NATALIE GUIDA MÜLLER

**Identificação de epitopos da protease de HIV-1 alvos
de respostas de células T CD4+ em pacientes
infectados pelo HIV-1**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Alergia e
Imunopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

São Paulo

2009

NATALIE GUIDA MÜLLER

**Identificação de epitopos da protease de HIV-1 alvos
de respostas de células T CD4+ em pacientes
infectados pelo HIV-1**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Alergia e
Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Müller, Natalie Guida

Identificação de epitopos da protease de HIV-1 alvos de respostas de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV-1 / Natalie Guida Müller. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Edecio Cunha-Neto.

Descritores: 1.HIV-1 2.Epitopos 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Inibidores de proteases HIV 5.Anti-retrovirais

USP/FM/SBD-442/09

Dedico este trabalho ao meu marido Danilo e minha filha Sophia, meus amores, aos quais sempre terei garra para batalhar e viver. Aos meus pais, Henrique e Cecília, e minha irmã, Stefanie, todo meu amor e gratidão.

Agradecimentos

As experiências profissionais e pessoais vividas nestes últimos três anos fizeram com que hoje eu avaliasse minha profissão e minha pessoa de outra forma. Entre erros e acertos, o amadurecimento veio a cada dia. Não poderia deixar de agradecer algumas pessoas que fizeram parte deste ciclo da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edecio Cunha Neto, pela oportunidade de aprender um pouco do imenso mundo chamado ciência e pelas discussões científicas e pessoais que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

À minha co-orientadora, Dra. Sandra do Lago Moraes, que também me abriu as portas para a realização deste trabalho. Obrigada pelas inúmeras horas de alegrias e de tristezas, pelos dias que passamos juntas e pelas tantas conversas que tivemos que também me ensinaram a amadurecer.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelo acolhimento em seu laboratório, sem o qual não teria tido contato com o fascinante universo da Imunologia.

Aos demais alunos e funcionários do projeto PROTEASE, Juliana, Hugo, especialmente a Edna pelo companheirismo em tantos momentos de bancada e Marina pela força nos últimos dias antes da entrega desta dissertação.

Aos demais integrantes do grupo do Prof. Dr. Edecio Cunha Neto, Daniela, Susan, Rafael, Camila, Andréia, Priscila, Eliane, Luciana, Adriana, Simone.

Ao Dr. Esper Kallas, pelas sugestões e discussões de diversos pontos de minha dissertação e Dra. Cristina Kokron.

Aos demais integrantes do LIM60, Karina (e Artur), Fernanda, Andréia, Bianca, Raphaella, Leandro, Tereza, Thais, Hernan, Fábio, Maria Candida, Helena, Ruth, Carlos, Maíra, Denise, Keity, Santa, Issler, Sérgio, Inês.

A todo pessoal do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT-DST/AIDS), especialmente a Dra. Rosa Alencar e Dra. Leda Jamal e a Sra. Neves, chefe da enfermagem.

Aos pacientes HIV+ que se prontificaram a doar suas amostras para a realização deste trabalho e acreditaram que esse pudesse fazer parte do sonho de uma vida melhor para 30 milhões de indivíduos infectados no mundo.

Aos colegas do Laboratório HLA, especialmente Hécio Rodrigues, pela realização da tipagem HLA dos pacientes e esclarecimento dos resultados obtidos.

Aos Drs. Alessandro Sette e John Sidney, La Jolla Institute of Allergy and Immunology, San Diego, USA, pela realização dos ensaios de ligação a moléculas HLA.

Aos demais colegas do laboratório de Imunologia do InCor, grupo da Dra. Verônica Coelho e da Dra. Luiza Guglielmi, obrigada pela amizade.

Aos meus pais, Henrique e Cecília, por sempre terem me ensinado a ter “Punho forte e sempre em frente”.

À minha querida irmã, Stefanie, pelos conselhos e ombro amigo, sempre.

Ao meu marido, Danilo, meu companheiro fiel de vida, a qual estamos batalhando muito para vencer... e venceremos.

À minha filha Sophia, minha sincera razão de viver e de vencer todos os obstáculos da vida, meu sentimento por você é o mais puro e forte que existe.

Sumário

Agradecimentos.....	iv
Sumário	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Resumo.....	xv
Summary	xvii
1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia do HIV-1	1
1.1.1 Epidemiologia global e no Brasil	1
1.2 Resposta imune contra o HIV.....	3
1.3 Variabilidade do HIV-1.....	4
1.4 Predição de epitopos de células T promíscuos.....	5
1.4.1 Identificação e caracterização de epitopos de células T	7
1.5 Mutações induzidas por drogas	8
1.5.1 Dados de mutações de resistência a drogas no Brasil	9
1.6 Reconhecimento de epitopos de moléculas-alvo de terapia antiretroviral por células T.....	10
1.6.1 Epitopos identificados na protease do HIV-1	10
1.6.2 Reconhecimento por linfócitos T de epitopos contendo mutações induzidas por drogas antiretrovirais	12
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo Principal	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1 Indivíduos da pesquisa	16
3.1.1 Características e procedência da população	16
3.1.2 Aspectos éticos da pesquisa	19
3.2 Processamento das amostras de sangue	19
3.2.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	20
3.2.2 Congelamento das CMSP	21
3.2.3 Descongelamento das CMSP.....	21
3.3 Extração de DNA.....	22
3.4 Tipagem de HLA	23
3.5 Seqüenciamento da protease do HIV-1 endógeno dos pacientes infectados	23

3.6	Peptídeos da protease de HIV-1	24
3.6.1	Seleção dos peptídeos	24
3.6.2	Síntese dos Peptídeos da protease de HIV-1	29
3.7	Análise de divisão celular por Citometria de fluxo baseado em diluição de corante vital.....	29
3.7.1	Ensaio de proliferação das células marcadas com CFSE.....	30
3.7.2	Reação de imunofluorescência	31
3.7.3	Análise da citômetria de fluxo.....	32
3.7.4	Estabelecimento de cut-off para os ensaios de proliferação	33
3.8	Ensaio de ligação dos peptídeos selecionados a moléculas HLA de classe II	35
4.	Resultados	37
4.1	Dados dos pacientes.....	37
4.2	Análise de seqüenciamento e genotipagem de resistência da protease do HIV-1 endógeno dos pacientes HIV-1+	39
4.3	Análise de divisão celular por citometria de fluxo baseado em diluição de corante vital (ensaio de CFSE)	47
4.4	Comparação entre respostas de células T e seqüência da protease endógena.....	54
4.5	Respostas de células T dos pacientes cujas seqüências endógenas da protease correspondem às seqüências dos peptídeos.....	62
4.6	Reconhecimento específico e cruzado de seqüências endógenas da protease correspondentes às seqüências dos peptídeos em estudo.	65
4.7	Tipagem HLA e ensaio de ligação a moléculas HLA de classe II.....	69
5.	Discussão	77
6.	Conclusão	87
Anexos		88
A.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88
B.	Dados Brutos dos Ensaios de Proliferação Celular.....	92
C.	Determinação de Cut-off para Ensaios de Proliferação	94
D.	Ensaios de Ligação a moléculas HLA Classe II	96
Referências Bibliográficas		97

Lista de Figuras

- Figura 1.** Número estimado de indivíduos vivendo com HIV em 2007 2
- Figura 2.** Estrutura cristalográfica da protease de HIV mostrando os sítios de mutações selecionadas por inibidores da protease mais freqüentes. 9
- Figura 3.** Seqüência da protease do HIV-1, isolado HXB2 (99 aminoácidos) (disponível em <http://www.hiv-web.lanl.gov/content/index>). Os sítios onde ocorrem as mutações selecionadas por inibidores da protease mais freqüentes no Brasil estão sublinhados.25
- Figura 4.** Janela do TEPITOPE com a varredura dos 99 aminoácidos da seqüência da protease de HIV-1, isolado HXB2, considerando um limiar de 5%. Seqüências previstas de se ligarem às moléculas de HLA-DR são assinaladas em azul e o aminoácido em vermelho corresponde ao resíduo hidrofóbico com função de âncora (P1), necessário para a ligação de alta afinidade do peptídeo para muitas moléculas de HLA-DR. Destacado em verde, três regiões da protease selecionadas com previsão de ligação a múltiplas moléculas HLA-DR: região dos aminoácidos 4-23, 45-64 e 76-95.26
- Figura 5.** Estratégia de análise do ensaio de proliferação de células marcadas com o corante CFSE. Células mononucleares do sangue periférico de paciente infectado por HIV-1 marcadas com CFSE foram estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 por 5 dias e coletadas para realização da reação de imunofluorescência e aquisição em citômetro FACS Canto. A análise foi feita utilizando-se o software Flow Jo. Foram adquiridos 10.000 eventos. 34
- Figura 6.** Alinhamento das seqüências da protease do HIV-1 endógeno de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em destaque nas caixas vermelhas estão as três regiões da protease selecionadas para identificação de epitopos de células T CD4+ (Região 4-23, 45-64 e 76-95).40
- Figura 7.** Freqüência dos subtipos de HIV-1 nos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS).40
- Figura 8.** Freqüência das três seqüências selvagens HXB2 da protease de HIV-1 e das mutações selecionadas por inibidores de protease (IP) inclusas ou não nos peptídeos de três regiões da protease, região 4-23 (a), 45-64 (b) e 76-95 (c), encontradas nas seqüências endógenas dos 40 pacientes infectados por HIV-1. A seqüência selvagem e mutações incorporadas nos peptídeos do

nosso estudo estão destacadas em vermelho, e as mutações não incluídas nos peptídeos estão destacadas em verde.42

Figura 9. Genotipagem de resistência ao Lopinavir (LPV) e ao Atazanavir (ATV) de 31 pacientes infectados por HIV-1 em uso de LPV (a,b) e de 9 pacientes infectados por HIV-1 em uso de ATV (c,d). I= resistência intermediária; R= resistente; S= sensível.46

Figura 10. Número de peptídeos da protease de HIV-1, selvagens e mutantes, reconhecidos por células T CD4⁺ e T CD8⁺ de cada um dos pacientes infectados por HIV-151

Figura 11. Frequência de reconhecimento dos peptídeos da protease de HIV-1, selvagens e mutantes, por células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes infectados por HIV-1 (n=40). Em destaque em vermelho, peptídeo selvagem HXB2 4-23 e peptídeos mutantes da mesma região. Em destaque em verde, peptídeo selvagem HXB2 45-64 e peptídeos mutantes da mesma região. Em destaque em azul, peptídeo selvagem HXB2 76-95 e peptídeos mutantes da mesma região52

Figura 12. Magnitude de resposta proliferativa de células T CD4⁺ e CD8⁺ aos peptídeos selvagens e mutantes da protease em PBMC de 40 pacientes infectados por HIV-1. Magnitude de resposta de células (A) T CD4⁺ por peptídeo, (B) T CD8⁺ por peptídeo, (C) T CD4⁺ por paciente e (D) T CD8⁺ por paciente. As barras representam a mediana dos índices de estimulação positivos com os respectivos interquartis. A magnitude de resposta foi determinada a partir do cálculo das medianas considerando-se apenas os resultados acima do índice de estimulação (IE>2,5 para CD4 e IE>3,5 para CD8)53

Figura 13. Resultados de resposta proliferativa de células T CD4⁺ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 4-23) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam os índices de estimulação positivos para CD4⁺ (>2,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(10)=400).56

Figura 14. Resultados da resposta proliferativa de células T CD4⁺ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 45-64) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD4⁺ (>2,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(14)=560).57

- Figura 15.** Resultados da resposta proliferativa de células T CD4+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 76-95) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD4+ ($>2,5$). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(11)=440).....58
- Figura 16.** Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 4-23) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD8+ ($>3,5$). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(10)=400).....59
- Figura 17.** Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 45-64) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivo para CD8+ ($> 3,5$). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(14)=560).....60
- Figura 18.** Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 76-95) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD8+ ($>3,5$). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(11)=440).....61
- Figura 19.** Reconhecimento de peptídeos da protease do HIV-1 por células T CD4+ e CD8+ nas regiões 4-23 (A), 45-64 (B) e 76-95 (C) por pacientes que apresentam seqüência endógena idêntica a um dos peptídeos em estudo.64

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Porcentagens das principais mutações na sequência do gene da protease de HIV-1 relacionadas à resistência aos inibidores da protease em 328 pacientes no Brasil.11
- Tabela 2.** Epítomos de células T CD8+ na protease de HIV-1 registrados no bando de dados Los Alamos (LANL) (<http://www.hiv-web.lanl.gov/content/immunology>), a espécie e os respectivos MHC em que foram descritos e o número de registro no LANL.....12
- Tabela 3.** Números de pacientes infectados por HIV-1 (HIV-1+) em acompanhamento clínico ambulatorial no Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT-DST/AIDS) com cada esquema de terapia antiretroviral (ARV) com Inibidor de protease (IP).....17
- Tabela 4.** Moléculas HLA-DR disponíveis pelo algoritmo TEPITOPE.26
- Tabela 5.** Sequências de peptídeos da protease de HIV-1 (cepa HXB2 e mutantes) selecionadas pelo TEPITOPE e o número de moléculas de HLA-DR ligantes previstas considerando um limiar de 5% e contendo as mutações induzidas por drogas mais frequentes. A frequência de mutações foi calculada em estudo prévio de 328 pacientes infectados por HIV-1 (Brindeiro e cols., dados não publicados).28
- Tabela 6.** Dados dos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS).38
- Tabela 7.** Frequência das principais mutações selecionadas por inibidores da protease (IP) e incluídas nas regiões dos aminoácidos 4-23, 45-64 e 76-95 da protease encontradas nos 40 pacientes infectados por HIV-1 do presente estudo. A frequência de portadores de sequências idênticas à HXB2 (4-23, 45-64 e 76-95) em cada região também está registrada.43
- Tabela 8.** Frequência de pacientes infectados por HIV-1 carreadores de sequências endógenas da protease idênticas a cada peptídeo selecionado, das regiões 4-23, 45-64 e 76-95 (sequências selvagens, cepa HXB2) da protease de HIV-1 e os peptídeos incorporando as principais mutações relacionadas aos inibidores da protease (IP).44
- Tabela 9.** Genotipagem de resistência aos inibidores da protease de 40 infectados por HIV-1.45

- Tabela 10.** Análise de proliferação celular de células T CD4+. Células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com 10 μ M CFSE, estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 (10 μ M) e controles (SEB (10 μ g/mL) e/ou PHA (5 μ g/mL)) e mantidas em cultura por 5 dias. Após esse período, as células foram marcadas com conjugados fluorescentes anti-CD3-PE e anti-CD4-PECy5 e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Flow Jo. Os resultados mostram o índice de estimulação (IE), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD4+ que proliferaram em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD4+ que proliferaram sem estímulo. 10.000 eventos foram adquiridos. Respostas de IE > 2,5 foram consideradas positivas e estão em destaque na tabela.49
- Tabela 11.** Análise de proliferação celular de células T CD8+. Células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com 10 μ M CFSE, estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 (10 μ M) e controles (SEB (10 μ g/mL) e/ou PHA (5 μ g/mL)) e mantidas em cultura por 5 dias. Após esse período, as células foram marcadas com conjugados fluorescentes anti-CD3-PE e anti-CD8-APC e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Flow Jo. Os resultados mostram o índice de estimulação (I.E.), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD8+ que proliferaram em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD8+ que proliferaram sem estímulo. 10.000 eventos foram adquiridos. Respostas de IE > 3,5 foram consideradas positivas e estão em destaque na tabela.50
- Tabela 12.** Frequência de reconhecimento por células T CD4+ e T CD8+ de pacientes infectados por HIV-1 (n=40) de pelo menos um peptídeo da protease de HIV-1 (por região e no total)51
- Tabela 13.** Frequências de testes com cada padrão de reconhecimento por células T CD4+ e T CD8+ dos peptídeos selvagens e mutantes da protease em 40 pacientes infectados por HIV-162
- Tabela 14.** Alinhamento das seqüências endógenas dos pacientes (em destaque na primeira linha) com as seqüências dos peptídeos correspondentes a cada região onde foi observada resposta a peptídeos idênticos à seqüência da protease endógena. Em negrito, mutações presentes na seqüência endógena do paciente quando alinhada a seqüência HXB2. Cada bloco de resultados corresponde a um paciente. Região 45 a 64: paciente PR071 (A); Região 76 a 95: Pacientes PR008 (B), PR013 (C), PR019 (D), PR028 (E), PR032(F) e PR035 (G). Em cinza, seqüência de peptídeo correspondente à seqüência endógena da protease e reconhecida (IE>2,5 para células T CD4 e IE>3,5 para células T CD8).66
- Tabela 15.** Sumário do perfil de reconhecimento de peptídeos da protease entre os pacientes que apresentaram resposta de linfócitos T CD4+ e/ou CD8+ a

peptídeo idêntico à sequência endógena (números representam a quantidade de peptídeos).....69

Tabela 16. Tipagem HLA dos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS)70

Tabela 17. Resumo do Ensaio de ligação a moléculas HLA classe II DR e DQ72

Tabela 18. Frequência (em porcentagem) de pacientes não respondedores a peptídeos autólogos segundo ligação dos peptídeos a alelos HLA classe II; número absoluto entre parênteses75

Tabela 19. Frequência de pacientes que apresentaram ausência de resposta proliferativa assim como ausência de ligação de alelos HLA classe II a peptídeos autólogos; número absoluto entre parênteses76

Resumo

Muller NG. *Identificação de epitopos da protease de HIV-1 alvos de respostas de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV-1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 115p.

Introdução: Uma proporção significativa de pacientes infectados por HIV-1 (pacientes HIV-1+) tratados com inibidores de protease (IPs) desenvolve mutações de resistência. Estudos recentes têm mostrado que células T CD8+ de pacientes HIV-1+ reconhecem epitopos de Pol incluindo mutações selecionadas por drogas. Nenhum epitopo CD4+ da protease foi descrito na base de dados de Los Alamos.

Objetivo: Considerando que a protease de HIV-1 é alvo de terapia antiretroviral e que essa pressão pode selecionar mutações, nós investigamos se mutações selecionadas por IPs afetariam o reconhecimento de epitopos da protease de HIV-1 por células T CD4+ em pacientes tratados com IPs. Nós investigamos o reconhecimento de três regiões da protease preditas de conter epitopos de células T CD4+ bem como mutações induzidas por IPs por células T CD4+ em pacientes HIV-1+ tratados com IPs. **Materiais e Métodos:** Quarenta pacientes HIV-1+ tratados com IPs foram incluídos (30 em uso de Lopinavir/ritonavir, 9 em uso de Atazanavir/Ritonavir e 1 em uso exclusivo de Atazanavir). Para cada paciente determinou-se a seqüência endógena da protease de HIV-1, genotipagem viral e tipagem HLA classe II. Utilizamos o algoritmo TEPITOPE para selecionar peptídeos promíscuos, ligadores de múltiplas moléculas HLA-DR, codificando as três regiões da protease de HIV-1 cepa HXB2 (HXB2 4-23, 45-64, e 76-95) e 32 peptídeos adicionais contidos nas mesmas regiões incorporando as mutações induzidas por IPs mais freqüentes no Brasil. Os 35 peptídeos foram sintetizados. Respostas proliferativas de células T CD4+ e CD8+ aos peptídeos foram determinadas por ensaios de proliferação com diluição do corante CFSE. Ensaios de ligação a alelos HLA classe II foram realizados para confirmar a promiscuidade desses peptídeos e avaliar a habilidade de se ligarem a moléculas HLA presentes em cada paciente. **Resultados:** Todos os peptídeos foram reconhecidos por pelo menos um paciente e respostas proliferativas de células T CD4+ e CD8+ a pelo menos um peptídeo da protease de HIV-1 foram encontradas em 78% e 75% dos pacientes, respectivamente. A terceira região (Protease 76 – 95) foi a mais freqüentemente reconhecida. Ao compararmos as respostas de células T às seqüências da protease do HIV-1 endógeno, observamos que a maioria dos pacientes não foi capaz de reconhecer peptídeos idênticos às essas seqüências, porém reconheceram peptídeos variantes diferentes das mesmas regiões. Apenas sete pacientes responderam às seqüências endógenas. Verificamos que diversos peptídeos endógenos que não foram reconhecidos apresentaram ausência de ligação a alelos HLA portados por estes pacientes, sugerindo que mutações selecionadas por pressão imune tenham levado ao escape de apresentação de antígeno e evasão de resposta de linfócitos T CD4+. Alternativamente, isso poderia ser explicado pela presença de um vírus replicante distinto presente no plasma uma vez que somente foram obtidas seqüências

provirais. **Conclusão:** Epitopos selvagens e mutantes da protease do HIV-1 reconhecidos por células T CD4+ foram identificados. Também verificamos que a maior parte dos pacientes não reconheceu as seqüências da protease endógena enquanto que reconheceram seqüências variantes. O reconhecimento de seqüências não-endógenas poderia ser hipoteticamente consequência de alvo de populações HIV-1 minoritárias; protease de HERV que contém regiões de similaridade com a protease do HIV-1; ou seqüências de HIV-1 presentes apenas em parceiros virêmicos. A falha de reconhecimento de seqüências endógenas seria mais provável devido ao escape imune, do que ao nível de apresentação ou reconhecimento por células T. Isso implica em uma consequência patofisiológica na evasão de respostas de células T contra a protease de HIV-1 e no fato de ser tradicionalmente considerada uma proteína pouco antigênica.

Descritores: 1.HIV-1 2.Epitopos 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Inibidores de proteases HIV 5.Anti-retrovirais

Summary

Muller NG. *Identification of HIV-1 protease epitopes target of CD4+ T cell responses in HIV-1 infected patients.* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 115p.

Introduction: A significant proportion of protease inhibitor (PI)-treated HIV-1 infected (HIV-1+) patients develop resistance mutations. Recent studies have shown that CD8+ T cells from HIV-1 patients can recognize antiretroviral drug-induced mutant Pol epitopes. No HIV-1 protease CD4 epitopes are described in the Los Alamos database. **Aims:** Given that the protease of HIV-1 is a target of antiretroviral therapy and this pressure may lead to the selection of mutations, we investigated whether PI-induced mutations affect the recognition of HIV-1 protease epitopes by CD4 + T cells in PI-treated patients. We investigated the recognition of three protease regions predicted to harbor CD4+ T cell epitopes as well as PI-induced mutations by CD4+ T cells of PI-treated HIV-1+ patients. **Methods:** Forty PI-treated HIV-1+ patients were included (30 undergoing Lopinavir/ritonavir, 9 undergoing Atazanavir/ritonavir and 1 undergoing exclusively Atazanavir treatment). For each patients, the endogenous HIV-1 protease sequence, viral genotype and HLA class II typing were determined. We used the TEPITOPE algorithm to select promiscuous, multiple HLA-DR-binding peptides encoding 3 regions of HIV-1 HXB2 strain protease (HXB2 4-23, 45-64, and 76-95) and 32 additional peptides contained in the same regions, but encompassing the most frequent PI-induced mutations in Brazil. The 35 peptides were thus synthesized. Proliferative responses of CD4+ and CD8+ T cells against peptides were determined by the CFSE dilution assay. HLA class II binding assays were made to confirm the promiscuity of these peptides and evaluate their ability to bind the HLA molecules carried by each patient. **Results:** All tested peptides were recognized by at least one patient and proliferative responses of CD4+ and CD8+ T cells against at least one HIV-1 protease peptide were found in 78% and 75% patients, respectively. The third region (Protease 76-95) was the most frequently recognized. By comparing T-cell responses to HIV-1 endogenous protease sequences, we found that most patients failed to recognize identical peptides of those sequences, but recognized different variant peptides of the same region. Only seven patients responded to endogenous sequences. We found that several endogenous peptides that failed to be recognized showed no binding to the HLA alleles carried by that given patient, suggesting that mutations selected by immune pressure have led to escape of antigen presentation, as well as direct escape of the CD4+ T cell response. Alternatively, it could have been due to the presence of a different replicating virus in the plasma-since we only obtained proviral sequences. **Conclusion:** Wild-type and mutant HIV-1 protease epitopes recognized by CD4+ T cells were identified. We also found that most patients failed to recognize their endogenous protease sequences, while they recognized variant sequences. The recognition of non-endogenous sequences could hypothetically be a consequence of targeting a minor HIV-1 population; HERV protease, that contains

regions of similarity with HIV-1 protease; or HIV-1 sequences present only in viremic partners. The failure to recognize endogenous sequences is most likely due to immune escape, either at the level of presentation or direct T cell recognition. This may have a pathophysiological consequence on evasion of T cell responses against protease and the fact that it has been considered traditionally a poorly antigenic HIV-1 protein.

Descriptors: 1.HIV-1 2.Epitopes 3.CD4-positive T-lymphocytes 4. HIV Protease Inhibitors 5. Anti-retroviral agents

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do HIV-1

1.1.1 Epidemiologia global e no Brasil

A epidemia de HIV-1 é a mais importante infecção emergente das últimas décadas, com mais de 33,2 milhões (30,6 - 36,1 milhões) de indivíduos infectados no mundo, sendo que 22,0 milhões (67%) vivem na África Sub-Saariana. Em 2007, houveram 2,7 milhões (2,2 – 3,2 milhões) de novas infecções e o número estimado de óbitos foi de 2,0 milhões (1,8 – 2,3 milhões) (Figura 1) (UNAIDS/WHO REPORT 2008).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil é um dos países mais afetados, com cerca de 600 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS. Estima-se que aproximadamente 200 mil óbitos tenham sido declarados. O principal subtipo do HIV-1 circulante no Brasil é o B (principalmente no Sudeste), seguido pelos subtipos F (também no Sudeste), C (principalmente no Sul), além de duas formas circulantes recombinantes (circulating recombinant form – CRF) B/C e B/F (www.aids.gov.br), sendo que os mais recentes identificados foram o CRF28_BF e CRF29_BF (os números indicam a ordem de descoberta seguido das letras dos subtipos que reúnem) (De Sa Filho e cols., 2006).

Figura 1. Número estimado de indivíduos vivendo com HIV em 2007

Um dos aspectos mais importantes no controle da epidemia HIV/AIDS no Brasil foi a aprovação da Lei 9.313 em novembro de 1996 (<http://www.aids.gov.br/assistencia/lei9313.htm>) que dispõe sobre a obrigatoriedade do acesso universal e gratuito aos medicamentos ARV a todos pacientes com AIDS estabelecida pelo sistema público de saúde, o que levou a uma diminuição importante na morbidade e na mortalidade causadas pela doença (Boletim Epidemiológico AIDS, Dezembro de 2005; Boletim Epidemiológico AIDS, Junho de 2008). Dados de 2007 indicam que três milhões de pessoas de países em desenvolvimento estão recebendo tratamento com antiretrovirais (ARV). Entre os países em desenvolvimento, o Brasil é o país que mais investe (em valores absolutos) no tratamento desses pacientes, cobrindo 75% das pessoas com HIV

avançado (UNAIDS/WHO REPORT 2008). Por outro lado, o custo do acesso universal tem aumentado devido a complexidade dos novos esquemas terapêuticos utilizados para pacientes multirresistentes.

1.2 Resposta imune contra o HIV

Diversos estudos mostraram que tanto a imunidade humoral quanto celular são importantes para mediar resposta ao HIV-1 (McMichael e cols., 2001) . Em relação à imunidade celular, várias evidências mostram a importância dos linfócitos T CD8+ citotóxicos específicos para o HIV-1 no controle da doença. Estudos realizados por Borrow e cols. (1994) mostraram que pacientes com infecção aguda primária sintomáticos que apresentavam resposta citotóxica às proteínas virais eram capazes de controlar a viremia. Outro estudo mostrou que indivíduos altamente expostos persistentemente soronegativos (HEPS) tiveram resposta citotóxica ao HIV e esta estava correlacionada à exposição (Rowland-Jones e cols., 2001). Macacos Rhesus depletados de linfócitos T CD8+ citotóxicos não controlam a infecção pelo vírus da imunodeficiência de símios (Jin e cols., 1999).

As células T CD4+ específicas para o vírus também são importantes na resposta imune protetora anti-retroviral, como foi demonstrado por vários estudos em camundongos e em humanos (Kalams e cols., 1998; Matloubian e cols., 1994; von Herrath e cols., 1996). Respostas proliferativas intensas de células T CD4+ específicas são observadas em pacientes infectados por HIV-1 que apresentam controle da replicação viral na ausência de terapia ARV (Rosenberg e cols., 1997;

Rosenberg e cols., 2000; Gloster e cols., 2004; Heeney e cols., 2002). Também verificou-se por ensaios de proliferação um elevado índice de resposta proliferativa de linfócitos CD4⁺ ao estímulo de antígeno p24 de HIV-1 em pacientes HIV-1 infectados primariamente tratados ou não com ARV, o qual se correlacionou inversamente com a carga viral. O mesmo trabalho também mostrou que resposta HIV-1 específica induziu a produção de IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Rosenberg e cols., 1997).

