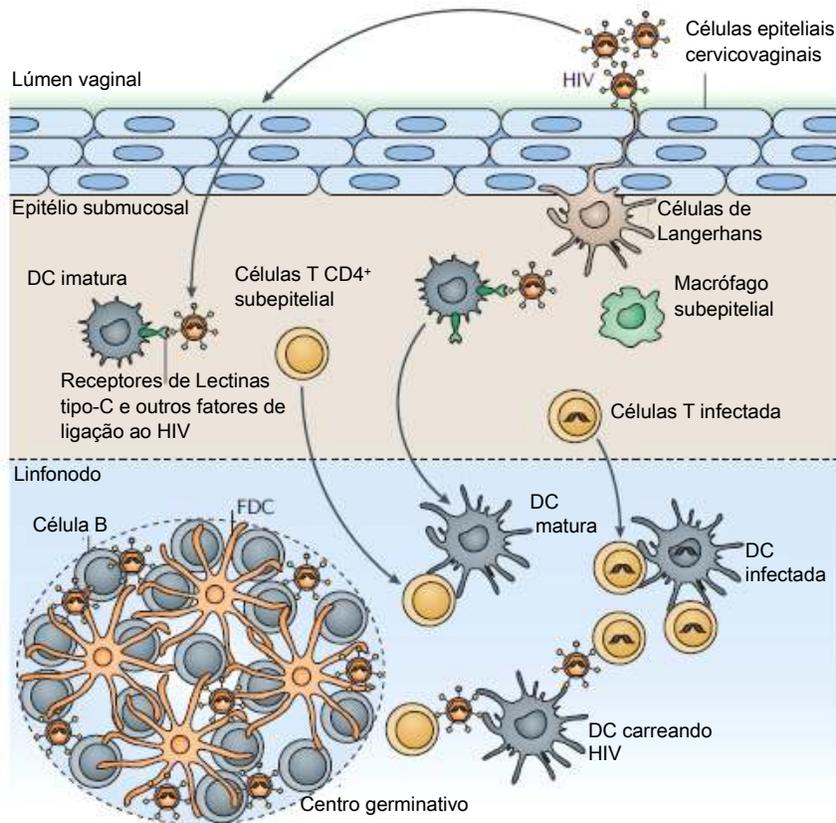


Figura 3: Papel das células dendríticas (DCs) na infecção e disseminação do HIV. As células dendríticas são propostas como as primeiras células alvos a encontrar o vírus na mucosa durante a transmissão sexual. Essas DCs incluem as células de Langerhans (as quais não são migratórias) no tecido epitelial e mucoso DCs mielóides imaturas na camada submucosa. Receptores de lectinas tipo-C e outros receptores para ligação ao HIV são expressos por essas células imaturas que capturam o vírus e migram para o tecido linfóide que é enriquecido em células T CD4⁺. Nesse tecido ocorre a transinfecção de células T CD4⁺ ativadas, facilitando a disseminação do HIV (traduzido de Wu e KewalRamani, 2006).

Seguindo a transmissão do vírus, ocorre um período de aproximadamente 10 dias, conhecido como fase de eclipse, na qual o RNA viral não é detectado no plasma (Fiebig *et al.*, 2003). Ao final dessa fase, o vírus alcança o linfodo drenante, onde encontra células T CD4⁺CCR5⁺ ativadas, que são alvos para infecção adicional. As células dendríticas possuem importante papel na disseminação do HIV (Figura 3), elas

capturam os vírus, migram para o linfonodo e transferem o HIV para células T CD4⁺ por processos conhecidos como *trans*-infecção (sem replicação viral na célula dendrítica) e *cis*-infecção (com replicação viral na célula dendrítica) (revisto por Wu e KewalRamani, 2006). No linfonodo o vírus replica-se rapidamente e atinge outros tecidos linfóides, particularmente, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), onde células de memória TCD4⁺CCR5⁺ ativadas estão presentes em grande número (Poles *et al.*, 2001) e são alvos predominante da depleção de células T CD4⁺ (Brenchley *et al.*, 2004; Mehandru *et al.*, 2004), característica da infecção pelo HIV.

Enquanto o HIV está replicando no GALT e em outros tecidos linfóides, a viremia plasmática aumenta exponencialmente podendo atingir um pico de mais de 20 milhões de cópias de RNA por mililitro de plasma por volta do 14^o-21^o dia de infecção (Piatak *et al.*, 1993). Estima-se que 40-90% dos indivíduos infectados pelo HIV apresentem sintomas nessa fase aguda, sendo que esses ocorrem tipicamente 2-3 semanas após exposição e geralmente inclui febre, fadiga, faringite, perde de peso, transpiração noturna excessiva, linfadenopatia, mialgias, dor de cabeça, náusea e diarreia (Kahn e Walker, 1998; Schacker *et al.*, 1996; Walensky *et al.*, 2001). Após esta fase inicial, a viremia plasmática começa a declinar até alcançar um determinado nível denominado “*set point*” viral que marca o início da fase crônica (assintomática) da infecção.

Como pode ser observado na Figura 4, a redução da carga viral no final da fase aguda coincide com a detecção de uma resposta primária de células T CD8⁺, apontando assim para um papel importante dessas células no controle inicial da replicação viral (Barouch *et al.*, 2000; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994), o que foi reforçado por estudos em primatas não humanos que sofreram depleção de células T CD8⁺ e não foram capazes de controlar a viremia inicial (Jin *et al.*, 1999; Matano *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999).

Além disso, foi observada uma correlação inversa entre o valor de carga viral atingido no *set point* da replicação viral e o padrão de imunodominância da resposta de células T CD8⁺ HIV-específica. Sendo que a preservação desse padrão durante a fase crônica da doença foi significativamente associada com um declínio mais lento da contagem de células T CD4⁺. Demonstrando que a especificidade e persistência de uma resposta inicial de células T CD8⁺ pode ser um indicador para o subsequente controle da infecção (Streeck *et al.*, 2009).

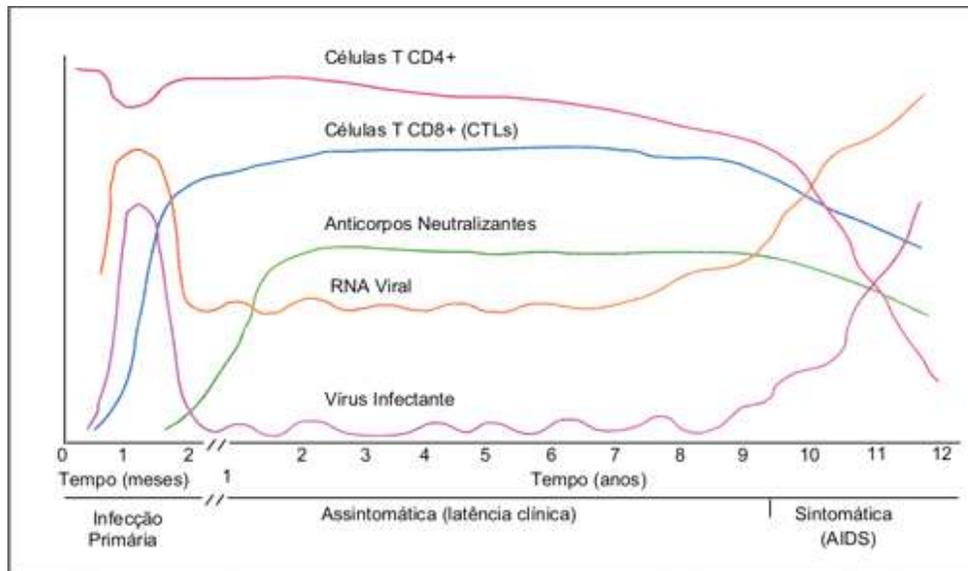


Figura 4: Curso clínico, imunológico e virológico típico da infecção pelo HIV-1 (adaptado de Poignard, Klasse e Sattentau, 1996).

1.3. Resposta imune celular

1.3.1. Resposta imune celular e velocidade de progressão para doença

A grande maioria dos indivíduos infectados (70-80%), os chamados progressores típicos, progredem para doença em um período de 8-10 anos. No entanto, aproximadamente 10% dos indivíduos infectados progredem para Aids em 2 a 3 anos após a infecção aguda, sendo caracterizados como progressores rápidos. Por outro lado, para alguns indivíduos não ocorre a progressão para a doença e os indivíduos permanecem assintomáticos mesmo após 10 a 15 anos de infecção (revisto por Pantaleo e Fauci, 1996).

Indivíduos pertencentes a esse último grupo foram inicialmente denominados Não Progressores de Longo Termo (LTNP) e representam 5-15% dos casos (Cao *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1995; Pantaleo *et al.*, 1995; Sheppard *et al.*, 1993), sendo que essa classificação foi baseada a princípio no tempo de infecção e na contagem de células T CD4⁺. Com o advento dos testes para quantificação da carga viral, foi demonstrado que a maioria dos indivíduos, denominados LTNPs, apresentava uma viremia baixa a moderada. Além disso, alguns desses indivíduos demonstraram aumento da carga viral e declínio na contagem de células CD4⁺ conforme a infecção evoluía (Goudsmit *et al.*, 2002; Lefrère *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1996; Rodés *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo,

tornou-se claro a existência de uma sub-população de indivíduos que eram capazes de manter a carga viral abaixo do limite de detecção (<50 cópias de RNA/ml no plasma). Atualmente esses indivíduos são denominados controladores de elite (EC) ou supressores de elite (ES).

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no controle do vírus diversos estudos têm demonstrado diferenças entre indivíduos capazes de controlar a viremia e aqueles que progridem para a doença. Entre os diferentes fatores que têm sido associados aos ECs e/ou LTNPs, existem fortes evidências de que a resposta de células T CD8⁺ HIV-específicas tenha um papel de grande importância no controle do vírus, ao menos em uma parcela desses indivíduos (revisado por Blankson, 2010; revisado por Deeks e Walker 2007; revisado por O'Connell, Bailey e Blankson, 2009). Além disso, verificou-se que a depleção de células CD8⁺ em macacos que eram capazes de controlar a infecção pelo vírus patogênico SIVmac239 resultou em um aumento entre 100 a 10.000 vezes da viremia (Friedrich *et al.*, 2007).

Células T CD8⁺ de indivíduos EC ou LTNP são qualitativamente diferentes das células daqueles que progridem para a doença. Um perfil polifuncional de células T CD8⁺ efetoras, caracterizado pela produção de diferentes citocinas, como IL-2, TNF- α e IFN- γ , e quimiocinas, como MIP-1 β , em diferentes combinações é mantido em ECs e LTNPs (Betts *et al.*, 2006), mas perdido em progressores (Streeck *et al.*, 2008). Esse perfil polifuncional também foi identificado por Ferre e cols. (2009) em células da mucosa retal em ECs. Uma alta capacidade de resposta proliferativa de células T CD8⁺ HIV-específicas aliada a um aumento da produção de perforina foi vista com maior frequência em ECs (Migueles *et al.*, 2002). Essa alta capacidade de proliferação é necessária para uma eficiente atividade citotóxica mediada por um carregamento e liberação mais eficiente de granzima B demonstrada nesses indivíduos (Migueles *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que células T CD8⁺ de controladores possuem alta capacidade de suprimir a infecção de células T CD4⁺ infectadas *in vitro*, atividade que não foi associada a fatores solúveis, apontando para uma restrição ao MHC, que foi reforçada pela observação da perda da capacidade supressiva quando essas células foram cultivadas com células T CD4⁺ heterólogas (Migueles *et al.*, 2008; Saez-Cirion *et al.*, 2007).

E em diversos estudos têm verificado um enriquecimento da presença de haplótipos HLA-Bw4, como B27 e B57, os quais estão associados com progressão lenta para a doença, em grupos de controladores, reforçando assim, o papel importante de

células T CD8⁺ restritas ao MHC de classe I na evolução para a Aids (Brumme *et al.*, 2008; Flores-Villanueva *et al.*, 2001; Goulder *et al.*, 1996; Kaslow *et al.*, 1996; Migueles *et al.*, 2000).

1.3.2. Resposta imune celular e evolução viral

Recentes trabalhos têm demonstrado que 80% das infecções transmitidas via mucosa, é iniciada por um único vírus, o qual é denominado vírus fundador. A homogeneidade das sequências do vírus fundador até o momento do pico da viremia indica que não ocorre uma seleção neste período dirigida pelo sistema imune, o que levaria ao surgimento de mutantes de escape (Abrahams *et al.*, 2009; Keele *et al.*, 2008; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2009). Porém, seguindo o aumento da resposta de células T CD8⁺, o genoma viral começa a variar significativamente e ocorre uma rápida seleção de mutantes em diferentes pontos do genoma viral conforme a viremia declina (Bernardin *et al.*, 2005; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2009).

Em um estudo detalhado de amostras de quatro pacientes durante os estágios iniciais da infecção foi visto que a maioria desses mutantes era selecionada por células T CD8⁺ que reconheciam epítopos expressos pelo vírus fundador (Goonetilleke *et al.*, 2009). Também foi observado que apenas uma minoria dos mutantes de escape não foi selecionada por essas células e, provavelmente, essas alterações poderiam ser reversões de mutações selecionadas por células T no hospedeiro anterior. Outros mutantes podem ter sido selecionados por anticorpos neutralizantes ou mesmo carreados juntos com as mutações de escape da resposta de células T provendo, assim, evidências adicionais de que essa resposta celular inicial está ligada a causa do declínio da carga viral na infecção aguda (Goonetilleke *et al.*, 2009).

Além disso, estudos apontam que a ocorrência de mutantes de escape da resposta de CTLs é uma das principais forças que dirigem a evolução do HIV, tanto no nível populacional como nos indivíduos (Allen *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2007; Borrow *et al.*, 1997; Brumme *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2008). Essa seleção imune tem grande implicação para o desenho de uma vacina com ampla cobertura mundial, uma vez mutações de escape relacionadas a diferentes tipos de HLA contribuem para a grande diversidade global do vírus.

1.4. Diversidade Genética do HIV-1

A grande variabilidade genética e a rápida evolução do HIV-1 são fatores importantes na pandemia e tem se mostrado como um fator limitante no desenvolvimento de vacinas. Essa diversidade é resultado da alta taxa de mutação do vírus (Preston, Poiesz e Loeb, 1988), rápida replicação viral (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995) e frequentes eventos de recombinação (Robertson, Hahn e Sharp, 1995; Salminen *et al.*, 1995). Devido a essa grande variação genética o HIV-1 é dividido em grupos, subtipos, sub-subtipos e recombinantes inter-subtipos.

Análises filogenéticas de amostras do HIV-1 levaram a classificação em quatro grupos diferentes: M (*Major*); O (*outlier*), N (não-M, não-O) e P (Robertson *et al.*, 2000; Plantier *et al.*, 2009). A maioria das infecções em todo o mundo é do grupo M, com o grupo O, N e P causando uma minoria de infecções na África Central. Dentro do grupo M, nove subtipos são reconhecidos, designados pelas letras A-D, F-H, J e K (Janssens *et al.*, 1994; Kostrikis *et al.*, 1995; Leitner *et al.*, 1995; Louwagie *et al.*, 1995; Louwagie *et al.*, 1993; Myers, MacInnes e Korber, 1992; Triques *et al.*, 2000). Os subtipos A e F são ainda divididos em sub-subtipos: A1-A4 e F1-F2 (Gao *et al.*, 2001; Meloni *et al.*, 2004; Triques *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2006).

Os eventos de recombinação entre os diferentes subtipos levam a geração de formas recombinantes que são classificadas como Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) ou Formas Recombinantes Únicas (URF). Na figura 5 observa-se o esquema representativo de um CRF, o qual foi descrito na região sudeste do Brasil por nosso grupo (Guimarães *et al.*, 2008). A descrição de um novo CFR, ou um novo subtipo ou sub-subtipo, exige que sejam sequenciados ao menos três genomas completos de vírus obtidos de indivíduos distintos, não relacionados epidemiologicamente. No caso de um novo CRF essas três sequências devem possuir o mesmo padrão de recombinação (Robertson *et al.*, 2000). Até o momento já foram descritas 45 CRFs (HIV Sequence Database, 2010).

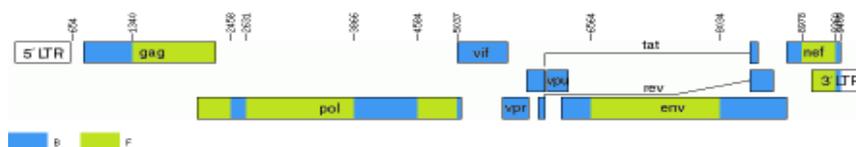


Figura 5: Esquema representativo de um CRF. CRF40_BF descrito por Guimarães e cols. (2008).

1.4.1. Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo

A distribuição e proporção global dos subtipos em 2004 são demonstradas na Figura 6. O subtipo C foi encontrado em metade das infecções em todo o mundo. O subtipo A, B, D e G foi detectado em 12, 10, 3 e 6% das infecções respectivamente. Os subtipos F, H, J e K juntos causaram menos de 1% das infecções. Os dois principais CRFs (CRF01_AE e CRF02_AG) foram encontrados em 5% das infecções cada um, enquanto o CRF03_AB apresentou-se em apenas 0,1% dos casos. Outros recombinantes somaram 8% das infecções (Hemelaar *et al.*, 2006).

Na África subsaariana, onde se encontra a maior proporção de casos (64%), mais da metade das infecções é causada pelo subtipo C, seguido pelo subtipo A (14%), G (10%) e CRF02_AG (7%), além de outros recombinantes (9%). No entanto é importante ressaltar que existe uma marcada diferença nessa distribuição entre as cinco regiões que compõem a África subsaariana.

Na Índia, onde estão 13% das infecções, o subtipo C é dominante atingindo aproximadamente 97% dos casos. No leste asiático a distribuição dos subtipos é muito semelhante a encontrada na China, onde o subtipo B é detectado em 38% das infecções, seguido pelo CRF01_AE (15%), sendo que no Japão o subtipo B é dominante, representando 81% das infecções. Na Oceania, região do Caribe, Europa Ocidental e América do Norte o subtipo B é encontrado na grande maioria dos casos, 88%, 94%, 88% e 98%, respectivamente. No leste europeu e Ásia central 79% das infecções são do subtipo A seguido por 15% do subtipo B. Na América Latina, onde se encontra 4% do número de casos, o subtipo B é encontrado em 74% dos casos, sendo que os subtipos C (13%), F1 (4%) e outras formas recombinantes (8%, principalmente a CRF12_BF e outras recombinantes B/F) têm um importante papel na epidemia da região (Hemelaar *et al.*, 2006).