Como as células T CD4⁺ são fundamentais para a indução (Ridge e cols., 1998) e maturação dos linfócitos T citotóxicos (Zajac e cols., 1998), e manutenção dos linfócitos T citotóxicos de memória (Janssen e cols., 2003; Shedlock e cols., 2003), é essencial a inclusão de epitopos de células T CD4⁺ em formulações candidatas à vacinas. Poucos epitopos de HIV de linfócitos T CD4⁺ foram descritos (Boaz e cols., 2003; Okazaki e cols., 2006; van der Burg e cols. 1999) comparativamente ao grande número de epitopos de HIV-1 de linfócitos T CD8⁺ (Yu e cols., 2002).

1.3 Variabilidade do HIV-1

A atividade de leitura das enzimas RNA-polimerase e transcriptase reversa nos genomas de retrovírus não é eficaz, assim muitas mutações são geradas espontaneamente, e estas podem levar a variações na sequência do antígeno (McMichael e cols., 1997).

Se a taxa de mutação é de 10⁻⁵ por base por geração e o genoma do HIV-1 tem aproximadamente 104 pares de base, no mínimo 108 vírus mutantes são

produzidos a cada dia (Saag e cols., 2000). Poucos vírus mutantes viáveis são produzidos, e muitos deles não se replicam bem e portanto competem ineficientemente com os vírus selvagens (McMichael e cols., 1997). Variações dentro de um epitopo podem causar a perda parcial ou total do reconhecimento funcional pelas células T, assim como afetar a clivagem, o processamento e o transporte do peptídeo (Goulder e cols., 1997; Phillips e cols. 1991), ligação ao MHC (Chen e cols., 2000; Couillin e cols., 1994), reconhecimento pelo receptor de célula T (TCR) (Mortara e cols., 1998; Harcourt e cols., 1998) ou deleção do epitopo (Koenig e cols., 1995). O escape da resposta citotóxica tem sido bastante estudado na infecção por HIV (Koup e cols., 1994; Saag e cols., 1988; Boissonnas e cols., 2002), mas escape da resposta dos linfócitos T CD4⁺ auxiliares ainda é pouco estudado (Harcourt e cols., 1998; Siliciano e cols., 1988).

1.4 Predição de epitopos de células T promíscuos

Epitopos dominantes de células T são geralmente peptídeos que se ligam com maior avidéz às moléculas de MHC. Portanto, a possibilidade de predizer a interação HLA-DR-peptídeo ajudaria a definir com alta precisão epitopos dominantes potenciais em proteínas individuais. Epitopos que se ligam a múltiplas moléculas de HLA, chamados de epitopos promíscuos, podem ser reconhecidos pelas células T de um número significativo de pacientes geneticamente distintos. Logo, uma vacina baseada em múltiplos epitopos promíscuos poderia levar a uma cobertura efetiva da população humana.

Até recentemente a identificação de peptídeos imunodominantes era realizada exclusivamente através do teste direto de um grande número de peptídeos sobrepostos ou de bibliotecas de peptídeos. A identificação de “motifs” de ligação de peptídeos a moléculas de HLA permitiu a previsão de epitopos de células T potenciais, e verificou-se que tais “motifs” estão agrupados em certas regiões de determinada proteína (Rammensee e cols., 1995a; Rammensee e cols., 1995b; Meister e cols., 1995). Com isso, modelos de computador capazes de simular e prever o processo biológico de apresentação de antígeno podem ser utilizados para minimizar o número de experimentos, permitindo a identificação sistemática de epitopos de células T *in silico*, diminuindo o número de peptídeos testados e ensaios biológicos a realizar.

O TEPITOPE (Hammer e cols., 1994) é um algoritmo de predição de ligação virtual ao MHC que incorpora matrizes de milhares de ensaios de ligação peptídeo-HLA, permitindo prever a ligação de peptídeos a múltiplas moléculas de HLA-DR. A predição de ligação a 25 distintas moléculas de HLA-DR leva a seleção de peptídeos com maior chance de ligação ao HLA-DR com alta afinidade, resultando em uma maior probabilidade de resposta de célula T ao imunógeno (Sturniolo e cols., 1999; Schroers e cols., 2002). Adicionalmente, o TEPITOPE também permite detectar seqüências previstas de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR simultaneamente, selecionando desta forma epitopos de células T promíscuos.

1.4.1 Identificação e caracterização de epitopos de células T

Nosso grupo utilizou o TEPITOPE para a identificação e caracterização de epitopos de células T. Iwai e cols. (2003, 2007) identificaram epitopos imunodominantes da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*, os quais foram freqüentemente reconhecidos em respostas primárias de CMSP de indivíduos sensibilizados. Estudos recentes de nosso grupo mostraram que 18 peptídeos de HIV-1 selecionados pelo algoritmo TEPITOPE das regiões conservadas do genoma inteiro de HIV-1 se ligaram efetivamente a moléculas de HLA-DR múltiplas em ensaios de ligação de peptídeos. Além disso, acima de 90% dos pacientes responderam ao painel de 18 peptídeos. Cada um dos 18 peptídeos selecionados foi reconhecido por CMSP de pacientes HIV-1+ (22-45% de 32 pacientes) quando avaliado por ELISPOT- γ -IFN. Nós observamos que mais de 90% dos pacientes testados reconheceram uma combinação de no mínimo 8 dos 18 peptídeos (Fonseca e cols., 2005). Também utilizamos o TEPITOPE para identificar epitopos promíscuos e freqüentemente reconhecidos por linfócitos T CD4+ de diversas proteínas de *Plasmodium vivax* (Rosa e cols., 2006), *Mycobacterium tuberculosis* e Citomegalovirus (dados não mostrados), além de auto-antígenos (Damico e cols., 2005).

1.5 Mutações induzidas por drogas

Estudos demonstraram que o aparecimento de mutantes resistentes à drogas são capazes de replicar eficientemente na presença de agentes ARV (Saag e cols., 2000; Shafer e cols., 2000; <http://hiv-web.lanl.gov/>). A terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), uma combinação de inibidores das enzimas protease (IP) e transcriptase reversa (ITR), pode diminuir a viremia de HIV-1 a níveis indetectáveis e desde que a HAART foi introduzida, o controle clínico da infecção por HIV melhorou muito (Ho e cols., 1995; Carpenter e cols., 1997; Gazzard e cols., 1997). Mas a resistência do HIV-1 às drogas ARV é um dos principais fatores do fracasso do tratamento que ocorre em cerca de 50% dos pacientes no primeiro ano após o início do tratamento (Montaner e cols., 1998).

O gene da protease de HIV-1 é composto por 297 pb e está localizado entre o precursor Gag-Pol. O mesmo codifica uma protease aspártica composta por dois monômeros estruturalmente idênticos de 99 aminoácidos (Shafer e cols., 2000) (figura 2). A resistência aos IP pode ser mediada pela alteração estrutural do sítio ativo, que resulta na redução da afinidade da ligação da droga às moléculas alvo mutantes, e fora do sítio ativo, onde as mutações podem alterar a atividade catalítica da enzima, estabilidade do dímero, cinética de ligação do inibidor ou remodelagem do sítio ativo por perturbações estruturais de longo alcance (Shafer e cols., 2000). Um número significativo de mutações de sequência de aminoácidos relacionadas a resistência aos IP foram identificados (figura 2) (Boden e cols., 1998; D'Aquila e cols., 2003).

Figura 2. Estrutura cristalográfica da protease de HIV mostrando os sítios de mutações selecionadas por inibidores da protease mais frequentes.

1.5.1 Dados de mutações de resistência a drogas no Brasil

Nossa equipe também tem contribuído significativamente para o conhecimento da frequência e significância da diversidade do HIV-1 e mutações da protease no Brasil (Brindeiro e cols., 2003; Tanuri e cols., 1999). Na tabela 1, nós mostramos as mutações selecionadas por drogas mais frequentes que contribuem para resistência ao IP, divididas por subtipos de HIV-1, em 328 amostras de sangue de pacientes brasileiros infectados por HIV-1. As amostras de HIV-1 foram genotipadas por RM Brindeiro, participante da Rede Nacional de Vigilância de Resistência a Drogas (HIV-BResNet) (Brindeiro e cols., 2003). A amostragem foi representativa da incidência de HIV/AIDS nos principais estados do Brasil e o subtipo B foi o mais prevalente (75,6%), seguido pelos subtipos F, C, D, K e A. Os

resultados são corroborados por outros estudos no Brasil (Caride e cols., 2001; Morgado e cols., 1994; Sabino e cols., 1996., Sa-Filho e cols., 2003).

1.6 Reconhecimento de epítopos de moléculas-alvo de terapia antiretroviral por células T

1.6.1 Epítopos identificados na protease do HIV-1

Existem relativamente poucos estudos sobre a imunogenicidade da protease, embora ela seja uma proteína importante no ciclo do vírus e um dos principais alvos de drogas ARV. Na tabela 2 apresentamos os oito epítopos de células T CD8+ registrados no banco de dados de Los Alamos a partir de dados publicados. Paradoxalmente, a protease é a única proteína do HIV-1 para a qual não epítopo reconhecido por linfócitos T CD4+ descrito na literatura ou no banco de dados de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov/>).

Recentemente, nosso grupo identificou dois peptídeos na protease de HIV-1, protease(7-21) e protease(80-94), capazes de se ligar a múltiplas moléculas HLA-DR, que foram reconhecidos por PBMC de 14/32 (43,8%) e 9/32 (28,1%) dos pacientes HIV-1+ testados ao ensaio de ELISPOT para IFN- γ ; entretanto, nesse trabalho não foi investigada a capacidade de células T CD4+ reconhecerem tais epítopos (Fonseca e cols., 2006).

Tabela 1. Porcentagens das principais mutações na sequência do gene da protease de HIV-1 relacionadas à resistência aos inibidores da protease em 328 pacientes no Brasil.

Mutação	subtipo do HIV-1						TOTAL		
	A (n=2)	B (n=248)	C (n=24)	D (n=18)	F (n=32)	K (n=4)	n	nº total de pacientes (n=328)	nº total de mutações (n=1684)
L63P	50,0	68,5	33,3	61,1	28,1	25,0	200	61,0	11,88
M36I	0,0	64,1	25,0	11,1	9,4	50,0	172	52,4	10,21
I93L	0,0	36,3	91,7	16,7	34,4	0,0	126	38,4	7,48
L90M	0,0	30,6	25,0	16,7	21,9	50,0	94	28,7	5,58
L10I	0,0	30,2	0,0	38,9	25,0	50,0	92	28,0	5,46
V77I	0,0	29,8	4,2	33,3	12,5	0,0	85	25,9	5,05
A71V	0,0	25,8	16,7	5,6	18,8	25,0	76	23,2	4,51
M46I	50,0	19,4	4,2	5,6	3,1	25,0	53	16,2	3,15
K20R	50,0	8,9	33,3	44,4	40,6	25,0	53	16,2	3,15
I54V	0,0	13,3	20,8	27,8	28,1	0,0	52	15,9	3,09
D30N	0,0	15,3	16,7	16,7	6,3	0,0	47	14,3	2,79
V82A	50,0	11,7	8,3	27,8	18,8	25,0	44	13,4	2,61
L89M	50,0	2,4	54,2	22,2	59,4	0,0	43	13,1	2,55
N88D	0,0	14,1	8,3	11,1	3,1	0,0	40	12,2	2,38
L10V	0,0	9,3	12,5	27,8	25,0	0,0	39	11,9	2,32
I84V	0,0	11,7	4,2	16,7	3,1	0,0	34	10,4	2,02
A71T	0,0	10,1	0,0	16,7	0,0	0,0	28	8,5	1,66
K20T	0,0	6,0	12,5	22,2	12,5	0,0	26	7,9	1,54
M46L	0,0	5,2	4,2	11,1	9,4	0,0	19	5,8	1,13
L33F	0,0	5,2	4,2	16,7	3,1	0,0	18	5,5	1,07
L63T	0,0	3,2	4,2	16,7	12,5	0,0	16	4,9	0,95
G73S	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	14	4,3	0,83
L10F	0,0	4,8	0,0	5,6	0,0	0,0	13	4,0	0,77
M36V	0,0	4,4	4,2	0,0	3,1	0,0	13	4,0	0,77
K20I	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	25,0	13	4,0	0,77
L63A	0,0	2,8	0,0	5,6	9,4	25,0	12	3,7	0,71
K20M	0,0	4,0	8,3	0,0	0,0	0,0	12	3,7	0,71
V82I	0,0	4,0	0,0	0,0	3,1	0,0	11	3,4	0,65
L24F	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	11	3,4	0,65
V32I	50,0	3,6	0,0	0,0	0,0	25,0	11	3,4	0,65
L89I	50,0	0,8	20,8	0,0	3,1	0,0	9	2,7	0,53
G73T	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	8	2,4	0,48
L63S	0,0	2,0	4,2	0,0	3,1	0,0	7	2,1	0,42
L63H	0,0	2,0	4,2	5,6	0,0	0,0	7	2,1	0,42

Tabela 2. Epítomos de células T CD8+ na protease de HIV-1 registrados no bando de dados Los Alamos (LANL) (<http://www.hiv-web.lanl.gov/content/immunology>), a espécie e os respectivos MHC em que foram descritos e o número de registro no LANL.

Seqüência do epitopo	Localização na protease HXB2	Espécie	MHC	Registro Los Alamos
ITLWQRPLV	3-11	Humana	A*6802	1138
		Humana	A*6802,A*7401,A19	397
		Humana	A*7401	1140
		camundongo transgênico	A2	52682
		Humana	A28	1432
		Humana	A28supertype	1499
		Humana	A74	1667
VTILIGGQLK	11-20	Humana	A3 supertype	1611
TIKIGGQLK	12-20	Humana	A3 supertype	53068
DTVLEEMNL	30-38	Humana	A*6802	398
		Humana	A68	53385
EEMNLPGRW	34-42	Humana	B*44	52574
		Humana	B44	53137
KMIGGIGGFI	45-54	camundongo humanizado	A*0201	53441
		Humana	A2 supertype	1594
VLVGPTPVNI	75-84	Humana	A*0201	400
		camundongo humanizado	A*0201	53442
		camundongo humanizado	HLA-A*0201	53007
LVGPTPVNI	76-84	Humana	A*0201	1306
		Humana	A02	53051
		Humana	A2	52727
		Humana	A2 supertype	1601

1.6.2 Reconhecimento por linfócitos T de epítomos contendo mutações induzidas por drogas antiretrovirais

Pouco se conhece sobre as respostas de células T a neopítomos criados por mutações de escape a drogas e a habilidade de tais respostas em ajudar o controle do crescimento das variantes de HIV-1 mutantes resistentes à drogas. Os poucos estudos encontraram tanto reatividade cruzada como reconhecimento específico de peptídeos incorporando as mutações de resistência à drogas por células T CD8+ (Schmitt e cols., 2000; Samri e cols., 2000; Karlsson e cols., 2003; Mason e cols., 2004; Stratov e cols., 2005). Schmitt e cols. (2000) encontraram uma linhagem de

CTL de um paciente HIV-1+ que reconhecia um epitopo incorporando uma mutação associada a alto nível de resistência à lamivudina, um inibidor nucleosídeo da TR (NRTI) e que não respondia à sequência selvagem tanto em ensaios de citotoxicidade como em ELISPOT (Enzyme-Linked Spot) para interferon-gamma (γ -IFN) (ELISPOT- γ -IFN). Samri e cols. (2000) identificaram 41 seqüências da TR abrangendo sítios das principais mutações selecionadas por NRTI (M41L, L74V, M184V e T215Y) e potenciais epitopos de células T CD8+ previstos por um programa de computador. Cinco epitopos previstos foram reconhecidos pelo menos uma vez por células T CD8+ de 9 pacientes HIV-1+selecionados de acordo com o tratamento e o tipo de HLA. Os resultados sugeriram que as principais mutações selecionadas por NRTI não prejudicaram a ligação do HLA ou o reconhecimento de células T destes epitopos em pacientes tratados.

Respostas de células T CD8+ contra um epitopo restrito a HLA-A2 da protease (LVGPTPVNI, PR82V76-84) e o peptídeo mutante selecionado por IP (V82A) foram avaliadas em um estudo transversal de 29 pacientes HIV-1+ que foram tratados com IP e que tinham desenvolvido resistência. O mutante PR82A76-84 foi reconhecido por 40% dos pacientes (Karlsson e cols., 2003). Outro estudo examinou o efeito de mutações associadas a resistência à drogas ARV no reconhecimento de 5 epitopos CTL da Pol de HIV-1 (4 da TR e 1 da protease) apresentados pelas moléculas de HLA comuns e suas variantes correspondentes incorporando as mutações de resistência à drogas (M41L, V108I, Y115F, Y181C, ou L210W na RT e I84V na PR). Eles observaram que estas mutações mantiveram ou em alguns casos até aumentaram a antigenicidade de epitopos CTL da Pol de HIV-1, demonstrando a existência de um

repertório de células T CD8 diversificado, alguns de reação cruzada e alguns específicos para determinadas variantes de resistência a drogas (Manson e cols., 2004). Stratov e cols. (2005) observaram respostas de células T CD8+ contra neoepitopos mutantes selecionados por ARV na RT e na protease em três de 25 pacientes HIV-1+ com resistência a múltiplas drogas. Imunização de primatas com estes neoepitopos induziram respostas de células T CD8+ (Stratov e cols., 2005). Em conjunto, os dados sugerem que pacientes HIV-1+ em tratamento com ARV são capazes de desenvolver respostas de células T CD8+ a epitopos mutantes selecionados por droga ARV, inclusive a protease do HIV. A questão de se há reconhecimento semelhante da protease por células T CD4+ permanece em aberto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Principal

Identificar epitopos selvagens e mutantes da protease de HIV-1 que sejam alvos de respostas de células T CD4+ de pacientes infectados pelo HIV-1 e relacionar o perfil de reconhecimento com as seqüências endógenas da protease.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o reconhecimento de epitopos da protease de HIV-1 selvagens e mutantes por células T CD4+ de pacientes HIV-1+ tratados com IP.
2. Relacionar o perfil de reconhecimento por células T CD4+ de pacientes HIV-1+ tratados com IP dos epitopos selvagens e mutantes da protease com as seqüências endógenas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Indivíduos da pesquisa

3.1.1 Características e procedência da população

Amostras de sangue de pacientes HIV-1+ foram colhidas no Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS). Todos os pacientes possuíam conhecimento prévio do seu estado de soropositividade, pois são pacientes em seguimento neste ambulatório e recebem tratamento ARV. De acordo com as Normas do Governo Brasileiro, o tratamento ARV deve ser oferecido universalmente para pacientes HIV+ que preencham as normas do Sistema Público de Saúde.

Os critérios para inclusão dos pacientes no projeto foram:

- Idade entre 21-60 anos;
- Diagnóstico bem documentado da infecção por HIV-1 por métodos sorológicos;
- CD4+ acima de 200 células/mm³;
- Carga viral abaixo de 10.000 cópias/mL;
- Disponibilidade de história completa do tratamento ARV;
- Estar no primeiro esquema terapêutico incluindo pelo menos uma droga Inibidora de Protease (IP).

Após a aprovação do projeto pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em outubro de 2006 e na Comissão de Ética em Pesquisa do CRT-DST/AIDS do Estado de São Paulo, iniciamos o processo de operacionalização para a inclusão de pacientes do CRT-DST/AIDS.

Para a seleção dos pacientes, inicialmente tivemos acesso a uma planilha eletrônica (em Excel) de 7712 registros de pacientes em tratamento atual com ARV, dos quais 2592 pacientes em tratamento incluindo algum inibidor de protease (na tabela 3, estão os números de pacientes com cada esquema de IP, independente do esquema com inibidores da transcriptase reversa).

Tabela 3. Números de pacientes infectados por HIV-1 (HIV-1+) em acompanhamento clínico ambulatorial no Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT-DST/AIDS) com cada esquema de terapia antiretroviral (ARV) com Inibidor de protease (IP).

Esquema antiretroviral com inibidores de protease		Nº de pacientes
Triplo	Lopinavir + Ritonavir + Saquinavir	82
	Lopinavir + Ritonavir + Amprenavir	18
	Lopinavir + Ritonavir + Atazanavir	10
	Lopinavir + Ritonavir + Nelfinavir	1
	Lopinavir + Ritonavir + Indinavir	1
	Amprenavir + Ritonavir + Saquinavir	1
Duplo	Lopinavir + Ritonavir (Kaletra)	967
	Atazanavir + Ritonavir	563
	Ritonavir + Saquinavir	70
	Amprenavir + Nelfinavir	57
	Amprenavir + Ritonavir	56
	Indinavir + Ritonavir	41
	Indinavir + Nelfinavir	2
Único	Atazanavir	335
	Nelfinavir	203
	Indinavir	182
	Amprenavir	3
Total		2592

A partir das informações dos últimos dados de contagem de células T CD4+ e carga viral cruzadas com as informações do uso de IP identificamos 463 pacientes

que preenchiam os critérios laboratoriais de inclusão. Após a revisão dos prontuários de 218 pacientes em uso de lopinavir e ritonavir (Kaletra) e de 169 em uso de atazanavir, verificamos quais estavam no primeiro esquema terapêutico com IP, e destes foram selecionados 100 e 76 pacientes, respectivamente.

Fizemos uma verificação semanal da data agendada para a colheita de sangue para realização dos exames laboratoriais de rotina (CD4+, carga viral e outros) de cada paciente. Nesta data, explicamos os objetivos do estudo e convidamos os pacientes a participarem como voluntários. Após a concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foi feita a colheita de 75 mL de sangue periférico por punção venosa, 70 mL em tubos heparinizados (Liquemine, La Roche, Basiléia, Suíça) para separação das CMSP e 5 mL em tubos com EDTA para extração de DNA. As amostras biológicas foram devidamente processadas e armazenadas no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração de São Paulo (InCor). Um questionário contendo estatística vital, dados epidemiológicos e clínicos, história completa do tratamento com ARV de cada paciente foi preenchido a partir do levantamento dos prontuários. Somente os pesquisadores (executante, responsável e colaborador) tiveram acesso às identidades dos participantes. Foram incluídos no estudo 40 pacientes do CRT-DST/AIDS.

3.1.2 Aspectos éticos da pesquisa

A participação dos pacientes foi secundária à leitura e assinatura do TCLE, previamente aprovado por Comitês de Ética de Pesquisa das Instituições envolvidas (anexo A), escrito de forma clara para que cada um conseguisse entender os aspectos científicos da pesquisa e que a sua participação incluiria a colheita de amostras de sangue. Eles foram assegurados da continuação do tratamento e assistência médica mesmo no caso de recusa em participar do estudo.

Em relação aos aspectos éticos da conservação e utilização de material biológico, foram mantidos os cuidados necessários, garantindo a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos envolvidos.

3.2 Processamento das amostras de sangue

Para a obtenção de plasma, as amostras de sangue heparinizado foram centrifugadas a 1.800 rpm por 8 min. O sobrenadante contendo o plasma foi coletado e aliqotado em microtubos devidamente identificados como amostras de plasma de heparina, com o número de registro do paciente (dado conforme a inclusão no estudo) e data da coleta. Os tubos de plasma foram armazenados a -20°C.

As amostras de sangue com EDTA foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min para separação do plasma e da camada leuco-plaquetária. Os tubos de plasma foram devidamente identificados e armazenados como descrito acima e a camada

leuco-plaquetária (entre o plasma e as células vermelhas) foi coletada utilizando-se uma pipeta pasteur e transferida para um tubo cônico de 15 mL, homogeneizada e aliquotada em microtubos de 0,5 mL (alíquotas de 200µL/microtubo). Os tubos foram devidamente identificados como “buffy coat”, com o número de registro do paciente (dado conforme a inclusão no estudo) e data da coleta e armazenados a -20°C. Estas células foram utilizadas posteriormente para extração de DNA utilizando-se o kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

3.2.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Amostras de sangue heparinizado foram diluídas a 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/L, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após centrifugação a 1800 rpm por 25 min, o anel de CMSP foi coletado, diluído com salina e centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O botão celular foi ressuspense em meio RPMI (desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute em 1966) suplementado com L-Glutamina 100 mM, Peflacin, Piruvato de Sódio 100 mM, Aminoácidos não-essenciais 100×, Vitamina 100× e Gentamicina (RPMI incompleto) e centrifugado a 1800 rpm por 8 min. Novamente o botão celular foi ressuspense em meio RPMI incompleto porém, desta vez centrifugado a 1300 rpm por 8 min com a finalidade de diminuir o número de plaquetas. Finalmente as células foram ressuspensas em meio RPMI incompleto acrescido de 10% de soro fetal bovino

(SFB) normal inativado (RPMI completo). A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.2.2 Congelamento das CMSP

As células obtidas foram congeladas até a realização dos experimentos. Logo após a contagem, as células obtidas por separação com gradiente de Ficoll Hypaque foram centrifugadas por 8 min a 1800 rpm e o sobrenadante desprezado. O sedimento de células foi ressuspenso em 1 mL (para cada $15-20 \times 10^6$ células) de solução de congelamento [90% de SFB e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO)], previamente preparado e estocado a 4°C. Tubos de criopreservação com alíquotas de 1 mL da solução de congelamento contendo as células foram devidamente identificados com o número de registro dos indivíduos (dado conforme a inclusão do paciente no estudo), data de congelamento e quantidade de células e imediatamente transferidos para um recipiente próprio de congelamento (*Nalgene*) contendo álcool isopropílico, onde foram mantidos “overnight” a – 80°C e posteriormente transferidos para um container contendo nitrogênio líquido (N₂ líquido).

3.2.3 Descongelamento das CMSP

Os criotubos contendo as células de interesse foram retirados do N₂ líquido. Logo, os mesmos foram descongelados em banho-maria a 37°C e as células foram

transferidas para um tubo cônico de 15 mL mantido em gelo contendo RPMI completo. Os criotubos foram lavados pelo menos 5 vezes no intuito que todas as células restantes fossem transferidas para o tubo cônico de 15 mL. O volume foi completado para 15 mL e as células foram centrifugadas por 8 min a 1.800 rpm. O sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em meio RPMI incompleto, o volume foi completado para 10 mL. Dez microlitros da suspensão celular foram diluídos em 10 µl do corante azul de Trypan para contagem das células e avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer. As células foram novamente centrifugadas por 8 min a 1.800 rpm e o sedimento foi ressuspensado a 2×10^7 células/ml em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS) contendo 0,1% de albumina bovina sérica (BSA).

3.3 Extração de DNA

DNA genômico foi extraído das amostras de sangue (camada leucocitária) dos 40 pacientes em acompanhamento clínico ambulatorial no CRT-DST/AIDS utilizando-se o kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Este procedimento foi realizado pelo Laboratório de Virologia Molecular do Instituto de Biologia do Departamento de Genética da UFRJ sob responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo de Moraes Brindeiro e Dra. Mônica Arruda.

3.4 Tipagem de HLA

A tipagem dos antígenos leucocitários humanos (HLA), “loci” HLA-A, -B e -C (classe I), -DR e -DQ (classe II), foi realizada por Hécio Rodrigues no setor de transplantes do Laboratório de Imunologia no Instituto do Coração (HCFMUSP) .

A tipagem do HLA foi feita com o kit LABType SSO typing (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) que utiliza a tecnologia LUMINEX. Resumidamente, foram usadas sondas com seqüências específicas de oligonucleotídeos acopladas a microesferas com fluorescência igualmente específica, de forma que cada seqüência/microesfera identificasse um dado alelo HLA na amostra de DNA. O DNA em análise foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com “primers” biotinilados designados para cada “locus” HLA; o produto amplificado foi desnaturado e hibridizado com a sonda de oligonucleotídeos complementares, imobilizada nas microesferas fluorescentes. As seqüências biotiniladas foram marcadas com ficoeritina conjugada à estreptavidina, o que permitiu a detecção no sistema LUMINEX das microesferas efetivamente associadas a seqüências amplificadas, identificando assim os alelos HLA presentes na amostra de DNA.

3.5 Seqüenciamento da protease do HIV-1 endógeno dos pacientes infectados

O seqüenciamento da protease do HIV-1 das amostras de DNA dos pacientes também foi realizado pelo Laboratório de Virologia Molecular do Instituto de

Biologia do Departamento de Genética da UFRJ sob responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo de Moraes Brindeiro e Dra. Mônica Arruda. As regiões genômicas *Pol* da protease de HIV-1 foram amplificadas por Nested-PCR. Ambas fitas dos fragmentos de PCR foram seqüenciadas usando primers internos com o kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) em um seqüenciador automatizado (ABI Model 3100, Perkin Elmer). As seqüências foram editadas e alinhadas usando o programa Seq Man contra a referência para análise de subtipagem do banco de dados de Los Alamos e foi identificada a ocorrência de mutações selecionadas por IP. A genotipagem foi analisada segundo o *HIV Drug Resistance Database* da Universidade Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>) e dados da “Interpretação Brasileira do teste de genotipagem” do Programa Nacional de DST-AIDS do Ministério da Saúde (<http://clinmaldb.usp.br:8083/hiv/resistencia/resistencia.html>).

3.6 Peptídeos da protease de HIV-1

3.6.1 Seleção dos peptídeos

A seqüência completa de 99 aminoácidos da protease do HIV-1, isolado HXB2 (Figura 3), aqui considerada como seqüência selvagem, foi varrida com sobreposição de um aminoácido no programa TEPITOPE (Figura 4). Este algoritmo prevê seqüências que tenham potencial capacidade de se ligar a uma ou mais de 25 moléculas de HLA-DR diferentes (Tabela 4), usando 25 matrizes virtuais que foram

reunidas de ensaios empíricos de ligação peptídeo-HLA-DR e cobrem muitas das especificidades de ligação de peptídeo-HLA-DR na população Caucasiana (Sturniolo e cols., 1999). As seqüências que atingem um escore acima do limiar para uma determinada molécula de HLA-DR são selecionadas pelo programa (por exemplo, um limiar de 5% seleciona seqüências com valor de ligação a moléculas HLA igual ou maior àqueles 5% de seqüências com valores maiores no banco de dados do TEPITOPE (Bian e cols., 2003)).

	10	20	30	40	50
PQVTLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMSLPG	RWKPKMIGGI	
GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF	
	60	70	80	90	

Figura 3. Seqüência da protease do HIV-1, isolado HXB2 (99 aminoácidos) (disponível em <http://www.hiv-web.lanl.gov/content/index>). Os sítios onde ocorrem as mutações selecionadas por inibidores da protease mais freqüentes no Brasil estão sublinhados.

Figura 4. Janela do TEPITOPE com a varredura dos 99 aminoácidos da sequência da protease de HIV-1, isolado HXB2, considerando um limiar de 5%. Sequências previstas de se ligarem às moléculas de HLA-DR são assinaladas em azul e o aminoácido em vermelho corresponde ao resíduo hidrofóbico com função de âncora (P1), necessário para a ligação de alta afinidade do peptídeo para muitas moléculas de HLA-DR. Destacado em verde, três regiões da protease selecionadas com previsão de ligação a múltiplas moléculas HLA-DR: região dos aminoácidos 4-23, 45-64 e 76-95.

Tabela 4. Moléculas HLA-DR disponíveis pelo algoritmo TEPITOPE.

Moléculas HLA DR disponíveis pelo algoritmo TEPITOPE				
DRB1*0101	DRB1*0404	DRB1*0801	DRB1*1104	DRB1*1311
DRB1*0102	DRB1*0405	DRB1*0802	DRB1*1106	DRB1*1321
DRB1*0301	DRB1*0410	DRB1*0804	DRB1*1107	DRB1*1501
DRB1*0401	DRB1*0421	DRB1*0806	DRB1*1305	DRB1*1502
DRB1*0402	DRB1*0701	DRB1*1101	DRB1*1307	DRB5*0101

Numa primeira etapa foram selecionadas três regiões da protease selvagem HXB2 (ressaltadas em verde na Figura 4) com previsão de se ligarem a 18 ou mais moléculas HLA-DR, considerando um limiar de 5% no TEPITOPE: região dos aminoácidos 4-23, 45-64 e 76-95. Uma vez selecionadas essas três regiões promíscuas, fez-se a varredura de seqüências das mesmas regiões com as substituições de aminoácidos em 12 sítios correspondentes a 24 mutações de resistências aos IPs com freqüência acima de 2% na população brasileira (Tabela 1). As mesmas seqüências ditas mutantes também mantiveram a habilidade de se ligarem a múltiplas moléculas de HLA-DR humanas de acordo com o algoritmo TEPITOPE. Com isso, 35 peptídeos, três selvagens (HXB2 4-23, HXB2 45-64 e HXB3 76-95) e 32 mutantes, foram selecionados para síntese (Tabela 5).

Tabela 5. Seqüências de peptídeos da protease de HIV-1 (cepa HXB2 e mutantes) selecionadas pelo TEPITOPE e o número de moléculas de HLA-DR ligantes previstas considerando um limiar de 5% e contendo as mutações induzidas por drogas mais frequentes. A frequência de mutações foi calculada em estudo prévio de 328 pacientes infectados por HIV-1 (Brindeiro e cols., dados não publicados).

Peptídeo	Seqüências dos peptídeos da protease de HIV-1 selecionados	HLA-DR (n)	Frequência
HXB2 4-23	TLWQRPLVTIKIGGQLKEAL	20	46,6
L10I	TLWQRP <u>I</u> VTIKIGGQLKEAL	20	28,0
L10V	TLWQRP <u>V</u> VTIKIGGQLKEAL	21	11,9
L10F	TLWQRP <u>F</u> VTIKIGGQLKEAL	20	4,0
K20R	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>R</u> EAL	20	16,2
K20T	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>T</u> EAL	20	7,9
K20I	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>I</u> EAL	20	4,0
K20M	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>M</u> EAL	20	3,7
L10I/K20R	TLWQRP <u>I</u> VTIKIGGQL <u>R</u> EAL	20	6,7
L10V/K20R	TLWQRP <u>V</u> VTIKIGGQL <u>R</u> EAL	21	2,1
HXB2 45-64	KMIGGIGGFIVKVRQYDQILI	18	21,0
M46I	K <u>I</u> IGGIGGFIVKVRQYDQILI	18	16,2
M46L	K <u>L</u> IGGIGGFIVKVRQYDQILI	18	5,8
I54V	KMIGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQILI	22	15,9
M46L/I54V	K <u>L</u> IGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQILI	22	3,1
L63P	KMIGGIGGFIVKVRQYDQI <u>P</u> I	18	61,0
L63T	KMIGGIGGFIVKVRQYDQI <u>T</u> I	18	4,9
L63A	KMIGGIGGFIVKVRQYDQI <u>A</u> I	18	3,7
L63S	KMIGGIGGFIVKVRQYDQI <u>S</u> I	18	2,1
L63H	KMIGGIGGFIVKVRQYDQI <u>H</u> I	18	2,1
M46I/L63P	K <u>I</u> IGGIGGFIVKVRQYDQI <u>P</u> I	18	12,8
M46L/L63P	K <u>L</u> IGGIGGFIVKVRQYDQI <u>P</u> I	18	3,4
I54V/L63P	KMIGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQI <u>P</u> I	22	10,4
M46I/I54V/L63P	K <u>I</u> IGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQI <u>P</u> I	22	2,4
HXB2 76-95	LVGPTPVNIIGRNLLTQIGC	23	25,9
V77I	L <u>I</u> GPTPVNIIGRNLLTQIGC	23	25,9
V82A	LVGPTP <u>A</u> NIIGRNLLTQIGC	19	13,4
V82I	LVGPTP <u>I</u> NIIGRNLLTQIGC	20	3,4
I84V	LVGPTPVN <u>V</u> IGRNLLTQIGC	22	10,4
N88D	LVGPTPVNIIGR <u>D</u> LLTQIGC	21	12,2
L89M	LVGPTPVNIIGRN <u>M</u> LTQIGC	23	13,1
L89I	LVGPTPVNIIGRN <u>I</u> LTQIGC	23	2,7
L90M	LVGPTPVNIIGRNL <u>M</u> TQIGC	25	28,7
I93L	LVGPTPVNIIGRNLLTQ <u>L</u> GC	23	38,4
V77I/I93L	L <u>I</u> GPTPVNIIGRNLLTQ <u>L</u> GC	23	4,9

3.6.2 Síntese dos Peptídeos da protease de HIV-1

Peptídeos sintéticos da protease de HIV-1 cepa HXB2 e mutantes foram sintetizados em um sintetizador de peptídeo de fase sólida múltipla automatizado Apex 396 (Advanced ChemTech, Kentucky, USA) com resinas de aminoácidos protegidos com 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) e resina TGR (Novabiochem, San Diego, CA, USA) produzindo peptídeos com o grupo carboxi C-terminal na forma amida. A qualidade dos peptídeos foi avaliada por HPLC (cromatografia líquida de alta performance) (Akta, Amersham-GE, USA) e Espectrofotômetro de massa Ettan Pro Maldi-Tof (Amersham-GE, USA). Todos os peptídeos da protease de HIV-1, selvagens (WT) e mutantes, foram pesados e ressuspensos em DMSO a uma concentração estoque de 25 mM e armazenados a -20°C.

3.7 Análise de divisão celular por Citometria de fluxo baseado em diluição de corante vital

A análise da divisão celular por citometria de fluxo foi detectada utilizando-se o corante fluorescente intracelular éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester - CFDA-SE ou CFSE) (FACS-CFSE) (Current protocols in Immunology 2003) o qual se liga covalentemente a componentes citoplasmáticos de células, resultando em uma fluorescência brilhante uniforme. Quando as células se dividem, o fluorocromo é

dividido igualmente entre células filhas, permitindo a resolução de até oito ciclos celulares de divisão celular por citometria de fluxo.

3.7.1 Ensaio de proliferação das células marcadas com CFSE

1. CMSP foram descongeladas segundo protocolo de descongelamento descrito no item 2.3, lavadas e ressuspensas em PBS estéril acrescido de 0,1% de BSA na concentração de 2×10^7 células/mL.
2. Solução de CFSE 10 μ M (Lyons e cols, 1994; Lyons e cols, 2000; Quah e cols, 2007) em PBS contendo BSA 0,1% (PBS-BSA) foi adicionada à suspensão de células (vol/vol), resultando na diluição final de CFSE 5 μ M e suspensão de células a 1×10^7 células/mL. Parte da suspensão de células não foi marcada com CFSE e foi utilizada como controle de células não marcadas para a compensação do citômetro.
3. As células diluídas em CFSE-PBS-BSA e as células controles não marcadas (na mesma diluição das marcadas) foram incubadas por 10 min ao abrigo da luz, em banho-maria a 37°C, com leve agitação ocasional.
4. A reação CFSE-células foi interrompida pela adição de 5 vol de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (RPMI completo) gelado e incubada por 5 min no gelo.
5. As células foram centrifugadas a 1800 rpm por 8 min

6. O sedimento celular foi ressuspensão em meio RPMI incompleto e a solução foi novamente centrifugada a 1800 rpm por 8 min.
7. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo a uma concentração de 2×10^6 células/mL e distribuídas em placa de cultura fundo U de 96 cavidades contendo 100 µl/cavidade de diferentes estímulos também diluídos em RPMI 10% SFB: peptídeos mutantes e selvagens da protease de HIV-1 (10 µM), SEB (10 µg/mL) e/ou PHA (5 µg/mL) e como controle negativo células marcadas apenas com CFSE. Células não marcadas com CFSE estimuladas com 1 µg/mL de PHA (aproximadamente 10 cavidades) também foram cultivadas para serem marcadas com outros fluorocromos (anti-CD3-PE, anti-CD4-PeCy5 e CD8) para compensação do citômetro de fluxo. As placas foram incubadas a 37°C 5% CO₂ por 5 dias (Lyons e cols, 1994; Lyons e cols, 2000; Quah e cols, 2007).

3.7.2 Reação de imunofluorescência

1. As placas contendo CMSP marcadas com CFSE e mantidas em cultura por 5 dias sob diversos estímulos foram centrifugadas a 1800 rpm 4°C por 5 min.
2. Os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa e esta foi congelada a -80°C para posterior análise para detecção de citocinas.
3. O sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS contendo 2% de soro fetal bovino (PBS-SFB) e os sedimentos celulares foram marcados com 25 µl

de uma solução de anticorpos monoclonais contendo anti-CD3 marcado com PE, anti-CD4 marcado com PeCy5 e anti-CD8 marcado com APC diluídos conforme titulação prévia em PBS-SFB por 30 min, em banho de gelo sob proteção da luz. (A titulação dos anticorpos é realizada sempre quando do uso de um novo lote).

4. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS-SFB.
5. As células foram tratadas com 100µL de paraformaldeído 2% por 5 min a 4°C.
6. Após adição de 100 µl de PBS-SFB, as células foram centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min e os sedimentos foram ressuspensos em 200 µL de PBS-SFB, transferidos para tubos plásticos pequenos e as células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACS Canto.

3.7.3 Análise da citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi realizada com o software Flow Jo com a estratégia exemplificada na figura 5. Inicialmente foi feito um “gate” na região de linfócitos (R1) (dot-plot Forward Scatter ou FSC x Side Scatter ou SSC). Em R1, foi feito um novo “gate” de células CD3+ marcadas com PE no dot-plot FL2 x SSC. As células CD3+ foram analisadas em dot-plot FL3 x FL4 (FL3 para a detecção de células T CD4+ marcadas com PeCy5 e em FL4 para detecção das células T CD8+ marcadas

com APC). A proliferação das células T CD4+ e T CD8+ foi analisada em novos dot-plots, FL3 x FL1 e FL4 x FL1, respectivamente, (FL1 para detecção de células marcadas com CFSE). As porcentagens de células encontradas no “gate com baixa fluorescência de CFSE (low CFSE) e marcadas com fluorescência FL3 (CD4+) e FL4 (CD8+) foram consideradas células T CD4+ e T CD8+ proliferantes, respectivamente. Os dados de proliferação celular foram como índice de estimulação (IE), calculado pela razão entre a porcentagem de células proliferantes em resposta ao estímulo e a porcentagem de células proliferantes sem estímulo (apenas meio de cultura) (Dados brutos obtidos à partir de ensaio de proliferação celular de células T CD4+ e T CD8+, anexo B).

3.7.4 Estabelecimento de cut-off para os ensaios de proliferação

Para identificação dos valores positivos da resposta proliferativa a peptídeos da protease, foram realizados ensaios de proliferação em um grupo de indivíduos soronegativos saudáveis (8 indivíduos para células T CD4+ e 10 indivíduos para células T CD8+) com os peptídeos da protease do HIV em estudo, visando calcular um Cut-off. Este Cut-off foi calculado da seguinte forma: primeiramente calculou-se o índice de estimulação ($IE = \frac{\text{Porcentagem de células CFSE}_{\text{Low}} \text{ estimuladas}}{\text{Porcentagem de células CFSE}_{\text{Low}} \text{ não estimuladas}}$) em resposta ao peptídeo de cada um dos 8 indivíduos controle. Calculou-se então a média e o desvio padrão das médias de IE para cada peptídeo. À essa média global de IEs, somou-se 2 valores do

desvio padrão, obtendo-se desta forma um cut-off geral: $IE > 2,5$ para células T CD4+ e $IE > 3,5$ para células T CD8+ (anexo C).

Figura 5. Estratégia de análise do ensaio de proliferação de células marcadas com o corante CFSE. Células mononucleares do sangue periférico de paciente infectado por HIV-1 marcadas com CFSE foram estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 por 5 dias e coletadas para realização da reação de imunofluorescência e aquisição em citômetro FACS Canto. A análise foi feita utilizando-se o software Flow Jo. Foram adquiridos 10.000 eventos.

3.8 Ensaios de ligação dos peptídeos selecionados a moléculas HLA de classe II

Com a finalidade de confirmar se os peptídeos selecionados previstos como promíscuos pelo algoritmo TEPITOPE (Figura 4) são capazes de se ligar a diferentes moléculas HLA de classe II, os peptídeos foram testados em ensaios de ligação in vitro com moléculas HLA-DR, DQ e DP altamente prevalentes na população: HLA-DR (DRB1*0101, 0301, 0401, 0404, 0405, 0701, 0802, 0901, 1101, 1201, 1302, 1501; DRB3* 0101; DRB4*0101; DRB5*0101), HLA-DQ (DQA1*0501 / DQB1*0201, DQA1*0501 / DQB1*0301, DQA1*0301 / DQB1*0302, DQA1*0401 / DQB1*0402, DQA1*0101 / DQB1*0501), HLA-DP (DPA1*0201 / DPB1*0101, DPA1*0103 / DPB1*0201, DPA1*01 / DPB1*0401, DPA1*0301 / DPB1*0402, DPA1*0201 / DPB1*0501). Esses ensaios foram realizados pelos Drs. Alessandro Sette e John Sidney, La Jolla Institute of Allergy and Immunology, San Diego, USA. Foram considerados como promíscuos os peptídeos que se ligaram a pelo menos 5 moléculas HLA-DR testadas.

Os ensaios foram feitos incubando-se as moléculas de HLA classe II humanas purificadas (5-500nM) com várias concentrações dos peptídeos da protease não marcados e com sondas de peptídeos radiomarcadas com I¹²⁵ (0,1-1 nM) por 48 horas. A capacidade de ligação dos peptídeos é determinada pela concentração mínima de inibição de 50% da ligação das moléculas de HLA às sondas de peptídeos (que são os ligantes conhecidos de cada molécula de HLA). Um peptídeo foi considerado como ligante à determinada molécula de HLA classe II quando a

concentração mínima inibitória foi abaixo de 1000 nM. (Sidney e cols. 1998, Southwood e cols. 1998)

4. Resultados

4.1 Dados dos pacientes

A tabela 6 mostra os dados dos 40 pacientes HIV-1+ incluídos no nosso estudo segundo idade, sexo, data de inclusão no projeto, contagem de células T CD4+ e T CD8+ (células/mL), razão de células T CD4+/CD8+, carga viral (cópias/mL), inibidor de protease em uso, início do tratamento e tempo de tratamento (meses). A mediana de idade foi de 44,2 anos. Dos 40 pacientes analisados, 34 eram do sexo masculino. Em relação às contagens de células TCD4+ e CD8+, a mediana foi de 615 e 1190 células/mL respectivamente. A maioria dos pacientes apresentou carga viral indetectável (IND), exceto os pacientes PR002, PR008, PR012, PR050, PR067, PR071 e PR077 que apresentaram carga viral detectável, porém, abaixo de 10.000 cópias/mL (8053, 5832, 380, 615, 155, 82 e 164 cópias/mL respectivamente). Em relação ao tratamento com inibidores de protease, 30 pacientes estavam em uso de Lopinavir/ritonavir (LPV/R), 9 em uso de Atazanavir/Ritonavir (ATV/R) e 1 em uso exclusivo de Atazanavir (ATV) . A mediana do tempo de tratamento foi de 33,3 meses.

Tabela 6. Dados dos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS).

D projeto	Idade (anos)	Sexo	Inclusão no projeto	CD4+ (células/mL)	CD8+ (células/mL)	CD4+/CD8+ (razão)	CVIRAL (cópias/mL)	IP atual	Início IP	Tempo tratamento (meses)
PR001	56,7	M	25/06/2007	420	492	0,85	400	LPV/R	18/08/2004	34,7
PR002	32,5	M	03/07/2007	295	253	1,17	8053	LPV/R	09/03/2007	3,9
PR004	39,8	M	03/07/2007	693	966	0,72	400	LPV/R	17/02/2004	41,1
PR005	54,3	M	04/07/2007	703	1029	0,68	400	LPV/R	18/01/2006	17,7
PR006	53,1	M	20/06/2007	697	1318	0,53	400	LPV/R	01/07/2002	60,5
PR007	49,2	M	05/07/2007	654	691	0,95	400	LPV/R	20/01/2003	54,2
PR008	49,2	M	06/07/2007	670	768	0,87	5832	LPV/R	13/10/2003	45,4
PR009	40,1	M	06/07/2007	445	643	0,69	400	LPV/R	20/01/2004	42,1
PR011	40,3	M	10/07/2007	307	1260	0,24	400	LPV/R	05/12/2005	19,4
PR012	50,7	M	10/7 /2007	211	1273	0,17	380	LPV/R	25/11/2002	56,3
PR013	41,6	M	10/07/2007	897	1150	0,78	400	LPV/R	13/10/2004	33,3
PR014	ND	F	07/08/2007	295	1107	0,27	400	LPV/R	22/01/2003	55,3
PR015	39,8	M	18/07/2007	616	1441	0,43	400	LPV/R	20/02/2006	17,1
PR016	35,0	M	26/07/2007	584	1518	0,38	400	LPV/R	24/01/2006	18,3
PR017	44,2	M	27/07/2007	699	534	1,31	400	LPV/R	11/02/2003	54,2
PR018	42,0	M	27/07/2007	679	1427	0,48	400	LPV/R	14/09/2005	22,7
PR019	40,1	M	01/08/2007	945	1570	0,60	400	LPV/R	17/01/2005	30,9
PR020	36,5	M	02/08/2007	1348	1306	1,03	400	ATV/R	18/06/2004	38,0
PR022	37,6	M	08/08/2007	435	1944	0,22	400	LPV/R	18/04/2007	3,7
PR024	45,6	M	13/08/2007	503	1556	0,32	400	LPV/R	10/09/2004	35,6
PR025	37,3	M	14/08/2007	417	2335	0,18	400	LPV/R	22/07/2005	25,1
PR028	58,0	M	29/08/2007	356	1040	0,34	400	LPV/R	28/08/2002	60,9
PR029	49,4	F	04/09/2007	617	994	0,62	400	LPV/R	17/08/2004	37,1
PR032	41,1	M	05/09/2007	586	1362	0,43	400	LPV/R	24/04/2006	16,6
PR033	42,7	M	06/09/2007	497	1240	0,40	400	ATV/R	18/09/2005	23,9
PR034	45,0	M	06/09/2007	743	1525	0,49	400	ATV/R	18/09/2003	48,3
PR035	31,0	F	14/09/2007	521	780	0,67	400	LPV/R	17/01/2004	44,5
PR037	50,2	M	24/09/2007	822	1170	0,70	400	LPV/R	13/01/2003	57,2
PR044	43,8	M	25/9 /2007	621	905	0,69	400	ATV	03/10/2005	24,1
PR046	36,1	M	26/09/2007	1029	1486	0,69	400	LPV/R	26/04/2005	29,4
PR048	48,7	M	26/09/2007	431	1209	0,36	400	LPV/R	15/11/2002	59,2
PR049	45,4	F	02/10/2007	574	1248	0,46	400	LPV/R	09/05/2003	53,6
PR050	32,6	M	02/10/2007	402	828	0,49	615	ATV/R	05/09/2007	0,9
PR052	60,1	M	08/10/2007	883	552	1,60	400	ATV/R	22/09/2006	12,7
PR061	55,8	M	29/10/2007	732	904	0,81	400	ATV/R	13/07/2005	27,9
PR067	49,8	M	07/11/2007	838	1459	0,57	155	LPV/R	21/11/2002	60,4
PR071	49,6	M	08/11/2007	1369	1903	0,72	82	ATV/R	29/12/2005	22,6
PR076	46,0	M	13/11/2007	610	805	0,76	400	ATV/R	11/03/2005	32,6
PR077	58,0	F	14/11/2007	585	2459	0,24	164	ATV/R	04/05/2004	43,0
PR082	41,4	F	05/12/2007	613	565	1,08	400	LPV/R	09/11/2005	25,2

ID: Identificação do paciente no projeto; Sexo M: Masculino, F: Feminino; CViral: carga viral, IND: Indetectável; IP: Inibidor de Protease, LPV: Lopinavir, R: Ritonavir, ATV: Atazanavir.

4.2 Análise de seqüenciamento e genotipagem de resistência da protease do HIV-1 endógeno dos pacientes HIV-1+

O DNA proviral codificando a protease do HIV-1 endógeno de 40 pacientes HIV-1+ foi seqüenciado (figura 6). Em destaque nas caixas vermelhas estão as três regiões da protease onde estão contidos os peptídeos selecionados como epitopos de células T CD4+: aminoácido 4 a 23, 45 a 64 e 76 a 95. Dentre as regiões estudadas, verificamos que a terceira região (76-95) apresentou menor variação de seqüência em relação à seqüência selvagem HXB2, do que as regiões 4-23 e 45-64 da protease endógena dos 40 pacientes. Ao longo dessas três regiões, observamos a ocorrência de regiões conservadas idênticas à seqüência HXB2, aminoácidos localizados nas posições 5 a 9, 11, 18, 21 a 23, 47 a 53, 55, 56, 58, 59, 76, 78 a 88, 90, 91, 94 e 95, e outras regiões mais polimórficas, aminoácidos localizados nas posições 4, 10, 12 a 17, 19, 20, 45, 46, 54, 57, 60 a 64 (em destaque a posição L63 altamente polimórfica), 77, 89, 92 e 93. Analisando as regiões fora dos trechos estudados, verificamos também a ocorrência de determinadas regiões conservadas idênticas a seqüência HXB2, aminoácidos localizados nas posições 1, 2, 24 a 32, 34, 38, 42 a 44, 66, 67, 70, 73, 74 e 96 a 99, lembrando que entre as posições 23 a 25 encontra-se o sítio ativo da protease, e outras regiões mais polimórficas, aminoácidos localizados nas posições 33, 35 a 37 (sendo esta última, S37, altamente polimórfica), 39 a 41, 65, 68, 69, 71, 72 e 75.

Figura 6. Alinhamento das seqüências da protease do HIV-1 endógeno de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em destaque nas caixas vermelhas estão as três regiões da protease selecionadas para identificação de epítopos de células T CD4+ (Região 4-23, 45-64 e 76-95).

A figura 7 apresenta a freqüência dos subtipos de HIV-1 na população estudada. O subtipo B foi o mais freqüente (87 %) seguido pelo subtipo F (10%) e subtipo D (3%).

Figura 7. Freqüência dos subtipos de HIV-1 nos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS).

Os gráficos da figura 8 mostram as frequências de mutações nas 3 regiões da protease de HIV-1 abrangidas pelos peptídeos selecionados e mutações não incluídas nesses peptídeos encontradas nas seqüências endógenas dos 40 pacientes HIV-1+. Notamos que a primeira e segunda região da protease, região dos aminoácidos 4 a 23 e 45 a 64, apresentaram uma variedade de mutações não abrangidas pelos peptídeos selecionados (região 4 a 23: T4P, T12A, T12I, T12N, T12P, T12Q, I13V, K14R, I15V, G16E, G17E, L19I, L19T E L19V; região 45 a 64: K45Q, K45R, I54L, R57K, D60E, Q61N, I62V, L63C, L63N, L63Q, L63V, I64L, I64M e I64V), fazendo delas regiões menos conservadas aos peptídeos em estudo. Já a terceira região, aminoácido 76 a 95, mostrou uma maior conservação e identidade aos peptídeos desenhados para a região, apresentando apenas uma mutação não abrangida pelos peptídeos (Q92E). A tabela 7 mostra os valores dessas frequências.

Também analisamos a frequência de seqüências endógenas correspondentes às seqüências dos peptídeos selecionados da protease de HIV-1 nos 40 pacientes HIV-1+ em estudo (Tabela 8). Assim, 30% dos pacientes apresentaram seqüências endógenas idênticas às seqüências dos peptídeos para a primeira região (aminoácidos 4 a 23), 27,5% para a segunda região (aminoácidos 45 a 64) e 97,5% para a terceira região (aminoácidos 76 a 95).

Figura 8. Frequência das três seqüências selvagens HXB2 da protease de HIV-1 e das mutações selecionadas por inibidores de protease (IP) incluídas ou não nos peptídeos de três regiões da protease, região 4-23 (a), 45-64 (b) e 76-95 (c), encontradas nas seqüências endógenas dos 40 pacientes infectados por HIV-1. A seqüência selvagem e mutações incorporadas nos peptídeos do nosso estudo estão destacadas em vermelho, e as mutações não incluídas nos peptídeos estão destacadas em verde.

Tabela 7. Frequência das principais mutações selecionadas por inibidores da protease (IP) e incluídas nas regiões dos aminoácidos 4-23, 45-64 e 76-95 da protease encontradas nos 40 pacientes infectados por HIV-1 do presente estudo. A frequência de portadores de seqüências idênticas à HXB2 (4-23, 45-64 e 76-95) em cada região também está registrada.