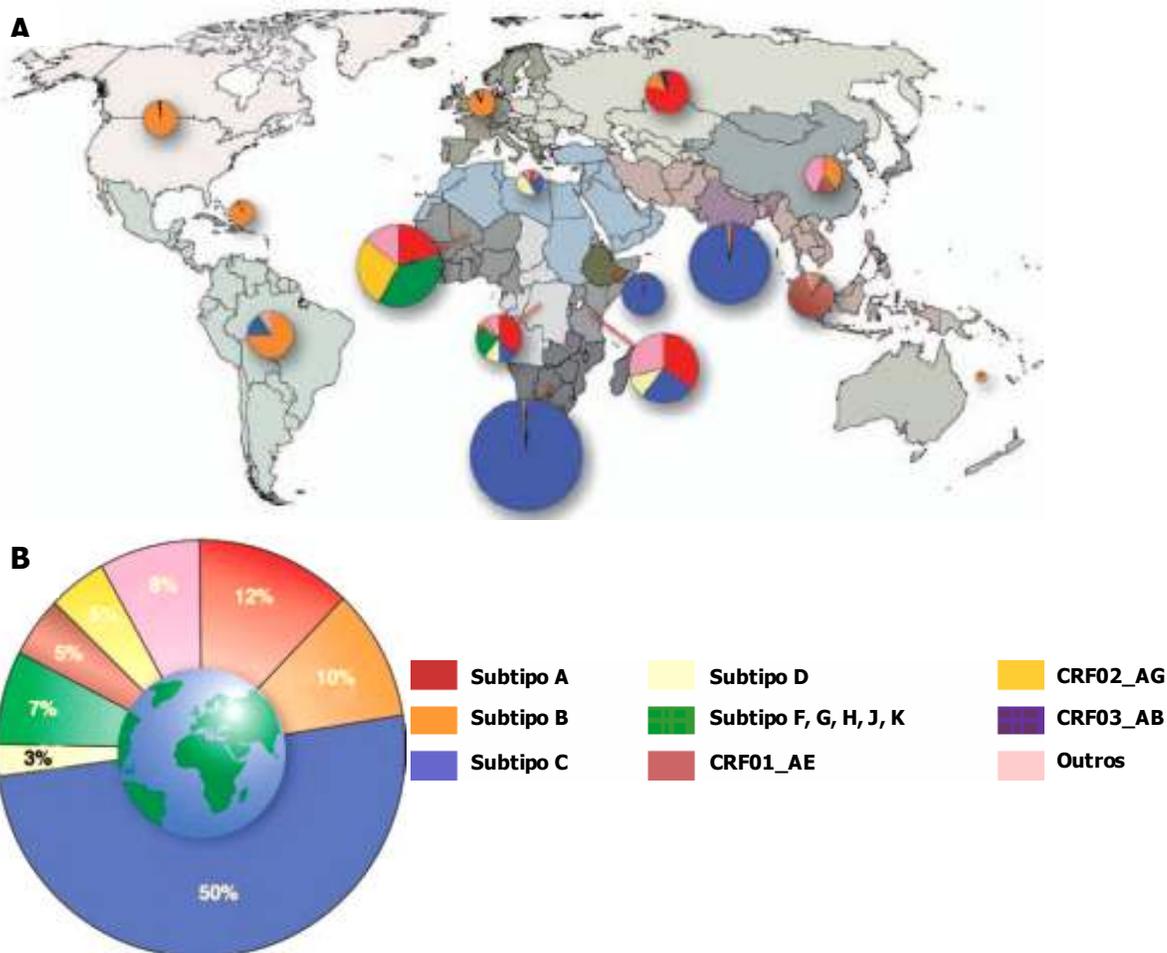


Figura 6: Distribuição regional dos subtipos e Formas Recombinantes Circulantes do HIV-1 em 2004. Em **A** o mundo foi subdividido em regiões, consistindo em grupo de países, que são representadas por cores diferentes, países pertencentes à mesma região apresentam a mesma cor. Os gráficos em formato de pizza representam a distribuição dos subtipos e formas recombinantes em cada região. A superfície relativa de cada gráfico corresponde ao número relativo de indivíduos vivendo com HIV em cada região. Em **B** o número de infecções causadas pelos subtipos e recombinantes do HIV-1 é representado como uma proporção do número total de indivíduos vivendo com HIV-1 (adaptado de Hemelaar *et al.*, 2006).

1.4.2. Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil

A epidemia de Aids no Brasil apresenta-se de forma complexa (Figura 7), sendo causada primariamente pelo subtipo B, seguido pelos subtipos F1 e C, em adição a recombinantes B/F1 e B/C (revisto por Morgado, Guimarães e Galvão-Castro, 2002). No entanto algumas regiões apresentam um padrão distinto na proporção desses subtipos. Na região sudeste, a qual apresenta a maior incidência de casos de Aids do país, o subtipo B aparece como dominante, seguido pelo subtipo F1, recombinantes

B/F1 e uma proporção bem menor do subtipo C (Cabral *et al.*, 2006; Morgado *et al.*, 1994; Pires *et al.*, 2004; Sabino *et al.*, 1994; Tanuri *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2004; Turchi *et al.*, 2002). Entre os recombinantes B/F1, quatro CRFs já foram descritos no sudeste brasileiro, CRF28_BF e CRF29_BF em São Paulo (De Sa *et al.*, 2006), e CRF39_BF e CRF40_BF no Rio de Janeiro (Guimarães *et al.*, 2008). Nessa região também já foram identificados casos isolados do subtipo D, bem como recombinantes B/D, CRF02_AG e o subtipo A (Cabral *et al.*, 2006; Caride *et al.*, 2000; Eyer-Silva e Morgado 2007; Morgado *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2004; Tanuri *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2004; Turchi *et al.*, 2002; Varella *et al.*, 2008).

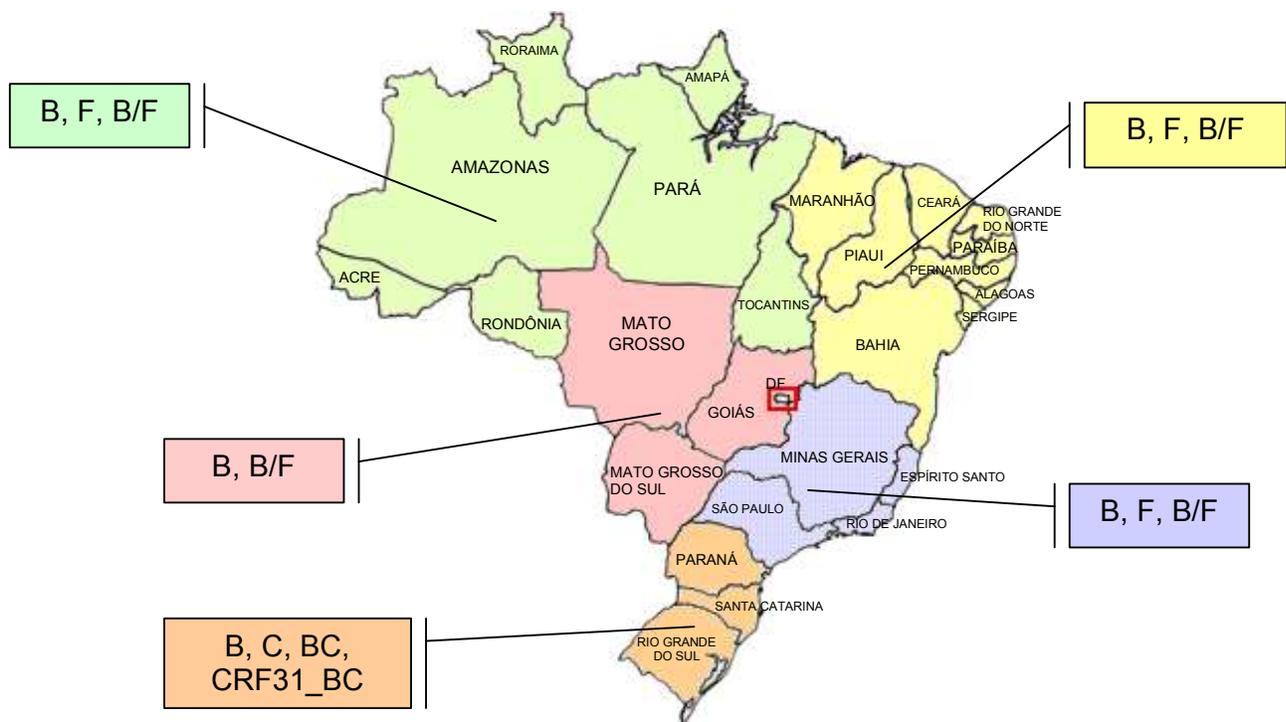


Figura 7: Distribuição dos subtipos de HIV-1 por região no Brasil.

Na região sul o subtipo C aparece com uma alta representatividade (30%), apresentando-se como subtipo dominante no Rio Grande do Sul (44,8% dos casos contra 29,92% do subtipo B) (Brindeiro *et al.*, 2003). Essa alta prevalência do subtipo C demonstra uma redução conforme se avança para o norte, chegando a 24% no Paraná e 3% no estado de São Paulo (Brindeiro *et al.*, 2003). Na região sul foi descrito um novo CRF em 2006, denominado CRF31_BC (Santos *et al.*, 2006), o qual é encontrado em aproximadamente 10% das infecções no Rio Grande do Sul (Santos *et al.*, 2007).

Na região Nordeste o subtipo B, também, aparece como prevalente (82,4%) seguido pelo subtipo F1 (11,8%) e recombinantes B/D e B/F1 (4,6%), sendo o subtipo C presente em apenas 1% dos casos, foi também observada uma proporção de casos do subtipo F1 significativamente maior no estado de Pernambuco (21,9%) comparado com o Ceará (5,6%), demonstrando um padrão heterogêneo na proporção dos subtipos entre diferentes locais da mesma região (Cavalcanti *et al.*, 2007).

Na região norte do país, em um estudo realizado na cidade de Manaus (Vicente *et al.*, 2000), foi encontrada uma porcentagem de casos similares dos subtipos B e F1, 51,6% e 48,4% respectivamente. Em 2009, um novo trabalho conduzido na região norte (Machado *et al.*, 2009), encontrou em Belém a seguinte distribuição de subtipos: B (88,3%), F1 (8,3%), uma amostra do subtipo D e uma do subtipo C (1,7% cada), além disso, foi identificado pela primeira vez o CRF02_AG na região. Em Macapá o subtipo B foi representado em 97,1% das amostras e o F1 em 2,9%. Na região centro-oeste o subtipo B é encontrado em aproximadamente 70-95% dos casos, seguido por recombinantes B/F1 (4,9-12%), os subtipos C e D também já foram encontrados na região (Stefani *et al.*, 2007; Veras *et al.*, 2007).

1.5. Vacinas anti-HIV e diversidade viral

Embora se tenha atingido um nível de conhecimento sobre o HIV nunca alcançado para qualquer outro patógeno, novos casos continuam ocorrendo. A terapia antirretroviral é efetiva, mas não elimina a infecção, além disso, o acesso à terapia contra o HIV ainda é um grande problema na maioria dos países em desenvolvimento e o surgimento de resistência aliado aos efeitos colaterais da terapia de longo termo põe-se como grandes desafios (Appay, 2009). Desta forma, para um controle eficaz da pandemia o desenvolvimento de uma vacina é extremamente necessário, porém diferentes fatores atuam como obstáculos para a obtenção de uma vacina efetiva e com ampla ação.

Diferentes estratégias têm sido utilizadas no desenho de vacinas anti-HIV (revisto por Nabel, 2002), como: vírus atenuados (Daniel *et al.*, 1992) proteínas recombinantes (Cohen, 2003; Flynn *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006), vacinas usando vetores de DNA (Barouch *et al.*, 2000; Boyer *et al.*, 1997; Chakrabarti *et al.*, 2002; MacGregor *et al.*, 1998), construções com vetores virais (Bonaldo *et al.*, 2010; Cox, Tartaglia e Paoletti, 1993; Ferrari *et al.*, 1997; Shiver *et al.*, 2002; Tartaglia *et al.*,

1992). A tabela 1 apresenta vacinas em testes clínicos em 2008 segundo dados da *International Aids Vaccine Interprise* (IAVI), sendo possível observar essa amplitude de estratégias usadas na busca de uma vacina anti-Aids. Além disso, outro fator que chama atenção nessa tabela é a inclusão de diferentes subtipos virais em composições vacinais e a combinação de diferentes abordagens utilizadas nos esquemas de imunizações, como uma primeira dose com vacina baseada em vetores de DNA e reforço com vacina baseada em vetores virais ou proteínas recombinantes.

Um fato que é observado na busca de uma vacina anti-HIV é o grande foco dado ao uso de estratégias voltadas para estimular uma imunidade celular, uma vez que diferentes estudos apontam para a importância de células T CD8⁺ na resposta anti-HIV (revisto por Korber, Letvin e Haynes, 2009). Embora vacinas que estimulam uma resposta de células T provavelmente não irão proteger contra a infecção, espera-se que elas sejam capazes de aumentar o tempo de progressão para a doença (Appay, 2009) e ter um impacto positivo na redução da transmissão, o que é apoiado por estudos que demonstraram que indivíduos com baixa carga viral não transmitiram o vírus para seus parceiros (Quinn *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001) e um estudo com mais de 550 pares de mãe-criança, que encontrou um risco de 0% de transmissão vertical quando a carga viral materna estava abaixo de 1.000 cópias (Garcia *et al.*, 1999).

Embora avanços tenham sido feitos no campo de desenhos de vetores virais (Duerr, Wasserheit e Corey, 2006; Hanke, McMichael e Dorrell, 2007) e em estudos com diferentes esquemas de imunização, uma questão ainda permanece como foco fundamental na busca de uma vacina anti-HIV: Como produzir uma resposta protetora contra múltiplas variantes do HIV? A diversidade do HIV-1 é considerada o maior desafio, a variação genética dentro de um subtipo pode ser na ordem de 15–20%, enquanto a variação entre subtipos é aproximadamente 25–35%, dependendo da região genômica analisada (Korber *et al.*, 2001), desta forma, a inclusão de antígenos virais referentes a subtipos predominantes em determinadas regiões geográficas pode ter um impacto positivo na formulação de vacinas anti-Aids. Essa estratégia foi utilizada em um recente teste clínico de fase III na Tailândia, onde o CRF01_AE é prevalente seguido pelo subtipo B (Watanaveeradej *et al.*, 2006). Neste estudo foi administrada ALVAC-HIV (vCP1521) (canaripox expressando gp120 referente ao subtipo E e Gag e Protease referentes ao subtipo B) seguido por um reforço com AIDSVAX B/E (gp120 referente ao subtipo B e ao subtipo E) (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Tabela 1: Vacinas em fase de testes clínicos (Adaptado de IAVI, 2008).

Vacinas em testes clínicos	
<i>Prime</i> com proteína + reforço com vetor viral	Fase III
Canaripox subtipo B, E, <i>prime</i> com gp120	US Department of Defense, Ministry of Public Health Thailand, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Thai Aids Vaccine Evaluation Group, sanofi pasteur, VaxGen (Finalizado em setembro de 2009)
Vetores de DNA +/- reforço com vetor viral	Fase I/II
Subtipo B'C + Eletroporação	International Aids Vaccine Initiative, Ichor, Aaron Diamond Aids Research Center
DNA poliepitopos, reforço com MVA	Epimmune Pharmexa, Bavarian Nordic
Subtipo B, reforço com MVA	GeoVax, US Military HIV Research Program
Multisubtipo A, B, C, reforço com Ad-5	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
Multisubtipo A, B, C, reforço com MVA	Karolinska Institute
Subtipo B'C, reforço com MVA	Johns Hopkins University, Guangxi, Changchun Baike
Subtipo C, reforço com NYVAC	EuroVacc, Agence national de recherches sur le sida et le hépatites virales
Subtipo B + IL-12, IL-15, reforço com peptídeos	Wyeth
DNA Subtipo C, reforço com MVA	South African Aids Vaccine Initiative
DNA Subtipo A, E, reforço com FPV	The HIV Netherlands Australia Thailand Research Collaboration
Pennvax-B	University of Pennsylvania, VGX Pharmaceuticals
Vetores virais	Fase I/II
Adenovírus	
Ad-6 subtipo B	Merck
Ad-35 Subtipo A, +/- Ad-5 (<i>prime</i> ou reforço)	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Vaccine Research Center
Ad-26 Subtipo A	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Harvard University
Poxvírus	
ALVAC-HIV	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Sanofi Pasteur
MVA Subtipo A, E	Walter Reed Army Institute of Research
MVA multiantígenos	Bavarian Nordic
MVA Subtipo C	International Aids Vaccine Initiative
Vaccinia multisubtipo (DNA e coquetel de proteínas)	St. Jude Children's Research Hospital
Proteínas	Fase I/II
Gp140 Subtipo C (mucosa)	St. George's, University of London
Porção C-terminal da p17, p24, fragmento de gp41 com adjuvante polioxidonio	Institute of Immunology, Moscow
Adjuvanted Gag, Pol and Nef	GlaxoSmithKline

Diante da grande variabilidade do HIV, diversas estratégias têm surgido a fim de diminuir o impacto da enorme diversidade viral na formulação de uma vacina que seja

eficaz contra diferentes variantes do vírus. Um meio efetivo de diminuir a distância genética entre a sequência utilizada na vacina e as dos vírus circulantes é pela obtenção de sequências artificiais que são “centrais” a esses vírus (Gaschen *et al.*, 2002). A abordagem mais simples é a obtenção de uma sequência consenso, a qual apresenta, em cada posição de um alinhamento, o nucleotídeo mais frequente (Eigen, Winkler-Oswatitsch e Dress, 1988). Além do consenso, duas outras estratégias têm sido utilizadas para obtenção de sequências “centrais”: ancestral (MRCA- *Most Recent Common Ancestor*), que representa o ancestral recente mais comum, definido por um nó na base de um grupo em uma árvore filogenética, e centro da árvore (COT), que é o ponto da menor média da distância genética para outras sequências na árvore (Gaschen *et al.*, 2002; Nickle *et al.*, 2003).

Uma vez que essas sequências “centrais” são artificiais, ou seja, não correspondem a um vírus existente, são necessários estudos que caracterizem melhor sua expressão e funções biológicas, bem como seu potencial antigênico e imunogênico. Em um estudo de Gao e cols. (2005), no qual o gene *env* (denominado no estudo de gene CON6) foi sintetizado com base no consenso do grupo M e utilizado para a construção de plasmídeos, que foram inseridos em vírus vaccinia recombinante, demonstrou-se expressão das proteínas CON6, que foram biologicamente funcionais e imunogênicas, sendo capazes de estimular resposta contra cepas selvagens do HIV-1 em camundongos (Gao *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que uma construção com o gene *env*, baseada no consenso e ancestral do subtipo C foi capaz de expressar glicoproteínas de envelope funcionais, as quais foram imunogênicas em modelos animais e estimularam resposta humoral e celular com comparável magnitude e amplitude (Kothe *et al.*, 2006). Outros estudos, feitos para melhor definição do potencial dessas sequências no desenho de vacinas, têm demonstrado que essas sequências são reconhecidas por células T e anticorpos do soro de pacientes infectados com diferentes subtipos virais e também confirmam a capacidade de induzir resposta imune específica em modelos animais (Bansal *et al.*, 2006; Frahm *et al.*, 2008; Krohn *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2007). Além disso, a expressão de diferentes proteínas originadas de sequências centrais tem sido avaliada (Doria-Rose *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2007), confirmando a utilidade do uso destas sequências como componentes de vacinas anti-HIV/Aids. Apesar desses resultados, ainda não é claro se essas sequências podem oferecer uma vantagem em termos de cobertura de epítomos imunogênicos em diferentes populações de indivíduos infectados com diferentes subtipos do HIV-1.

2. Justificativa

Diversas abordagens têm sido utilizadas na busca de uma vacina eficaz que previna a infecção pelo HIV-1 e/ou a progressão para a Aids. Apesar destes esforços, até hoje nenhuma das vacinas testadas tem mostrado resultados promissores. Além da ausência de correlatos de imunidade bem definidos, a questão da diversidade do HIV-1 é ainda um ponto central tanto para o desenvolvimento de vacinas, como de reagentes que visem avaliar a resposta imune ao HIV-1. Desta forma, diferentes estratégias têm sido empregadas para obtenção de antígenos que sejam capazes de diminuir o impacto da diversidade viral na formulação de uma vacina, entre elas, o uso de sequências centrais, como consenso e ancestral, tem sido amplamente discutido.

Considerando que o subtipo B é o mais prevalente no Brasil, seguido pelo subtipo F1 e recombinantes B/F1, torna-se relevante a utilização de bancos de dados de sequências correspondentes a esses subtipos para o desenho de peptídeos relativos a regiões imunodominantes de interesse. Neste contexto, a utilização de ferramentas de bioinformática permite determinar diferentes tipos de peptídeos com base nas sequências consenso e sequências derivadas a partir de isolados virais com reduzida distância genética em relação a um conjunto de sequências brasileiras. A partir desta abordagem, é possível analisar a capacidade de resposta imune celular de indivíduos infectados pelo HIV frente a peptídeos derivados a partir destes dois tipos de sequências, no sentido de avaliar o quanto a distância genética/antigênica frente ao imunógeno impacta na reatividade imunológica.

A proteína Nef é considerada como principal fator de patogenicidade da infecção pelo HIV, além disso, é altamente imunogênica, junto com Gag, Nef concentra a maior densidade de epítomos de células T CD8⁺ e é o principal alvo da resposta inicial ao HIV, a qual está ligada a um declínio da carga viral durante a fase aguda. Além disso, essa proteína tem feito parte de compostos vacinais em testes, como nos estudos STEP, IAVI P002 e HVTN 505 (Trial Database- IAVI), justificando sua seleção para este estudo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o uso potencial de sequências consenso comparadas a sequências de isolados virais mais próximos, na definição de antígenos vacinais. Bem como determinar o impacto do polimorfismo viral na resposta imune de indivíduos infectados pelo HIV-1.