Seqüência selvagem e mutações incorporadas nos peptídeos do nosso estudo	Frequência nos 40 pacientes CRT-DST/AIDS
HXB2 4-23	27,5%
L10I	2,5%
L10V	5,0%
L10F	0,0%
K20R	10,0%
K20T	0,0%
K20I	0,0%
K20M	0,0%
L10I/K20R	0,0%
L10V/K20R	2,5%
HXB2 45-64	10,0%
M46I	2,5%
M46L	2,5%
I54V	0,0%
M46L/I54V	0,0%
L63P	35,0%
L63T	2,5%
L63A	5,0%
L63S	2,5%
L63H	7,5%
M46I/L63P	2,5%
M46L/L63P	0,0%
I54V/L63P	0,0%
M46I/I54V/L63P	0,0%
HXB2 76-95	50,0%
V77I	35,7%
V82A	0,0%
V82I	0,0%
I84V	0,0%
N88D	0,0%
L89M	7,5%
L89I	0,0%
L90M	0,0%
I93L	22,5%
V77I/I93L	17,5%

Tabela 8. Frequência de pacientes infectados por HIV-1 carreadores de seqüências endógenas da protease idênticas a cada peptídeo selecionado, das regiões 4-23, 45-64 e 76-95 (seqüências selvagens, cepa HXB2) da protease de HIV-1 e os peptídeos incorporando as principais mutações relacionadas aos inibidores da protease (IP).

Peptídeos	Seqüência dos peptídeos da protease de HIV-1 selecionados	Frequência nos 40 pacientes CRT-DST/AIDS (%)
HXB2 4 - 23	TLWQRPLVTIKIGGQLKEAL	27,5
L10I	TLWQRP <u>I</u> VTIKIGGQLKEAL	0,0
L10V	TLWQRP <u>V</u> VTIKIGGQLKEAL	0,0
L10F	TLWQRP <u>F</u> VTIKIGGQLKEAL	0,0
K20R	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>R</u> EAL	2,5
K20T	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>T</u> EAL	0,0
K20I	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>I</u> EAL	0,0
K20M	TLWQRPLVTIKIGGQL <u>M</u> EAL	0,0
L10I/K20R	TLWQRP <u>I</u> VTIKIGGQL <u>R</u> EAL	0,0
L10V/K20R	TLWQRP <u>V</u> VTIKIGGQL <u>R</u> EAL	0,0
HXB2 45 - 64	KMIGGIGGFIKVRQYDQILI	10,0
M46I	K <u>I</u> IGGIGGFIKVRQYDQILI	0,0
M46L	K <u>L</u> IGGIGGFIKVRQYDQILI	0,0
I54V	KMIGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQILI	0,0
M46L/I54V	K <u>L</u> IGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQILI	0,0
L63P	KMIGGIGGFIKVRQYDQI <u>P</u> I	15,0
L63T	KMIGGIGGFIKVRQYDQI <u>T</u> I	0,0
L63A	KMIGGIGGFIKVRQYDQI <u>A</u> I	0,0
L63S	KMIGGIGGFIKVRQYDQI <u>S</u> I	0,0
L63H	KMIGGIGGFIKVRQYDQI <u>H</u> I	2,5
M46I/L63P	K <u>I</u> IGGIGGFIKVRQYDQI <u>P</u> I	0,0
M46L/L63P	K <u>L</u> IGGIGGFIKVRQYDQI <u>P</u> I	0,0
I54V/L63P	KMIGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQI <u>P</u> I	0,0
M46I/I54V/L63P	K <u>I</u> IGGIGGF <u>V</u> KVRQYDQI <u>P</u> I	0,0
HXB2 76 - 95	LVGPTPVNIIGRNLLTQIGC	50,0
V77I	<u>I</u> VGPTPVNIIGRNLLTQIGC	17,5
V82A	LVGPTP <u>A</u> NIIGRNLLTQIGC	0,0
V82I	LVGPTP <u>I</u> NIIGRNLLTQIGC	0,0
I84V	LVGPTPVN <u>V</u> IGRNLLTQIGC	0,0
N88D	LVGPTPVNIIGR <u>D</u> LLTQIGC	0,0
L89M	LVGPTPVNIIGRN <u>M</u> LTQIGC	7,5
L89I	LVGPTPVNIIGRN <u>I</u> LTQIGC	0,0
L90M	LVGPTPVNIIGRNL <u>M</u> TQIGC	0,0
I93L	LVGPTPVNIIGRNLLTQ <u>L</u> GC	5,0
V77I/I93L	<u>I</u> VGPTPVNIIGRNLLTQ <u>L</u> GC	17,5

Na tabela 9 apresentamos os resultados da genotipagem de resistência aos IPs dos 40 pacientes HIV-1+ e nos gráficos da figura 9 estes resultados foram divididos segundo o IP em uso.

Tabela 9. Genotipagem de resistência aos inibidores da protease de 40 infectados por HIV-1.

<i>Pacientes CRT</i>	<i>FPV</i>	<i>IDV</i>	<i>LPV</i>	<i>NFV</i>	<i>RTV</i>	<i>SQV</i>	<i>ATV</i>	<i>DRV</i>	<i>FPV/r</i>	<i>SQV/R</i>	<i>IDV/r</i>	<i>ATV/r</i>	<i>Subtipo</i>
PR001	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR002	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR004	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR005	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR006	R	I	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	F
PR007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR008	I	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR011	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR012	S	I	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	B
PR013	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR014	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR015	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR016	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR017	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR018	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR019	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR020	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR022	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR024	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR025	R	I	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	F
PR028	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR029	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR032	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	F
PR033	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR034	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	B
PR035	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR037	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR044	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR046	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR048	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR049	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	I	S	B
PR050	S	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	B
PR052	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	F
PR061	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR067	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR071	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR076	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
PR077	R	R	S	R	R	R	R	S	I	S	R	S	B
PR082	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B

Inibidores de protease: FPV: fosamprenavir; IDV: Indinavir; LPV: Lopinavir; NFV: Nelfinavir; RTV: Ritonavir; SQV: Saquinavir; ATV: Atazanavir; DRV: Darunavir; FPV/r: fosamprenavir/ritonavir; SQV/R: Saquinavir/ritonavir; IDV/r: Indinavir/ritonavir; ATV/r: Atazanavir/ritonavir. Genotipagem: R: resistente; S: sensível; I: intermediária.

De um modo geral, poucos pacientes apresentaram genótipo de resistência aos IPs. Todos os pacientes em uso de LPV mostraram-se sensíveis ao tratamento, porém dois pacientes apresentaram genótipo de resistência intermediária ao ATV

(PR006 e PR025) mesmo sem terem usado a droga (Tabela 9 e Figura 9a e 9b). Entre os pacientes em uso de ATV, um apresentou genótipo de resistência à droga em uso (PR077) e nenhum apresentou genótipo de resistência ao LPV (Tabela 9 e Figura 9c e 9d).

Figura 9. Genotipagem de resistência ao Lopinavir (LPV) e ao Atazanavir (ATV) de 31 pacientes infectados por HIV-1 em uso de LPV (a,b) e de 9 pacientes infectados por HIV-1 em uso de ATV (c,d). I= resistência intermediária; R= resistente; S= sensível.

Em relação aos pacientes em uso de Lopinavir, verificamos que nenhuma mutação de resistência característica para estas drogas foi identificada (V32I, I47V/A e V82A/F/T/S) (Figura 6) (Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1; Johnson e cols. 2008). Em relação aos pacientes em uso de Atazanavir, apesar de um paciente (PR077) ter apresentado resistência à droga, nenhuma mutação de

resistência característica tampouco foi identificada (I50L, I84V e N88S) (Figura 6) (Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1; Johnson e cols. 2008). Em relação ao ritonavir, apesar de verificarmos alguns pacientes resistentes ou com resistência intermediária, esta droga por si só não leva a resistência (não existem mutações de resistência característica), uma vez que sua ação é de inibir as enzimas que metabolizam os inibidores da protease fazendo com que eles permaneçam por mais tempo no organismo em uma concentração plasmática superior, aumentando dessa forma a eficiência clínica do tratamento (Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1; Johnson e cols. 2008).

4.3 Análise de divisão celular por citometria de fluxo baseado em diluição de corante vital (ensaio de CFSE)

Os ensaios de proliferação celular utilizando diluição de CFSE foram realizados com amostras de CMSP de 40 indivíduos HIV-1+ para detecção de resposta proliferativa de células T CD4+ e T CD8+ em resposta aos peptídeos em estudo. Os resultados são apresentados nas tabelas 10 e 11, respectivamente.

Dos 40 pacientes testados, 77,5% e 75,0% apresentaram resposta proliferativa de células T CD4+ e CD8+ a pelo menos um peptídeo (Figura 10). A mediana do número de peptídeos reconhecidos por paciente foi de 2 (quartil 25%-quartil 75%=1-6) e 1 (quartil 25%-quartil 75%=1-4) para linfócitos T CD4+ e CD8+, respectivamente. O paciente PR032 mostrou forte resposta proliferativa direcionada a todos os peptídeos testados, tanto de células T CD4+ como CD8+.

Todos os 35 peptídeos da protease testados (100%) foram reconhecidos por células T CD4+ e T CD8+ (Figura 11) de pelo menos um paciente. A mediana do número de pacientes reconhecendo cada peptídeo foi de 4 (quartil 25%-quartil 75%=3-6) e 3 (quartil 25%-quartil 75%=2-5) para linfócitos T CD4+ e CD8+, respectivamente.

A região 76-95 da seqüência da protease foi a mais reconhecida tanto por células T CD4+ (65,0%) como por célula T CD8+ (55,0%) (tabela 12).

Também investigamos se existiam grupos de pacientes que reconheciam preferencialmente determinadas regiões (regiões 4-23, 45-64 e 76-95). Para células T CD4+, o grupo mais freqüente foram pacientes que reconheceram especificamente a terceira região (25%), seguido do reconhecimento simultâneo das 3 regiões (20%), reconhecimento simultâneo da primeira e terceira região (10%), reconhecimento simultâneo da segunda e terceira região (10%), reconhecimento da segunda (7,5%) e finalmente reconhecimento da primeira região (2,5%) e reconhecimento simultâneo da primeira e segunda região (2,5%). Para células T CD8+, o grupo mais freqüente foram pacientes que reconheceram as 3 regiões simultaneamente (17,5%) assim como o reconhecimento apenas da terceira região (17,5%), seguido pelo reconhecimento simultâneo da segunda e terceira região (12,5%), reconhecimento da primeira região (10%) assim como da segunda (10%) e finalmente reconhecimento simultâneo da primeira e terceira região (7,5%). Não houve reconhecimento simultâneo da primeira e segunda região.

Tabela 10. Análise de proliferação celular de células T CD4+. Células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com 10 μ M CFSE, estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 (10 μ M) e controles (SEB (10 μ g/mL) e/ou PHA (5 μ g/mL)) e mantidas em cultura por 5 dias. Após esse período, as células foram marcadas com conjugados fluorescentes anti-CD3-PE e anti-CD4-PECy5 e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Flow Jo. Os resultados mostram o índice de estimulação (IE), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD4+ que proliferaram em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD4+ que proliferaram sem estímulo. 10.000 eventos foram adquiridos. Respostas de IE > 2,5 foram consideradas positivas e estão em destaque na tabela.

PACIENTE	PEPTÍDEOS PROTEASE																																		
	REGIÃO 4-23										REGIÃO 45-64										REGIÃO 76-95														
	HXB2 4-23	L10I	L10V	L10F	K20R	K20T	K20I	K20M	L10I/K20R	L10V/K20R	HXB2 45-64	M46I	M46L	I54V	M46L/I54V	L63P	L63T	L63A	L63S	L63H	M46I/L63P	M46L/L63P	I54V/L63P	M46I/I54V/L63P	HXB2 76-95	V77I	V82A	V82I	I84V	N88D	L89M	L89I	L90M	I93L	V77I/I93L
PR001	4,9	1,4	1,0	0,9	2,3	1,8	3,4	8,1	1,4	0,6	1,3	1,0	1,0	15,8	11,7	1,2	0,9	1,0	3,0	1,0	0,7	1,3	2,4	1,3	0,9	1,2	0,9	2,2	8,6	0,9	2,5	1,0	0,7	1,3	0,9
PR002	1,4	1,0	0,7	1,0	2,0	0,8	0,9	0,7	1,0	1,4	0,8	0,5	1,1	0,9	1,4	0,9	0,8	1,4	0,8	1,0	1,0	2,1	2,4	0,9	1,2	1,0	1,0	0,7	1,8	0,9	1,2	2,2	2,2	1,0	2,5
PR004	0,6	0,9	1,0	2,1	0,5	0,6	0,7	0,8	0,4	0,8	0,5	0,9	0,8	0,7	1,2	1,0	0,9	1,2	0,9	0,9	0,9	1,2	0,6	1,0	1,0	0,5	1,0	1,2	0,6	0,9	0,8	1,1	1,0	1,1	0,8
PR005	2,3	1,3	0,4	0,6	0,9	2,6	1,6	1,0	0,8	0,4	1,0	2,1	2,6	0,6	1,1	1,9	1,2	1,5	1,4	1,0	1,3	1,6	1,2	4,3	0,8	0,2	-	-	0,7	1,5	1,0	-	-	-	1,2
PR006	0,8	0,2	0,7	5,3	4,9	0,6	1,1	0,8	0,7	6,4	4,9	0,8	1,2	0,9	1,0	5,5	4,6	1,3	1,6	0,6	1,8	4,8	5,8	0,7	0,8	0,8	0,3	6,6	6,3	1,3	1,3	1,0	0,9	6,6	6,2
PR007	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,8	0,7	0,6	0,4	0,4	0,5	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,7	0,2	8,2	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	1,1	0,3
PR008	1,0	0,5	1,1	1,3	33,6	1,6	0,9	2,4	0,8	13,3	25,6	2,9	0,9	2,5	2,6	2,0	2,1	1,7	1,4	15,8	26,3	2,0	1,6	1,8	0,9	3,9	0,5	35,9	12,7	2,4	9,8	33,0	1,3	8,6	4,0
PR009	1,2	0,6	0,5	0,2	0,3	0,2	0,8	0,4	0,2	0,5	0,4	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7	0,8	0,2	0,6	1,4	0,7	0,7	0,6	0,5	1,2	0,4	0,4	8,9	0,3	0,4	1,7	1,5	6,6	0,8	0,4
PR011	0,5	4,7	2,9	1,5	0,5	3,0	4,1	0,3	0,5	0,2	0,3	1,3	0,4	1,3	0,8	0,2	0,5	0,7	0,4	1,2	0,4	0,3	0,2	0,8	1,0	7,3	0,4	0,5	0,3	1,3	1,4	0,9	0,6	1,0	0,4
PR012	0,4	0,4	1,2	2,3	3,7	1,7	0,8	1,9	1,1	0,5	1,1	0,9	0,5	0,8	1,4	0,6	0,5	1,2	4,1	0,7	0,6	0,9	0,7	1,3	11,8	0,4	1,0	0,5	0,5	1,3	2,2	0,5	0,6	0,4	0,6
PR013	1,6	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,4	0,7	0,8	0,7	1,2	1,0	0,8	1,2	1,3	0,8	0,5	0,9	1,8	1,0	1,4	1,0	1,1	1,5	3,4	0,5	0,5	2,3	0,6	2,4	1,2	1,7	0,8	1,3	0,7
PR014	0,8	0,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,5	1,0	0,5	0,7	0,6	1,1	1,6	1,1	1,2	1,4	1,2	0,9	0,5	0,8	1,4	0,7	1,0	1,2	0,9	0,9	0,7	1,4	1,8	1,2	1,1	1,0	0,9	1,0	0,7
PR015	1,0	0,4	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,4	1,4	1,4	0,8	1,4	0,6	1,0	0,8	0,8	0,7	0,8	0,5	0,7	1,2	1,0	0,4	0,7	0,3	3,5	0,8	0,7	0,3	6,0	0,4	0,6	5,8
PR016	0,6	0,3	0,5	1,1	0,5	0,6	1,3	0,4	0,7	1,1	0,4	0,9	1,1	1,0	0,8	0,9	0,9	0,6	0,5	0,8	0,3	0,6	0,7	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	1,9	0,5	0,6	1,5	0,8	0,8	0,6
PR017	0,7	0,8	0,9	0,7	1,0	0,5	0,3	0,5	0,6	0,9	0,8	0,3	0,3	0,4	0,5	0,9	0,9	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8	1,1	0,5	0,4	0,7	0,4	0,7	1,5	0,9	1,2	0,9	0,6	1,1	2,8
PR018	12,3	0,4	0,5	0,5	1,5	0,3	1,1	0,6	0,4	0,4	1,3	0,7	0,4	1,2	0,8	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,8	0,3	0,8	0,4	0,5	0,7	0,4	0,5	1,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5
PR019	0,6	0,2	0,3	0,3	0,6	0,8	0,6	0,4	1,1	0,6	0,6	1,5	0,8	0,5	0,9	0,6	0,8	0,7	1,8	2,9	2,6	0,4	1,2	1,9	1,5	3,3	1,7	1,4	2,2	3,1	2,7	4,6	7,8	4,7	2,2
PR020	1,0	0,4	0,8	0,7	0,9	1,6	0,5	3,5	0,8	1,9	1,1	1,4	4,7	2,2	1,0	1,4	0,8	21,8	1,5	1,3	1,1	0,7	0,6	3,4	0,5	0,5	0,9	1,8	0,2	4,7	0,7	6,0	1,2	0,8	0,5
PR022	0,5	0,5	0,5	0,6	0,8	1,0	0,7	2,3	1,1	0,8	5,7	1,1	0,8	1,0	1,2	0,7	2,1	1,1	0,9	0,9	1,2	0,7	4,1	1,8	0,9	0,6	1,0	3,2	2,5	1,3	2,4	15,8	7,6	1,6	1,2
PR024	1,3	0,8	0,9	1,5	2,2	0,7	1,8	0,6	1,7	0,6	0,7	0,8	1,8	0,8	1,3	0,7	0,7	1,2	0,9	1,3	4,5	0,7	0,7	0,7	1,0	1,1	1,0	0,8	1,2	0,8	0,7	1,3	0,9	0,6	0,8
PR025	1,1	0,7	0,8	1,0	2,0	0,8	1,1	7,9	1,0	0,9	1,0	1,6	0,7	0,7	1,0	12,7	0,9	0,9	4,0	0,9	8,5	1,4	1,5	0,6	2,0	1,1	1,7	3,8	1,2	2,6	1,1	5,4	1,2	1,2	2,1
PR028	0,4	1,0	0,0	0,0	14,6	0,3	278,8	0,9	1,8	0,5	0,0	1,6	0,4	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,8	0,0	0,0	0,0	23,1	1,2	9,2	135,8	203,5	0,0	6,2
PR029	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	0,8	1,4	0,8	0,6	0,7	1,3	0,6	1,0	0,7	0,8	0,7	1,1	0,7	1,1	0,9	0,8	0,9	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0	0,9	1,1	0,8	0,9	2,4	2,6	0,6	1,0
PR032	14,9	8,2	4,8	6,1	5,1	7,1	4,1	5,6	4,8	6,4	7,9	5,7	6,1	6,5	6,3	6,9	7,0	6,8	5,3	6,4	7,3	6,6	6,9	6,6	16,8	7,8	9,3	7,0	5,6	6,8	6,9	8,4	7,8	7,8	5,3
PR033	1,1	0,6	0,5	0,8	0,9	0,4	0,6	0,8	0,6	0,5	0,6	0,8	0,8	1,1	0,7	1,0	1,0	0,9	1,0	0,7	1,1	0,8	0,9	0,8	2,0	0,0	0,8	1,6	0,8	0,9	0,5	0,5	0,7	1,0	0,9
PR034	0,4	0,4	0,7	0,6	2,2	0,7	0,8	0,7	0,5	1,1	0,8	1,5	0,6	0,7	0,5	0,4	0,8	0,7	1,4	1,0	12,7	0,6	0,5	0,9	1,1	0,4	0,6	0,7	0,5	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	0,6
PR035	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,1	235,9	6,5	0,2	0,6	0,3	0,2	0,5	0,1	0,3	0,3	0,0	0,4	0,6	0,1	0,1	0,1	1,0	0,1	0,7	0,6	0,3	0,2	27,7	0,6	14,6	163,0	197,8	0,9	19,0
PR037	1,3	0,5	0,5	0,8	0,6	1,0	0,5	0,8	0,6	0,9	0,9	1,1	1,0	0,8	0,8	1,0	1,2	0,9	1,1	0,7	0,8	1,3	1,0	0,7	0,8	0,3	1,1	0,6	1,1	0,8	1,1	0,9	1,0	0,8	0,8
PR044	0,4	0,5	0,3	0,2	0,8	2,5	0,6	1,7	0,9	0,7	0,8	2,5	0,7	0,1	0,8	1,2	1,0	1,7	1,3	0,8	1,9	0,1	1,3	1,3	0,6	0,5	0,3	0,2	1,0	0,7	0,9	1,2	1,1	0,3	2,7
PR046	1,8	1,0	0,8	0,9	0,9	0,7	1,2	0,8	0,8	1,1	0,8	1,3	1,1	1,0	2,2	1,6	1,3	1,3	1,3	0,9	1,0	1,0	0,9	1,1	1,1	0,5	1,1	1,1	0,9	0,9	2,4	0,8	0,7	0,9	1,0
PR048	0,8	1,1	1,0	1,2	0,9	0,6	0,9	0,6	1,0	0,8	1,0	-	3,6	0,8	0,9	0,7	0,8	0,8	1,1	1,3	1,2	0,9	0,9	19,2	1,0	1,1	1,0	0,8	0,7	1,0	1,6	1,4	1,8	6,7	1,0
PR049	1,1	1,8	0,8	0,7	3,5	0,9	0,8	0,9	0,7	1,1	0,9	-	0,5	1,0	0,9	0,4	1,3	1,0	1,7	1,1	1,2	0,7	1,1	0,9	1,2	0,8	1,3	0,7	1,7	2,0	1,8	3,1	1,1	0,8	1,4
PR050	1,1	1,4	1,3	1,3	1,3	1,0	1,1	1,2	1,3	1,0	1,6	-	1,1	1,2	1,0	0,9	1,5	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	1,2	1,4	1,3	1,2	1,2	1,5	1,1	1,0	1,6	-	1,2	1,3	1,3
PR052	1,6	0,7	2,9	5,0	1,3	2,5	1,2	1,4	1,5	1,0	0,9	1,6	3,0	2,0	2,3	1,1	2,1	1,6	1,7	1,5	1,5	1,4	1,3	2,1	1,6	1,5	0,8	1,4	1,5	4,8	1,7	1,7	2,4	1,1	1,3
PR061	0,5	0,8	2,0	1,0	0,9	1,0	1,1	0,9	0,9	0,5	0,5	-	0,9	0,9	0,8	0,8	1,0	0,8	1,1	1,2	1,9	0,9	1,0	1,0	0,6	1,6	0,9	1,1	3,0	-	3,7	1,1	1,4	0,8	1,4
PR067	0,7	1,8	0,6	0,6	0,7	0,6	1,6	0,6	1,0	0,9	0,8	0,8	1,3	0,3	0,8	0,8	0,7	0,5	1,7	0,5	0,8	0,8	0,4	0,6	1,3	0,5	0,8	13,3	2,5	0,8	1,1	0,7	5,7	0,8	1,2
PR071	0,6	0,9	0,9	0,8	0,7	0,5	0,6	0,0	0,4	0,5	0,6	0,8	0,8	0,8	1,1	1,9	0,7	0,5	0,9	0,0	0,7	0,6	0,8	0,3	0,6	1,5	0,6	0,5	1,6	0,3	1,				

Tabela 11. Análise de proliferação celular de células T CD8+. Células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com 10 μ M CFSE, estimuladas com peptídeos da protease de HIV-1 (10 μ M) e controles (SEB (10 μ g/mL) e/ou PHA (5 μ g/mL)) e mantidas em cultura por 5 dias. Após esse período, as células foram marcadas com conjugados fluorescentes anti-CD3-PE e anti-CD8-APC e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Flow Jo. Os resultados mostram o índice de estimulação (I.E.), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD8+ que proliferaram em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD8+ que proliferaram sem estímulo. 10.000 eventos foram adquiridos. Respostas de IE > 3,5 foram consideradas positivas e estão em destaque na tabela.

PACIENTE	PEPTÍDEOS PROTEASE																																		
	REGIÃO 4-23										REGIÃO 45-64										REGIÃO 76-95														
	HXB2 4-23	L10I	L10V	L10F	K20R	K20T	K20I	K20M	L10I/K20R	L10V/K20R	HXB2 45-64	M46I	M46L	IS4V	M46I/IS4V	L63P	L63T	L63A	L63S	L63H	M46I/L63P	M46L/L63P	IS4V/L63P	M46I/IS4V/L63P	HXB2 76-95	V77I	V82A	V82I	IS4V	N88D	L89M	L89I	L90M	IS3L	V77I/IS3L
PR001	1,4	1,5	1,3	1,0	1,1	1,9	3,3	6,1	1,0	0,4	1,6	1,0	1,0	11,3	10,8	0,8	1,3	0,9	3,4	0,7	0,6	1,2	3,0	0,6	2,0	0,9	1,0	1,2	7,6	1,3	3,5	0,9	0,8	1,9	0,9
PR002	1,4	1,0	0,9	1,0	2,4	1,0	1,1	1,1	1,3	1,2	0,6	1,0	0,8	0,9	1,4	1,0	0,7	1,2	1,0	0,9	1,1	1,3	2,3	1,0	1,4	0,8	1,1	1,1	2,1	1,7	1,3	1,7	1,8	1,5	2,7
PR004	0,6	0,7	0,9	3,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,7	0,6	0,7	1,3	0,7	1,5	1,1	0,7	0,6	0,5	0,6	0,6	0,9	0,5	0,8	0,5	0,2	1,0	0,8	1,4	0,6	1,0	0,9	0,6	0,5	0,4
PR005	4,1	1,0	0,3	0,7	0,5	2,8	2,3	0,7	1,3	1,2	0,3	3,6	2,7	0,9	1,3	1,7	0,6	1,7	2,8	0,6	1,8	1,8	0,5	5,3	0,6	0,3	-	-	0,2	3,8	0,4	-	-	-	0,4
PR006	0,7	0,3	0,6	9,9	10,2	0,5	0,7	0,5	0,5	10,5	9,9	0,5	0,6	0,4	0,5	10,1	10,0	1,1	1,2	0,4	1,8	9,5	10,2	0,5	0,5	0,6	0,3	10,3	10,4	0,9	1,0	0,6	0,7	10,4	10,1
PR007	1,1	1,5	0,5	0,3	0,9	0,3	0,4	0,5	0,3	0,6	0,8	0,2	0,1	0,2	0,3	1,0	0,8	1,0	1,4	0,2	0,7	0,0	0,6	0,5	0,6	0,7	0,2	57,2	-	1,0	1,0	0,5	0,1	3,0	0,4
PR008	1,1	1,0	0,7	0,6	42,7	0,9	0,7	1,1	1,0	1,3	38,8	1,5	1,0	1,5	1,3	1,3	1,4	1,7	0,8	0,7	6,0	0,9	1,0	0,9	0,7	0,3	0,3	57,6	4,8	2,4	18,3	43,7	0,9	11,0	1,3
PR009	1,0	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	1,7	0,6	0,4	0,6	0,5	0,7	0,8	0,8	0,6	0,5	1,0	0,6	1,1	1,6	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3	40,9	0,7	0,5	0,4	0,9	2,7	0,7	0,4
PR011	0,7	11,1	4,1	1,9	0,7	3,9	4,6	0,6	0,5	0,4	0,2	1,8	0,6	0,6	0,5	0,3	0,4	0,4	1,0	0,9	0,4	0,4	0,3	0,5	1,7	5,0	0,4	0,4	0,3	1,5	3,0	0,7	0,4	1,5	0,5
PR012	0,9	0,9	0,9	1,9	2,4	0,6	0,6	1,3	0,9	0,4	0,8	0,8	0,6	0,6	1,6	0,3	0,4	1,6	2,2	0,4	1,1	1,0	0,8	1,2	6,0	0,2	0,6	0,4	0,5	0,3	2,2	0,4	0,5	0,5	0,6
PR013	1,5	1,1	1,0	0,8	0,8	1,2	0,8	0,8	1,5	0,7	0,5	0,4	1,2	1,3	0,7	1,2	0,9	1,0	2,1	0,8	1,4	0,7	1,3	1,7	8,3	1,2	1,2	1,7	1,2	5,1	2,1	0,5	0,9	1,3	0,5
PR014	1,1	1,4	1,4	0,9	1,4	1,0	1,1	1,3	1,1	1,1	1,2	1,0	2,0	1,1	1,6	1,9	1,7	1,0	0,9	1,2	1,3	0,9	1,8	0,9	1,3	1,8	1,6	1,1	1,9	1,6	1,2	1,2	1,4	1,1	1,2
PR015	1,9	5,4	1,2	1,7	3,1	1,8	1,2	1,6	0,9	2,1	3,0	1,4	1,5	1,5	2,3	1,5	2,9	1,0	1,4	0,9	1,0	0,9	2,5	2,1	1,5	0,0	1,6	1,5	3,8	1,1	1,5	0,9	1,3	0,5	18,8
PR016	1,2	1,3	1,1	3,4	1,5	1,1	1,0	0,5	1,0	0,9	1,6	0,9	1,2	2,8	0,8	1,5	1,4	1,6	1,0	1,0	1,1	1,4	0,8	0,7	1,3	1,4	1,1	1,2	3,8	1,3	1,0	1,8	1,5	1,2	0,7
PR017	1,7	2,1	2,8	0,9	0,3	0,4	0,8	0,4	0,0	0,8	1,6	0,9	0,0	0,9	0,5	0,3	1,7	0,0	1,2	2,4	0,5	0,4	5,0	0,0	0,0	1,1	1,0	1,1	1,8	0,9	6,3	2,6	1,6	0,3	5,1
PR018	21,9	0,3	0,5	0,6	2,2	0,2	0,5	0,7	0,3	0,2	1,7	0,3	0,3	0,7	0,4	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,6	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,6
PR019	0,3	0,3	0,7	0,5	0,5	0,4	0,6	0,5	1,6	1,3	0,7	0,6	1,4	0,3	0,5	0,3	2,5	1,0	7,2	25,0	14,1	0,4	7,4	8,5	9,3	27,5	9,2	6,2	9,3	25,7	32,5	57,5	65,7	42,7	28,0
PR020	1,2	0,2	0,7	0,6	0,5	0,5	0,8	2,0	0,7	3,2	0,7	1,8	9,7	1,7	1,5	0,5	0,4	53,7	0,8	0,8	1,3	0,5	0,6	6,3	0,4	0,4	0,3	1,6	0,4	9,5	0,8	1,3	0,5	1,8	0,3
PR022	1,6	1,2	1,1	1,0	1,9	3,3	2,1	2,8	1,5	1,1	7,9	1,1	1,0	1,2	1,6	0,9	4,2	1,5	1,1	1,1	1,2	1,2	5,8	2,2	1,6	1,3	1,3	5,1	4,9	1,7	4,1	21,4	11,9	2,8	1,9
PR024	1,5	1,0	0,9	1,9	2,4	1,1	2,3	0,8	1,9	0,9	0,9	0,9	1,5	0,9	1,5	0,8	1,2	1,4	0,9	1,0	5,0	0,7	0,9	1,1	0,7	1,0	1,2	1,2	1,2	0,9	0,8	1,1	0,9	0,9	1,1
PR025	1,2	0,9	1,0	1,3	1,9	0,9	1,1	1,0	0,8	1,1	1,2	1,3	0,7	1,0	0,8	9,8	0,7	1,0	2,9	0,8	7,7	0,8	1,5	0,7	2,1	1,4	1,8	0,6	1,3	2,6	1,3	1,2	1,2	1,2	1,6
PR028	0,6	0,0	0,0	0,0	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	1,2	0,7	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
PR029	0,5	0,6	0,8	0,6	0,9	0,4	1,1	0,7	0,5	0,6	1,1	0,4	0,7	0,6	0,6	0,7	1,1	0,5	0,7	0,6	0,5	0,7	0,8	0,7	1,0	0,9	0,9	0,5	1,1	0,4	0,7	0,5	0,8	0,3	0,8
PR032	42,9	48,1	47,7	45,4	51,0	74,6	72,5	69,6	49,4	69,0	75,0	81,0	65,6	72,3	84,0	77,5	82,5	74,4	84,0	76,3	90,0	72,9	90,0	94,6	135,0	96,5	109,6	97,9	83,1	99,4	97,5	109,2	107,5	75,0	91,3
PR033	1,2	0,8	0,8	1,0	0,6	0,4	0,8	0,6	0,9	0,7	0,7	0,6	2,4	0,9	0,8	1,2	1,0	0,4	0,8	0,7	0,6	1,0	1,1	0,8	0,0	0,8	0,4	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7	0,6	0,7	0,8
PR034	0,6	0,6	0,9	0,6	2,6	0,5	1,1	0,5	0,5	1,7	0,5	2,8	0,8	1,0	0,7	0,4	1,0	1,3	1,3	1,1	21,4	0,7	0,8	0,7	1,1	0,7	0,6	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8
PR035	0,8	0,0	0,0	0,0	0,3	1,0	0,0	1,2	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,6	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	0,8	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	1,1	1,5	0,0	0,0	0,7	0,0	1,3
PR037	1,5	0,6	1,0	1,1	1,0	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	1,8	1,1	0,7	1,3	1,3	1,1	0,9	1,1	0,8	1,0	0,9	0,5	0,9	0,6	0,8	1,1	0,8	0,6	1,1	0,9	1,0	1,3	1,0
PR044	1,1	2,1	0,6	1,1	1,5	6,2	0,5	1,5	1,1	1,2	0,8	1,1	1,4	40,5	1,1	1,4	1,5	0,6	0,7	2,0	1,5	0,0	1,5	2,4	0,7	0,7	0,4	0,5	1,6	1,1	0,7	1,1	1,4	0,8	15,4
PR046	2,5	0,9	1,0	0,7	0,9	0,8	0,7	1,1	0,6	0,9	0,7	1,0	0,9	1,3	2,1	3,0	1,6	1,4	1,0	0,8	0,8	1,1	1,0	1,0	0,9	0,8	1,3	1,5	1,0	0,8	3,8	1,5	1,2	1,0	1,0
PR048	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,5	0,7	0,4	0,4	0,5	0,7	-	1,0	0,7	0,7	0,5	0,6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,6	1,8	0,7	0,7	1,7	0,9
PR049	0,7	1,1	0,5	0,4	6,4	0,5	0,9	0,5	0,3	0,5	0,6	-	0,7	0,7	0,7	0,4	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,4	1,0	0,7	0,6	0,6	0,6	0,4	0,4	1,4	0,6	0,7	0,6	0,3	1,0
PR050	1,0	1,0	1,2	1,0	1,4	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,9	-	1,3	1,0	0,9	1,0	1,4	1,0	1,1	0,9	1,2	1,2	1,1	1,2	0,9	1,1	0,6	1,1	1,0	-	1,0	-	1,1	0,9	1,4
PR052	1,6	0,8	2,5	4,7	0,9	2,0	1,2	1,1	1,2	0,9	0,6	1,4	3,1	1,4	2,0	0,9	1,8	1,6	1,1	0,9	1,0	1,2	1,2	2,1	0,9	0,9	0,8	0,8	1,8	4,9	1,1	0,8	1,4	0,8	0,7
PR061	0,5	1,1	3,3	1,2	1,8	0,7	1,0	1,8	1,5	0,8	0,5	-	0,9	0,9	1,1	1,4	1,2	0,8	0,8	2,5	1,3	1,3	1,1	0,6	1,0	0,5	0,8	0,5	-	0,7	0,8	0,5	0,6	1,0	
PR067	0,9	1,4	1,0	1,1	1,0	0,7	1,5	0,8	0,7	0,9	0,8	1,0	0,7	0,7	0,8	0,9	0,8	1,0	1,0	0,7	0,8	0,6	0,7	0,9	0,8	0,5	0,9	7,9	1,1	0,7	0,8	0,9	5,8	0,7	1,1
PR071	0,8	0,9	1,0	1,1	0,7	0,8	0,8	0,0	0,9	0,7	0,9	0,5	1,1	0,7	4,7	8,3	1,0	0,4	0,8	0,0	3,3	2,6	1,6	0,5	2,0	1,7	1,4	0,7	4,1	1,1	3,9	3,2	0,8	0,6	1,6
PR076	1,4	0,9	4,9	0,9	0,9	1,0	1,8	4,9	4,7																										

Tabela 12. Frequência de reconhecimento por células T CD4+ e T CD8+ de pacientes infectados por HIV-1 (n=40) de pelo menos um peptídeo da protease de HIV-1 (por região e no total)

	CD4 (%)	CD8 (%)
<i>Região 4 – 23</i>	35	35
<i>Região 45 – 64</i>	40	40
<i>Região 76 – 95</i>	65	55
<i>No total</i>	77,5	75

Figura 10. Número de peptídeos da protease de HIV-1, selvagens e mutantes, reconhecidos por células T CD4+ e T CD8+ de cada um dos pacientes infectados por HIV-1

Figura 11. Frequência de reconhecimento dos peptídeos da protease de HIV-1, selvagens e mutantes, por células T CD4+ e T CD8+ de pacientes infectados por HIV-1 (n=40). Em destaque em vermelho, peptídeo selvagem HXB2 4-23 e peptídeos mutantes da mesma região. Em destaque em verde, peptídeo selvagem HXB2 45-64 e peptídeos mutantes da mesma região. Em destaque em azul, peptídeo selvagem HXB2 76-95 e peptídeos mutantes da mesma região

Também analisamos a magnitude das respostas proliferativas de células T CD4+ e T CD8+ para cada peptídeo da protease de HIV-1 (Figuras 12 A e B) e de cada paciente (Figuras 12 C e D). Apesar da terceira região (PR76-95) ter apresentado um maior reconhecimento por células T CD4+ (65,0%) (tabela 12), a magnitude de resposta mostrou-se comparável para as três regiões em estudo. Os peptídeos que induziram uma maior magnitude de resposta foram K20I localizado na primeira região dos aminoácidos 4-23 e L89I e L90M, localizados na terceira região dos aminoácidos 76-95. Em relação às células T CD8+, verificamos que a magnitude de resposta foi visivelmente superior que a de células T CD4+, embora sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 12 A e B). Notamos também uma grande dispersão interindividual dessas respostas, onde alguns pacientes

apresentaram respostas muito elevadas tanto para células T CD4+ (PR026 e PR35) quanto para células T CD8+ (PR032) (Figura 12C e D).

Figura 12. Magnitude de resposta proliferativa de células T CD4+ e CD8+ aos peptídeos selvagens e mutantes da protease em PBMC de 40 pacientes infectados por HIV-1. Magnitude de resposta de células (A) T CD4+ por peptídeo, (B) T CD8+ por peptídeo, (C) T CD4+ por paciente e (D) T CD8+ por paciente. As barras representam a mediana dos índices de estimulação positivos com os respectivos interquartis. A magnitude de resposta foi determinada a partir do cálculo das medianas considerando-se apenas os resultados acima do índice de estimulação ($IE > 2,5$ para CD4 e $IE > 3,5$ para CD8)

4.4 Comparação entre respostas de células T e seqüência da protease endógena

Os resultados das respostas proliferativas de células T CD4+ e T CD8+ aos peptídeos selvagens e mutantes foram analisados em relação à seqüência da protease do HIV-1 endógeno de cada paciente. Nas figuras 13 a 15 mostramos os resultados de IEs positivos de células T CD4 ($IE > 2,5$) para cada peptídeo testado divididos pelas regiões em estudo: aminoácido 4 a 23 (Figura 13), 45 a 64 (Figura 14) e 76 a 95 (Figura 15). Nas figuras 16 a 18 mostramos os mesmos resultados, porém para células T CD8 ($IE > 3,5$): aminoácido 4 a 23 (Figura 16), 45 a 64 (Figura 17) e 76 a 95 (Figura 18). Em amarelo foram destacadas seqüências da protease endógenas idênticas a seqüências de peptídeos em estudo e em azul, mutações existentes nos peptídeos encontradas ao longo das seqüências endógenas não idênticas a seqüências de peptídeos em estudo, portanto, seqüências portadoras de outras mutações diferentes daquelas inclusas nos peptídeos em estudo. As mutações não abrangidas pelos peptídeos testados e encontradas nas seqüências da protease do HIV-1 endógeno de cada paciente estão representadas na última coluna à direita. Apenas os valores de IEs para células T CD4 e T CD8 positivos foram apresentados na tabela.

Podemos observar vários padrões de reconhecimento dos peptídeos selvagens e mutantes:

1. Reconhecimento específico: Reconhecimento de peptídeo idêntico à sequência da protease do HIV-1 endógeno (podendo reconhecer outros peptídeos também) (RE);
2. Reconhecimento não específico: Reconhecimento de peptídeo diferente da sequência endógena da protease do HIV-1 (RNE);
3. Ausência de reconhecimento: Ausência de reconhecimento do peptídeo (NR).

Resposta linfoproliferativa célula T CD4+ e Sequenciamento - Região 4-23												
Pacientes	HXB2 4-23	L10I	L10V	L10F	K20R	K20T	K20I	K20M	L10I K20R	L10V K20R	Outras mutações	
1	4,9						3,4	8,1			K14R, I15V	
2												
4												
5						2,6					T12I, I13V	
6				5,3	4,9					6,4	I15V	
7											I13V, K14R	
8					33,6					13,3	I15V	
9											T12N, K14R, I15V	
11		4,7	2,9			3,0	4,1					
12					3,7						I15V	
13											G17E	
14											L19T	
15											T12N, L19I	
16											I13V, I15V	
17											T12P, K14R	
18	12,3										I15V	
19											I15V	
20								3,5			T12P, K14R, L19I	
22											I13V, K14R	
24												
25								7,9			K14R, I15V, G17E	
28					14,6		278,9					
29											I13V	
32	14,9	8,2	4,8	6,1	5,1	7,1	4,1	5,6	4,8	6,4	T12A, I15V, G16E	
33											G16E	
34												
35							235,9	6,5				
37												
44						2,5					T12N, L19I	
46												
48											L19I	
49					3,5							
50												
52			2,9	5,0							I15V	
61											K14R, I15V	
67												
71											T12Q	
76											I15V, G16E	
77											T4P, I13V	
82											I15V, L19V	
RE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
RNE	3	2	3	3	6	4	5	5	1	3	35	8,8
NR	37	38	37	37	34	36	35	35	39	37	365	91,3
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	400	100,0

Figura 13. Resultados de resposta proliferativa de células T CD4+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 4-23) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam os índices de estimulação positivos para CD4+ (>2,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(10)=400).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Resposta linfoproliferativa célula T CD4+ e Sequenciamento - Região 45-64															
Pacientes	HXB2 45-64	M46I	M46L	I54V	M46L I54V	L63P	L63T	L63A	L63S	L63H	M46I L63P	M46L L63P	I54V L63P	M46I I54V L63P	Outras mutações
1				15,8	11,7				3,0						I62V
2															I64V
4															I64L
5			2,6											4,3	
6	4,9					5,5	4,6					4,8	5,8		R57K, Q61N, L63C
7															I64V
8	25,6	2,9		2,5	2,6					15,8	26,3				K45R, R57K
9															I64V
11															I62V
12									4,1						I62V
13															I62V
14															
15															I64V
16															L63Q, I64V
17															
18															R57K
19										2,9	2,6				
20			4,7					21,8						3,4	
22	5,7												4,1		D60E, I62V, I64M
24											4,5				R57K, I62V
25						12,7			4,0		8,5				R57K, Q61N
28															K45R, R57K
29															I62V, I64V
32	7,9	5,7	6,1	6,5	6,3	6,9	7,0	6,8	5,3	6,4	7,3	6,6	6,9	6,6	R57K, Q61N, L63N
33															R57K, Q61N
34											12,7				Q61E, I62V, I64L
35															K45R, L63V
37															
44															L63Q, I64V
46															K45Q, I64V
48			3,6											19,3	
49															I62V
50															R57K, D60E, I62V
52			3,0												D60E, Q61E
61															
67															
71															
76					3,0										
77															I54L, R57K, Q61N
82													5,2		R57K
RE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RNE	4	2	5	3	4	3	2	2	4	3	6	2	4	4	48
NR	36	38	35	37	36	37	38	38	36	37	34	38	36	36	512
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	560
															100,0

Figura 14. Resultados da resposta proliferativa de células T CD4+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 45-64) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD4+ (>2,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(14)=560).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Resposta linfoproliferativa célula T CD4+ e Sequenciamento - Região 76-95													
Pacientes	HXB2 76-95	V77I	V82A	V82I	I84V	N88D	L89M	L89I	L90M	I93L	V77I I93L	Outras mutações	
1	4,9				8,6		2,5						
2													
4													
5													
6				6,6	6,3					6,6	6,2		
7				8,2									
8		3,9		35,9	12,7		9,8	33,0		8,6	4,0		
9				8,9					6,7				
11		7,3											
12	11,8												
13	3,4												
14													Q92E
15				3,5				6,0			5,8		
16													
17											2,8		
18													
19		3,3				3,1	2,7	4,6	7,8	4,7			
20						4,7		6,0					
22				3,2	2,5			15,8	7,6				
24													
25				3,8		2,6		5,4					
28					23,1		9,2	135,8	203,5		6,2		
29									2,6				
32	16,8	7,8	9,3	7,0	5,6	6,8	6,9	8,4	7,8	7,8	5,3		
33													
34													
35					27,7		14,6	163,0	197,8		19,0		
37													
44											2,7		
46													
48										6,7			
49								3,1					
50													
52						4,8							
61					3,0		3,7						
67				13,3	2,5				5,7				
71								3,9					
76							4,7	4,5	3,6	2,8	3,4		
77													
82													
RE	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	1,4
RNE	2	3	1	9	9	5	8	12	9	6	6	70	15,9
NR	36	36	39	31	31	35	32	28	31	34	31	364	82,7
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	440	100,0

Figura 15. Resultados da resposta proliferativa de células T CD4+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 76-95) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD4+ (>2,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(11)=440).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Resposta linfoproliferativa célula T CD8+ e Sequenciamento - Região 4-23												
Pacientes	HXB2 4-23	L10I	L10V	L10F	K20R	K20T	K20I	K20M	L10I K20R	L10V K20R	Outras mutações	
1								6,1			K14R, I15V	
2												
4				3,8								
5	4,1										T12I, I13V	
6				9,9	10,2					10,5	I15V	
7											I13V, K14R	
8					42,7						I15V	
9											T12N, K14R, I15V	
11		11,1	4,1			3,9	4,6					
12											I15V	
13											G17E	
14											L19T	
15		5,4									T12N, L19I	
16											I13V, I15V	
17											T12P, K14R	
18	21,9										I15V	
19											I15V	
20											T12P, K14R, L19I	
22											I13V, K14R	
24												
25											K14R, I15V, G17E	
28					13,8							
29											I13V	
32	42,9	48,1	47,7	45,4	51,0	74,6	72,5	69,6	49,4	69,0	T12A, I15V, G16E	
33											G16E	
34												
35												
37												
44						6,2					T12N, L19I	
46												
48											L19I	
49					6,4							
50												
52				4,8							I15V	
61											K14R, I15V	
67												
71											T12Q	
76			4,9						4,9	4,7	I15V, G16E	
77											T4P, I13V	
82											I15V, L19V	
RE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
RNE	3	3	3	4	5	3	2	2	2	3	30	7,5
NR	37	37	37	36	35	37	38	38	38	37	370	92,5
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	400	100,0

Figura 16. Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 4-23) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD8+ (>3,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(10)=400).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Resposta linfoproliferativa célula T CD8+ e Sequenciamento - Região 45-64															
Pacientes	HXB2 45-64	M46I	M46L	I54V	M46L I54V	L63P	L63T	L63A	L63S	L63H	M46I L63P	M46L L63P	I54V L63P	M46I I54V L63P	Outras mutações
1				11,32	10,82										I62V
2															I64V
4															I64L
5		3,6												5,4	
6	9,9					10,1	10,0					9,5	10,2		R57K, Q61N, L63C
7															I64V
8	38,8										6,0				K45R, R57K
9															I64V
11															I62V
12															I62V
13															I62V
14															
15															I64V
16															L63Q, I64V
17													5,0		
18															R57K
19									7,2	25,0	14,1		7,4	8,5	
20			9,7					53,7						6,3	
22	7,9						4,2						5,8		D60E, I62V, I64M
24											5,0				R57K, I62V
25						9,8					7,7				R57K, Q61N
28															K45R, R57K
29															I62V, I64V
32	75,0	81,0	65,6	72,3	84,0	77,5	82,5	74,4	84,0	76,3	90,0	72,9	90,0	94,6	R57K, Q61N, L63N
33															R57K, Q61N
34											21,4				Q61E, I62V, I64L
35															K45R, L63V
37															
44				40,5											L63Q, I64V
46															K45Q, I64V
48															
49															I62V
50															R57K, D60E, I62V
52															D60E, Q61E
61															
67															
71					4,7	8,3									
76					4,9										
77															I54L, R57K, Q61N
82													8,9		R57K
RE	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RNE	4	2	2	3	4	3	3	2	2	2	6	2	6	4	45
NR	36	38	38	37	36	36	37	38	38	38	34	38	34	36	514
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	560
															100

Figura 17. Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 45-64) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivo para CD8+ (> 3,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(14)=560).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Resposta linfoproliferativa célula T CD8+ e Sequenciamento - Região 76-95													
Pacientes	HXB2 76-95	V77I	V82A	V82I	I84V	N88D	L89M	L89I	L90M	I93L	V77I I93L	Outras mutações	
1					7,6								
2													
4													
5						3,8							
6				10,4	10,4					10,4	10,1		
7				57,2					3,0				
8				57,6	4,8		18,3	43,7		11,0			
9				40,9									
11		5,0											
12	6,0												
13	8,3					5,1							
14												Q92E	
15					3,8						18,8		
16					3,8								
17							6,3				5,1		
18													
19	9,3	27,5	9,2	6,2	9,3	25,7	32,5	57,5	65,7	42,7	28,0		
20						9,5							
22				5,1	4,9		4,1	21,4	11,9				
24													
25													
28													
29													
32	135,0	96,5	109,6	97,9	83,1	99,4	97,5	109,2	107,5	75,0	91,3		
33													
34													
35													
37													
44											15,4		
46							3,8						
48													
49													
50													
52						4,9							
61													
67				7,9					5,9				
71					4,1		3,9						
76			3,7				7,5	9,2	7,2	3,8	15,7		
77													
82													
RE	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,7
RNE	1	3	3	8	9	6	8	5	6	5	7	61	13,9
NR	36	37	37	32	31	34	32	35	34	35	33	376	85,5
	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	440	100

Figura 18. Resultados de resposta proliferativa de células T CD8+ aos peptídeos selvagem e mutantes da protease de HIV-1 (região 76-95) de 40 pacientes infectados por HIV-1. Em amarelo, seqüências endógenas idênticas a seqüência do respectivo peptídeo. Em azul, seqüências endógenas contendo tanto mutações contidas nos peptídeos analisados, quanto mutações adicionais (coluna à direita). Os números representam índices de estimulação positivos para CD8+ (>3,5). Os valores em porcentagens são o número de testes com o respectivo padrão, dividido pelo número total de testes (pacientes (40) x peptídeos testados(11)=440).

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

Entre as respostas celulares positivas, o padrão de reconhecimento mais freqüente, tanto para CD4+ quanto para CD8+, foi o reconhecimento de peptídeos cujas seqüências não correspondiam às seqüências da protease do HIV-1 endógeno (RNE): 97,4 % para células T CD4+ e 97,7 % para células T CD8+ (Tabela 13).

Tabela 13. Freqüências de testes com cada padrão de reconhecimento por células T CD4+ e T CD8+ dos peptídeos selvagens e mutantes da protease em 40 pacientes infectados por HIV-1

	RE		RNE		NR		Total	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
Região 4-23	0,0	0,0	8,8	7,5	91,3	92,5	100,0	100,0
Região 45-64	0,0	0,2	8,6	8,0	91,4	91,8	100,0	100,0
Região 76-95	1,4	0,7	15,9	13,9	82,7	85,5	100,0	100,0
Média	0,5	0,3	11,1	9,8	88,5	89,9	100,0	100,0

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à seqüência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo.

4.5 Respostas de células T dos pacientes cujas seqüências endógenas da protease correspondem às seqüências dos peptídeos.

Para avaliarmos mais detalhadamente o fenômeno descrito na tabela 13, observamos o perfil de reconhecimento de peptídeos da protease somente dos pacientes cuja seqüência endógena era idêntica a um dos peptídeos testados, evitando um possível viés causado pela análise da resposta de pacientes a peptídeos cujas seqüências não correspondem exatamente à seqüência da protease endógena (Figura 19). Esta análise foi dividida pelas três regiões da protease em

estudo, 4 a 23, 45 a 64 e 76 a 95, independente de ter ocorrido resposta proliferativa ao peptídeo com seqüência igual a endógena. Consideramos novamente os perfis de reconhecimento: RE, RNE, NR.

Para a região 4-23 da protease do HIV-1, observamos que dos 12 pacientes que apresentaram seqüência endógena idêntica a um dos peptídeos testados nenhum paciente reconheceu peptídeos endógenos (Figura 19A, perfil de reconhecimento a) e quatro pacientes reconheceram peptídeos distintos do endógeno tanto por células T CD4+ como T CD8+ (Figura 19A, perfil de reconhecimento RNE).

Para a região 45-64 da protease do HIV-1, observamos que dos 11 pacientes que apresentaram seqüência endógena idêntica a um dos peptídeos testados apenas um paciente reconheceu peptídeo endógeno por células T CD8+ (Figura 19B, perfil de reconhecimento RE). Quanto ao reconhecimento de peptídeos distintos do endógeno, cinco pacientes reconheceram tanto por células T CD4+ quanto por T CD8+ (Figura 19B, perfil de reconhecimento RNE).

Para a região 76-95 da protease do HIV-1, observamos que dos 39 pacientes que apresentaram seqüência endógena idêntica a um dos peptídeos testados cinco pacientes reconheceram peptídeo endógeno por células T CD4+ e três pacientes por células T CD8+ (Figura 19C, perfil de reconhecimento RE). Quanto ao reconhecimento de peptídeos distintos do endógeno, 27 pacientes reconheceram por células T CD4+ e 23 pacientes por células T CD8+ (Figura 19C, perfil de reconhecimento RNE).

Figura 19. Reconhecimento de peptídeos da protease do HIV-1 por células T CD4+ e CD8+ nas regiões 4-23 (A), 45-64 (B) e 76-95 (C) por pacientes que apresentam sequência endógena idêntica a um dos peptídeos em estudo.

Padrões de reconhecimento: RE: Reconhecimento de peptídeo idêntico à sequência da protease do HIV-1 endógeno; RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da sequência endógena da protease do HIV-1; NR: Ausência de reconhecimento do peptídeo

Com isso, observamos que, mesmo entre os pacientes que apresentavam seqüências da protease endógena idênticas aos peptídeos testados, o perfil de reconhecimento de peptídeos da protease mais freqüente foi o reconhecimento de seqüências diferentes da protease endógena (perfil RNE), dado que corrobora resultados anteriores (Tabela 13).

4.6 Reconhecimento específico e cruzado de seqüências endógenas da protease correspondentes às seqüências dos peptídeos em estudo.

Para investigar a freqüência da reconhecimento cruzado, analisamos apenas a resposta dos pacientes que reconheceram um peptídeo correspondente à seqüência endógena da protease, independente desta resposta ter sido por células T CD4⁺ ou CD8⁺ (n=7). Na tabela 14 alinhamos as seqüências endógenas destes pacientes (em destaque em azul) com a seqüência do isolado HXB2 (primeira linha) e as seqüências dos peptídeos correspondentes a cada região onde foi observada resposta a peptídeos idênticos à seqüência endógena da protease.