3.2. Objetivos específicos

- Obtenção de sequências consenso e MRCA e escolha de sequências isolados virais com menor distância genética para o desenho de peptídeos dos subtipos B e F1;
- Confirmar o potencial antigênico da proteína Nef;
- Verificar se peptídeos desenhados a partir de sequências consenso dos subtipos B e F1 oferecem alguma vantagem em termos de antigenicidade quando comparados aos desenhados a partir de sequências de isolados de HIV-1;
- Verificar se existe resposta cruzada frente a peptídeos derivados dos consensos dos subtipos B e F1 e do grupo M;
- Avaliar se existe uma correlação entre distância genética da sequência viral obtida a partir dos indivíduos testados e aquelas utilizadas para o desenho dos peptídeos e a magnitude de resposta frente aos consensos e isolados de ambos os subtipos.
- Verificar se existe um padrão de resposta diferencial a esses peptídeos nos grupos de pacientes analisados com diferente grau de controle da carga viral.

4. Material e Métodos

4.1. Casuística

Foram recrutados 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, no período de novembro de 2008 a janeiro de 2010, segundo os critérios de seleção descritos abaixo:

- (1) Controladores da carga viral: indivíduos infectados pelo HIV-1 que são capazes de manter a carga viral abaixo de 10.000 cópias/mL e contagem de linfócitos T CD4⁺ acima de 500 células/ μ L, na ausência de terapia antirretroviral e com mais de três anos de infecção;
- (2) Soroconversores recentes: indivíduos infectados pelo HIV-1 com menos de 18 meses de infecção documentada sem terapia antirretroviral;
- (3) Subtipagem da polimerase F1: indivíduos infectados pelo HIV-1 com a subtipagem da região da polimerase como F1 podendo ou não estar em tratamento

Os indivíduos foram provenientes do Hospital Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) recrutados no âmbito do projeto “Análise do impacto do polimorfismo de regiões imunodominantes do HIV-1 na resposta imune celular e na inibição da neutralização viral em pacientes infectados com subtipos prevalentes no Brasil”. Esse projeto passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, CEP FIOCRUZ sob o parecer número 219/03. Todos voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2. Reconstrução de Sequências Centrais e desenhos dos peptídeos

No sentido de minimizar a distância genética entre o imunógeno e os vírus circulantes, os peptídeos sintéticos foram desenhados a partir de sequências centrais: consenso e ancestral comum mais recente (MRCA).

Para construção das sequências consensos e MRCA dos subtipos B e F1 brasileiros foram obtidas 89 sequências (51 do subtipo B e 38 do subtipo F1), correspondente a um fragmento de aproximadamente 480pb na região do gene *nef*, no banco de dados do laboratório de Aids e Imunologia Molecular e na base de dados de Los Alamos (HIV Sequence Database, 2009) referentes a amostras isoladas da epidemia brasileira no período de 1989 a 2007.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) e após o alinhamento os consensos foram obtidos através do programa Dambe v.5.0.10 (Xia e Xie, 2001). A partir das mesmas sequências foi reconstruído, também, o MRCA de cada subtipo utilizando o método filogenético de Máxima Verossimilhança como se descreve em Bello e cols. (2004). Como grupo externo foi utilizado a sequência consenso previamente derivada.

Para escolha das sequências de isolados virais calculou-se a média da distância genética de cada sequência em relação ao conjunto de sequências usando o modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) como implementado no programa MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007). Foram selecionadas as sequências dos isolados virais que apresentavam a menor distância genética em relação ao conjunto de sequências analisadas de cada subtipo.

Na base de dados de Los Alamos também foi obtido o consenso M, correspondente ao consenso de todos os subtipos do grupo M do HIV-1. As sequências consenso previamente reconstruídas, o consenso M e as sequências dos isolados virais com menor distância genética em relação aos conjuntos de sequências utilizados serviram de base para o desenho dos peptídeos.

Os peptídeos foram sintetizados pela NeoMPS (PolyPeptide Laboratories group - San Diego, CA, EUA). Eles possuem 15-16 aminoácidos sobrepostos por 11 aminoácidos referentes à posição 9001-9276 do HXB2, cobrindo fragmentos imunogênicos da proteína Nef. Os peptídeos foram agrupados em quatro *pools* para avaliação inicial da resposta imune celular dos indivíduos, sendo o primeiro *pool* cobrindo a região 9001 a 9081 (região 1), o segundo 9049 a 9141 (região 2), o terceiro 9109 a 9237 (região 3) e o quarto 9205 a 9276 (região 4).

4.3. Coleta de sangue e obtenção de PBMCs

No momento de admissão ao protocolo de estudo foram coletados cerca de 40-60 mL de sangue periférico de cada indivíduo. Foram feitas alíquotas de sangue total para a extração de DNA. O sangue foi centrifugado a 450g por 10 minutos a 25°C e foram feitas alíquotas de plasma. A quantificação de células T CD4⁺ (CD3/CD8/CD45/CD4, BD MultitestTM, BD Biosciences, EUA) e a determinação da carga viral plasmática (VERSANT HIV RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens Healthcare, EUA) foram realizados como parte dos exames laboratoriais de rotina dos pacientes

soropositivos para o HIV. O volume restante de sangue foi utilizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), conforme protocolo abaixo.

4.4. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

O sangue foi diluído na proporção de 1:1 em PBS1X (sem CaCl₂ e MgCl₂; pH 7.4; Invitrogen, EUA). As CMSPs foram obtidas por centrifugação do sangue diluído sobreposto em Ficoll-Hypaque (d=1.077) (Sigma, Alemanha), obedecendo a proporção de 2:1, a 450g por 30 minutos a 25°C. O anel formado contendo as CMSP foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur, foi adicionado PBS1X e as células foram centrifugadas a 450g por 10 minutos a 25°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em PBS1X (4°C) e foi realizada contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de trypan (Sigma, EUA), em microscópio óptico (Nikon, EUA) com o aumento de 200x. As células foram centrifugadas a 450g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em solução de criopreservação [90% SFB (Invitrogen, EUA) e 10% DMSO (Sigma, EUA)] e então colocadas no recipiente Mr Frosty (Nalgene, Rochester, NY, EUA) e transferidas para o freezer -70°C, onde ficaram ~12 horas. Após foram estocadas em botijão contendo nitrogênio (N₂) líquido (Thermolyne, Locator 4, Cryobiological Satorage System, CA, EUA).

4.5. Extração de DNA e amplificação por *nested* PCR do gene *nef*

A extração de DNA do sangue total ou CMSP foi realizada por método cromatográfico, utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), conforme indicação do fabricante.

Para a análise molecular das amostras de HIV-1 obtidas dos indivíduos incluídos no estudo foi utilizada a técnica de *nested* PCR para amplificar um fragmento de aproximadamente 700 pb, cobrindo a região do gene *nef*.

Como iniciadores externos foram utilizados NEF1 e LTR3 ou NEF1 (Artenstein *et al.*, 1996) e SCDOAD (Sierra *et al.*, 2005) e como iniciadores internos NEF 3 e NEF4 ou NEF3 (Artenstein *et al.*, 1996) e SCDNAD (Sierra *et al.*, 2005).

Os reagentes utilizados na primeira reação de PCR foram: 5µL do tampão 10x da enzima [Tris-HCl pH 9,0; NaCl 50mM; MgCl₂ 5mM]; 5µL de MgCl₂ 25mM (Sigma, EUA); 0,6µL de dNTPs 25mM (Invitrogen, EUA); 0,5µL de cada iniciador (senso e

anti-senso) a 25pmol; 33,2µL de água (DNase/RNase free Distilled Water- Gibco BRL, EUA). A essa solução foram adicionados 0,25µL da enzima Gotaq DNA Polymerase a 5U/µL (Promega, EUA) e 5µL de DNA de cada amostra. Para a segunda reação foram transferidos 5µL do produto da primeira reação, totalizando um volume de 50µL. A concentração dos reagentes foi igual à da primeira reação. As reações foram feitas em termociclador modelo GeneAmp 9700 (Applied biosystems, EUA).

As condições de PCR utilizadas nas 2 etapas foram: 3 ciclos de 97°C por 1 min, 55°C 1min, 72°C por 2 min seguindo-se de 32 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 1 min, 72° por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para verificar se houve amplificação do fragmento de 435pb, foram aplicados 5µL do produto da segunda reação adicionado de 1µL do corante azul de bromofenol [azul de bromofenol 28%, EDTA 10mM pH8,0 e sacarose 40%] em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,001%. As amostradas foram submetidas à eletroforese (80 Volts por 1 hora e 30 minutos) utilizando TBE1x [Tris-HCl 1M, Ácido bórico 1M e EDTA 20mM] como tampão de corrida. O padrão de peso molecular usado foi o fago ΦX174 digerido com a enzima de restrição HAE III. Todas as reações foram monitoradas com uso de controles positivos e negativos.

4.6. Purificação e quantificação dos produtos de PCR para sequenciamento

A obtenção dos produtos de PCR purificados para o uso nas reações de sequenciamento ocorreu por método cromatográfico, através de colunas de purificação, utilizando-se o Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Inglaterra) seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação dos produtos purificados foi realizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 0,01%. Foram aplicados no gel 2µl do produto purificado adicionado de 1µl do corante Azul de Bromofenol. As amostras foram submetidas à eletroforese (80 Volts por duas horas) utilizando TBE1X como tampão de corrida. Como padrão de peso molecular, utilizamos 2µl do Low DNA Mass Ladder (Gibco BRL, EUA). Este padrão apresenta bandas de 100, 200, 800, 1200 e 2000bp que correspondem a 5, 10, 20, 40, 60 e 100ng de DNA, respectivamente. A intensidade das bandas correspondentes às amostras foi comparada com as bandas do padrão, a fim de estimar a quantidade, em ng, do produto purificado e o volume do mesmo a ser utilizado na reação de sequenciamento.

4.7. Reação de sequenciamento

Os fragmentos amplificados foram sequenciados nos 2 sentidos utilizando-se os iniciadores NEF3, LTR1 e NEF4 (Artenstein *et al.*, 1996). Para esta reação foram utilizados 1µl do Big Dye v.3.1 (Ready Reaction Mix), 3µl do tampão de diluição 5X (BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer), 1µl do oligonucleotídeo iniciador a 5pmol/µl e a essa solução foram adicionados 60 a 100ng do produto da segunda reação de PCR purificado. Água extra pura foi adicionada à reação para completar um volume final de 10µl.

A ciclagem utilizada para a reação de sequenciamento foi: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a reação, a precipitação dos produtos foi realizada na placa de sequenciamento. A cada poço foram adicionados 80µL de isopropanol 70%. A placa foi incubada ao abrigo da luz por 15 min e então centrifugada com rotor adaptado para placas (Centrifuge 5804-R, Eppendorf, Alemanha) a 2255g por 45 min a 21°C. Após a centrifugação o Isopropanol foi removido vertendo-se a placa e o excesso foi retirado através de centrifugação da placa invertida a 115g por 1 minuto. A placa foi completamente seca em termociclador a 95°C por 5 min e mantida ao abrigo da luz.

As amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA), aquecidas em termociclador por 5 min a 95°C, e então colocadas imediatamente no gelo. O sequenciador DNA Sequencer modelo 3100 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para o sequenciamento automático das amostras. O protocolo utilizado para o sequenciamento seguiu a recomendação do fabricante para a versão 3.1 do Kit Big Dye Terminator.

4.8. Edição, alinhamento e determinação do subtipo viral

A edição das seqüências foi feita no pacote de programas DNASTAR versão 4.0 (DNASTAR Inc, EUA), utilizando o *software* SeqMan 4.00.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos foi realizado utilizando o programa Clustal \mathcal{W} . As seqüências editadas foram alinhadas juntamente com seqüências de referência correspondentes aos diferentes subtipos do HIV-1 obtidas na base de dados de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>) para determinação do subtipo viral.

A determinação do subtipo viral foi realizada com o uso do programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando os arquivos correspondentes aos alinhamentos. Para esta análise sítios contendo *gaps* nas sequências alinhadas foram removidos. A sequência CPZUS (número de acesso Los Alamos: AF103818) foi utilizada como grupo externo. Utilizou-se o método de distância de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*) (Saitou e Nei, 1987), com correção de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). O método de *bootstrap* (500 réplicas) foi utilizado para dar suporte aos grupamentos.

4.9. ELISpot

Placas de filtração de 96 poços (Milipore, Bedford, MA) foram cobertas com 100µL de anticorpos monoclonais de captura anti-IFN-γ (Diaclone, France) e incubadas a 4° C durante 18 horas. As placas foram lavadas três vezes com PBS1X (sem CaCl₂ e MgCl₂; pH 7.4; Invitrogen, EUA) e bloqueadas durante meia hora em estufa a 37°C com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) [suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA), antimicótico-antibiótico (Invitrogen, EUA), L-glutamina 200mM (Invitrogen, EUA), aminoácidos não-essenciais 100X (Invitrogen, EUA), e piruvato de sódio 100mM (Invitrogen, EUA)] (esse meio foi denominado “meio completo”). Após os *pools* de peptídeos foram adicionados aos poços na concentração de 4µg/mL. Como controle positivo foi usado a fitohemaglutinina 5µg/mL (PHA) (*Lectin from Phaseolus vulgaris (red Kidney bean) Phytohemagglutinin PHA-P* - Sigma, EUA) e como controle negativo foi usado apenas meio completo. Em seguida foram adicionadas as CMSP dos indivíduos recrutados para o estudo aos poços na concentração de 1x10⁵ células/poço. As placas foram incubadas por 20 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada. Após esse período, elas foram lavadas seguindo os seguintes passos: 3 vezes com PBS1X; 3 vezes com PBS1X/Tween20 0,05% (Merck, Alemanha) e 3 vezes com PBS1x, então foram adicionados 100µL de anticorpo anti-IFN-γ biotinilado (Diaclone, France) diluído em PBS1X/BSA 0,5% (BSA, fração V, ≥96% - Sigma, EUA), e a placa foi incubada a 37° C por 4 horas. Ao término da incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS1X e foram adicionados 100µL de uma solução de estreptoavidina fosfatase alcalina (Amershan Biosciences, Inglaterra) diluída em PBS1X/BSA 0,5% (BSA, fração V, ≥96% - Sigma, EUA). Após incubação de uma hora a 37° C, as placas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS1X e foram adicionados 50µL do substrato NBT-BCIP (Sigma, EUA). A reação enzimática foi interrompida com lavagem em água

destilada. Os *spots* foram contados no leitor de placas de ELISpot (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology, EUA), utilizando o programa Image Acquisition v.4 (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology, EUA) para obtenção de imagem e ImmunoSpot v.3.2 (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology, EUA) para a contagem dos *spots*. As respostas foram consideradas como positivas quando o número de CFS/10⁶ CMSP foi igual ou superior a 50, após subtração do controle negativo.

4.10. Análises estatísticas

O teste t de *Student* foi utilizado para comparar as médias das distâncias genéticas entre as sequências consenso e isolados em relação ao conjunto de sequências utilizadas para derivar os consensos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado na comparação das magnitudes de resposta e o teste de Sperman foi usado para verificar a existência de correlação entre distância genética e magnitude de resposta.

5. Resultados

5.1. Definição das sequências consenso e ancestral e escolha de sequências de isolados virais dos subtipos B e F do HIV-1

A partir do alinhamento das sequências brasileiras (50 do subtipo B e 38 do subtipo F1), foram obtidas as sequências consenso de uma região de aproximadamente 300pb na região de *nef* para ambos os subtipos utilizando o programa Dambe v.5.0.10. As sequências ancestrais foram inferidas com o programa DNAmI (PHYLIP 3.6) e apresentavam-se idênticas as sequências consenso dos respectivos subtipos, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9.

Devido aos consensos serem sequências artificiais, ou seja, não correspondem as sequências de um vírus real, foram escolhidas sequências de isolados virais para comparação do potencial antigênico de peptídeos baseados nessas diferentes estratégias. Para escolha das sequências de isolados virais calculou-se a média da distância genética de cada uma delas em relação ao conjunto de sequências usando o modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) como implementado no programa MEGA 4.0. As sequências de isolados virais, que apresentavam a menor distância genética média em relação ao conjunto de sequências analisadas de cada subtipo, foram escolhidas para o desenho dos peptídeos que foram utilizados posteriormente nos ensaios imunológicos. Na figura 10 é possível observar que as sequências consenso de ambos os subtipos possuem uma distância genética média menor em relação ao conjunto de sequências utilizadas, quando comparadas a isolados virais. Enquanto os consensos apresentaram a média das distâncias genéticas de 5,35% (SD= ±1,526) e 4,1% (SD= ±1,505) para os subtipos B e F1, respectivamente, as sequências de isolados virais demonstraram valores significativamente maiores (valores de $P < 0,05$), 6,87% (SD= ±1,724) (B) e 5,22% (SD= ±1,657) (F1) para as sequências mais próximas, e 12,09% (SD= ±1,457) (B) e 9,64% (SD= ±1,677) (F1) para as sequências mais distantes.

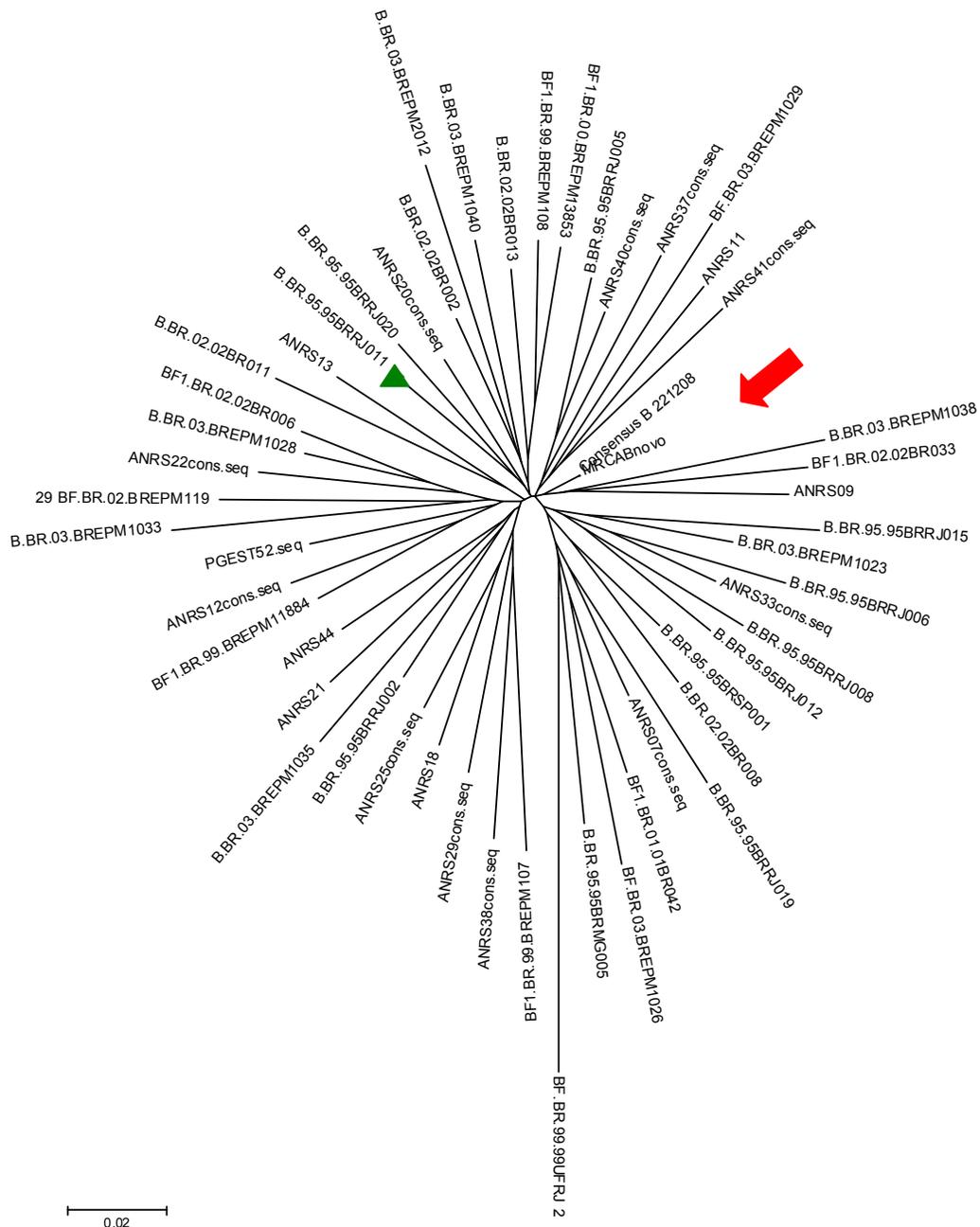


Figura 8: Análise genética da região do gene *nef* de 50 seqüências brasileiras do HIV-1 classificadas como subtipo B, incluindo as seqüências consenso e ancestral. A história evolucionária foi inferida utilizando o método Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-Nei. Todas as posições contendo *gaps* e indefinições foram desconsideradas na análise. O triângulo verde indica a seqüência que apresentou a menor distância genética em relação ao grupo de seqüências e a seta vermelha indica as seqüências consenso e ancestral, que se localizam na mesma posição na árvore.