(A) Paciente PR071 - Região 45 a 64 (14peptídeos)

[illegible]

IE

[illegible]

(C) Paciente PR013 - Região 76 a 95 (11peptídeos)																			IE			
PR013	L	V	G	P	T	P	V	N	I	I	G	R	N	L	L	T	Q	I	G	C	CD4	CD8
HXB2 76-95	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3,4	8,3
V77I	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
V82A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
V82I	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
I84V	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
N88D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	-	5,1
L89M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	-	-
L89I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	-	-
L90M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	-	-
I93L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	-	-
V77I/I93L	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	-	-

D) Paciente PR019- Região 76 a 95 (11peptídeos)																			IE			
PR019	L	V	G	P	T	P	V	N	I	I	G	R	N	L	L	T	Q	I	G	C	CD4	CD8
HXB2 76-95	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	9,3
V77I	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	27,5
V82A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	9,2
V82I	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	6,2
I84V	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	9,3
N88D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	-	25,7
L89M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	-	32,5
L89I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	-	57,5
L90M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	-	65,7
I93L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	-	42,7
V77I/I93L	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	-	28,0

[illegible]

(F) Paciente PR032- Região 76 a 95 (11peptídeos)																			IE			
PR032	L	V	G	P	T	P	V	N	I	I	G	R	N	L	L	T	Q	I	G	C	CD4	CD8
HXB2 76-95	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	16,8	135,0
V77I	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7,8	96,5
V82A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9,3	109,6
V82I	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7,0	97,9
I84V	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5,6	83,1
N88D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	6,8	99,4
L89M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	6,9	97,5
L89I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	8,4	109,2
L90M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	7,8	107,5
I93L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	7,8	75,0
V77I/I93L	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	5,3	91,3

[illegible]

A tabela 15 representa um sumário dessas análises onde estão destacados o reconhecimento endógeno, cruzado (reconhece o endógeno e outros peptídeos com seqüência diferente do endógeno) e o não reconhecimento.

Tabela 15. Sumário do perfil de reconhecimento de peptídeos da protease entre os pacientes que apresentaram resposta de linfócitos T CD4+ e/ou CD8+ a peptídeo idêntico à sequência endógena (números representam a quantidade de peptídeos).

	Reconhecimento endógeno exclusivo		Reconhecimento Cruzado		Não reconhecimento	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
Pac. 08	1	0	6	0	4	11
Pac. 13	1	1	0	1	10	9
Pac. 19	0	1	0	10	11	0
Pac. 28	1	0	4	0	6	11
Pac. 32	1	1	10	10	0	0
Pac. 35	1	0	4	0	6	11
Pac. 71	0	1	0	1	14	12

Podemos observar que todos os 7 pacientes cujos linfócitos T reconheceram uma sequência da protease endógena apresentaram reconhecimento cruzado, ou seja, reconhecimento simultâneo de outras sequências diferentes da sequência endógena do paciente (Tabela 14, Tabela 15).

4.7 Tipagem HLA e ensaio de ligação a moléculas HLA de classe II

Para avaliar se houve reconhecimento promíscuo dos peptídeos, ou seja, se entre os respondedores estão pacientes com diferentes moléculas HLA, realizou-se a tipagem HLA dos 40 pacientes. As análises de moléculas foram realizadas para os alelos HLA classe I A, B e C e HLA classe II DR e DQ (Tabela 16). Esses dados foram utilizados posteriormente em comparação com as respostas de cada indivíduo a peptídeos individuais.

Tabela 16. Tipagem HLA dos 40 pacientes infectados por HIV-1 do Ambulatório do Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Estado de São Paulo (CRT-DST/AIDS)

Paciente	MHC Classe I						MHC Classe II			
	A*	A*	B*	B*	Cw	Cw	DRB1	DRB1	DQB1	DQB1
PR001	03	66	1402	44	05	08	13	13	05	06
PR002	01	02	4004	44	03	16	04	07	02	03
PR004	03	24	18	38	12	12	04	16	03	05
PR005	02	02	1402	51	08	15	03	07	02	03
PR006	02	68	18	49	07	07	03	04	02	03
PR007	24	31	35	5201	03	15	04	04	03	03
PR008	02	02	15	44	03	05	01	08	04	05
PR009	11	32	35	44	04	16	07	07	02	02
PR011	32	68	40	51	03	12	01	04	03	05
PR012	02	68	15	38	03	12	04	04	03	03
PR013	26	32	07	51	07	15	04	15	03	06
PR014	01	33	07	1402	08	15	01	04	03	05
PR015	02	33	14	39	08	12	08	10	04	05
PR016	01	74	37	53	04	06	01	09	02	05
PR017	02	03	18	51	04	07	01	03	02	05
PR018	03	68	27	35	02	04	01	11	03	05
PR019	02	30	07	27	01	07	01	15	05	06
PR020	03	29	15	44	03	16	01	07	02	05
PR022	02	02	40	51	03	12	01	13	05	06
PR024	02	29	40	58	03	07	15	15	06	06
PR025	02	11	3502	53	04	04	03	13	02	06
PR028	02	03	35	45	04	16	01	09	03	05
PR029	02	66	35	58	04	06	13	16	03	03
PR032	01	66	08	5802	06	07	03	13	02	03
PR033	24	33	1402	55	03	08	01	11	03	05
PR034	01	01	57	57	06	07	07	07	02	03
PR035	31	68	15	39	04	07	08	11	03	04
PR037	68	68	1402	44	03	07	07	13	02	03
PR044	24	29	1402	4901	07	08	03	11	02	03
PR046	02	33	1402	41	07	08	03	07	02	03
PR048	02	02	15	15	03	04	07	08	03	04
PR049	02	30	39	42	12	17	09	10	02	05
PR050	02	02	18	44	04	07	03	07	02	05
PR052	03	34	08	44	04	07	07	15	02	06
PR061	02	23	4901	56	01	07	07	13	02	06
PR067	02	31	35	35	03	04	08	08	04	04
PR071	03	29	07	44	07	16	07	15	02	06
PR076	02	11	18	51	07	14	08	11	03	03
PR077	01	03	07	51	01	07	01	13	05	06
PR082	01	23	45	58	07	16	03	04	02	03

Com a finalidade de confirmar se os peptídeos selecionados previstos como promíscuos pelo algoritmo TEPITOPE (Figura 4) eram capazes de se ligar a diferentes moléculas HLA de classe II, os peptídeos foram testados em ensaios de ligação contra 15 moléculas HLA-DR e 5 moléculas HLA-DQ altamente prevalentes na população (anexo D). Verificamos que todos os 35 peptídeos estudados se ligaram a alelos das moléculas HLA-DR, sendo que em média cada peptídeo ligou a 5 moléculas HLA-DR. Em relação às moléculas HLA-DQ, 13 peptídeos dos 35 se ligaram a alelos das moléculas HLA-DQ testadas, sendo que em média cada

peptídeo também ligou a 5 moléculas HLA-DQ. Desta forma, pudemos confirmar a promiscuidade desses peptídeos. A tabela 17 mostra um resumo dos ensaios de ligação. Interessantemente observamos que os peptídeos da terceira região apresentaram a menor porcentagem de ligação a moléculas HLA classe II (23,3%; em média cada peptídeo ligou a aproximadamente 4 moléculas HLA classe II), apesar de ter sido a região mais reconhecida pelos ensaios de proliferação por CFSE (tabela 12). Em contraste, os peptídeos da primeira e segunda região apresentaram uma maior porcentagem de ligação a moléculas HLA classe II (32,6% e 44% respectivamente; em média cada peptídeo ligou a aproximadamente 6 moléculas HLA classe II em ambas regiões) mesmo mostrando-se regiões menos reconhecidas nos ensaios de proliferação. Com isso, podemos considerar a terceira região como sendo melhor reconhecida porém menos promíscua, ao passo que a primeira e segunda regiões apresentaram menor reconhecimento porém maior promiscuidade.

Tabela 17. Resumo do Ensaio de ligação a moléculas HLA classe II DR e DQ

Peptídeo	Número de alelos ligantes por peptídeo		
	HLA-DR (n=15)	HLA-DQ (n=5)	Total (HLA-DR+DQ)
HXB2 4-23	8	1	9
L10I	8	0	8
L10V	8	0	8
L10F	8	0	8
K20R	4	0	4
K20T	4	0	4
K20I	3	0	3
K20M	7	2	9
L10I/K20R	5	0	5
L10V/K20R	4	1	5
Total Região 4-23	59	4	63
HXB2 45-64	7	1	8
M46I	4	1	5
M46L	9	1	10
I54V	5	1	6
M46L/I54V	8	1	9
L63P	3	0	3
L63T	3	0	3
L63A	2	0	2
L63S	5	0	5
L63H	6	0	6
M46I/L63P	8	2	10
M46L/L63P	4	1	5
I54V/L63P	4	2	6
M46I/I54V/L63P	5	2	7
Total Região 45-64	73	12	85
HXB2 76-95	6	0	6
V77I	2	0	2
V82A	3	0	3
V82I	3	0	3
I84V	2	0	2
N88D	5	1	6
L89M	7	0	7
L89I	7	0	7
L90M	3	0	3
I93L	2	0	2
V77I/I93L	4	0	4
Total Região 76-95	44	1	45
Total	176	17	193
(peptídeos ligantes)			

Os dados de tipagem HLA-DR e DQ foram utilizados posteriormente em comparação com as respostas proliferativas de cada indivíduo a peptídeos individuais e também aos ensaios de ligação a peptídeos. Analisamos especificamente as situações em que respostas proliferativas contra o peptídeo autólogo não foram induzidas, ou seja, pacientes não respondedores para peptídeos autólogos. Dentre esses indivíduos não-respondedores, procuramos determinar se os peptídeos autólogos ligavam ou não a algum dos alelos HLA classe II portados pelo indivíduo. Dessa forma, dois perfis foram traçados:

1. LIGA E NÃO-RESPONDE: peptídeo liga-se a pelo menos um alelo HLA do paciente (ensaio de ligação), porém os linfócitos desse paciente não proliferaram quando estimulados com o referido peptídeo (proliferação celular não foi detectada no ensaio com CFSE);
2. NÃO-LIGA E NÃO-RESPONDE: peptídeo não se liga ao alelo HLA do paciente (ensaio de ligação) e os linfócitos do paciente não proliferaram quando estimulados com o referido peptídeo (proliferação celular não foi detectada no ensaio com CFSE).

Para a análise do peptídeo autólogo, consideramos somente os pacientes cujo peptídeo era idêntico a pelo menos um testado na região correspondente. Vale ressaltar que a situação observada nos ensaios de um único paciente pode se encaixar em mais de um dos perfis citados, ou seja, os perfis não são mutuamente excludentes para um mesmo paciente. Para melhor exemplificar, consideremos o paciente PR002 e os resultados observados para o peptídeo idêntico ao seu

autólogo HXB2 4-23 (numerado como 1) da primeira região. Esse paciente apresenta os alelos 04 e 07 para HLA-DRB1 e os alelos 02 e 03 para HLA-DQB1. Neste caso, este paciente não apresentou resposta proliferativa ao peptídeo autólogo. Com isso, o mesmo encaixa-se no perfil LIGA-NÃO-RESPONDE por apresentar o peptídeo autólogo HXB2 4-23 ligando-se ao alelo HLA-DQB1 03; porém também se encaixa no perfil NÃO-LIGA-NÃO-RESPONDE por apresentar o mesmo peptídeo não se ligando aos demais alelos identificados para esse paciente. O mesmo raciocínio foi feito para todos os pacientes e peptídeos autólogos das demais regiões. Portanto, as frequências mencionadas abaixo se referem à porcentagem de pacientes que se encaixam no perfil mencionado (o que não exclui a possibilidade desse mesmo paciente estar incluído em ambos os perfis; por esse motivo, a soma das frequências é superior a 100%).

Para a primeira região, dentre os 12 pacientes com peptídeo autólogo detectado, 9 pacientes (75%) apresentaram o perfil LIGA-NÃO-RESPONDE enquanto o perfil NÃO-LIGA-NÃO-RESPONDE prevaleceu em 11 pacientes (91,6%). Para a segunda região, dentre os 11 pacientes com o autólogo detectado, 6 pacientes (aproximadamente 55%) apresentaram o perfil LIGA-NÃO-RESPONDE e o perfil NÃO-LIGA-NÃO-RESPONDE predominou em 10 pacientes (aproximadamente 91%). Para a terceira região, dentre os 34 pacientes com o peptídeo autólogo identificado nessa região, o perfil LIGA-NÃO-RESPONDE foi identificado em 18 pacientes (aproximadamente 53%) e o perfil NÃO-LIGA-NÃO-RESPONDE prevaleceu em 33 pacientes (aproximadamente 97%). Com isso notamos que as três regiões

apresentaram o perfil NÃO-LIGA-NÃO-RESPONDE mais freqüente em relação ao perfil LIGA-NÃO-RESPONDE (Tabela 18)

Tabela 18. Freqüência (em porcentagem) de pacientes não respondedores a peptídeos autólogos segundo ligação dos peptídeos a alelos HLA classe II; número absoluto entre parênteses

<i>Regiões da Protease em estudo</i>	<i>Liga-não- responde (Frequência)</i>	<i>Não-liga-não- responde (Frequência)</i>	<i>Total de pacientes com autólogo identificado</i>
Região 4 - 23	75% (9)	91,6% (11)	12
Região 45 - 64	54,5% (6)	90,9% (10)	11
Região 76 - 95	52,9% (18)	97,1 (33)	34

Adicionalmente, calculamos a freqüência de pacientes não-respondedores cujo peptídeo autólogo não-ligava a nenhum alelo HLA classe II. A ausência dessa ligação poderia indicar que a ausência de resposta é devido a um escape imunológico viral. Verificamos que 3 pacientes dos 12 com peptídeo autólogo identificado para a região 4 a 23 (25%), 5 pacientes dos 11 com peptídeo autólogo identificado para a região 45 a 64 (aproximadamente 45%) e 16 pacientes dos 34 com peptídeo autólogo identificado para a região 76 a 95 (aproximadamente 47%) não apresentaram ligação do peptídeo autólogo a nenhum alelo HLA classe II (Tabela 19).

Tabela 19. Frequência de pacientes que apresentaram ausência de resposta proliferativa assim como ausência de ligação de alelos HLA classe II a peptídeos autólogos; número absoluto entre parênteses

<i>Regiões da Protease em estudo</i>	<i>Pacientes cujos peptídeos autólogos não se ligam a nenhum alelo HLA</i>	<i>Total de pacientes não respondedores</i>
Região 4 - 23	25,0% (3)	12
Região 45 - 64	45,5% (5)	11
Região 76 - 95	47,1% (16)	34

5. Discussão

No presente estudo, foram identificados, pela primeira vez, epitopos da protease de HIV-1 reconhecidos por células T CD4⁺ nas regiões dos aminoácidos 4 a 23, 45 a 64 e 76 a 95. Observamos um perfil peculiar de reconhecimento em que células T CD4⁺ e CD8⁺ da maioria dos pacientes não eram capazes de induzir resposta proliferativa a peptídeos da protease do HIV-1 idênticos à sequência endógena. Paradoxalmente, células T CD4⁺ e CD8⁺ de boa parte desses mesmos pacientes induziram resposta proliferativa a peptídeos distintos da sequência endógena. Dos quarenta pacientes apresentando respostas proliferativas de linfócitos T a peptídeos da protease, apenas sete o fizeram à sequência endógena.

Epitopos selvagens e mutantes de três regiões da protease, cobrindo os 12 sítios de mutações e incluindo as 25 mutações mais freqüentes no Brasil (Brindeiro e cols., 2003 e dados não publicados) (Tabela 1), tiveram sua capacidade de ligação a múltiplas moléculas HLA-DR previstas pelo algoritmo TEPITOPE. O fato de todos os 35 peptídeos terem induzido resposta proliferativa por células T CD4⁺ de pelo menos um paciente, e aproximadamente 78% dos pacientes induzirem resposta proliferativa por células T CD4⁺ a pelo menos um peptídeo comprova a eficácia do algoritmo na identificação de epitopos de células T CD4⁺, como comprovado anteriormente por nosso grupo no contexto do HIV (Fonseca e cols., 2006) e outros patógenos/alvos antigênicos (Garcia e cols., 2008; Iwai e cols., 2007; Rosa e cols.,

2006; Iwai e cols. 2003; Fonseca e cols., 2004; Fonseca e cols., 2005; Damico e cols., 2005).

É significativo que, previamente a esse trabalho, nenhum epitopo de célula T CD4⁺ tivesse sido identificado na protease do HIV até o momento, segundo o banco de dados de Los Alamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/helper_summary.html). A protease permanecia como a única proteína do HIV para a qual só haviam sido descritos epitopos de células T CD8⁺, mas não CD4⁺. Podemos especular que a dificuldade em encontrar epitopos CD4⁺ na protease se desse devido ao método de detecção. No trabalho atual utilizamos o ensaio de proliferação de células marcadas com CFSE, que detecta propriedade proliferativa, muito freqüente em células T CD4⁺ estimuladas por antígenos. Este ensaio apresenta importantes diferenças com os ensaios mais freqüentemente utilizados, como o ensaio de proliferação por incorporação de timidina triciada - que também mede proliferação celular, mas é menos sensível - e o ELISPOT para IFN-gama, método que detecta células que produzam aquela citocina específica em resposta a estímulo antigênico. Células T CD4⁺, especialmente as que proliferam em resposta a antígeno, geralmente são produtoras de IL-2 e muitas vezes não produzem IFN-gama, sendo portanto indetectáveis por esse método. É, portanto, possível hipotetizar que as células T CD4⁺ protease-específicas detectadas em nosso estudo sejam do tipo proliferativas produtoras de IL-2.

Em relação ao seqüenciamento das regiões genômicas da protease do HIV-1 endógeno, o alinhamento mostrou que a terceira região (aminoácido 76 a 95)

apresentou-se mais homogênea e conservada entre os pacientes estudados, do que a primeira (aminoácido 4 a 23) e segunda regiões (aminoácido 45 a 64) (Figura 6 e figura 8). Isso acarretou uma maior concordância entre os peptídeos selecionados para síntese e as seqüências endógenas da protease, nessa região. Também foi realizada análise de genotipagem da protease quanto ao subtipo de HIV, sendo o subtipo B mais freqüente (87%) seguido pelo subtipo F (10%) e subtipo D (3%) (Figura 7). Estudos recentes confirmam o subtipo B ainda como sendo o mais prevalente no Brasil, seguido pelo subtipo F, embora muitas formas recombinantes tenham surgido nos últimos anos, principalmente CRF_BF, formas facilmente detectadas (de Sa-Filho e cols. 2008, Sá-Ferreira e cols. 2007, Vêras e cols. 2007).

Pudemos notar também uma variabilidade na distribuição de regiões polimórficas e mais conservadas ao longo da seqüência (Figura 6). Diversos polimorfismos foram descritos ao longo do gene da protease, sendo identificados em 49 das 99 posições/resíduos de aminoácidos (Miller e cols., 2001). Dentre estes, substituições em mais de 20 posições estão associadas com redução de susceptibilidade à terapia com IPs (Johnson e cols., 2007), dentre elas, mutações localizadas na fenda da enzima (D30, V32, V82, I84), “flap” (M46, I47, F53, I54), sítios conservados (G73, N88, L90) e polimórficos (L10, K20, M36, L63, A71, V77, I93) (Erickson e cols. 1996, Shafer e cols. 2000). Dentre as regiões conservadas está o sítio ativo da proteína (Asp-Thr-Gly) localizado na região dos aminoácidos 25 a 27, onde estudos mostraram que substituições de aminoácidos acarretariam em falha no processamento de precursores virais e produção de vírions não infectantes

(Miller e cols., 2001; Shafer e cols., 2000; Boden e cols., 1998; Wlodawer e cols., 1998; Erickson e cols., 1996).

Observamos baixa frequência de indivíduos portando genotipagem de resistência aos IPs do HIV em nossa amostra. Verificamos que apenas o paciente PR077 apresentou genotipagem de resistência ao IP em uso, no caso ATZ, além de resistência genotípica a diversos outros IPs (Tabela 9). Pelo fato do paciente PR077 apresentar resistência a sete IPs, podemos sugerir um possível início de falha terapêutica, apesar de apresentar CV de 164 cópias/mL. Interessantemente, o mesmo paciente não apresentou reconhecimento por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ de qualquer dos peptídeos da protease do HIV-1.

Em relação aos ensaios de proliferação utilizando marcador CFSE, os resultados obtidos mostraram que aproximadamente 78% e 75% dos pacientes induziram resposta proliferativa a pelo menos um peptídeo para células T CD4⁺ e células T CD8⁺, respectivamente (tabela 10 e 11, Figura 10). A mediana do número de peptídeos que induziram resposta proliferativa dos linfócitos por paciente foi de 2 (quartil 25%-quartil 75%=1-6) e 1 (quartil 25%-quartil 75%=1-4) para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente. No entanto, 100% dos peptídeos induziram proliferação de células T CD4⁺ (Figura 11), o que nos permite identificá-los como epitopos de células T CD4⁺ da protease do HIV, até o momento não descritos (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/helper_summary.html).

Dentre as três regiões da protease em estudo, notamos que os peptídeos da região dos aminoácidos 76 a 95 foram mais reconhecidos por células T CD4⁺ (65%) e CD8⁺ (55%) (tabela 12). Este fato poderia ser explicado pela maior conservação da região

em relação à região dos aminoácidos 4 a 23 e 45 a 64 – e conseqüentemente maior pareamento entre os peptídeos testados para reconhecimento com as seqüências endógenas. Com isso, verificamos que tanto epitopos selvagens quanto mutantes induziram resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Poucos estudos verificaram o reconhecimento de peptídeos incorporando mutações de resistência aos IPs, e nenhum por células T CD4⁺. Schmitt e cols (2000) verificaram resposta de células T CD8⁺ a um epitopo incorporando mutação de resistência associada à lamivudina. Samri e cols (2000) estudaram epitopos de células T CD8⁺ abrangendo sítios das principais mutações selecionadas por NRTI, onde cinco destes foram reconhecidos pelo menos uma vez. Outro estudo mostrou resposta de células T CD8⁺ a um epitopo incorporando uma mutação de resistência a IP (V82A) em pacientes HIV-1+ que foram tratados com IP e que desenvolveram resistência (Karlsson e cols., 2003). Stratov e cols. (2005) observaram respostas de células T CD8⁺ contra epitopos mutantes selecionados por ARV na RT e na protease em pacientes HIV-1+ com resistência a múltiplas drogas. Mahnke e cols. (2006) verificaram resposta por células T CD8⁺ a um epitopo incorporando a mutação K103N presente na transcriptase reversa. Ainda relacionado a mutações induzidas por NRTI, Okazaki e cols. (2006) também verificaram resposta CTL a um epitopo incorporando a mutação M184V.

Em relação à magnitude de resposta por células T CD4⁺ (Figura 12A) e T CD8⁺ (Figura 12B) aos peptídeos da protease de HIV em estudo, verificamos aparentemente uma maior magnitude de resposta por células T CD8⁺ que T CD4⁺, embora a grande dispersão impeça uma comparação estatística. Em relação às

células T CD4⁺, uma maior magnitude de resposta ocorreu para os peptídeos L89I e L90M. No entanto, notamos também uma grande dispersão dessas respostas, sendo que alguns pacientes tiveram respostas muito elevadas, mas pelo menos a metade dos respondedores teve respostas comparáveis às demais seqüências.

Também analisamos a correlação entre as respostas linfoproliferativas aos peptídeos (número de peptídeos reconhecidos por paciente e mediana dos resultados acima do índice de estimulação positivos por paciente (IE>2,5 para CD4 e IE>3,5 para CD8)) e contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺/mL porém não observamos nenhum resultado estatisticamente significativo. Portanto, em nosso grupo, a magnitude e amplitude das respostas são independentes de uma maior ou menor contagem celular.

Os resultados das respostas proliferativas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ aos peptídeos selvagens e mutantes foram analisados em relação à seqüência da protease do HIV-1 endógeno de cada paciente (figuras 13 a 18). Conforme descrito nos resultados, observamos diferentes padrões de reconhecimento dos peptídeos selvagens e mutantes testados, e o mais freqüente foi o de pacientes que induziram resposta proliferativa a peptídeos cujas seqüências não coincidiam com a seqüência da protease do HIV-1 endógeno (padrão RNE: Reconhecimento de peptídeo diferente da seqüência endógena da protease do HIV-1): 97,4 % para células T CD4⁺ e 97,7 % para células T CD8⁺ (Tabela 13). Verificamos que todos os 40 pacientes apresentaram seqüência endógena idêntica a algum peptídeo selecionado em pelo menos uma das três regiões, dos quais apenas sete (aproximadamente 17%) apresentaram resposta a peptídeos idênticos à seqüência endógena da protease

(Tabela 14 e tabela 15). Esses números demonstram que o não reconhecimento do endógeno não foi decorrência de variações de sequência não incluídas entre os peptídeos, mas pela pura e simples ausência do reconhecimento de peptídeos que efetivamente apresentavam sequência idêntica à endógena. Também observamos que a reação cruzada foi evento relativamente raro, embora ocorresse em todos os que induziam resposta proliferativa ao peptídeo idêntico ao endógeno - 7 pacientes. O padrão mais comum de reconhecimento – reconhecimento inespecífico, ou seja, reconhecimento de peptídeos não coincidentes com o endógeno – não pode ser creditado à reação cruzada na maioria dos casos.

A pergunta que aqui se coloca é, qual é a fonte do estímulo antigênico que elicit os linfócitos T protease-específicos encontrados, se não a protease endógena? Diversas hipóteses podem ser levantadas, dentre elas a presença de cepas circulantes minoritárias que possivelmente não teriam sido detectadas pelo seqüenciamento, feito como “bulk sequencing” e detectando a sequência majoritária ou uma sequência mais comum, ou “consenso” da quasispécie viral. Diversos estudos mostram que as técnicas de seqüenciamento são capazes de detectar apenas espécies majoritárias, estando as mesmas presentes em 25-30% do total da carga viral. Halfon e cols. (2003) propuseram o uso do LiPa (*line probe assay* baseado em hibridização reversa) o qual permite uma detecção rápida de mutações associadas a resistência e maior sensibilidade em relação ao seqüenciamento ao detectar-se cepas minoritárias, no caso, o desaparecimento de vírus portando mutações de resistência e reaparecimento de vírus selvagem, após longo período de interrupção de tratamento para manutenção de resistência a

múltiplas drogas. Outras metodologias propostas são o MS-PCR (*mutagenically separated PCR*), utilizado em um estudo para detectar mutações de resistência a ZDV (Zidovudina) (Myint e cols. 2002), PCR em tempo real utilizado para detectar mutações em populações minoritárias, tais como L90M, em pacientes soroconversores agudos (Metzner e cols., 2005) e análise por clonagem (Paolucci e cols., 2001). Outra pergunta relacionada é por que os pacientes apresentaram freqüentes respostas a seqüências distintas da seqüência endógena majoritária? Uma possibilidade é que as freqüentes respostas detectadas sejam dirigidas a populações minoritárias do HIV, que talvez já tenham sido majoritárias até surgir uma resposta imune robusta a elas dirigida, e que desta forma sua freqüência teria diminuído em resposta à dupla pressão do IP e da resposta imune. A existência de dupla pressão de drogas e de resposta imune de células T CD8⁺ já foi documentada (Karlsson e cols., 2003, Mueller e cols., 2007). Outra hipótese seria que a resposta imune celular anti-HIV detectada poderia ser dirigida a uma seqüência de HIV não originária do indivíduo, mas infectante de possíveis parceiros virêmicos, com os quais o indivíduo manteria relacionamento não protegido. Willberg e cols. (2008) verificaram que indivíduos em uso de ARV com carga viral suprimida que apresentavam relações sexuais não protegidas regulares com parceiros HIV+ virêmicos apresentavam elevada freqüência de resposta celular T HIV-1 específica a essas seqüências. Já os indivíduos nas mesmas condições que mantinham relações com parceiros avirêmicos não apresentaram esse aumento de resposta. Estudos de pacientes expostos soronegativos para o HIV (por exemplo, pares discordantes) também têm demonstrado que a exposição ao HIV, mesmo quando não resulta em

soroconversão/infecção, induz uma resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ detectável, dirigida a seqüências de HIV do parceiro (Stranford e cols. 1999). Outra explicação seria que, em pacientes HIV+, ocorria ativação de transcrição de certas proteínas de retrovírus endógenos ou HERV - *Human Endogenous Retrovirus*, vírus endógenos que possuem estrutura gênica semelhante ao HIV (genes gag-env-pol, com uma protease clivadora de precursores protéicos) (Padow e cols., 2000). Respostas de células T CD8⁺ HERV-específicas e de reação cruzada com o HIV-1 foram documentadas em pacientes HIV-1+ (Garrison e cols., 2007). Assim, uma terceira possibilidade de explicar as respostas para seqüências não contidas na seqüência endógena majoritária da protease do HIV, seria que a expressão de HERV poderia estimular respostas a protease de HERV, e as regiões de similaridade com a protease do HIV-1 poderiam resultar em respostas cruzadas, mas não dirigidas às seqüência endógenas da protease do HIV-1. A identificação de qual dos três mecanismos é operativo no reconhecimento da protease do HIV poderia ser alcançada através do seqüenciamento exaustivo de seqüências minoritárias, da identificação das seqüências de protease do HIV de eventuais parceiros que proporcionem estímulo antigênico exógeno e do estudo do reconhecimento de epitopos da protease de HERVs ativados em nossos pacientes.

Outra questão relacionada aos padrões de reconhecimento é a freqüente ausência de reconhecimento da seqüência da protease endógena. Porque a resposta à seqüência endógena majoritária da protease foi tão rara? Dentre os casos onde a seqüência endógena deixou de ser reconhecida, observamos dois padrões considerando-se a ligação HLA-peptídeo (LIGA E NÃO-RESPONDE e NÃO-

LIGA E NÃO-RESPONDE) (Tabela 18). Observamos que 75%, 55% e 53% dos peptídeos endógenos não reconhecidos na primeira, segunda e terceira regiões, respectivamente, se ligaram a algum alelo de HLA-DR ou DQ carregado pelo paciente. Para esses casos, podemos sugerir que o não reconhecimento desses peptídeos tenha sido devido a uma falha de reconhecimento pelo repertório TCR – talvez por uma mutação de escape de reconhecimento por TCR. Além disso, que a sequência endógena proviral, que foi obtida em nosso estudo (sequência arquivo), poderia ser diferente do HIV que estaria replicando no plasma. Por outro lado, constatamos que 25%, 45% e 47% dos peptídeos endógenos não reconhecidos na primeira, segunda e terceira regiões, respectivamente, não se ligaram a nenhum alelo de HLA classe DR ou DQ carregado pelo paciente (Tabela 19). Isso significa que, em uma proporção significativa dos endógenos não reconhecidos, houve falha de apresentação do epitopo. A ausência de ligação e, conseqüentemente, de reconhecimento poderia ser devida ao desenvolvimento de mutações que abolem a ligação aos alelos HLA de classe II, levando ao escape de apresentação e de resposta ao antígeno. Uma tal mutação, selecionada pela pressão imune, que promova a evasão da resposta de linfócitos T CD4⁺, poderia ser complementar à pressão da resposta imune a epitopos mutantes de linfócitos T CD8⁺, na chamada “dupla pressão” imune e por drogas antiretrovirais. Tais resultados podem ter implicações na imunopatologia e tratamento da infecção pelo HIV com inibidores de protease.

6. Conclusão

Epitopos de células T CD4+da protease do HIV-1 foram identificados, inclusive epitopos contendo mutações selecionadas por Inibidores de protease. Também verificamos que a maior parte dos pacientes reconheceu peptídeos cujas seqüências não coincidiam com a seqüência da protease do HIV-1 endógeno – e, surpreendentemente, sem reconhecer a seqüência endógena. Isto nos leva a pensar que outros mecanismos, como a existência de isolados com seqüências minoritárias reconhecidas, ou mutações de escape ao reconhecimento por TCR ou por ligação às moléculas HLA presentes em cada paciente seriam operativos no reconhecimento da protease do HIV. Com isso, novos estudos devem ser realizados para a melhor compreensão desse fenômeno.

Anexos

A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUGITO OU RESPONSÁVEL LEGAL:

NOME DO PACIENTE:	SEXO:	DATA NASC.:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º:	N.º	APTO:
ENDEREÇO:	CIDADE:	
BAIRRO:	TELEFONE:	
CEP.:		

RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA: (grau de parentesco, tutor, curador, etc.)		
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º:	SEXO:	DATA NASC.:
ENDEREÇO:	N.º	APTO:
BAIRRO:		
CIDADE:		
CEP.:	TELEFONE:	

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS DA PROTEASE DE HIV-1 ALVOS DE
RESPOSTA DE CÉLULAS T CD4+ EM PACIENTES INFECTADOS
PELO HIV-1

2. PESQUISADOR: Dr. Edecio Cunha Neto
CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR II
INSC. CONS. REGIONAL N.º: CRM/SP
68033
UNIDADE DO HCFMUSP: SERVIÇO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA E ALERGIA E INSTITUTO
DO CORAÇÃO

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

O nosso organismo tenta se defender e destruir o vírus HIV através do sistema imune o que na maioria das vezes não consegue, pois o vírus promove uma destruição lenta e gradual das células T CD4+, que têm um papel central nesse sistema de defesa contra agentes infecciosos. Pessoas infectadas que não desenvolvem logo a doença, os chamados não progressores, apresentam forte resposta de células T CD4+ contra o vírus, o que sugere que esta resposta tenha um papel importante na não progressão da doença. Assim é muito importante estudar proteínas do vírus que sejam reconhecidas por células T CD4+ e que possam ser incluídas numa vacina contra o vírus. Neste projeto nós vamos estudar a resposta de células T CD4+ contra uma proteína do HIV-1, a protease, que também é uma das proteínas aonde agem importantes drogas antiretrovirais utilizadas e que podem também ser modificadas por essas drogas os indivíduos. Nós pretendemos investigar se pedaços dessa proteína são bem reconhecidos e se esse reconhecimento é afetado por modificações causadas pelo uso das drogas. Os resultados obtidos poderão fornecer informações importantes para o desenvolvimento de futuras vacinas que previnam o aparecimento de vírus HIV resistentes.

Você está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar em uma das duas seguintes situações:

- Estar infectado por HIV-1, com contagem de células CD4+ em sangue maior que 250 céls/mm³, carga viral abaixo de 10.000 cópias/mL e estar ou não em tratamento com antiretrovirais incluindo inibidor da protease (IP);
- Não estar infectado por HIV-1 e não ter nenhuma outra doença no momento (grupo controle).

O sangue desses dois grupos de indivíduos será testado para determinação de algumas características da resposta imunológica (de defesa) de cada organismo contra a proteína protease do vírus, sendo que o sangue do grupo controle será usado como parâmetro de resposta imunológica normal. Além da análise da resposta imunológica, analisaremos na mesma amostra de sangue colhida as características do HIV de cada pessoa. Caso o sangue colhido não seja completamente usado nos experimentos desse projeto atual, esse material poderá ser devidamente armazenado e utilizado em projetos futuros, garantindo que todos os aspectos éticos, em especial o sigilo e a confidencialidade da identidade do doador e dos resultados obtidos no projeto.

➤ **Objetivos da pesquisa**

O objetivo dessa pesquisa é investigar o reconhecimento pelo sistema imune de pessoas infectadas pelo vírus HIV de partes da proteína protease do vírus que tenham a probabilidade de sofrerem modificações após o uso de drogas inibidoras da protease de HIV por longo tempo.

➤ **Duração do estudo**

Esse estudo está previsto para durar 2 anos.

➤ **Procedimentos a serem seguidos durante o estudo**

Espera-se que um total de 77 indivíduos sejam incluídos para participar desse estudo.

Os procedimentos a serem realizados são uma consulta médica, durante a qual serão feitas perguntas sobre seus dados demográficos (idade, sexo, procedência, etc.), sobre sua história médica (doenças que já apresentou) e avaliação de sua condição física (exame físico). O seu prontuário médico também será revisado, para que os resultados de todos os exames que você já realizou sejam avaliados pelos pesquisadores.

Após a consulta serão colhidos 80 mL de sangue de sua veia, para realização de testes que avaliarão:

- Como seu organismo defende-se dos agentes infecciosos: avaliação do número e função das células do sistema de defesa, avaliação do tipo e quantidade de substâncias secretadas pelas células de defesa;
- Quais as características do HIV-1 em cada pessoa.

Caso existam problemas técnicos com os testes, talvez seja necessária uma nova coleta do mesmo volume de sangue em outra data.

Caso você concorde, poderemos realizar uma coleta única de uma quantidade maior de sangue, colhida em uma bolsa para doação (500 ml). Essa amostra de sangue será utilizada para os mesmos testes de defesa imunológica e estudo do HIV.

➤ **Desconfortos e riscos potenciais**

Os riscos da coleta de sangue são desconforto, dor local e formação de hematomas (manchas roxas) no local da coleta.

➤ **Benefícios que poderão ser obtidos**

Você não receberá qualquer benefício participando deste estudo. As informações obtidas a partir desta pesquisa poderão beneficiar outros por promoverem um melhor entendimento sobre o comportamento do sistema de defesa frente à infecção pelo HIV.

➤ **Compensações e custos**

Todas as consultas, procedimentos e testes laboratoriais feitos especificamente para este estudo serão fornecidos a você sem nenhum custo. Você entende que qualquer cuidado médico que não for especificamente necessário para este estudo, mas que seja parte de seu cuidado médico pessoal será pago por você ou por seu convênio médico. Você não receberá pagamento por sua participação nesse estudo.

➤ **Descontinuação do Estudo**

Você poderá deixar de participar deste estudo pelas seguintes razões:

- ✓ se o médico investigador julgar oportuno a sua retirada do estudo;
- ✓ se decidir descontinuar a participação;
- ✓ se você perder alguma das coletas de sangue programadas;
- ✓ se o pesquisador e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa decidirem pelo término do estudo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida;
2. Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irão de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento agora ou no futuro no Serviço de Saúde que o está atendendo.
3. Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Seus registros permanecerão confidenciais. Os investigadores e a Comissão de Ética podem pedir para rever seus registros. Nomes de participantes ou materiais identificando participantes não serão liberados sem permissão escrita, exceto se exigido por lei. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será mantida nos seus registros médicos e uma será dada a você.
4. Todos os procedimentos e consultas deste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica não relacionada com este estudo será de sua responsabilidade.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO NA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você apresente algum problema fora de seu período de visita ao Ambulatório, você poderá entrar em contato com os investigadores deste projeto de pesquisa. Os investigadores são os Drs. Edecio Cunha Neto, Sandra do Lago Moraes-Avila. O telefone para contato é 3069-5914 ou 3069-5906.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: Nenhuma

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de
____/____/____ Hora: ____:____ _____
assinatura do paciente ou seu representante legal

____/____/____ Hora: ____:____ _____
assinatura do investigador que explicou o termo
carimbar sobre a assinatura

____/____/____ Hora: ____:____ _____
assinatura do coordenador do estudo
carimbar sobre a assinatura

B. Dados Brutos dos Ensaios de Proliferação Celular

Dados brutos obtidos à partir de ensaio de proliferação celular de células T CD4+ (n=40). Os resultados mostram a porcentagem de proliferação (%) obtida para cada peptídeo. As mesmas são utilizadas para calcular o Índice de estimulação (I.E.), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD4+ proliferantes em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD4+ proliferantes sem estímulo.

Peptídeos	PAC_01	PAC_02	PAC_04	PAC_05	PAC_06	PAC_07	PAC_08	PAC_09	PAC_11	PAC_12	PAC_13	PAC_14	PAC_15	PAC_16	PAC_17	PAC_18	PAC_19	PAC_20	PAC_22	PAC_24	PAC_25	PAC_28	PAC_PR29	PAC_PR32	PAC_33	PAC_34	PAC_35	PAC_37	PAC_44	PAC_46	PAC_48	PAC_49	PAC_50	PAC_52	PAC_61	PAC_67	PAC_71	PAC_76	PAC_77	PAC_R2
CN	0,65	0,63	0,82	0,28	8,40	2,73	0,90	1,70	3,69	2,95	0,79	1,90	0,41	0,77	1,06	0,87	0,58	0,41	1,90	1,66	0,49	0,03	1,08	1,42	0,73	0,70	0,09	1,28	0,79	0,87	0,53	0,58	1,92	0,82	0,81	1,26	2,89	2,36	0,95	1,58
PR01	3,20	0,91	0,51	0,64	6,90	0,37	0,90	1,98	1,88	1,13	1,29	1,48	0,43	0,46	0,78	10,70	0,36	0,43	0,94	2,21	0,52	0,01	0,70	21,10	0,82	0,30	0,03	1,60	0,32	1,55	0,40	0,65	2,15	1,35	0,44	0,88	1,71	2,81	0,39	1,54
PR02	0,94	0,65	0,73	0,36	2,01	0,82	0,49	1,09	17,20	1,15	0,27	0,96	0,17	0,25	0,87	0,32	0,13	0,15	0,94	1,29	0,32	0,03	0,75	11,60	0,44	0,26	0,02	0,64	0,36	0,85	0,57	1,02	2,64	0,61	0,64	2,23	2,58	1,66	0,49	1,65
PR03	0,66	0,47	0,81	0,11	5,96	0,70	0,98	0,80	10,70	3,44	0,41	1,47	0,24	0,35	1,00	0,40	0,19	0,33	1,02	1,45	0,40	0,00	0,82	6,76	0,33	0,48	0,04	0,63	0,24	0,72	0,53	0,47	2,55	2,34	1,59	0,71	2,46	4,00	0,40	1,35
PR04	0,56	0,61	1,72	0,16	44,70	0,63	1,17	0,40	5,43	6,80	0,39	1,32	0,28	0,88	0,75	0,41	0,20	0,28	1,08	2,54	0,51	0,00	0,87	8,65	0,60	0,42	0,02	1,00	0,19	0,75	0,63	0,40	2,50	4,07	0,81	0,77	2,17	2,01	0,36	2,46
PR05	1,48	1,27	0,42	0,25	41,20	0,60	30,20	0,43	1,68	10,90	0,42	1,58	0,24	0,39	1,10	1,32	0,33	0,37	1,55	3,66	0,98	0,38	0,94	7,28	0,65	1,57	0,03	0,81	0,63	0,77	0,48	2,01	2,47	1,03	0,74	0,83	1,98	1,92	0,62	1,20
PR06	1,19	0,50	0,46	0,72	4,65	0,35	1,43	0,36	11,10	4,99	0,66	1,32	0,23	0,45	0,55	0,23	0,49	0,67	1,84	1,16	0,37	0,01	0,90	10,10	0,29	0,47	0,01	1,32	1,96	0,63	0,33	0,52	1,89	2,05	0,81	0,73	1,39	2,81	0,92	1,25
PR07	2,21	0,59	0,61	0,45	8,82	0,70	0,83	1,43	15,00	2,40	0,33	1,02	0,21	0,98	0,31	0,95	0,32	0,20	1,38	2,94	0,53	7,25	1,51	5,77	0,42	0,56	21,70	0,69	0,48	1,08	0,49	0,46	2,05	1,00	0,87	1,98	1,67	2,61	0,54	1,58
PR08	5,26	0,41	0,62	0,29	6,86	0,66	2,17	0,72	1,29	5,49	0,55	1,92	0,23	0,27	0,48	0,52	0,23	1,42	4,33	0,93	3,85	0,02	0,90	8,00	0,55	0,50	0,60	1,07	1,31	0,66	0,34	0,54	2,29	1,15	0,74	0,70	0,00	5,75	0,57	1,09
PR09	0,94	0,61	0,35	0,22	5,54	0,74	0,72	0,33	1,81	3,10	0,64	0,98	0,21	0,53	0,67	0,34	0,64	0,31	2,10	2,76	0,48	0,05	0,66	6,75	0,44	0,35	0,02	0,72	0,72	0,68	0,54	0,40	2,50	1,24	0,69	1,24	1,08	5,48	0,40	1,34
PR10	0,38	0,91	0,69	0,12	53,70	1,28	12,00	0,92	0,90	1,45	0,52	1,33	0,18	0,81	0,99	0,32	0,33	0,79	1,59	0,98	0,45	0,01	0,78	9,11	0,37	0,80	0,05	1,21	0,57	0,97	0,41	0,63	1,87	0,84	0,40	1,08	1,48	1,76	0,45	0,97
PR11	0,83	0,50	0,45	0,29	40,80	0,69	23,00	0,67	0,99	3,35	0,98	1,05	0,56	0,32	0,89	1,11	0,35	0,47	10,80	1,16	0,47	0,00	1,39	11,20	0,42	0,59	0,03	1,19	0,61	0,67	0,53	0,53	3,10	0,72	0,42	1,02	1,79	1,81	0,55	3,47
PR12	0,66	0,30	0,76	0,58	6,41	0,76	2,57	1,37	4,68	2,75	0,79	2,06	0,56	0,67	0,31	0,57	0,89	0,59	2,11	1,38	0,80	0,04	0,70	8,05	0,60	1,08	0,02	1,44	1,97	1,10	-	-	-	1,32	-	0,97	2,24	2,95	1,04	0,74
PR13	0,62	0,68	0,64	0,72	9,85	0,95	0,81	1,07	1,64	1,39	0,66	3,09	0,31	0,86	0,36	0,38	0,45	1,91	1,49	3,00	0,32	0,01	1,04	8,66	0,59	0,44	0,05	1,31	0,54	0,92	1,89	0,28	2,09	2,44	0,69	1,64	2,37	3,84	0,71	1,56
PR14	10,30	0,58	0,55	0,16	7,93	0,81	2,26	1,21	4,82	2,35	0,95	2,14	0,56	0,76	0,42	1,07	0,31	0,89	1,96	1,30	0,32	0,00	0,72	9,16	0,82	0,49	0,01	0,97	0,11	0,85	0,45	0,56	2,25	1,65	0,71	0,39	2,26	3,58	0,49	3,04
PR15	7,61	0,91	0,97	0,32	8,68	2,29	2,31	0,91	2,85	4,03	1,06	2,29	0,26	0,65	0,51	0,66	0,54	0,39	2,29	2,08	0,51	0,03	0,85	8,99	0,48	0,38	0,03	1,03	0,65	1,95	0,48	0,53	1,83	1,85	0,67	1,00	3,15	7,03	0,89	1,05
PR16	0,81	0,58	0,80	0,52	46,60	2,02	1,77	1,17	0,88	1,65	0,65	2,71	0,39	0,66	0,91	0,42	0,34	0,57	1,42	1,14	6,21	0,00	0,71	9,74	0,74	0,30	0,03	1,33	0,91	1,42	0,39	0,22	1,71	0,91	0,67	1,03	5,53	0,27	0,58	1,50
PR17	0,60	0,51	0,70	0,33	38,80	1,56	1,89	1,35	1,87	1,51	0,39	2,23	0,34	0,69	0,94	0,48	0,44	0,31	4,07	1,23	0,46	0,00	1,24	9,97	0,75	0,58	0,00	1,56	0,80	1,09	0,44	0,73	2,89	1,74	0,84	0,82	1,90	2,17	0,82	1,57
PR18	0,67	0,86	0,98	0,41	11,10	0,97	1,56	0,30	2,59	3,56	0,71	1,73	0,34	0,44	0,45	0,53	0,38	8,95	2,12	1,97	0,45	0,00	0,75	9,68	0,68	0,47	0,04	1,15	1,33	1,17	0,45	0,56	2,21	1,29	0,61	0,67	1,46	3,39	0,81	1,36
PR19	1,98	0,49	0,70	0,38	13,60	1,12	1,25	1,07	1,58	12,00	1,45	0,90	0,28	0,36	0,48	0,43	1,02	0,60	1,75	1,50	1,97	0,01	1,17	7,58	0,71	1,00	0,06	1,36	1,04	1,14	0,60	0,96	2,53	1,42	0,92	2,14	2,64	3,81	0,86	1,61
PR20	0,68	0,60	0,71	0,27	5,21	1,33	14,20	2,43	4,35	2,20	0,79	1,61	0,32	0,62	0,57	0,45	1,68	0,53	1,75	2,17	0,43	0,00	1,01	9,12	0,51	0,69	0,01	0,88	0,66	0,81	0,67	0,65	2,08	1,25	0,94	0,57	0,10	1,74	0,68	1,33
PR21	0,47	0,66	0,76	0,35	15,50	0,52	23,70	1,11	1,30	1,72	1,08	2,62	0,21	0,20	0,49	0,68	1,48	0,46	2,20	7,51	4,15	0,00	0,89	10,40	0,77	8,87	0,01	0,96	1,53	0,86	0,63	0,70	2,23	1,24	1,57	1,07	2,10	2,18	0,74	3,04
PR22	0,87	1,34	1,02	0,45	40,40	0,75	1,82	1,19	1,07	2,62	0,79	1,31	0,27	0,46	0,83	0,27	0,22	0,28	1,40	1,12	0,68	0,00	0,94	9,33	0,55	0,39	0,01	1,64	0,08	0,86	0,49	0,41	2,05	1,18	0,73	1,00	1,59	1,60	1,03	0,92
PR23	1,54	1,49	0,51	0,33	48,70	1,15	1,42	1,03	0,79	2,01	0,86	1,94	0,50	0,57	1,20	0,67	0,69	0,26	7,72	1,21	0,72	0,00	1,09	9,76	0,65	0,36	0,09	1,34	1,04	0,82	0,48	0,66	2,32	1,06	0,85	0,54	2,24	1,78	0,72	8,23
PR24	0,83	0,57	0,82	1,19	6,29	0,97	1,64	0,91	2,83	3,94	1,21	2,29	0,40	0,34	0,58	0,34	1,12	1,41	3,49	1,21	0,29	0,02	0,94	9,43	0,58	0,62	0,01	0,90	1,05	0,92	10,20	0,52	2,66	1,70	0,85	0,77	0,96	1,46	0,19	1,55
PR25	0,58	0,78	0,81	0,22	7,02	0,63	0,83	2,05	3,57	34,90	2,70	1,75	0,17	0,41	0,45	0,41	0,85	0,19	1,67	1,62	0,98	0,02	1,04	23,90	1,47	0,78	0,06	1,06	0,45	0,95	0,51	0,70	2,44	1,33	0,49	1,67	1,78	3,48	0,23	2,00
PR26	0,81	0,60	0,45	0,05	7,06	1,80	3,48	0,64	27,00	1,29	0,41	1,72	0,30	0,45	0,72	0,60	1,92	0,21	1,21	1,79	0,53	0,00	0,95	11,10	0,00	0,26	0,06	0,42	0,43	0,46	0,56	0,49	2,25	1,27	1,26	0,62	4,35	5,73	0,24	0,79
PR27	0,61	0,63	0,83	-	2,46	0,41	0,45	0,71	1,43	3,01	0,36	1,34	0,13	0,38	0,43	0,35	1,01	0,37	1,84	1,58	0,82	0,00	1,13	13,20	0,56	0,39	0,03	1,41	0,22	0,97	0,52	0,74	2,25	0,67	0,70	1,07	1,66	5,31	0,31	0,98
PR28	1,46	0,43	1,00	-	55,40	22,30	32,30	15,20	1,75	1,43	1,79	2,57	1,44	0,47	0,73	0,42	0,80	0,74	6,14	1,25	1,86	0,00	0,93	9,90	1,19	0,51	0,02	0,83	0,19	0,97	0,43	0,40	2,80	1,16	0,89	16,70	1,36	1,25	2,13	0,83
PR29	5,56	1,14	0,53	0,20	53,10	1,72	11,40	0,43	1,07	1,46	0,50	3,35	0,32	1,46	1,58	1,01	1,27	0,09	4,77	1,95	0,58	0,60	1,16	8,02	0,62	0,36	2,55	1,43	0,81	0,74	0,39	1,00	2,20	1,26	2,43	3,20	4,55	4,60	0,96	1,56
PR30	0,61	0,59	0,77	0,43	10,80	0,70	2,13	0,71	4,85	3,90	1,86	2,19	0,27	0,40	0,91	0,28	1,77	1,92	2,45	1,26	1,27	0,03	0,88	9,64	0,69	0,29	0,05	1,00	0,58	0,82	0,51	1,18	1,90	3,96	0,27	0,97	0,76	3,46	0,33	1,18
PR31	1,65	0,78	0,64	0,27	10,90	1,09	8,86	2,91	5,27	6,53	0,92	2,05	0,13	0,45	1,24	0,34	1,57	0,29	4,58	1																				

Dados brutos obtidos à partir de ensaio de proliferação celular de células T CD8+ (n=40). Os resultados mostram a porcentagem de proliferação (%) obtida para cada peptídeo. As mesmas são utilizadas para calcular o Índice de estimulação (I.E.), calculado pela razão entre a porcentagem de células T CD8+ proliferantes em resposta ao estímulo/porcentagem de células T CD8+ proliferantes sem estímulo.