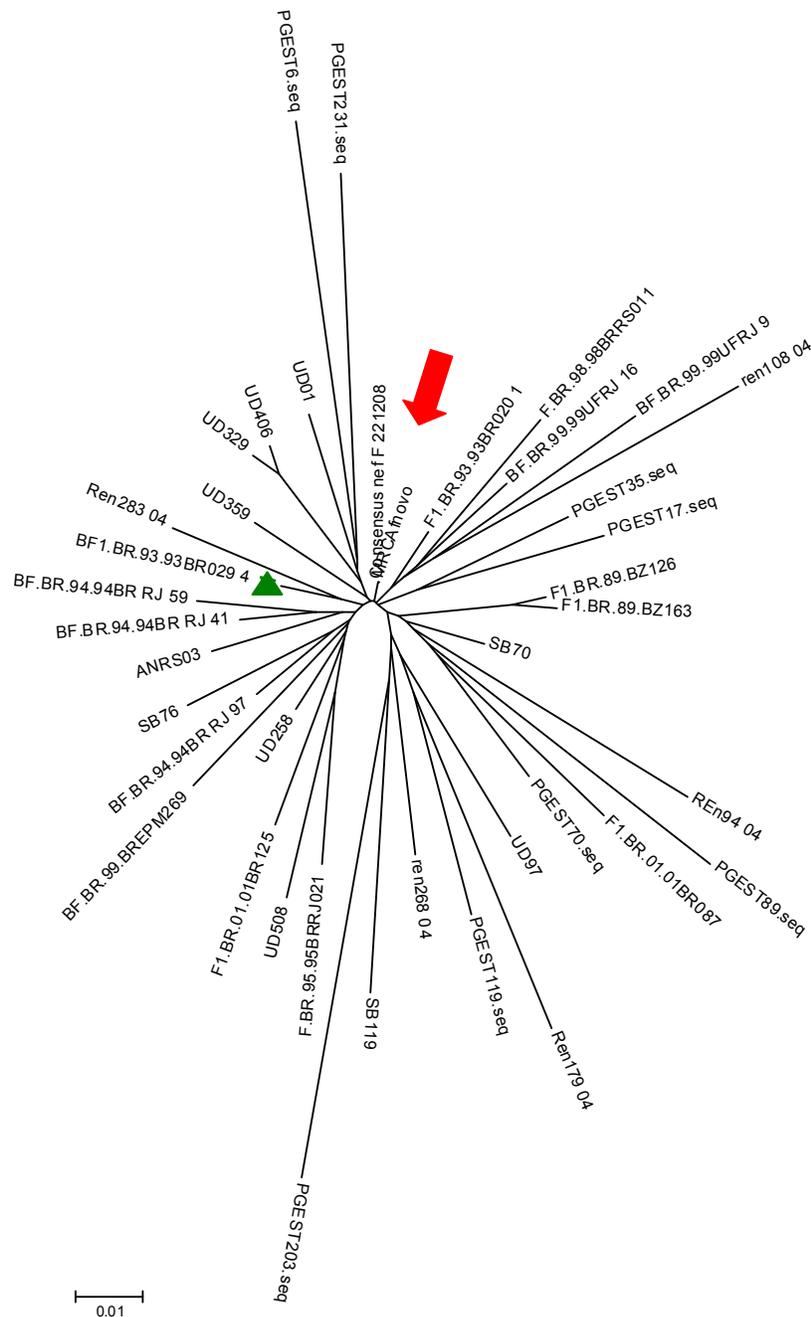


Figura 9: Análise genética da região do gene *nef* do HIV-1 de 38 sequências brasileiras classificadas como subtipo F, incluindo as sequências consenso e ancestral. A história evolucionária foi inferida utilizando o método Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-Nei. Todas as posições contendo *gaps* e indefinições foram desconsideradas na análise. O triângulo verde indica a sequência que apresentou a menor distância genética em relação ao grupo de sequências e a seta vermelha indica as sequências consenso e ancestral, que se localizam na mesma posição na árvore.

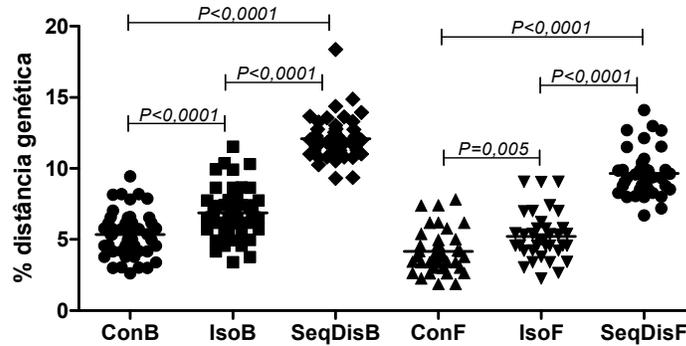


Figura 10: Cálculo da distância genética média entre a sequência dos consensos do subtipo B e F1 e as sequências dos isolados B e F1 mais próximos e mais distantes ao grupo de sequências utilizadas para o alinhamento. As distâncias foram calculadas utilizando o modelo Tamura-Nei, como implementado no programa MEGA 4.0. **Con** significa sequência consenso, **Iso** sequência do isolado com menor distância genética e **SeqDis** sequência do isolado com maior distância genética. **B** refere-se ao subtipo B e **F** ao subtipo F1. Os valores de *P* foram determinados usando teste *t* de Student.

5.2.Caracterização da população estudada

Para o estudo, foram recrutados trinta e um pacientes, que foram divididos em três grupos: (1) indivíduos infectados pelo subtipo B, sendo subdividido em (1A) indivíduos controladores da carga viral (HC), os quais na ausência de tratamento são capazes de manter a carga viral em níveis abaixo de 10.000 cópias/mL, e (1B) indivíduos não controladores da carga viral, sendo maioria 4/5 indivíduos com infecção recente (menor de 10 meses) documentada; (2) indivíduos infectados pelo subtipo F1, que, devido a proporção bem menor de infecções por este subtipo (~10%), esse grupo foi mais heterogêneo; (3) indivíduos que não foram subtipados para a região *nef*, incluindo 4 HC e 1 indivíduo com subtipagem para o gene *pol* como F1. Esse último grupo não entrou nas análises subtipo dependentes. Os valores de mediana da contagem de células T CD4⁺ e Log₁₀ da carga viral de cada grupo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Valores da mediana da contagem de células T CD4⁺ e carga viral (CV) dos grupos de indivíduos, no momento de inclusão no estudo.

Grupo	n	CD4 (células/ μ L) (IC95%)	Log ₁₀ CV (IC95%)
1-Subtipo B	1A	11	1089 (771,6-1203)
	1B	5	611 (190,1-872,7)
2- Subtipo F1	10	648 (379,3-1045)	4,01 (2,44-4,29)
3- Não definido	5	1341 (1010-1562)	1,7 (1,48-2,14)

É importante destacar que entre os 11 indivíduos que fazem parte do grupo 1A, 10 possuem mais de 8 anos de infecção, possuem contagem de células T CD4⁺ acima de 500 células/ μ L e não apresentam sintomas da doença, sendo classificados como Não Progressores de Longo Termo (LTNPs).

5.3. Determinação do subtipo viral do gene *nef*

A fim de determinar o subtipo viral das amostras utilizadas na região do gene *nef*, alvo do estudo, foi feita a análise genética da região.

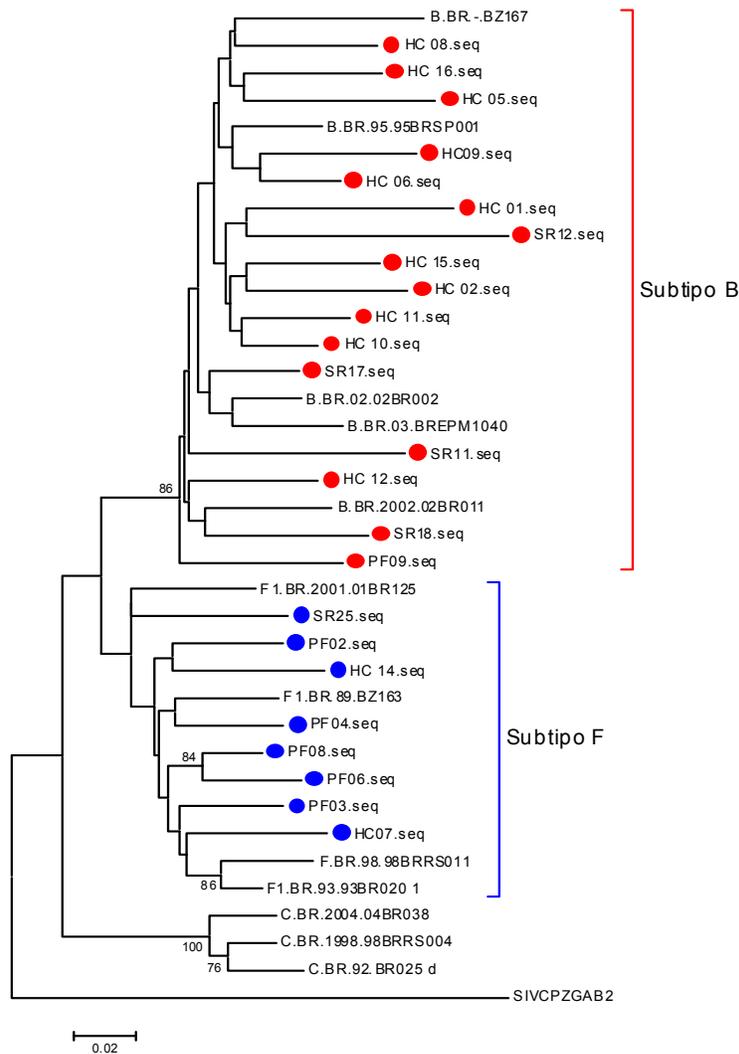


Figura 11: Análise genética da região do gene *nef* de 24 amostras estudadas e amostras de referência do subtipo B, C e F1. A história evolucionária foi inferida utilizando o método Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Tamura-Nei. Todas as posições contendo *gaps* e indefinições foram desconsideradas na análise. As amostras do subtipo B estão marcadas por um círculo vermelho e as do subtipo F1 por um círculo azul.

Entre as 31 amostras, duas não amplificaram e três não foram sequenciadas com sucesso. Na figura 11 as sequências marcadas com círculos vermelhos pertencem ao subtipo B totalizando 16 sequências, enquanto as marcadas com círculos azuis pertencem ao subtipo F1, sendo 8 sequências. Duas amostras apresentaram sequência relativamente menor que as outras e foram subtipadas como F1 com uso da ferramenta *online Genotyping* (www.ncbi.nlm.nih.gov). As amostras que não tiveram o subtipo definido não fazem parte das análises que envolveram um subtipo específico.

5.4. Confirmação de regiões imunodominantes

Para confirmar o potencial antigênico de regiões da proteína Nef foi feito o ensaio de ELIspot IFN- γ , no qual as CMSPs de 31 indivíduos, independente do subtipo em Nef, foram estimuladas com *pools* de peptídeos que cobriram quatro regiões sobrepostas (Figura 12), tanto para o subtipo B quanto para o F. A posição de aminoácidos referente ao HXB2 de cada região é a seguinte: região 1, 69-95; região 2, 85-115; região 3, 105-144; região 4, 137-160.



Figura 12: Regiões cobertas pelos *pools* de peptídeos. Região 1 em preto; região 2 em vermelho; região 3 em verde; e região 4 em azul.

Como demonstrado na figura 13a, as regiões 1 e 3 apresentaram maior frequência de resposta, 84% e 73% para o *pool* de peptídeos referente ao consenso B e 65% e 69% para o *pool* de peptídeos referente consenso F1, respectivamente. A região 2 apresentou frequência de reconhecimento intermediária, 30% (*pool* de peptídeos referente ao consenso B) e 43% (*pool* de peptídeos referente ao consenso F1). Por último, a região 4 com menor porcentagem de resposta, 23% (*pool* de peptídeos referente ao consenso B) e 19% (*pool* de peptídeos referente ao consenso F1). A mediana da magnitude de resposta, das células dos indivíduos com resposta positiva ao *pool* (≥ 50 CFS/ 10^6 CMSP), foi maior nas regiões 1 e 3, 732 (IC 95%= 556-1555) e 575 (IC 95%= 441-1481) CFS/ 10^6 CMSP para o *pool* de peptídeos referente ao consenso B e 785 (IC 95%= 430-1584) e 637 (IC 95%= 472-1553) CFS/ 10^6 CMSP para o *pool* de peptídeos referente ao consenso F1, respectivamente. Na região 2 os valores foram 170 (IC 95%= 47-431) para o *pool* de peptídeos referente ao consenso B e 212 (IC 95%= 1,4-779) e para o *pool* de peptídeos referente ao F1. A região 4 apresentou, assim como

na frequência, os valores mais baixos 115 (IC 95%= 58-186) e 165 (IC 95%= 78-265) (Figura 13b) confirmando, assim, o maior potencial antigênico das regiões 1 e 3, sendo a região 2 intermediária e a região 4 com baixo potencial.

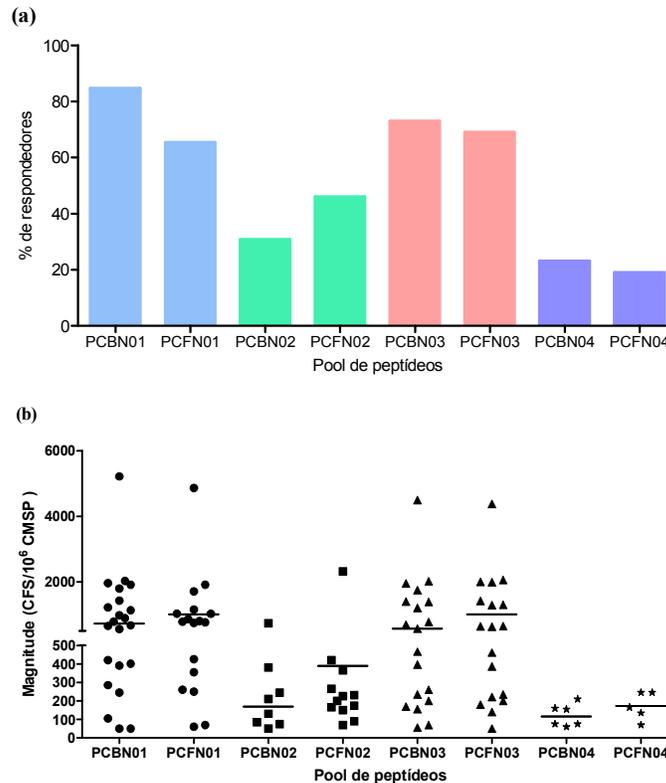


Figura 13: Identificação de regiões imunodominantes por ELISpot IFN γ . Frequência (a) e magnitude (b) de resposta de células de indivíduos infectados pelo HIV-1 estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados nas sequências consenso do subtipo B (PCBN) e F1 (PCFN). Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. PCBN Pool Consenso B Nef; PCFN Pool Consenso F1 Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*.

5.5. Análise comparativa da antigenicidade de peptídeos derivados de sequências consenso B e F e de isolados virais destes subtipos

Após a confirmação da antigenicidade de três das quatro regiões escolhidas para o estudo, o próximo objetivo foi verificar se peptídeos baseados nas sequências consenso apresentariam maiores frequências e magnitude de resposta quando comparados aos baseados em sequências de isolados virais, tanto para o subtipo B quanto para o F1. Esta comparação foi realizada pelo ensaio de ELISpot IFN- γ . A Figura 14 mostra a análise de CMSPs de 14 indivíduos que tiveram a região do gene *nef* subtipado como B, nela é possível observar que a frequência de resposta tanto para o

pool de peptídeos baseados na sequência do isolado (PIBN) quanto para o *pool* de peptídeos baseados na sequência consenso (PCBN) foi igual na região 1 (93%) e muito próxima na região 2, 28% para PCBN contra 21% PIBN. Na região 3, as sequências do consenso e do isolado no subtipo B são idênticas, e 71% dos indivíduos infectados pelo subtipo B responderam ao *pool* dessa região. A magnitude de resposta não foi significativamente diferente entre o PCBN e o PIBN ($P>0,05$) para ambas regiões, como observado na Figura 14b.

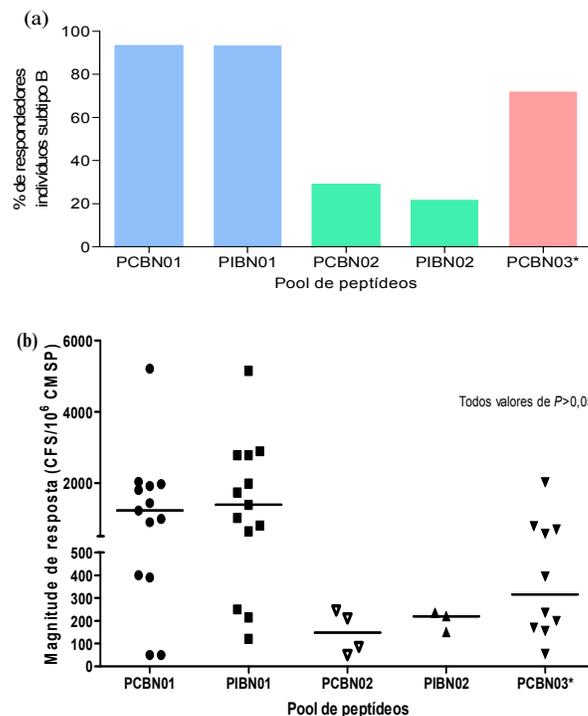


Figura 14: Comparação da antigenicidade entre *pool* de peptídeos derivados da sequência consenso e de isolado viral por ELISpot IFN γ . Frequência **(a)** e magnitude **(b)** de resposta de células de indivíduos, infectados pelo subtipo B, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados na sequência do consenso (**PCBN**) e do isolado mais próximo do subtipo B (**PIBN**). Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. **PCBN** Pool Consenso B Nef; **PIBN** Pool Isolado B Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*. Os valores de P foram determinados usando o teste de Mann Whitney. *Na região 3 a sequência do consenso é idêntica a do isolado.

A comparação do potencial antigênico entre peptídeos derivados da sequência consenso e de isolado viral também foi realizada para o subtipo F1, sendo avaliada a resposta das CMSP de 9 indivíduos infectados pelo subtipo F (Figura 15). O *pool* de peptídeos referente ao consenso (PCFN) e ao isolado (PIFN) apresentaram

valores similares na frequência de resposta para a região 1, 44% e 55%, e idênticos na região 3, 66%, para o PCFN e o PIFN respectivamente, sendo uma pequena diferença observada na região 2, com o PCFN sendo reconhecido por 66% dos indivíduos contra 44% do PIFN. A magnitude de resposta, também não apresentou diferença significativa entre o PCFN e o PIFN ($P>0,05$), mas é possível observar que, diferente do observado em relação a resposta de indivíduos infectados pelo subtipo B frente a peptídeos baseados no subtipo B, os quais apresentam a maior magnitude para a região 1, no subtipo F1 a região 3 além de ser mais frequentemente reconhecida, também apresenta uma tendência de respostas de maior magnitude. Nesta análise foram detectados 1705 (IC 95%= 369-3362) e 842 (IC 95%= 22-2104) CFS/ 10^6 CMSP para o *pool* da região 3, contra 617 (IC 95%= 120-1062) e 550 (IC 95%= 221-1060) na região 1, em relação ao consenso e isolado respectivamente.

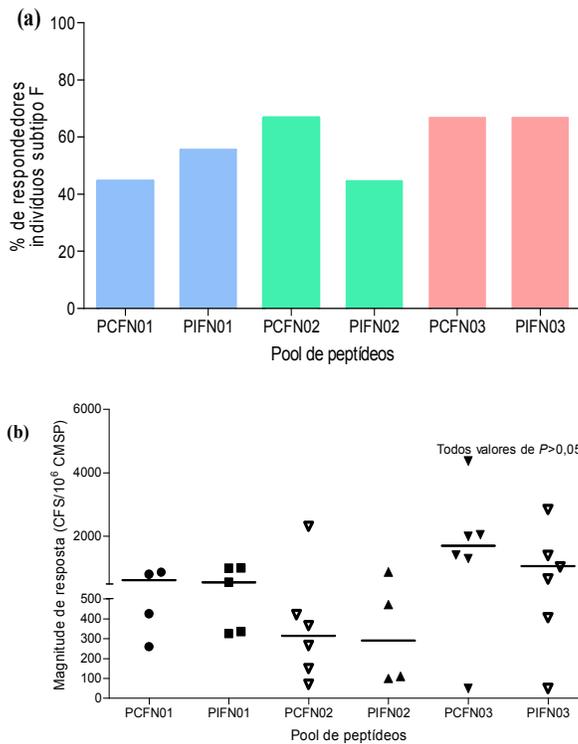


Figura 15: Comparação da antigenicidade entre *pool* de peptídeos derivados a partir da seqüência consenso e de isolado viral por ELISpot IFN γ . Frequência **(a)** e magnitude **(b)** de resposta de células de indivíduos infectados pelo subtipo F1, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados na seqüência do consenso (**PCFN**) e do isolado mais próximo do subtipo F1 (**PIFN**). Respostas ≥ 50 CFS/ 10^6 CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. **PCFN** Pool Consenso F Nef; **PIFN** Pool Isolado F Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*. Os valores de P foram determinados usando o teste de Mann Whitney.

5.6. Reatividade cruzada em os subtipos B e F1 e o grupo M

Uma vez observado que não existiam diferenças significativas entre a resposta aos *pools* de peptídeos baseados no consenso e no isolado de ambos subtipos, em termos de reconhecimento das regiões analisadas, o próximo passo foi determinar se existia uma reatividade cruzada entre os subtipos B e F1, e frente ao consenso do grupo M (obtido na base de dados de Los Alamos), o qual é o consenso de todos os subtipos do grupo M e que tem sido proposto como uma alternativa no desenho de antígenos para utilização em uma vacina mundial, dada a heterogeneidade da distribuição global dos subtipos do HIV-1.

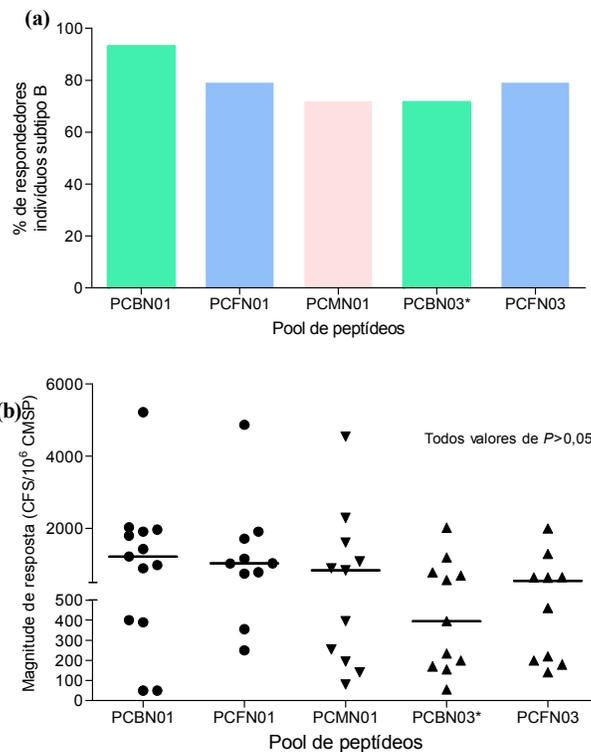


Figura 16: Reatividade cruzada entre *pool* de peptídeos derivados a partir das sequências consenso dos subtipos B e F e do grupo M avaliada por ELISpot IFN γ . A frequência (a) e a magnitude (b) de resposta de células de indivíduos, infectados pelo subtipo B, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados no consenso do subtipo B (PCBN), subtipo F (PCFN) e consenso do grupo M (PCMN). Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. PCBN Pool Consenso B Nef; PCFN Pool Consenso F Nef, PCMN Pool Consenso M Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*. Os valores de *P* foram determinados usando o teste de Mann Whitney. *Na região 3 a sequência do consenso B é idêntica a do consenso M.

A reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 e o grupo M foi analisada primeiro em indivíduos infectados pelo subtipo B. Como demonstrado na figura 16a, a frequência de resposta, na região 1, foi maior para o *pool* correspondente ao consenso do mesmo subtipo dos indivíduos 93% contra 79% para o *pool* referente ao consenso F1 e 71% para o *pool* referente ao grupo M. Esse padrão não se manteve na região 3, o *pool* referente ao consenso F1 apresentou uma porcentagem de resposta um pouco maior que o referente ao consenso B/M (nessa região a sequência do *pool* do consenso B é idêntica ao do consenso M), 78% e 71% respectivamente. A magnitude de resposta não foi significativamente diferente entre os *pools* dos consensos nas duas regiões analisadas (Figura 16b).

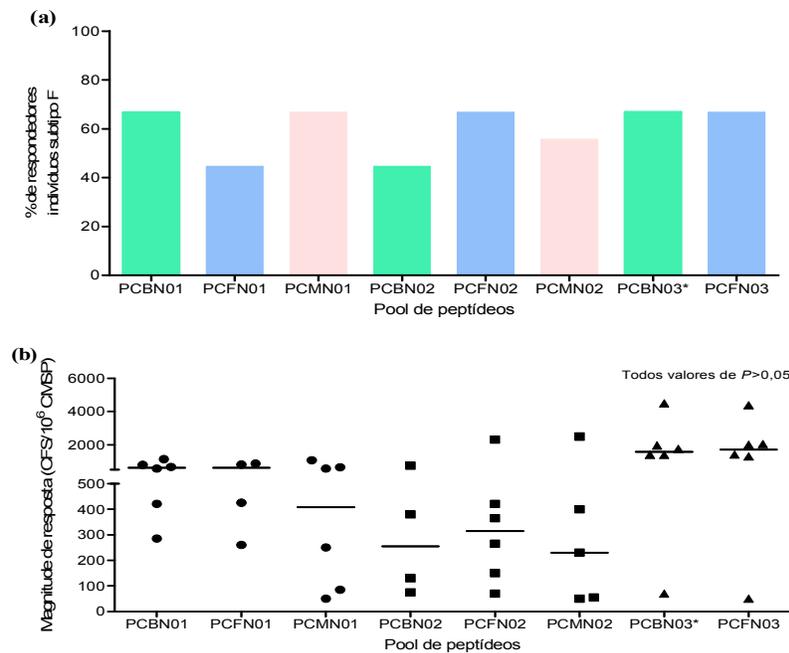


Figura 17: Reatividade cruzada entre os consensos dos subtipos B e F e o consenso do grupo M. ELISpot IFN γ . A frequência **(a)** e a magnitude **(b)** de resposta de células de indivíduos, infectados pelo subtipo F1, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados no consenso do subtipo B (**PCBN**), subtipo F1 (**PCFN**) e consenso do grupo M. Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. **PCBN** Pool Consenso B Nef; **PCFN** Pool Consenso F Nef, **PCMN** Pool Consenso M Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*. Os valores de *P* foram determinados usando o teste de Mann Whitney. *Na região 3 a sequência do consenso B é idêntica a do consenso M.

Quando a reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 e o grupo M foi analisada para indivíduos infectados pelo subtipo F1, observou-se um padrão diferente em cada região em termos de frequência de resposta. A Figura 17a demonstra que na região 1 a

frequência de resposta foi maior para os *pools* dos consensos B e M (66%) do que para o *pool* do consenso F (44%). Na região 2 a frequência é maior para o *pool* do consenso F (66%), seguida pelo *pool* do M (55%), com B apresentando a menor porcentagem (44%) de indivíduos respondedores. Na região 3 os valores foram iguais para ambos consensos (66%). A magnitude, assim como observado para os indivíduos infectados pelo subtipo B, também não foi significativamente diferente entre os subtipos e o grupo M ($P>0,05$). A resposta ao *pool* do consenso M apresentou uma tendência de magnitude menor (407 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= 33-858; 230 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= -649-1942) do que a observada frente aos *pools* dos consensos B (620 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= 330-959; 255 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= -151-813) e F1 (617 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= 120-1062; 315 CFS/ 10^6 CMSP, IC 95%= -296-1451) nas regiões 1 e 2 respectivamente (Figura 17b). Na região 3, a magnitude de resposta do consenso F1 foi maior que a do consenso B/M, 1705 (IC 95%= 369-3362) e 1575 (IC 95%= 315-3371) CFS/ 10^6 CMSP.

Uma vez determinado que existia uma grande reatividade cruzada frente aos peptídeos dos subtipos B e F1 e o grupo M, foi feita uma análise individual de cada resposta discordante a fim de verificar se existia alguma ligação com diferenças entre as sequências dos *pools* e a sequência do vírus obtida do indivíduo doador das células. Como representado na Figura 18, no grupo dos indivíduos infectados pelo subtipo B, foram encontradas 29 respostas positivas (≥ 50 CFS/ 10^6 CMSP), das quais 23 foram detectadas com *pools* referentes tanto ao subtipo B como ao F1 e ao grupo M, 2 foram detectadas apenas pelos *pools* referente ao subtipo B e ao grupo M, 2 apenas com uso do *pool* referente ao subtipo B e 2 apenas com uso do *pool* referente ao subtipo F1. Nos indivíduos infectados pelo subtipo F1, as respostas concordantes para as três abordagens também foram maioria, 13 das 19 respostas positivas, sendo 2 detectadas apenas com *pools* referentes ao subtipo F1 e ao grupo M, 2 detectadas apenas com *pool* referente ao subtipo B e ao grupo M, 1 apenas com uso do *pool* B e 1 apenas com o *pool* referente ao subtipo F1.

Como pode ser observado na Figura 19, entre as seis respostas discordantes nos indivíduos infectados pelo subtipo B, apenas 3 apresentaram valores de CFS/ 10^6 CMSP com grande variação. Desta forma, as diferenças de aminoácidos encontradas entre a sequência do indivíduo e sequência dos peptídeos com resposta positiva e negativa com grande variação foram analisadas. No indivíduo HC05 na região 1 observa-se uma resposta positiva aos peptídeos referentes ao consenso do subtipo B e do grupo M,

enquanto os peptídeos do consenso do subtipo F1 a resposta foi igual a 0. Tanto as sequências dos peptídeos referentes aos subtipos B, F1 como ao grupo M diferem da sequência do vírus do HC05 em duas posições (posição de aminoácidos referentes ao HXB2): 92 (R/K) para ambas sequências, 83 (G/A) para o subtipo B e 85, L/V para o subtipo F1 e L/F para o grupo M. Comparando a sequência referente ao consenso do subtipo B com a do consenso F e M, é provável que tanto a mudança na posição 83 como a na posição 85 tenha um impacto na ligação dos peptídeos 3 e 4 ao HLA.

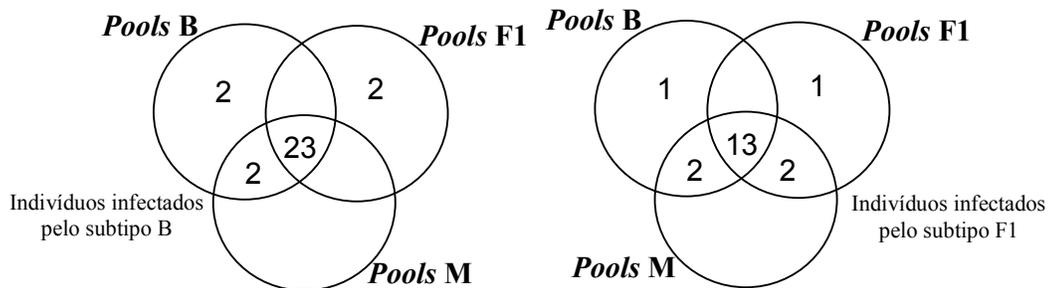


Figura 18: Diagramas de Venn mostrando o número de respostas positivas detectadas utilizando cada conjunto de peptídeos referentes ao subtipo B, F1 ou grupo M em indivíduos infectados pelo subtipo b e pelo subtipo F1.

Na região 2, as diferenças entre as sequências dos indivíduos e as sequências dos peptídeos foram maiores. No indivíduo HC11, no qual a resposta alvo foi o peptídeo 5, é possível observar que a mudança na posição 85 teve impacto na resposta nesse paciente, apesar do peptídeo referente ao consenso F1, frente ao qual foi detectada resposta, apresentar um aminoácido diferente da sequência desse indivíduo. No SR11, sendo a resposta detectada com o peptídeo 9, três diferenças foram encontradas entre a sequência do indivíduo e a dos peptídeos, posição 107 (K/Q), 108 (E/D) e 114 (M/V) tanto nos peptídeos referentes ao subtipo B quanto ao grupo M; e 104 (Q/K), 107 (K/Q) e 114 (M/V) para os peptídeos F1.

Entre os indivíduos infectados pelo subtipo F1, não foram encontradas respostas discordantes na região 3. Na região 1, no SR25 as posições 83 e 85, aparecem novamente como tendo provável papel na resposta, uma vez que na sequência dos peptídeos 3 e 4 referentes ao subtipo B não existia diferença em relação a sequência do vírus do SR25 e foi encontrada uma alta magnitude de resposta, enquanto nas sequências referente ao consenso F e M, foram detectadas diferenças nessas posições. Na região 2 foram identificadas quatro respostas discordantes, e como nos indivíduos B, essa região apresentou maior número de diferenças, sendo referentes as posições 85, 98, 102, 104 e 108.

Sequência da região de Nef do HIV-1 em indivíduos infectados pelo subtipo B

Região 1

HC05 PVRPQVPLRPMTYK**GA**LDLSHFLKE**KG** (resposta frente aos peptídeos 3 e 4)
 Consenso BA.....K... (390)
 Consenso FV.....K... (<50)
 Consenso MF.....K... (140)
HC15 PVRPQVPLRPMTYK**GA**LDLSHFLKE**KG**
 Consenso BA..... (50)
 Consenso FV..... (<50)
 Consenso MF..... (<50)
SR17 PVRPQVPLRPMTYK**GA**LDLSHFLKE**KG**
 Consenso BA.....K... (50)
 Consenso FV.....K... (<50)
 Consenso MF.....K... (<50)

Região 2

HC11 LDLSHFLKEKGGLEGLIHSQR**Q**DIIDLVWY (resposta frente ao peptídeo 5)
 Consenso BY..K..... (<50)
 Consenso F V.....Y..K..E..... (225)
 Consenso M F.....D...Y..... (<50)
SR11 LDLSHFLKEKGGLEGLIYSQ**R**KEIIDLWY (resposta frente ao peptídeo 9)
 Consenso BQD.....V... (<50)
 Consenso F V.....K..Q.....V... (90)
 Consenso M F.....D.....QD.....V... (<50)

Região 3

HC05 KRQDILDLVWYNTQGYFPDWQNYTPGPGTRFPLTFGWCFKLVP
 Consenso BH...T.....I.Y..... (55)
 Consenso F ..E.....H...T.....I.Y..... (<50)
 Consenso MH...T.....I.Y..... (55)

Sequência da região de Nef do HIV-1 em indivíduos infectados pelo subtipo F

Região 1

SR25 PVRPQVPLRPMTY**KA**ALDLSHFLKE**KG** (resposta frente aos peptídeos 3 e 4)
 Consenso BL..... (1135)
 Consenso FL.....G.V..... (<50)
 Consenso ML.....G.F..... (655)

Região 2

PF02 LDLSHFLKEKGGLEGLIHSK**R**QEIIDLWY
 Consenso BY.Q...D..... (<50)
 Consenso F V.....Y..... (365)
 Consenso M F.....D...Y.Q...D..... (55)
HC14 VDVSHFLKEKGGLEGLIHSK**R**QEIIDLWY
 Consenso B L.L.....Y.Q...D..... (<50)
 Consenso FY..... (265)
 Consenso M F.....D...Y.Q...D..... (230)
PF8 IDLSHFLKEKGGLEGLIYSQ**R**REIIDLWY
 Consenso B L.....QD..... (75)
 Consenso F V.....K..Q..... (<50)
 Consenso M F.....D.....Q..QD..... (<50)
SR25 LDLSHFLKEKGGLEGLIYSQ**R**QEIIDLWY
 Consenso BD.....Y (<50)
 Consenso F V.....K.....Y (70)
 Consenso M F.....D.....Q...D.....Y (<50)

Figura 19: Comparação entre a sequência do vírus dos indivíduos infectados com subtipo B ou F1 e a sequências dos peptídeos referentes ao consenso do subtipo B, F1 e grupo M. Os valores após cada sequência referem-se ao número de CFS/10⁶ CMSP, valores ≥50 CFS/10⁶ CMSP são considerados positivos.

Uma vez que a tipagem do HLA não foi feita para nenhum dos indivíduos, não se pode afirmar o real impacto dessas mudanças no reconhecimento dos peptídeos utilizados, mas foi possível observar que alterações em certas posições como 83, 85, 104 e 108, que foram encontradas em comparações nos indivíduos infectados por ambos subtipos certamente tem impacto na ligação ao HLA.

5.7. Identificação dos peptídeos alvos da resposta

A comparação das respostas entre consenso *vs* isolado e subtipo B *vs* subtipo F1 foi realizada utilizando os peptídeos em *pools*, que continham de 3 a 8 peptídeos, sendo os *pools* que cobriam a região 1 e 3 responsáveis pela maior frequência e magnitude de resposta. A fim de verificar o (s) alvo(s) específico(s) destas respostas, os peptídeos correspondentes a essas regiões foram testados individualmente. Para essa análise foram utilizadas amostras de 14 indivíduos que apresentaram respostas superiores a 200 CFS/10⁶ CMSP aos *pools* das regiões 1 e 3. Os peptídeos que apresentavam a maior frequência de reconhecimento foram os mesmos nas quatro abordagens utilizadas, consensos e isolados dos subtipos B e F1. Na Figura 20 são demonstrados os resultados representativos das quatro abordagens, na região 1 os peptídeos 3 e 4 foram responsáveis pela maior frequência de resposta, enquanto na região 3 os peptídeos 12 e 13 foram destaques. Na região 1 esse mesmo par também apresentou maior magnitude de resposta, enquanto na região 3 a magnitude de resposta foi mais alta nos peptídeos 12 e 16. É importante lembrar que esses peptídeos são sobrepostos, desta forma, é provável que a mesma sequência esteja sendo reconhecida em ambos pares de peptídeos que apresentaram a maior frequência de resposta.

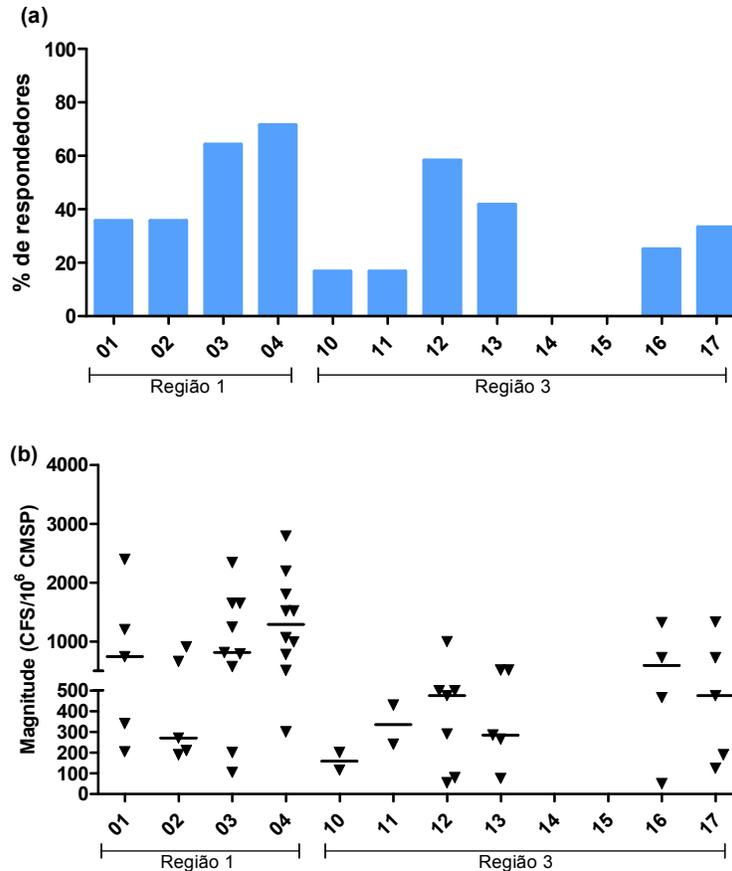


Figura 20: Identificação dos peptídeos alvos da resposta por ELISpot IFN γ . Resultados representativos referente a resposta frente aos peptídeos baseados no consenso B. Frequência **(a)** e a magnitude **(b)** de resposta de células estimuladas com peptídeos referentes a regiões 1 e 3 baseados nas sequências de consensos e isolados do subtipo B e F. Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas.

5.8. Relação entre distância genética e magnitude de resposta

Devido à falta de diferenças significativas na frequência e magnitude de resposta entre peptídeos derivados do consenso e do isolado e entre subtipo B e F, foi calculada a distância genética de cada amostra testada em relação ao consenso e isolado de ambos os subtipos para verificar se a homogeneidade de resposta poderia ser explicada por um valor similar de distância genética. Na Figura 21 é demonstrado que existe diferença significativa entre a distância genética de aminoácidos entre o consenso B e F1, consenso B e isolado F1 e consenso B e consenso M em indivíduos infectados pelo subtipo B. No entanto, essa diferença não teve impacto na magnitude de resposta, a qual não foi significativamente diferente frente aos conjuntos de peptídeos utilizados. No

subtipo F1 não ocorreram diferenças significativas nos valores de distância genética entre a sequência viral das amostras utilizadas e a sequência dos consensos e isolados, bem como na magnitude de resposta frente aos diferentes *pools* testados, indicando a ausência de relação entre a resposta e a distância genética.

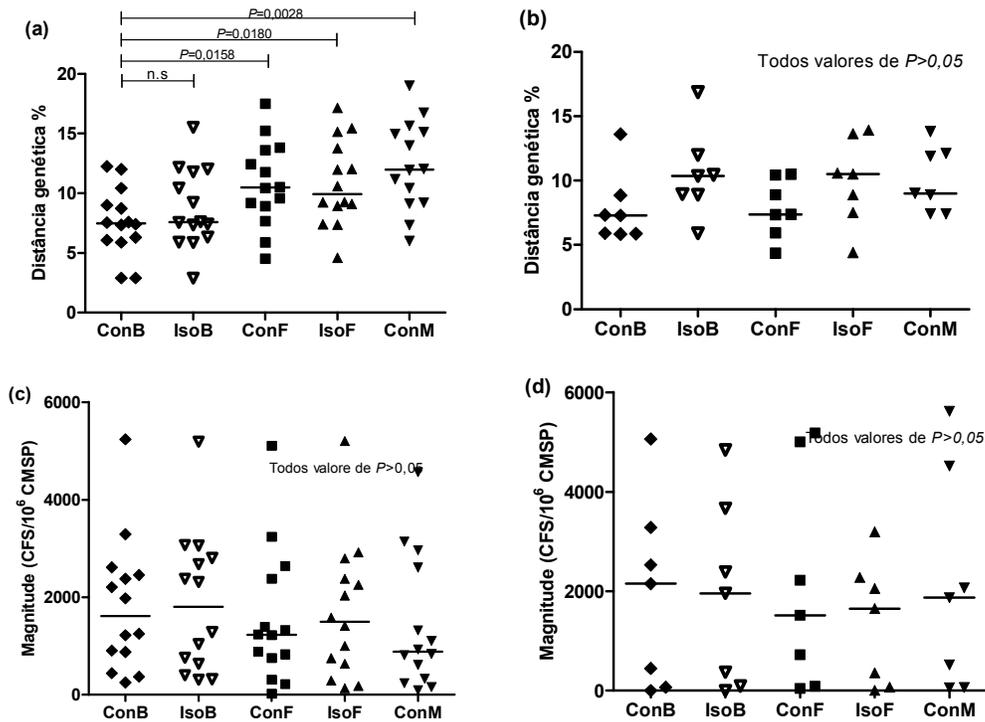


Figura 21: Comparação entre distância genética de aminoácidos e a magnitude de resposta. As distâncias genética de aminoácidos **(a)** e **(b)** e a magnitude de resposta **(c)** e **(d)** foram calculadas para os *pools* dos consensos e isolados dos subtipos B e F e para o consenso do grupo M referente às regiões 1-3 indivíduos infectados pelo subtipo B **(a)** e **(c)** e pelo subtipo F1 **(b)** e **(d)**. Os valores de *P* foram determinados usando o teste de Mann Whitney.

Para confirmar a ausência de correlação entre a magnitude de resposta em ambos os subtipos analisados, foi feito um teste de correlação entre essas duas variáveis. Como demonstrado na Figura 22, a distância genética, em geral, não teve impacto na magnitude de resposta, não existindo correlação entre os dois valores ($r=0,1415$, $P>0,05$).

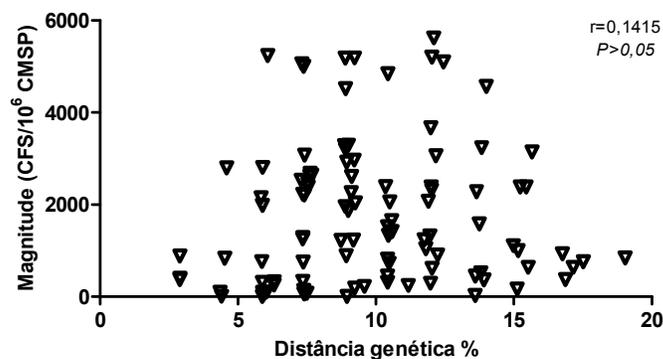


Figura 22: Correlação entre distância genética de aminoácidos e magnitude de resposta. As distâncias genética de aminoácidos e a magnitude de resposta foram calculadas para os *pools* dos consensos e isolados dos subtipos B e F1 e para o consenso do grupo M, referente às regiões 1-3, em amostras de indivíduos infectados pelo subtipo B e F1. A correlação entre distância genética e magnitude foi determinada usando o teste de Spearman.

5.9. Relação entre magnitude e frequência de resposta e controle da carga viral

Após as análises das respostas nos contextos de consenso *vs* isolado e subtipo B *vs* subtipo F1, o próximo passo foi verificar se existia alguma relação entre o controle da carga viral e a frequência e magnitude de resposta. Para essa análise somente as regiões 1 e 3 foram consideradas, uma vez que elas apresentaram os níveis mais altos de resposta, e apenas foram consideradas as repostas frente aos peptídeos baseados nos consensos. Na figura 23a é possível observar que os indivíduos que controlavam a carga viral apresentavam uma menor frequência de resposta. Na região 1, 64% dos controladores apresentaram resposta ≥ 50 CFS/ 10^6 CMSP, enquanto 77% dos não controladores foram capazes de responder ao *pool* de peptídeo testado para o subtipo B, esse perfil se repetiu no subtipo F1, 52% contra 66%, nos controladores e não controladores respectivamente. A magnitude de resposta (Figura 23b) na região 1 não foi significativamente diferente entre os controladores e não controladores ($P>0,05$), porém na região 3 essa diferença foi observada. Os valores de mediana da magnitude para ambos subtipos foram mais altos para os não controladores, 1295 e 1415 CFS/ 10^6 CMSP, contra 247,5 e 235 CFS/ 10^6 CMSP nos controladores, para o *pool* do consenso B e F1 respectivamente ($P=0,0312$ para B, $P=0,0040$ para o consenso F1).

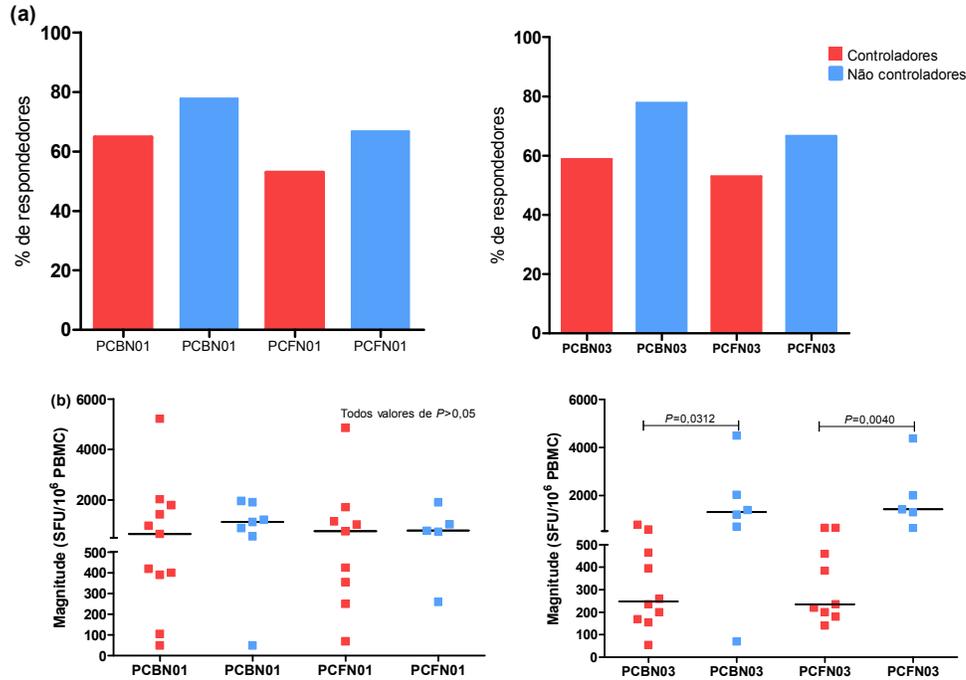


Figura 23: Relação entre controle da carga viral e magnitude e frequência de resposta por ELISpot IFN γ . A frequência **(a)** e a magnitude **(b)** de resposta de células de indivíduos controladores (vermelho) e não controladores (azul) da carga viral, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados na sequência dos consensos do subtipo B (PCBN) e F (PCFN). Respostas ≥ 50 CFS/ 10^6 CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. PCBN Pool Consenso B Nef PCFN Pool Consenso F1 Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*. Os valores de *P* foram determinados usando teste Teste de Mann Whitney.

Com objetivo de confirmar relação entre controle da carga viral e magnitude e frequência de resposta, o grupo dos controladores foi subdividido em 3 categorias baseadas no histórico dos valores de carga viral: (HCa) indivíduos que apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção em todos os pontos (n=4); (HCb) indivíduos que apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção em 70% dos pontos (n=5); (HCc) indivíduos que apresentavam carga viral acima do limite de detecção na maioria dos pontos, porém abaixo de 10.000 cópias/mL (n=8). Apesar do número reduzido de indivíduos em cada grupo, é possível observar uma tendência de uma menor frequência de resposta nos indivíduos do grupo HCa, como demonstrado na Figura 24. Sendo que o único indivíduo desse grupo que apresentou resposta positiva possui um valor absoluto de células TCD8⁺ acima do observado para os outros componentes do grupo, podendo indicar que nesse indivíduo essas células possam ter um papel fundamental no controle. Essa possível relação entre frequência de resposta e controle da carga viral fica mais

clara na região 3, sendo encontrado um percentual de respondedores de 25% (HCa), 40% (HCb) para os *pools* derivados de ambos subtipos e 100% e 85,7% para o *pool* derivado do subtipo B e F1, respectivamente, nos HCc. A magnitude de resposta, entre os indivíduos que responderam, foi similar para os três grupos.

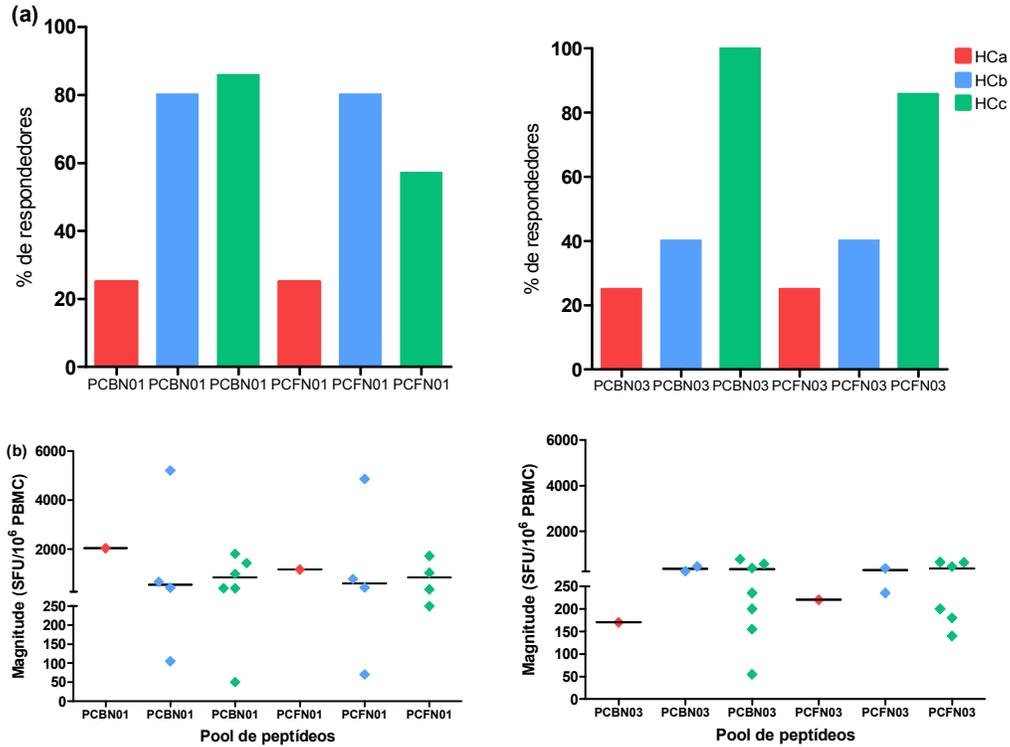


Figura 24: Relação entre controle da carga viral e magnitude e frequência de resposta por ELISpot IFN γ . Frequência **(a)** e a magnitude **(b)** de resposta de células de indivíduos controladores (vermelho) e não controladores (azul) da carga viral, estimuladas com *pools* de peptídeos referentes a regiões da proteína Nef baseados na sequência dos consensos do subtipo B (PCBN) e F (PCFN). Respostas ≥ 50 CFS/10⁶ CMSP foram consideradas positivas, sendo o cálculo da magnitude feito apenas com respostas positivas. **PCBN** Pool Consenso B Nef **PCFN** Pool Consenso F1 Nef, o número após cada sigla refere-se à região coberta pelo *pool*.

6. Discussão

A extensiva diversidade global do HIV-1 é considerada o maior obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina contra a Aids (Bansal *et al.*, 2006; Brander *et al.*, 2006). Com objetivo de diminuir o impacto dessa diversidade na formulação de vacinas com ampla ação, sequências centrais artificiais, como Consenso, Ancestral e COT, têm sido propostas para o desenho de imunógenos devido a sua capacidade de redução da distância genética em relação aos vírus circulantes (Gaschen *et al.*, 2002; Nickle *et al.*, 2003). Diferentes estudos têm comprovado o potencial dessas sequências na indução e/ou detecção de uma resposta HIV específica (Bansal *et al.*, 2006; Doria-Rose *et al.*, 2005; Frahm *et al.*, 2008; Krohn *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2007), no entanto até o momento nenhum deles utilizou essa abordagem com o subtipo F1, o qual após o B é subtipo mais prevalente no Brasil (revisto por Morgado, Guimarães e Galvão-Castro, 2002), além de ser encontrado em outros países da América Latina (Aulicino *et al.*, 2007; Gomez-Carrillo *et al.*, 2006; Hierholzer *et al.*, 2002; Laukkanen *et al.*, 2000).

6.1. Mapeamento das regiões imunodominantes

Diante disso, a primeira etapa desse estudo consistiu na obtenção dos consensos dos subtipos B e F1 brasileiros e da escolha das sequências de isolados virais de ambos subtipos que apresentavam a menor distância genética em relação ao conjunto de sequências brasileiras utilizado referente à região do gene *nef*. Com objetivo de comparar o potencial antigênico entre as duas abordagens, consenso e isolado mais próximo, essas sequências serviram de base para o desenho de peptídeos que foram utilizados para detecção de resposta de células T em indivíduos infectados pelo subtipo B e F1.

Em concordância com outros estudos (Currier *et al.*, 2006; Frahm *et al.*, 2004; Inwoley *et al.*, 2005; Yusim *et al.*, 2009), foi encontrada uma maior frequência de indivíduos capazes de reconhecer peptídeos referentes às regiões 1 a 3 (Posição de aminoácidos no HXB2: 69 a 148). Baseado nesses dados a região 4 foi desconsiderada das análises seguintes. Observou-se uma tendência de uma menor porcentagem de indivíduos infectados pelo subtipo B que reconhecem peptídeos da região 2 (Posição de aminoácidos no HXB2: 85 a 115) comparados ao infectados pelo subtipo F1, enquanto a

região 1 (Posição de aminoácidos no HXB2: 69 a 95) obteve uma maior taxa de reconhecimento por indivíduos do subtipo B.

Esses dados estão de acordo com o observado por Turk e cols. (2008), no qual a maior frequência de reconhecimento em indivíduos infectados pelo subtipo B ocorria na região 1, e indivíduos infectados por recombinantes BF, sendo todos subtipados como F na região do gene *nef*, eram capazes de reconhecer peptídeos referentes a região 2 com maior frequência que indivíduos infectados com o subtipo B.

Com objetivo de determinar com maior precisão o(s) alvo(s) da resposta celular, os peptídeos que faziam parte dos *pools* que cobriam as regiões 1 e 3, as quais apresentavam a maior frequência de resposta, foram testados individualmente usando amostras de um grupo de indivíduos, sendo maioria pertencente ao subtipo B (12/14). Os peptídeos mais frequentemente reconhecidos foram o 3 (RPMTYKAALDLSHFL) e 4 (YKAALDLSHFLKEKG) na região 1, e os peptídeos 12 (WVYHTQGYFPDWQNY) e 13 (TQGYFPDWQNYTPGP) na região 3, sugerindo que os epítomos reconhecidos nos dois casos devem estar mapeados nas zonas de sobreposição destes peptídeos. Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que as regiões cobertas por esses peptídeos são as mais frequentemente reconhecidas em Nef (Frahm *et al.*, 2004; Turk *et al.*, 2008; Yusim *et al.*, 2009).

6.2. Comparável frequência e magnitude de resposta frente a peptídeos derivados dos consensos e isolados

Estudos com sequências centrais, em geral, comparam a capacidade antigênica e/ou imunogênica de peptídeos e/ou proteínas derivadas dessas sequências em relação a sequências de isolados virais de referência, como o HXB2 e HIV-1 MN (Bansal *et al.*, 2006; Santra *et al.*, 2008), ou, entre as diferentes abordagens para geração de uma sequência central, como comparação entre consenso, ancestral e COT (Frahm *et al.*, 2008). No presente estudo a fim de selecionar o “isolado de referência” para a obtenção dos antígenos, foram utilizadas sequências de isolados que apresentaram a menor distância genética em relação a um conjunto de sequências brasileiras, usado para derivação dos consensos.

Apesar da demonstração de que os consensos, tanto do subtipo B quanto do subtipo F1, apresentavam em média uma menor distância genética em relação ao conjunto de sequências quando comparados com as sequências dos isolados de ambos

os subtipos, isso não se repetiu ao avaliar a distância do consenso e dos isolado dos dois subtipos em relação a sequências de amostras dos indivíduos infectados com o subtipo correspondente, recrutados para esse estudo. Foi encontrada uma taxa similar de distância genética entre consensos e isolados, a qual se refletiu na resposta a peptídeos derivados dos dois subtipos, não sendo demonstradas diferenças significativas, tanto na magnitude quanto na frequência de resposta, entre células estimuladas com peptídeos derivados dos consensos ou dos isolados.

A ausência de diferença na resposta frente a peptídeos derivados do consenso e isolado também foi demonstrada por Bansal e cols. (2006), no qual foi comparada a reatividade de peptídeos referentes a Gag usando diferentes estratégias, entre elas o consenso do subtipo B e o isolado do subtipo B HXB2, não sendo observada diferenças tanto na magnitude quanto na frequência de resposta entre as duas abordagens em indivíduos infectados pelo subtipo B ou subtipo C. Outro estudo, comparando consenso e isolado, porém com o subtipo A, também não encontrou diferenças significativas entre as duas abordagens em Gag (Currier *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que macacos rhesus imunizados com antígenos do envelope viral baseados no consenso do grupo M apresentaram magnitude de resposta frente a peptídeos do subtipo B comparável a animais imunizados com antígenos baseados no isolado HXBc2/BaL (Santra *et al.*, 2008). Em contraste, em um estudo com 17 indivíduos infectados pelo subtipo B, peptídeos baseados no isolado MN (subtipo B) foram mais eficiente na detecção de respostas de células T CD8⁺ do que peptídeos baseados no consenso do subtipo B (Rutebemberwa *et al.*, 2005).

6.3. Detecção de reatividade cruzada entre os subtipos B e F1 e o grupo M

Como mencionado anteriormente, a diversidade genética do HIV-1 atua como um dos principais obstáculos para a geração de uma vacina, bem como de reagentes que visem avaliar a resposta imune ao HIV-1. Essa diversidade tem um impacto ainda maior em países onde diferentes subtipos circulam, como exemplo no Brasil, onde em alguns locais é possível observar uma alta taxa de recombinação entre os subtipos B e F1 (Brennan *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2002; Stefani *et al.*, 2007). Desta forma, é interessante determinar se seria vantajoso incluir em uma vacina antígenos referentes aos diferentes subtipos circulantes em uma região. O consenso do grupo M também tem sido proposto como uma alternativa para derivação de antígenos vacinais, dada a ampla

distribuição dos diferentes subtipos desse grupo no mundo (Hemelaar *et al.*, 2006), e a menor distância genética entre o consenso M e os diversos subtipos virais incluídos neste grupo.

Nesse estudo observamos, em geral, que peptídeos baseados tanto no subtipo B, F1 ou grupo M são capazes de detectar níveis similares de resposta. Quando consideramos o total de respostas positivas detectadas no grupo dos indivíduos infectados pelo subtipo B, quase 80% foi detectada usando qualquer um dos *pools*, sendo 2 detectadas exclusivamente pelo *pool* referente ao consenso B, 2 exclusivamente pelo *pool* referente ao consenso F1 e 2 pelos *pools* referentes ao subtipo B e M. Nos indivíduos infectados pelo subtipo F1, as respostas concordantes entre as três abordagens também foram maioria, quase 70%.

Essa reatividade cruzada entre B e F1 também é observada para Nef em um estudo de Turk e cols. (2008) com indivíduos infectados tanto pelo subtipo B quanto por recombinantes BF (subtipados como F em *nef*) frente a peptídeos baseados no consenso B e no isolado de referência do CRF12_BF (o qual em possui a região do gene *nef* subtipada como F), nesse estudo não foram encontradas diferença significativas na magnitude e número de epítomos reconhecidos de modo geral, no entanto uma análise mais detalhada foi visto que indivíduos infectados pelo subtipo B eram capazes de reconhecer um total de 34 epítomos diferentes, enquanto os infectados pelo subtipo F essa amplitude de resposta era bem menor, apenas 13 epítomos (Turk *et al.*, 2008).

Estudos de neutralização viral em indivíduos infectados com subtipo B e o subtipo F1 também demonstraram reatividade cruzada, no entanto plasmas de indivíduos infectados com o subtipo F1 possuíam mais frequentemente anticorpos neutralizantes com atividade, não somente frente a isolados primários do mesmo subtipo, mas também do subtipo B (Bongertz *et al.*, 2005). Essa capacidade superior de neutralização de anticorpos presentes no plasma de indivíduos infectados pelo subtipo F1 também foi demonstrada em um trabalho posterior do mesmo grupo (Ouverney *et al.*, 2005).

Nossos dados também estão de acordo com os resultados encontrados por Bansal e cols. (2006), que demonstrou que a porcentagem de peptídeos capazes de elicitar uma resposta positiva, no ensaio de ELISpot IFN- γ , foi semelhante entre os peptídeos derivados do subtipo B e do grupo M. Além disso, foi demonstrado que células de camundongos imunizados com glicoproteínas do envelope, baseadas na sequência

consenso do grupo M, foram capazes de reconhecer peptídeos referentes aos subtipos B e C (Gao *et al.*, 2005).

Diferentes fatores influenciam no reconhecimento de peptídeos referentes ao mesmo epítipo, incluindo o número, o tipo (mudanças de aminoácidos conservativas vs não conservativas), e a posição das substituições dentro do epítipo (Malhotra *et al.*, 2009). Na avaliação das diferenças de aminoácidos entre as sequências dos diferentes conjuntos de peptídeos utilizados e as sequências virais dos indivíduos que apresentaram respostas discordantes foram identificadas posições que podem ter um impacto importante na ligação ao HLA. Porém não dispomos ainda da tipagem do HLA, dos indivíduos incluídos no estudo, o que não nos permitiu analisar com mais precisão se diferenças de aminoácidos nessas posições podem ser responsáveis pelas diferenças na magnitude de resposta encontrada.

Células T são capazes de reconhecer variante do mesmo epítipo (Buseyne e Riviere, 2001), no entanto esse reconhecimento pode levar a diferenças funcionais na resposta, como uma menor magnitude de resposta. Em um estudo de Malhotra e cols. (2007) usando um epítipo de Nef (AL9: AAVDLSHFL, posição de aminoácidos no HXB2 83-91), foi demonstrado que células de indivíduos infectados pelo subtipo B eram capazes de reconhecer mais de uma variante desse epítipo (GAVDLSHFL, AAADLSHFL, AAIDLSHFL, GALDLSHFL e GAFDLSHFL), no entanto a magnitude de resposta foi bem reduzida frente as variantes com dois aminoácidos diferentes, sendo essa resposta variável entre os indivíduos avaliados, demonstrando um papel do HLA nas diferentes respostas encontradas.

Esse epítipo é encontrado nos peptídeos 3 e 4 utilizados no nosso estudo, os quais, como citado anteriormente, foram responsáveis pela maior frequência de resposta na região 1. Todas seis variantes foram detectadas no presente estudo, sendo que quando avaliamos as respostas discordantes as posições 83 (G/A) e 85 (I/V/L/F) foram onde ocorriam diferenças com maior frequência. Concordante com o estudo de Malhotra e cols. (2007), o impacto da mudança em uma ou nas duas posições foi diferente entre os indivíduos. No indivíduo HC05 a diferença de apenas 1 aminoácido entre a sequência dos peptídeos referentes ao subtipo B, F1 e ao grupo M em relação ao vírus autólogo (GAL) e entre as três abordagens foi suficiente para não ser detectada resposta com os peptídeos referentes ao consenso F1 (GAV), e ter uma variação de magnitude entre os peptídeos referentes ao consenso B (AAL) e os referentes ao M (GAF) de $250 \text{ CFS}/10^6 \text{ CMSP}$. Enquanto no indivíduo SR25 a diferença em dois

aminoácidos levou a redução da magnitude de resposta pela metade quando comparados os peptídeos do consenso B (o qual nessas posições possui os mesmos aminoácidos do vírus do SR25, AAL, 1135 CFS/10⁶ CMSP) e M (GAF, 655 CFS/10⁶ CMSP), enquanto os peptídeos referentes a F (GAV) não demonstraram uma resposta positiva, apenas 30 CFS/10⁶ CMSP.

6.4. Relação entre controle da carga viral e resposta Nef específica

Diferentes estudos têm avaliado se existe relação entre viremia e resposta de células T, sendo os resultados controversos, enquanto alguns apontam para uma correlação negativa entre resposta de célula T e viremia (Edwards *et al.*, 2002; Ogg *et al.*, 1998), outros demonstram uma correlação positiva (Betts *et al.*, 2001; Buseyne *et al.*, 2002) ou mesmo uma ausência de correlação (Addo *et al.*, 2003; Frahm *et al.*, 2004). No presente estudo a frequência de indivíduos capazes de reconhecer peptídeos derivados tanto do consenso do subtipo B quanto do F1 apresentou um valor moderadamente maior no grupo dos não controladores da carga viral (NC) em relação ao grupo dos controladores da carga viral (HC), para ambas as regiões analisadas. Quando foi avaliada a magnitude de resposta na região 1 não foi encontrada diferença entre os dois grupos, porém na região 3 os NC apresentaram uma magnitude de resposta significativamente maior que os HC.

Na tentativa de confirmar essa relação inversa entre controle da carga viral e resposta Nef específica o grupo dos HC foi subdividido em 3 grupos de acordo com o histórico de controle da carga viral. No HCc, composto por indivíduos que apresentavam mais de 70% dos pontos avaliados no histórico de carga viral acima do limite de detecção (>50 cópias de RNA/mL de plasma), foi encontrada uma porcentagem muito maior de indivíduos que eram capazes de reconhecer o *pool* de peptídeos na região 3 do que nos subgrupos HCa e HCb, ambos com um controle superior da carga viral. Embora esses dados tenham sido obtidos com um reduzido número de indivíduos existe uma clara tendência a uma menor resposta à região 3 dos indivíduos com melhor controle da carga viral.

Essa relação inversa entre resposta Nef específica e viremia também foi demonstrada em diferentes estudos (Betts *et al.*, 2001; Geldmacher *et al.*, 2007; Masemola *et al.*, 2004; Novitsky *et al.*, 2003), apontando para a necessidade de estímulo antigênico constante para a manutenção de uma resposta anti Nef.

Em um grupo de controladores de elite, apesar da detecção de uma resposta frente a peptídeos referentes a Nef, foi encontrada uma fraca correlação entre resposta Nef específica e supressão viral, ao contrário do que foi identificado para a resposta Gag específica, que apresentou uma forte correlação com a capacidade supressiva das células T CD8⁺ de indivíduos EC (Saez-Cirion *et al.*, 2009), reforçando a crescente associação entre resposta Gag de células T e controle da viremia (Edwards *et al.*, 2002; Emu *et al.*, 2008; Kiepiela *et al.*, 2007).

Apesar da resposta Nef específica não ter sido associada a um melhor controle viral no presente estudo e em outros trabalhos, é provável que ainda assim ela tenha um papel no controle viral. Em um dos indivíduos estudados, HC02, que possui mais de doze anos de infecção e nenhum ponto de carga viral acima do limite de detecção (50 ou 80 cópias de RNA/mL), foi encontrada uma forte resposta Nef específica. No trabalho de Saez-Cirion e cols. (2009) Nef foi a segunda proteína mais reconhecida tanto no grupo dos indivíduos EC que possuíam alta capacidade de supressão viral como nos com baixa supressão viral. Nossos dados corroboram, assim, com a visão que indivíduos capazes de controlar a replicação viral não fazem parte de um grupo homogêneo.

7. Conclusões

Nossos dados indicam que tanto a estratégia do consenso, quanto a do isolado mais próximo é capaz de estimular uma resposta HIV específica. Além disso, nosso estudo aponta que sequências referentes tanto ao subtipo B quanto ao F1 poderiam servir como base para o desenho de imunógenos pautados na proteína Nef.

- ✓ As regiões 1, 2 e 3 apresentaram as frequência mais alta de reconhecimento;
- ✓ Os peptídeos baseados tanto no consenso como no isolado dos subtipos B e F1 apresentaram níveis similares de reconhecimento antigênico, demonstrando que ambas estratégias podem ser consideradas para o desenho de antígenos vacinais;
- ✓ Foi detectada uma forte reatividade cruzada na resposta de células T frente aos peptídeos do subtipo B e F1 e do grupo M;
- ✓ Apesar de existir diferenças entre as distâncias genéticas entre as sequências do vírus de cada indivíduo em relação as sequências dos peptídeos utilizados isso não se refletiu na resposta;
- ✓ Indivíduos capazes de um melhor controle da carga viral, em geral, apresentaram uma frequência de resposta menor que os não controladores.

8. Perspectivas

- ✓ Avaliar a resposta Nef específica usando peptídeos derivados do consenso do subtipo C em indivíduos infectados pelo subtipo C;
- ✓ Avaliar a resposta Gag específica frente a peptídeos derivados do consenso do subtipo B, F1 e C;
- ✓ Verificar se existe reatividade entre os subtipos B, F1 e C no contexto de uma resposta Gag específica;
- ✓ Fazer a subtipagem do HLA dos indivíduos que participaram do estudo;
- ✓ Aumentar o número de indivíduos com diferentes níveis de controle da carga viral para confirmar a existência de uma relação entre resposta celular e controle da viremia.

9. Referências Bibliográficas

Abrahams M, Anderson J, Giorgi E, Seoighe C, Mlisana K, Ping L, *et al.* Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J Virol.* 2009 Apr;83(8):3556-67.

Addo M, Yu X, Rathod A, Cohen D, Eldridge R, Strick D, *et al.* Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol.* 2003 Feb;77(3):2081-92.

Allen T, Altfeld M, Geer S, Kalife E, Moore C, O'sullivan K, *et al.* Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol.* 2005 Nov;79(21):13239-49.

Appay V. 25 years of HIV research! ... and what about a vaccine? *Eur J Immunol.* 2009 Aug;39(8):1999-2003.

Artenstein A, Hegerich P, Beyrer C, Rungruenthanakit K, Michael N, Natpratan C. Sequences and phylogenetic analysis of the nef gene from Thai subjects harboring subtype E HIV-1. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1996 Apr;12(6):557-60.

Aulicino PC, Bello G, Rocco C, Romero H, Mangano A, Morgado MG, *et al.* Description of the first full-length HIV type 1 subtype F1 strain in Argentina: Implications for the origin and dispersion of this subtype in South America. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2007;23:1176-82.

Bansal A, Gough E, Ritter D, Wilson C, Mulenga J, Allen S, *et al.* Group M-based HIV-1 Gag peptides are frequently targeted by T cells in chronically infected US and Zambian patients. *Aids.* 2006 Feb;20(3):353-60.

Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, *et al.* Control of viremia and prevention of clinical Aids in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science*. 2000 Oct;290(5491):486-92.

Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Lopez-Galindez C. Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J Gen Virol*. 2004 Feb;85:399-407.

Bernardin F, Kong D, Peddada L, Baxter-Lowe L, Delwart E. Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J Virol*. 2005 Sep;79(17):11523-8.

Betts M, Ambrozak D, Douek D, Bonhoeffer S, Brenchley J, Casazza J, *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol*. 2001 Dec;75(24):11983-91.

Betts M, Nason M, West S, De Rosa S, Migueles S, Abraham J, *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006 Jun;107(12):4781-9.

Bhattacharya T, Daniels M, Heckerman D, Foley B, Frahm N, Kadie C, *et al.* Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science*. 2007 Mar;315(5818):1583-6.

Blankson J. Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses? *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):295-302.

Boletim Epidemiológico 2007. Boletim Epidemiológico - Aids e DST Ano IV - nº 1 [on line]. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids [capturado em 22 de dezembro de 2009]. Disponível em: <http://www.Aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>

Boletim Epidemiológico 2008. Boletim Epidemiológico - Aids e DST Ano V - nº 1 [on line]. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids [capturado em 22 de dezembro de 2009]. Disponível em: <http://www.Aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>

Bonaldo M, Martins M, Rudersdorf R, Mudd P, Sacha J, Piaskowski S, *et al.* Recombinant Yellow Fever Vaccine Virus 17D Expressing SIVmac239 Gag Induces SIV-Specific CD8+ T Cell Responses in Rhesus Macaques. *J Virol.* Epub 2010 Jan 20.

Bongertz V, Teixeira S, Grinztejn B, Pilotto J, Veloso V, Morgado M, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by plasma from B or F genotype infected individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Feb;100(1):85-9.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary Human-Immunodeficiency-Virus type-1 infection. *J Virol.* 1994 Sep;68(9):6103-10.

Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz M, Peffer N, Meyers H, *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med.* 1997 Feb;3(2):205-11.

Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, *et al.* Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med.* 1997 May;3(5):526-32.

Brander C, Frahm N, Walker BD. The challenges of host and viral diversity in HIV vaccine design. *Curr Opin Immunol.* 2006 Aug;18(4):430-7.

Brenchley J, Schacker T, Ruff L, Price D, Taylor J, Beilman G, *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004 Sep;200(6):749-59.

Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology.* 2006 Mar;7(3):235-9.

Brennan C, Brites C, Bodelle P, Golden A, Hackett JJ, Holzmayer V, *et al.* HIV-1 strains identified in Brazilian blood donors: significant prevalence of B/F1 recombinants. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2007 Nov;23(11):1434-41.

Briefing Boletim Epidemiológico 2009. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais [capturado em 22 de dezembro de 2009]. Disponível em: <http://www.Aids.gov.br/data/documents/stored>

Documents/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B2572A1B2-1C41-40F0-AE25-4BF127B5F498%7D/Briefing_boletim_2009_vers%E3o%20imprensa_25.11.09.pdf

Brindeiro R, Diaz R, Sabino E, Morgado M, Pires I, Brigido L, *et al.* Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *Aids*. 2003 May;17(7):1063-9.

Brumme Z, Brumme C, Carlson J, Streeck H, John M, Eichbaum Q, *et al.* Marked epitope- and allele-specific differences in rates of mutation in human immunodeficiency type 1 (HIV-1) Gag, Pol, and Nef cytotoxic T-lymphocyte epitopes in acute/early HIV-1 infection. *J Virol*. 2008 Sep;82(18):9216-27.

Buseyne F, Riviere Y. The flexibility of the TCR allows recognition of a large set of naturally occurring epitope variants by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*. 2001 Jul;13(7):941-50.

Buseyne F, Scott-Algara D, Porrot F, Corre B, Bellal N, Burgard M, *et al.* Frequencies of ex vivo-activated human immunodeficiency virus type 1-specific gamma-interferon-producing CD8+ T cells in infected children correlate positively with plasma viral load. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12414-22.

Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EF, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espirito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Dec;101(8):881-5.

Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrin J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1995 Jan 26;332(4):201-8.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, *et al.* Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2000 Sep 15;275(1):107-15.

Cavalcanti A, Lacerda H, Brito A, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Nov;102(7):785-92.

Chakrabarti B, Kong W, Wu B, Yang Z, Friberg J, Ling X, *et al*. Modifications of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein enhance immunogenicity for genetic immunization. *J Virol*. 2002 Jun;76(11):5357-68.

Cohen J. Public health. Aids vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science*. 2003 Feb;299(5611):1290-1.

Cox W, Tartaglia J, Paoletti E. Induction of cytotoxic T lymphocytes by recombinant canarypox (ALVAC) and attenuated vaccinia (NYVAC) viruses expressing the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology*. 1993 Aug;195(2):845-50.

Currier JR, Viswapoka U, Tovanabutra S, Mason CJ, Birx DL, McCutchan FE, *et al*. CTL epitope distribution patterns in the Gag and Nef proteins of HIV-I from subtype A infected subjects in Kenya: Use of multiple peptide sets increases the detectable breadth of the CTL response. *Bmc Immunol*. 2006 Apr;7.

Daniel M, Kirchhoff F, Czajak S, Sehgal P, Desrosiers R. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science*. 1992 Dec;258(5090):1938-41.

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

Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: Mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):406-16.

Doria-Rose NA, Learn GH, Rodrigo AG, Nickle DC, Li F, Mahalanabis M, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 subtype B ancestral envelope protein is

functional and elicits neutralizing antibodies in rabbits similar to those elicited by a circulating subtype B envelope. *J Virol.* 2005 Sep;79(17):11214-24.

Duerr A, Wasserheit JN, Corey L. HIV vaccines: New frontiers in vaccine development. *Clin Infect Dis.* 2006 Aug;43(4):500-11.

Edwards B, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan M, Goepfert P. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol.* 2002 Mar;76(5):2298-305.

Eigen M, Winkler-Oswatitsch R, Dress A. Statistical geometry in sequence space: a method of quantitative comparative sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Aug;85(16):5913-7.

Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin J, *et al.* HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol.* 2008 Jun;82(11):5398-407.

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Nov;102(7):809-15.

Ferrari G, Humphrey W, McElrath MJ, Excler JL, Duliege AM, Clements ML, *et al.* Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb;94(4):1396-401.

Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, Garcia JC, *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood.* 2009 Apr;113(17):3978-89.

Fiebig E, Wright D, Rawal B, Garrett P, Schumacher R, Peddada L, *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids.* 2003 Sep;17(13):1871-9.

Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, Vittinghoff E, Buchbinder S, Leung JY, *et al.* Control of HIV-1 viremia and protection from Aids are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5140-5.

Flynn N, Forthal D, Harro C, Judson F, Mayer K, Para M. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2005 Mar;191(5):654-65.

Frahm N, Korber BT, Adams CM, Szinger JJ, Draenert R, Addo MM, *et al.* Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol.* 2004 Mar;78(5):2187-200.

Frahm N, Nickle DC, Linde CH, Roach T, Walker BD, Allen TM, *et al.* Increased detection of HIV-specific T cell responses by combination of central sequences with comparable immunogenicity. *Aids.* 2008 Feb;22(4):447-56.

Friedrich TC, Valentine LE, Yant LJ, Rakasz EG, Piaskowski SM, Furlott JR, *et al.* Subdominant CD8(+) T-cell responses are involved in durable control of Aids virus replication. *J Virol.* 2007;81(7):3465-76.

Galvin S, Cohen M. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Jan;2(1):33-42.

Gao F, Vidal N, Li Y, Trask S, Chen Y, Kostrikis L, *et al.* Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2001 May;17(8):675-88.

Gao F, Weaver EA, Lu ZJ, Li YY, Liao HX, Ma BJ, *et al.* Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type I group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):1154-63.

Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, *et al.* Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. *N Engl J Med.* 1999 Aug;341(6):394-402.

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

Geldmacher C, Currier J, Herrmann E, Haule A, Kuta E, McCutchan F, *et al.* CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2440-8.

Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, *et al.* Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2006;22(11):1186-91.

Goonetilleke N, Liu M, Salazar-Gonzalez J, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov V, *et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009 Jun;206(6):1253-72.

Goudsmit J, Bogaards J, Jurriaans S, Schuitemaker H, Lange J, Coutinho R, *et al.* Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *Aids.* 2002 Mar;16(5):791-3.

Goulder PJ, Bunce M, Krausa P, McIntyre K, Crowley S, Morgan B, *et al.* Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1996 Dec 10;12(18):1691-8.

Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, *et al.* Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet.* 2001 Apr;357(9263):1149-53.

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):289-95.

Guimarães M, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado M. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2002 Nov;18(17):1261-9.

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

Haaland R, Hawkins P, Salazar-Gonzalez J, Johnson A, Tichacek A, Karita E, *et al*. Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS Pathog*. 2009 Jan;5(1):e1000274.

Haase A. The Aids lentivirus connection. *Microb Pathog*. 1986 Feb;1(1):1-4.

Hanke T, McMichael AJ, Dorrell L. Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88:1-12.

Hemelaar J, Gouws E, Ghyss PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids*. 2006 Oct;20(16):W13-W23.

Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, *et al*. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2002 Dec;18(18):1339-50.

HIV Sequence Database. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). Los Alamos National Laboratory. [on line]. Califórnia,USA; [capturado em 26 de Janeiro de 2010]. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, *et al*. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*. 2007 Feb;26(2):257-70.

Ho D, Neumann A, Perelson A, Chen W, Leonard J, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan;373(6510):123-6.

IAVI – International Aids Vaccine Initiative. *Aids Vaccine Blueprint 2008: A Challenge to the Field, A Roadmap for Progress*. 2008.

Inwoley A, Recordon-Pinson P, Dupuis M, Gaston J, Genête M, Minga A, *et al*. Cross-clade conservation of HIV type 1 Nef immunodominant regions recognized by CD8+ T

cells of HIV type 1 CRF02_AG-infected Ivorian (West Africa). *Aids Res Hum Retroviruses*. 2005 Jul;21(7):620-8.

Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong J, *et al*. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. *Aids Res Hum Retroviruses*. 1994 Jul;10(7):877-9.

Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, *et al*. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 1999 Mar 15;189(6):991-8.

Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998 Jul 2;339(1):33-9.

Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, *et al*. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):405-11.

Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, *et al*. Identification and characterisation of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Article]. 2008 May;105(21):7552-7.

Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, *et al*. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):46-53.

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

Korber B, Letvin N, Haynes B. T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency virus, the virus with a thousand faces. *J Virol*. 2009 Sep;83(17):8300-14.

Kostrikis L, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho D. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol*. 1995 Oct;69(10):6122-30.

- Kothe DL, Li YY, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Zammit KP, Salazar MG, *et al.* Ancestral and consensus envelope immunogens for HIV-1 subtype C. *Virology*. 2006 Sep;352(2):438-49.
- Koup R, Safrit J, Cao Y, Andrews C, McLeod G, Borkowsky W, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4650-5.
- Krohn K, Stanescu L, Blazevic V, Vesikari T, Ranki A, Ustav M. A DNA HIV-1 vaccine based on a fusion gene expressing non-structural and structural genes of consensus sequence of the A-C subtypes and the ancestor sequence of the F-H subtypes. Preclinical and clinical studies. *Microbes Infect*. 2005 Nov;7(14):1405-13.
- Laukkanen T, Carr JK, Janssens W, Liitsola K, Gotte D, McCutchan FE, *et al.* Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *Virology*. [Article]. 2000 Mar;269(1):95-104.
- Lefrère J, Morand-Joubert L, Mariotti M, Bludau H, Burghoffer B, Petit J, *et al.* Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997 Aug;90(3):1133-40.
- Leitner T, Alaeus A, Marquina S, Lilja E, Lidman K, Albert J. Yet another subtype of HIV type 1? *Aids Res Hum Retroviruses*. 1995 Aug;11(8):995-7.
- Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G, *et al.* Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J Virol*. 1995 Jan;69(1):263-71.
- Louwagie J, McCutchan F, Peeters M, Brennan T, Sanders-Buell E, Eddy G, *et al.* Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *Aids*. 1993 Jun;7(6):769-80.
- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, *et al.* First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency

virus type 1 infection: Safety and host response. *Am J Infect Dis.* 1998 Jul;178(1):92-100.

Machado L, Ishak M, Vallinoto A, Lemos J, Azevedo V, Moreira M, *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2009 Oct;25(10):961-6.

Malhotra U, Nolin J, Horton H, Li F, Corey L, Mullins J, *et al.* Functional properties and epitope characteristics of T-cells recognizing natural HIV-1 variants. *Vaccine.* 2009 Nov;27(48):6678-87.

Masemola A, Mashishi T, Khoury G, Mohube P, Mokgotho P, Vardas E, *et al.* Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8(+) T cells: Correlation with viral load. *J Virol.* 2004 Apr;78(7):3233-43.

Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane H, Martin M. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):164-9.

Mehandru S, Poles M, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004 Sep;200(6):761-70.

Meloni S, Kim B, Sankalé J, Hamel D, Tovanabutra S, Mboup S, *et al.* Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12438-45.

Migueles S, Laborico A, Shupert W, Sabbaghian M, Rabin R, Hallahan C, *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):1061-8.

Migueles S, Osborne C, Royce C, Compton A, Joshi R, Weeks K, *et al.* Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity.* 2008 Dec;29(6):1009-21.

Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2709-14.

Ministério da Saúde. Epidemiologia [on line]. [capturado em 22 de dezembro de 2009]. Disponível em: <http://www.Aids.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823PTBRIE.htm>

Morgado M, Sabino E, Shpaer E, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes M, *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1994 May;10(5):569-76.

Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Mar;97(2):143-50.

Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CBG, Costa CI, Neves I, Veloso VG, *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1998;18(5):488-94.

Muñoz A, Kirby A, He Y, Margolick J, Visscher B, Rinaldo C, *et al.* Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 Apr;8(5):496-505.

Myers G, MacInnes K, Korber B. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1992 Mar;8(3):373-86.

Nabel GJ. HIV vaccine strategies. *Vaccine.* 2002 May;20(15):1945-7.

Nickle DC, Jensen MA, Gottlieb GS, Shriner D, Learn GH, Rodrigo AG, *et al.* Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science.* 2003 Mar;299(5612):1515-7.

Novitsky V, Gilbert P, Peter T, McLane M, Gaolekwe S, Rybak N, *et al.* Association between virus-specific T-cell responses and plasma viral load in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):882-90.

O'Brien T, Blattner W, Waters D, Eyster E, Hilgartner M, Cohen A, *et al.* Serum HIV-1 RNA levels and time to development of Aids in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA*. 1996 Jul;276(2):105-10.

O'Connell K, Bailey J, Blankson J. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Dec;30(12):631-7.

Ogg G, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar P, Nowak M, Monard S, *et al.* Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998 Mar;279(5359):2103-6.

Ouverney E, Teixeira S, Silva-de-Jesus C, Hacker M, Morgado M, Bastos F, *et al.* HIV-1 binding and neutralizing antibodies of injecting drug users. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Sep;38(9):1313-20.

Pantaleo G, Fauci A. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:825-54.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci A. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1993 Feb;328(5):327-35.

Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, *et al.* Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995 Jan 26;332(4):209-16.

Piatak MJ, Saag M, Yang L, Clark S, Kappes J, Luk K, *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993 Mar;259(5102):1749-54.

Pires IL, Soares MA, Speranza FAB, Ishii SK, Vieira MCG, Gouvea M, *et al.* Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the Army Health Service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):426-30.

Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant

glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis.* 2006 Dec;194(12):1661-71.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):871-2.

Poignard P, Klasse P, Sattentau Q. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today.* 1996 May;17(5):239-46.

Poles M, Elliott J, Taing P, Anton P, Chen I. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2001 Sep;75(18):8390-9.

Preston B, Poiesz B, Loeb L. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 1988 Nov;242(4882):1168-71.

Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li CJ, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine.* 2000 Mar;342(13):921-9.

Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AidsVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine.* 2009 Dec;361(23):2209-20.

Robertson D, Hahn B, Sharp P. Recombination in Aids viruses. *J Mol Evol.* 1995 Mar;40(3):249-59.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000 Apr;288(5463):55-7.

Rodés B, Toro C, Paxinos E, Poveda E, Martinez-Padial M, Benito J, et al. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids.* 2004 May;18(8):1109-16.

Rolland M, Jensen MA, Nickle DC, Yan J, Learn GH, Heath L, et al. Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol.* 2007 Aug;81(16):8507-14.

Rousseau C, Daniels M, Carlson J, Kadie C, Crawford H, Prendergast A, *et al.* HLA class I-driven evolution of human immunodeficiency virus type 1 subtype c proteome: immune escape and viral load. *J Virol.* 2008 Jul;82(13):6434-46.

Rutebemberwa A, Currier J, Jagodzinski L, McCutchan F, Birx D, Marovich M, *et al.* HIV-1 MN Env 15-mer peptides better detect HIV-1 specific CD8 T cell responses compared with consensus subtypes B and M group 15-mer peptides. *Aids.* 2005 Jul;19(11):1165-72.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, *et al.* Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6340-6.

Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr;104(16):6776-81.

Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, Urrutia A, Versmisse P, Lacabaratz C, *et al.* Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses. *J Immunol.* 2009;182(12):7828-37.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul;4(4):406-25.

Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, *et al.* Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009 Jun;206(6):1273-89.

Salminen M, Carr J, Burke D, McCutchan F. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1995 Nov;11(11):1423-5.

Santos A, Schrago C, Martinez A, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa T, *et al.* Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007 Jul;45(3):328-33.

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

Santra S, Korber BT, Muldoon M, Barouch DH, Nabel GJ, Gao F, *et al.* A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Jul;105(30):10489-94.

Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med.* 1996 Aug 15;125(4):257-64.

Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science.* 1999 Feb 5;283(5403):857-60.

Sheppard H, Lang W, Ascher M, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4⁺ T-cell levels. *Aids.* 1993 Sep;7(9):1159-66.

Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, *et al.* Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature.* 2002 Jan;415(6869):331-5.

Sierra M, Thomson M, Ríos M, Casado G, Castro R, Delgado E, *et al.* The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF. *Infect Genet Evol.* 2005 Apr;5(3):209-17.

Stefani M, Pereira G, Lins J, Alcantara K, Silveira A, Viegas A, *et al.* Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol.* 2007 Jul;39(3):205-9.

- Stoddard E, Ni H, Cannon G, Zhou C, Kallenbach N, Malamud D, *et al.* gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue. *J Virol.* 2009 Sep;83(17):8596-603.
- Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, Cohen KW, Jolin JS, Meier A, *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8(+) T cells. *Plos Med.* 2008;5(5):790-804.
- Streeck H, Jolin J, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson R, Kwon D, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *J Virol.* 2009 Aug;83(15):7641-8.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1596-9.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993 May;10(3):512-26.
- Tanuri A, Swanson T, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, *et al.* HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Jan;20(1):60-6.
- Tartaglia J, Cox W, Taylor J, Perkus M, Riviere M, Meignier B, *et al.* Highly attenuated poxvirus vectors. *Aids Res Hum Retroviruses.* 1992 Aug;8(8):1445-7.
- Teixeira SL, Bastos FI, Telles PR, Hacker MA, Brigido LF, de FOCA, *et al.* HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. *J Clin Virol.* 2004 Nov;31(3):221-6.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL *W*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov;22(22):4673-80.

Trial Database- IAVI. [on line] [capturado em 10 de fevereiro de 2010]. Disponível em: <http://www.iavireport.org/trials-db/Pages/default.aspx>

Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, *et al.* High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology*. 1999 Jun;259(1):99-109.

Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, *et al.* Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2000 Jan;16(2):139-51.

Turchi MD, Diaz RS, Martelli CMT, Sabino EC, da Silva WP, Ferreira O, *et al.* Genetic diversity and HIV-1 incidence estimation among cocaine users in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Aug;30(5):527-32.

Turk G, Gherardi MM, Laufer N, Saracoo M, Luzzi R, Cox JH, *et al.* Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants. *J Virol*. 2008 Mar;82(6):2853-66.

UNAIDS/WHO. Aids epidemic update : December 2009; [on line] [capturado em 19 de dezembro de 2009]. Disponível em: http://data.unAids.org/pub/Report/2009/2009_epidemic_update_en.pdf

Varella RB, Ferreira SB, Castro MB, Tavares MD, Zalis MG. Prevalence of resistance-associated mutations in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals failing HAART in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2008 Oct;12(5):380-4.

Veras NMC, Veras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brigido MM, *et al.* HIV type 1 genetic variability in Central Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1481-9.

Vicente A, Otsuki K, Silva N, Castilho M, Barros F, Pieniazek D, *et al.* The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000 Apr;23(4):327-31.

Vidal N, Mulanga C, Bazepeo S, Lepira F, Delaporte E, Peeters M. Identification and molecular characterization of subtype A4 in central Africa. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2006 Feb;22(2):182-7.

Walensky R, Rosenberg E, Ferraro M, Losina E, Walker B, Freedberg K. Investigation of primary human immunodeficiency virus infection in patients who test positive for heterophile antibody. *Clin Infect Dis*. 2001 Aug;33(4):570-2.

Watanaveeradej V, Benenson MW, De Souza M, Sirisopana N, Nitayaphan S, Tontichaivanich C, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in preparation for a phase III prime-boost vaccine trial in Thailand and a new approach to HIV type 1 genotyping. *Aids Research and Human Retroviruses*. 2006 Aug;22(8):801-7.

Wei X, Ghosh S, Taylor M, Johnson V, Emini E, Deutsch P, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995 Jan;373(6510):117-22.

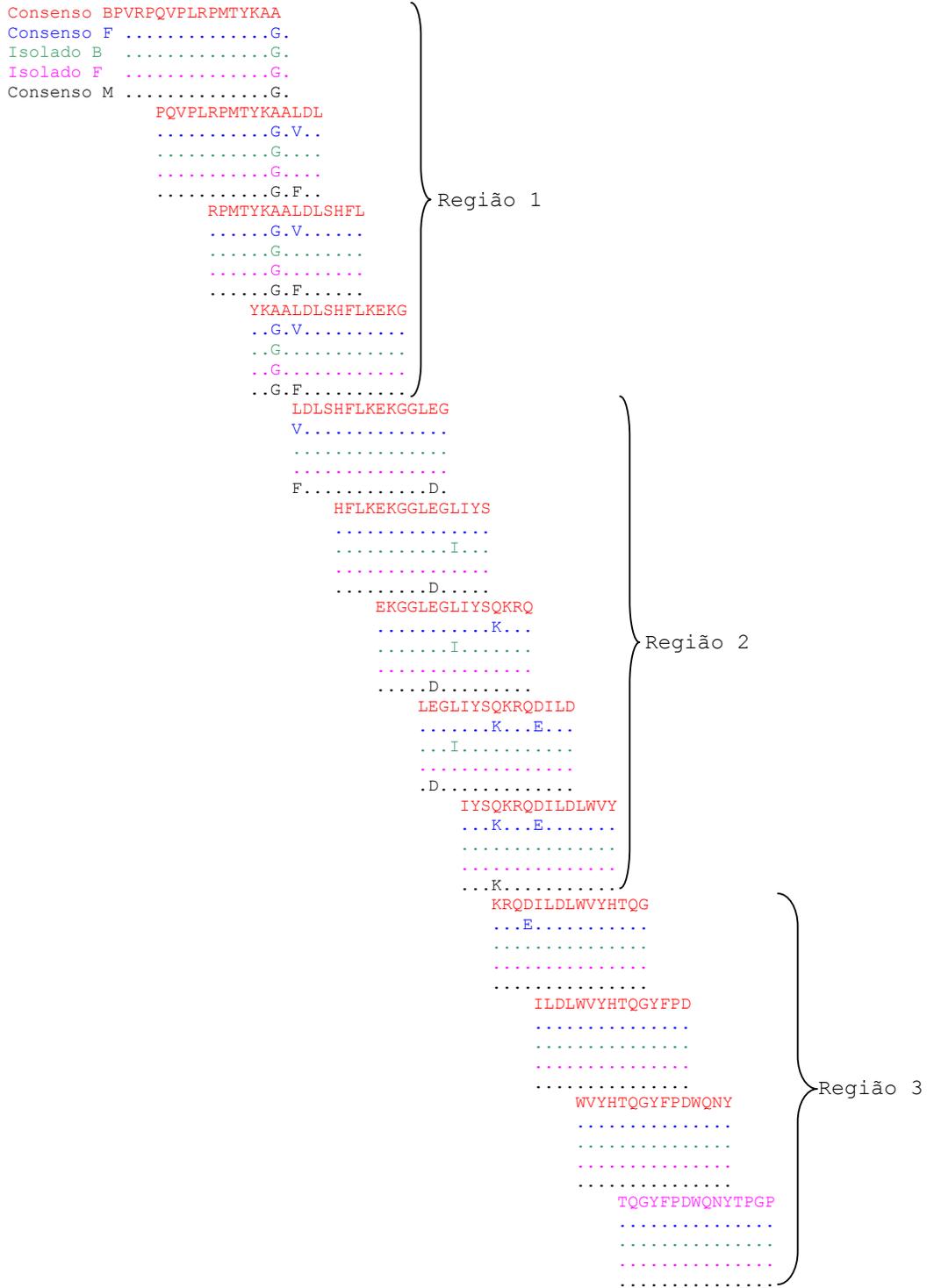
Wu L, KewalRamani V. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):859-68.

Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*. 2001;92(4):371-3.

Yusim K, Korber BT, Brander C, Haynes BF, Koup R, Moore JP, *et al.*, editors. *HIV Molecular Immunology 2009*. Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group T-6; 2009.

10. Anexos

Sequência dos peptídeos



Consenso B	FPDWQNYTPGGIRY	}	Região 3 cont
Consenso F		
Isolado B		
Isolado FT..		
Consenso M		
	WQNYTPGGIRYPLTF		
		
		
T....L		
		
	PGPGIRYPLTFGWCF	}	Região 4
		
		
T....L....		
		
	IRYPLTFGWCFKLVP		
		
		
	T....L.....		
		
	LTFGWCFKLVPVEPE	}	Região 4
D..		
D.D		
	..L.....		
		
	WCFKLVPVEPEQVEE		
D..E..K		
D.DE..K		
		
		
	LVPVEPEQVEEANEG		
D..E..K....		
D.DE..K...R		
		
		

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](#)