Peptídeos	PAC_01	PAC_02	PAC_04	PAC_05	PAC_06	PAC_07	PAC_08	PAC_09	PAC_11	PAC_12	PAC_13	PAC_14	PAC_15	PAC_16	PAC_17	PAC_18	PAC_19	PAC_20	PAC_22	PAC_24	PAC_25	PAC_28	PAC_29	PAC_PR32	PAC_33	PAC_34	PAC_35	PAC_37	PAC_44	PAC_46	PAC_48	PAC_49	PAC_50	PAC_52	PAC_61	PAC_67	PAC_71	PAC_76	PAC_77	PAC_82
CN	0,82	0,92	0,31	0,26	6,65	0,60	0,90	0,67	0,83	1,34	0,85	3,33	0,31	0,42	0,12	0,54	0,44	0,19	1,41	0,83	1,22	0,03	1,01	0,48	0,32	0,34	0,03	0,57	0,19	0,46	1,05	0,90	1,80	0,59	0,51	0,33	0,60	0,48	0,99	1,05
PR01	1,12	1,26	0,18	1,06	4,89	0,63	0,96	0,69	0,62	1,19	1,30	3,75	0,59	0,49	0,20	11,80	0,15	0,23	2,25	1,25	1,43	0,02	0,54	20,60	0,37	0,22	0,03	0,86	0,21	1,15	0,76	0,61	1,84	0,93	0,28	0,31	0,46	0,65	0,35	1,50
PR02	1,19	0,89	0,22	0,27	2,30	0,92	0,91	0,36	9,20	1,20	0,92	4,64	1,68	0,55	0,25	0,17	0,15	0,03	1,63	0,84	1,07	0,00	0,57	23,10	0,25	0,20	0,00	0,33	0,39	0,43	0,73	0,96	1,88	0,48	0,58	0,47	0,56	0,41	0,39	1,78
PR03	1,05	0,85	0,28	0,09	4,27	0,28	0,59	0,28	3,38	1,23	0,84	4,61	0,37	0,45	0,33	0,29	0,31	0,14	1,49	0,71	1,22	0,00	0,81	22,90	0,26	0,29	0,00	0,55	0,12	0,45	0,93	0,43	2,18	1,46	1,66	0,33	0,57	2,33	0,34	1,13
PR04	0,84	0,93	1,18	0,18	66,00	0,18	0,57	0,35	1,57	2,51	0,68	3,16	0,54	1,43	0,11	0,32	0,20	0,11	1,42	1,61	1,57	0,00	0,62	21,80	0,32	0,22	0,00	0,62	0,20	0,32	0,60	0,36	1,79	2,80	0,63	0,36	0,68	0,42	0,38	2,23
PR05	0,89	2,22	0,17	0,12	67,60	0,52	38,00	0,21	0,54	3,17	0,69	4,57	0,95	0,64	0,04	1,18	0,21	0,09	2,73	1,98	2,34	0,44	0,93	24,50	0,18	0,88	0,01	0,58	0,29	0,40	0,81	5,74	2,55	0,53	0,94	0,34	0,42	0,41	0,64	1,00
PR06	1,54	0,91	0,17	0,74	3,22	0,15	0,83	0,27	3,27	0,86	1,06	3,24	0,56	0,47	0,05	0,13	0,18	0,10	4,64	0,88	1,10	0,00	0,41	35,80	0,13	0,16	0,03	0,50	1,18	0,38	0,54	0,44	1,76	1,19	0,34	0,23	0,45	0,48	0,90	1,03
PR07	2,71	1,02	0,16	0,59	4,44	0,22	0,66	1,13	3,84	0,81	0,67	3,64	0,36	0,44	0,10	0,28	0,25	0,16	2,91	1,92	1,37	0,00	1,07	34,80	0,24	0,37	0,00	0,54	0,09	0,31	0,77	0,81	1,94	0,70	0,52	0,50	0,45	0,84	0,34	0,97
PR08	5,00	1,01	0,15	0,18	3,23	0,32	1,02	0,38	0,53	1,69	0,65	4,24	0,51	0,19	0,05	0,38	0,21	0,38	3,96	0,63	1,20	0,00	0,66	33,40	0,20	0,18	0,04	0,48	0,29	0,52	0,45	0,42	1,95	0,62	0,93	0,26	0,00	2,33	0,27	0,81
PR09	0,83	1,18	0,13	0,34	3,03	0,19	0,87	0,26	0,45	1,26	1,27	3,54	0,28	0,42	0,00	0,16	0,69	0,13	2,11	1,59	1,02	0,00	0,52	23,70	0,29	0,16	0,00	0,44	0,21	0,26	0,47	0,31	1,93	0,68	0,77	0,23	0,51	2,26	0,31	0,94
PR10	0,30	1,11	0,22	0,30	69,50	0,37	1,19	0,37	0,30	0,49	0,62	3,55	0,66	0,36	0,10	0,11	0,56	0,61	1,53	0,75	1,38	0,02	0,62	33,10	0,23	0,59	0,01	0,45	0,22	0,43	0,57	0,42	1,76	0,54	0,43	0,29	0,44	0,43	0,38	0,81
PR11	1,32	0,53	0,20	0,07	65,80	0,50	34,50	0,33	0,19	1,11	0,43	4,05	0,93	0,66	0,19	0,93	0,32	0,13	11,10	0,76	1,45	0,00	1,11	36,00	0,21	0,18	0,01	0,55	0,15	0,31	0,73	0,58	3,35	0,38	0,23	0,28	0,51	0,54	0,28	3,09
PR12	0,86	0,91	0,22	0,93	3,20	0,14	1,33	0,48	1,47	1,13	0,33	3,37	0,44	0,39	0,11	0,15	0,28	0,34	1,55	0,75	1,56	0,04	0,44	38,90	0,20	0,96	0,01	0,59	0,21	0,45	-	-	-	0,82	-	0,34	0,29	0,64	0,31	0,72
PR13	0,85	0,69	0,39	0,71	3,74	0,06	0,87	0,51	0,47	0,83	1,00	6,65	0,45	0,52	0,00	0,16	0,60	1,85	1,39	1,25	0,83	0,02	0,75	31,50	0,76	0,26	0,00	1,02	0,26	0,41	1,04	0,63	2,28	1,82	0,46	0,24	0,67	0,93	0,26	0,77
PR14	9,28	0,85	0,23	0,23	2,72	0,14	1,35	0,55	0,53	0,85	1,13	3,81	0,46	1,18	0,11	0,38	0,14	0,32	1,65	0,77	1,19	0,00	0,56	34,70	0,30	0,33	0,00	0,64	7,69	0,60	0,73	0,65	1,87	0,83	0,45	0,24	0,41	1,60	0,40	1,89
PR15	8,87	1,30	0,45	0,35	3,53	0,16	1,19	0,37	0,41	2,11	0,63	5,23	0,71	0,32	0,06	0,20	0,20	0,28	2,25	1,23	0,97	0,00	0,58	40,30	0,24	0,25	0,01	0,39	0,21	0,97	0,78	0,61	1,53	1,19	0,56	0,26	2,81	2,37	0,79	0,76
PR16	0,65	0,93	0,34	0,44	66,90	0,59	1,12	0,35	0,29	0,45	1,00	6,33	0,48	0,61	0,04	0,14	0,14	0,09	1,24	0,68	11,90	0,00	0,68	37,20	0,37	0,13	0,01	0,72	0,27	1,40	0,48	0,35	1,84	0,53	0,71	0,31	4,57	0,26	0,30	0,64
PR17	1,07	0,66	0,23	0,15	66,70	0,47	1,21	0,68	0,37	0,56	0,79	5,53	0,90	0,57	0,20	0,13	1,10	0,08	5,86	0,96	0,90	0,02	1,14	39,60	0,33	0,33	0,02	0,74	0,29	0,74	0,67	0,75	2,44	1,07	0,59	0,26	0,57	0,47	0,30	0,95
PR18	0,74	1,12	0,20	0,45	7,17	0,60	1,47	0,43	0,35	2,13	0,88	3,43	0,30	0,67	0,00	0,13	0,42	10,20	2,05	1,20	1,22	0,00	0,50	35,70	0,13	0,45	0,00	0,61	0,12	0,65	0,76	0,75	1,75	0,92	0,40	0,33	0,26	0,33	0,20	1,08
PR19	2,82	0,89	0,14	0,73	8,23	0,81	0,70	0,77	0,86	2,96	1,78	2,84	0,43	0,44	0,14	0,23	3,17	0,16	1,56	0,75	3,58	0,00	0,75	40,30	0,27	0,45	0,00	0,51	0,14	0,48	0,76	0,78	1,93	0,67	0,39	0,32	0,47	0,92	0,40	0,93
PR20	0,59	0,79	0,20	0,16	2,40	0,14	0,64	1,07	0,72	0,60	0,64	4,13	0,28	0,40	0,29	0,12	11,00	0,16	1,56	0,80	0,99	0,00	0,60	36,60	0,23	0,36	0,01	0,62	0,38	0,37	0,86	0,83	1,69	0,52	0,40	0,22	0,00	0,63	0,29	0,82
PR21	0,46	1,05	0,19	0,48	12,00	0,44	5,32	0,47	0,36	1,42	1,16	4,19	0,31	0,48	0,05	0,20	6,19	0,24	1,69	4,18	9,44	0,01	0,52	43,20	0,20	0,20	0,01	0,44	0,28	0,37	0,64	0,84	2,07	0,59	1,29	0,28	1,99	0,42	0,72	1,22
PR22	0,98	1,18	0,28	0,48	63,20	0,00	0,83	0,48	0,35	1,37	0,60	3,12	0,27	0,57	0,04	0,26	0,16	0,10	1,72	0,59	1,00	0,00	0,69	35,00	0,31	0,24	0,00	0,55	0,00	0,50	0,61	0,32	2,21	0,72	0,68	0,19	1,53	0,61	0,37	0,70
PR23	2,45	2,10	0,17	0,13	67,80	0,33	0,92	0,39	0,23	1,13	1,07	6,01	0,79	0,33	0,60	0,29	3,25	0,11	8,14	0,77	1,79	0,02	0,80	43,20	0,35	0,28	0,03	0,51	0,29	0,45	0,66	0,88	1,98	0,71	0,65	0,22	0,96	0,28	0,40	9,38
PR24	0,50	0,90	0,26	1,39	3,62	0,27	0,83	0,27	0,38	1,63	1,42	2,85	0,64	0,29	0,00	0,25	3,75	1,20	3,15	0,91	0,82	0,02	0,69	45,40	0,25	0,25	0,02	0,31	0,46	0,44	0,69	0,67	2,22	1,26	0,58	0,30	0,30	0,33	0,23	0,82
PR25	1,61	1,27	0,16	0,15	3,14	0,34	0,63	0,26	1,38	8,09	7,08	4,37	0,45	0,54	0,00	0,18	4,10	0,08	2,22	0,55	2,55	0,00	1,06	64,80	0,00	0,36	0,00	0,50	0,13	0,43	0,54	0,54	1,69	0,53	0,31	0,26	1,17	0,82	0,30	1,64
PR26	0,70	0,74	0,05	0,07	4,28	0,42	0,24	0,29	4,18	0,29	1,00	5,88	0,00	0,59	0,13	0,25	12,10	0,08	1,89	0,79	1,72	0,00	0,86	46,30	0,25	0,24	0,02	0,35	0,13	0,35	0,66	0,55	1,98	0,52	0,53	0,16	1,03	1,61	0,24	0,60
PR27	0,84	0,98	0,32	-	1,74	0,10	0,27	0,22	0,35	0,77	0,99	5,19	0,49	0,45	0,12	0,31	4,05	0,06	1,80	1,01	2,24	0,00	0,93	52,60	0,14	0,19	0,00	0,46	0,07	0,59	0,65	0,52	1,14	0,48	0,26	0,29	0,82	1,79	0,19	0,78
PR28	1,01	1,02	0,25	-	68,80	34,30	51,30	27,40	0,35	0,56	1,47	3,79	0,46	0,52	0,13	0,20	2,74	0,31	7,19	0,96	0,72	0,00	0,51	47,00	0,26	0,24	0,00	0,61	0,09	0,70	0,71	0,36	1,89	0,48	0,39	2,62	0,41	0,77	2,33	0,83
PR29	6,20	1,95	0,44	0,04	69,30	-	4,24	0,45	0,25	0,63	1,03	6,31	1,17	1,58	0,22	0,17	4,11	0,07	6,95	0,96	1,59	0,00	1,11	39,90	0,22	0,18	0,04	0,48	0,31	0,46	0,79	0,38	1,76	1,05	0,23	0,37	2,47	1,59	0,91	1,20
PR30	1,10	1,53	0,20	0,98	5,66	0,58	2,10	0,34	1,24	0,45	4,34	5,39	0,33	0,55	0,11	0,12	11,30	1,81	2,36	0,77	3,13	0,00	0,41	47,70	0,24	0,15	0,05	0,33	0,20	0,38	0,68	1,29	-	2,91	-	0,24	0,64	0,71	0,23	0,83
PR31	2,83	1,21	0,31	0,11	6,48	0,58	16,30	0,30	2,45	3,01	1,79	3,95	0,46	0,40	0,76	0,16	14,30	0,15	5,79	0,67	1,58																			

C. Determinação de Cut-off para Ensaios de Proliferação

Cálculo para determinação de Cut-off para células T CD4+. Ensaio realizado em grupo de indivíduos soronegativos saudáveis, com os mesmos peptídeos da protease do HIV. (IE>2,5).

	CN_MLG	CN_SR	CN_EOM	CN-15	CN-16	CN-17	CN-18	CN-03	MÉDIA
CMV	0,78	2,00	0,92	0,31	0,89	0,43	1,28	0,07	0,84
CN	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PR01	0,58	0,97	0,58	0,72	0,82	0,53	0,89	0,86	0,74
PR02	0,81	0,88	0,94	0,96	1,11	0,67	0,82	0,21	0,80
PR03	1,43	0,81	0,77	1,19	0,95	0,73	1,02	0,20	0,89
PR04	0,44	0,93	0,85	1,06	1,21	0,83	1,23	0,23	0,85
PR05	0,45	0,91	0,95	0,85	0,97	0,87	0,93	1,68	0,95
PR06	0,56	1,08	0,73	0,87	0,84	0,47	0,77	0,89	0,78
PR07	1,18	0,67	1,27	0,93	0,20	0,73	0,98	0,93	0,86
PR08	1,13	1,09	0,85	1,50	0,76	0,67	1,04	0,39	0,93
PR09	0,56	1,21	0,96	0,30	0,79	1,17	1,12	0,39	0,81
PR10	0,61	4,02	-	0,44	0,97	1,30	1,59	0,08	1,29
PR11	1,10	1,05	2,53	0,89	0,66	0,77	1,09	0,82	1,11
PR12	0,51	1,18	1,29	1,09	0,92	0,83	1,10	0,54	0,93
PR13	0,81	1,02	0,89	1,13	0,71	0,87	1,04	0,57	0,88
PR14	1,26	1,70	0,92	1,35	0,55	0,90	0,99	0,79	1,06
PR15	0,74	1,49	0,85	1,93	0,84	0,40	0,93	0,68	0,98
PR16	0,31	0,96	-	1,74	1,16	0,50	1,46	0,22	0,91
PR17	5,09	0,92	1,18	1,19	1,34	0,90	0,88	1,36	1,61
PR18	0,79	2,89	1,71	1,52	0,71	0,63	0,70	1,00	1,24
PR19	1,00	0,96	1,09	1,85	0,68	0,73	1,05	0,61	1,00
PR20	1,20	1,71	0,96		0,79	1,20	0,95	0,86	1,10
PR21	0,70	1,38	0,86	2,02	1,03	1,03	0,80	0,34	1,02
PR22	0,67	1,01	-	1,67	1,08	0,77	1,23	0,33	0,96
PR23	0,74	1,22	1,39	1,94	0,97	0,26	1,11	1,36	1,12
PR24	0,50	0,97	1,06	2,30	1,00	0,70	0,91	1,75	1,15
PR25	0,74	0,96	1,54	1,48	0,71	-	0,54	0,18	0,88
PR26	0,66	1,21	0,72	1,04	0,92	1,00	1,06	0,25	0,86
PR27	0,85	1,18	1,71	-	0,55	1,13	0,95	0,18	0,94
PR28	0,33	1,01	-	1,26	0,82	0,83	1,34	0,43	0,86
PR29	0,64	1,28	0,94	2,02	1,05	1,83	0,63	0,43	1,10
PR30	0,56	4,23	1,75	1,83	0,97	1,17	0,89	0,57	1,50
PR31	0,83	1,18	1,09	1,93	0,74	0,40	0,91	0,71	0,97
PR32	0,99	1,95	0,84	1,28	0,95	0,53	0,73	0,39	0,96
PR33	0,86	2,80	1,85	1,24	1,03	1,07	0,80	0,14	1,22
PR34	14,12	6,06	-	1,37	0,76	-	1,06	0,25	3,94
PR35	1,47	1,06	1,28	2,22	0,97	0,57	1,38	0,29	1,16
PR36	0,74	1,89	2,80	2,81	1,05	1,03	0,96	0,71	1,50
PR37	0,99	2,93	1,16	1,65	1,21	1,13	0,73	0,30	1,26
PR38	0,81	1,29	1,09	1,44	0,89	0,63	0,88	0,93	1,00
PR39	0,54	1,65	-	1,87	0,87	0,93	1,17	0,54	1,08
SEB	5,00	57,89	83,29	10,70	14,21	7,77	12,44	4,82	24,51

média todos 1,1
 DP todos 0,5
 M+2SD 2,1

Cut-off 2,5

Cálculo para determinação de Cut-off para células T CD8+. Ensaio realizado em grupo de indivíduos soronegativos saudáveis, com os mesmos peptídeos da protease do HIV. (IE>3,5)

	CN_MLG	CN_SR	CN_EOM	CN-15	CN-16	CN-17	CN-18	CN-19	CN-20	CN-22	MÉDIA
CMV	1,63	4,56	3,15	1,16	1,03	0,78	1,05	0,43	0,00	1,17	1,50
CN	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PR01	1,23	0,81	0,97	0,88	0,97	0,93	0,81	1,38	2,47	0,72	1,12
PR02	0,67	0,69	1,16	0,68	1,07	0,83	0,71	0,22	1,03	0,85	0,79
PR03	0,70	0,61	1,07	0,97	0,21	0,85	1,21	0,89	0,65	0,59	0,78
PR04	0,71	0,53	1,28	1,00	0,76	0,75	1,18	0,49	2,21	0,96	0,99
PR05	0,77	0,69	1,95	1,03	0,93	0,73	0,94	1,32	2,44	0,72	1,15
PR06	1,37	0,89	1,69	0,78	0,72	0,73	1,00	0,57	2,00	0,15	0,99
PR07	0,65	0,39	2,16	0,93	0,24	0,53	0,98	0,68	1,85	0,19	0,86
PR08	1,07	1,00	1,52	1,52	0,11	0,65	1,08	0,73	1,88	0,91	1,05
PR09	1,00	0,72	2,10	0,41	0,90	0,65	1,08	2,14	1,35	0,00	1,03
PR10	1,07	6,72	-	0,51	0,97	0,93	1,30	0,54	0,65	0,70	1,49
PR11	1,37	1,22	1,38	0,62	0,38	0,90	1,19	0,43	1,32	0,78	0,96
PR12	1,19	1,03	1,48	1,10	1,14	0,80	0,73	1,70	0,94	0,70	1,08
PR13	1,07	0,83	1,89	1,13	0,62	0,70	1,63	1,00	1,62	0,33	1,08
PR14	1,26	1,03	1,10	1,30	0,69	0,60	1,01	0,49	1,94	0,14	0,96
PR15	0,32	1,08	1,43	1,00	0,52	0,50	0,96	0,51	0,65	0,81	0,78
PR16	0,73	1,89	-	1,14	1,07	0,73	1,34	0,49	0,79	0,00	0,91
PR17	18,45	0,67	0,97	0,87	0,48	0,70	1,26	1,24	1,59	0,30	2,65
PR18	1,04	3,31	1,74	1,86	0,31	0,63	0,86	0,54	1,88	0,81	1,30
PR19	1,05	0,50	1,49	1,59	1,03	0,73	1,10	0,25	1,97	0,43	1,01
PR20	3,01	2,69	1,87	-	0,72	0,85	0,95	0,54	1,44	1,15	1,47
PR21	1,04	1,19	0,75	1,80	0,86	0,80	0,90	0,70	0,88	0,91	0,98
PR22	1,04	0,92	-	1,23	1,34	0,63	1,19	0,27	0,41	0,52	0,84
PR23	1,85	0,78	1,59	1,55	0,83	0,78	1,75	0,73	1,00	0,59	1,14
PR24	0,82	1,36	1,28	1,55	1,14	0,75	0,80	0,97	1,41	0,65	1,07
PR25	1,54	0,72	1,05	1,67	0,59	-	0,49	2,65	0,79	1,28	1,20
PR26	1,25	1,33	1,43	1,25	0,69	1,15	0,61	1,24	1,03	0,52	1,05
PR27	1,48	0,75	1,89	-	0,55	1,18	0,95	0,46	1,59	0,61	1,05
PR28	1,45	1,03	-	0,83	0,41	0,60	1,56	0,00	1,85	0,48	0,91
PR29	3,05	1,06	1,80	2,32	0,76	1,10	1,09	0,22	2,50	0,70	1,46
PR30	1,18	9,69	1,30	1,99	1,31	0,73	0,74	0,46	0,94	0,85	1,92
PR31	2,14	0,81	1,56	1,77	1,14	0,68	1,15	0,76	1,71	0,41	1,21
PR32	1,90	0,78	0,98	1,51	0,33	0,63	0,98	0,78	0,44	0,69	0,90
PR33	1,55	1,72	3,56	1,54	0,45	0,80	1,14	0,26	2,00	0,19	1,32
PR34	35,00	13,33	-	1,97	0,72	-	1,33	0,00	2,41	0,35	6,89
PR35	3,79	1,22	1,67	2,19	0,76	0,53	1,36	0,86	0,65	0,41	1,34
PR36	2,19	2,39	1,98	2,01	0,93	0,78	1,33	0,95	1,53	0,14	1,42
PR37	2,01	3,94	2,33	2,33	1,07	0,95	1,04	1,27	1,32	0,30	1,66
PR38	1,68	0,64	1,89	1,84	1,03	0,85	0,89	0,51	2,21	0,70	1,22
PR39	1,61	1,47	-	1,72	0,93	0,78	1,40	0,25	0,21	0,31	0,97
SEB	16,67	178,61	109,34	13,32	27,52	7,83	39,75	24,81	6,53	9,15	43,35

média todos 1,31

DP todos 0,98

M+2SD 3,27

Cut-off 3,5

D. Ensaios de Ligação a moléculas HLA Classe II

Resultado dos ensaios de ligação aos 35 peptídeos em estudo contra 15 moléculas HLA-DR e 5 moléculas HLA-DQ altamente prevalentes na população. Em vermelho, peptídeo considerado como ligante à determinada molécula de HLA classe II (concentração mínima inibitória abaixo de 1000 nM).

	HLA DRB1												HLA DRB3/4/5			HLA DQ				
Peptideo	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	DRB3*0101	DRB4*0101	DRB5*0101	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0101/ DQB1*0501
HXB2 4-23	103	6181	3959	2412	4192	6551	33	648	5048	638	128	6,1	2952	620	846	8267	533	11589	12276	7530
L10I	84	5786	6620	2991	4001	682	17	107	1189	781	1696	9,3	1468	525	988	19440	1649	-	-	25126
L10V	72	7980	4433	9266	4203	856	103	680	3414	933	1246	10	2816	835	141	14172	2042	-	-	7740
L10F	36	8900	4319	825	1404	1142	211	358	667	562	1884	3,2	1437	1447	622	28506	1668	-	-	1250
K20R	117	2746	3660	5500	5551	1594	4,8	3878	4699	4779	308	1,5	2501	3555	3930	13249	1581	9136	8593	21930
K20T	59	4801	6510	4962	3458	6974	46	3334	2998	3530	962	20	4194	1947	2271	1282	1631	5625	4027	5459
K20I	192	-	5918	8711	7864	3409	494	10043	9624	3171	1482	195	4575	18831	5359	4439	7088	12734	10756	15625
K20M	29	3717	9148	3238	3494	4056	32	811	2854	840	424	11	2716	1329	700	759	599	6886	3729	1793
L10I/K20R	12	5949	4539	5813	5730	3632	14	1245	656	1589	3770	10	3072	852	2049	31486	2526	25562	19302	31250
L10V/K20R	19	3830	8355	7761	6149	1040	480	416	4274	1228	4102	11	2679	1435	1557	10246	517	-	21905	24272
HXB2 45-64	187	10280	2966	893	3791	1839	652	4244	655	5403	397	9,8	1698	1152	490	9870	1454	3480	4598	629
M46I	373	9442	22966	1895	2877	1819	1302	2312	643	3981	152	34	2285	4361	1944	8723	146	5729	1103	1969
M46L	79	4567	27730	1263	2865	708	284	545	769	1657	338	6,8	1583	960	553	8951	2509	7772	2207	651
I54V	797	20943	9643	5470	4400	844	3262	1392	684	3870	1683	59	7294	6271	542	5071	1077	-	6415	546
M46L/I54V	602	6533	763	2651	2896	549	2166	150	293	107	1259	6,0	2919	1211	93	8550	1621	3115	3438	322
L63P	6875	34296	4782	4605	6107	1259	2138	4339	780	6469	1719	25	6517	2704	109	7929	1065	3353	2288	4078
L63T	3833	24894	10163	1094	2243	1053	1349	6113	435	7947	1183	51	5127	3864	122	7624	1344	2146	1159	6460
L63A	8276	20071	1241	2826	2481	1129	1430	4495	649	8910	1337	14	10083	3082	4647	7791	1136	1956	2563	4936
L63S	3651	20676	7647	2788	4413	850	1677	1078	630	4091	767	20	13492	1215	652	6825	1227	3072	2492	2246
L63H	3374	21614	4306	3429	3451	813	4611	1072	559	69	1099	53	18399	810	560	9992	1096	4475	2793	1361
M46I/L63P	557	-	20209	2982	5566	458	3622	793	273	2196	852	18	4645	420	65	1921	248	6594	1346	78
M46L/L63P	2569	-	10304	5200	5339	723	3295	1698	501	3494	2052	37	5079	1652	101	5163	2018	4940	1527	373
I54V/L63P	5793	-	8188	5161	6274	659	2740	2076	522	5349	3695	13	8743	1930	467	14269	661	8082	2961	509
M46I/I54V/L63P	654	-	13815	4303	5573	747	1986	4671	618	4015	1212	5,8	6251	2237	342	7523	86	4754	3024	773
HXB2 76-95	136	11602	3223	3682	5942	2244	103	5214	693	5448	0,6	37	430	5743	3613	5399	2573	-	9848	3800
V77I	5076	30844	12666	6588	5939	14997	1228	5032	4452	3567	93	295	1029	31312	4574	9641	11093	-	4274	5081
V82A	3252	23641	6577	5665	5392	5987	836	-	23694	10543	11	494	4352	28357	-	23518	5961	-	18683	10753
V82I	2483	5247	22734	14799	22473	22365	535	-	3431	-	65	144	9038	26794	-	-	21222	-	-	-
I84V	5572	-	7619	4703	5190	6536	1298	14417	1342	23209	98	330	1748	8285	-	6047	38226	19348	16188	6150
N88D	1409	1042	2100	13544	36287	7411	654	10351	970	3840	871	307	42	3753	8361	3833	4569	966	2574	6046
L89M	207	18976	490	1665	2437	4669	94	4911	605	7267	44	38	748	1401	7683	21169	6156	-	12262	3968
L89I	123	13147	1760	5529	5818	7383	112	5781	319	7299	31	15	573	520	7453	31056	3160	3023	1142	1769
L90M	1367	-	5358	6971	9415	27355	836	8545	1653	-	788	784	7310	14319	-	-	-	7775	10351	20747
I93L	1510	-	14076	6609	6206	25702	7380	20750	730	12342	702	2858	26561	8838	14569	29586	-	7182	-	4417
V77I/I93L	225	-	8512	2322	5513	2817	1221	3469	477	3591	46	91	5099	6222	2159	5191	5691	-	24859	2678

Referências Bibliográficas

Bian H, Reidhaar-Olson JF, Hammer J. The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* 29 :299–309, 2003.

Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, D'Sousa E, Van Wheelley C, Vyakarnam A. CD4 responses to conserved HIV-1 T helper epitopes show both negative and positive associations with virus load in chronically infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 134: 454-463, 2003.

Boden D, Markowitz M. Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors. *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy*, 42: 2775-2783, 1998.

Boissonnas A, Bonduelle O, Antzack A, Lone Y-C, Gache C, Debrè P, Autran B, Combadiere B. In vivo priming of HIV-specific CTLs determines selective cross-reactive immune responses against poorly immunogenic HIV-natural variants. *J. Immunol.* 169: 3694-3699, 2002.

Boletim epidemiológico 2005. Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>

Boletim Epidemiológico AIDS, Junho de 2008. Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>

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.* 68: 6103, 1994.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A and the Brazilian Network for drug resistance surveillance. Brazilian network for HIV drug resistance surveillance (HIV-BresNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-1069, 2003.

Caride E, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Brindeiro R, Machado E, Sa CAM, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LFC, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virus Genes* 23: 193-202, 2001.

Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein, DA, Montaner JS, Richman DD, Saag MS, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Yeni PG, Volberding PA. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 277: 1962-1969, 1997.

Chen ZW, Craiu A, Shen L, Kuroda MJ, Iroku UC, Watkins DI, Voss G, Letvin NL. Simian immunodeficiency virus evades a dominant epitope-specific cytotoxic T lymphocyte response through a mutation resulting in the accelerated dissociation of viral peptide and MHC class I. *J. Immunol.* 164: 6474-9, 2000.

Couillin I, Culmann-Penciolelli B, Gomard E, Choppin J, Levy JP, Guillet JG, Saragosti S. Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein. *J. Exp. Med.* 180, 1129-34, 1994.

Current protocols in Immunology 2003. Use of the Intracellular Fluorescent Dye CFSE to Monitor Lymphocyte Migration and Proliferation. Unidade 4.9.

Damico FM, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Iwai LK, Marin ML, Hammer J, Kalil J, Yamamoto JH. T-cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1*0405-positive and -negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Jul;46(7):2465-71.

D'Aquila RT, Schapiro JM, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Grant RM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Shafer RW, Richman DD. Drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine*, 11(3): 92-96, 2003.

De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Human Retroviruses Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Jan; Vol. 22, No. 1: 1-13, 2006

de Sa-Filho DJ, Soares Mda S, Candido V, Gagliani LH, Cavaliere E, Diaz RS, Caseiro MM. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Mar;24(3):347-53.

Epítomos de células T CD8+ na protease de HIV-1 registrados no bando de dados Los Alamos. Disponível em: <http://www.hiv-web.lanl.gov/content/immunology>.

Epitopos de células T CD4⁺ da protease do HIV. Disponível em: (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/helper_summary.html).

Erickson JW, Burt SK. Structural mechanisms of HIV drug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:545-71.

Fonseca CT, Cunha-Neto E, Kalil J, Jesus AR, Correa-Oliveira R, Carvalho EM, Oliveira SC. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99:63-6, 2004.

Fonseca GS, Silva AC, Fonseca LA, Moraes S, Mairena E, Maciel BC, Gutierrez E, Segurado E, Santos S, Li HY, Rodrigues H, Hammer J, Sidney J, Sette A, Kalil K, Cunha-

Neto E. Novel conserved immunodominant CD4+ T cell epitopes from Clade B HIV-1 are frequently recognized by HIV-1 infected patients in different disease stages following HAART and in long-term non progressors. presented on AIDS Vaccine, sep. 6-9, 2005.

Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, Hammer J, Kallás EG, Sidney J, Sette A, Kalil J, Cunha-Neto E. Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. AIDS. 2006 Nov 28;20(18):2263-73.

Formas circulantes recombinantes (circulating recombinant form – CRF). Disponível em: www.aids.gov.br.

Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG, Durães Fdo V, Marinho FA, Penido ML, Caliari MV, de Melo AL, Pinto HA, Barsante MM, Cunha-Neto E, Oliveira SC. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. Acta Trop. 2008 Jun;106(3):162-7. Epub 2008 Mar 15.

Garrison KE, Jones RB, Meiklejohn DA, Anwar N, Ndhlovu LC, Chapman JM, Erickson AL, Agrawal A, Spotts G, Hecht FM, Rakoff-Nahoum S, Lenz J, Ostrowski MA, Nixon DF. T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2007 Nov;3(11):e165.

Gazzard BG, Moyle GJ, Weber J, Johnson M, Bingham JS, Brettle R, Fisher M, Griffin G, Jefferies D, King E, Gormer R, Lee C, Pozniak A, Smith JR, Tudor Williams G, Williams I. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. BHIVA Guidelines Co-ordinating Committee. *Lancet* 349: 1086-92, 1997.

Gloster SE, Newton P, Cornforth D, Lifson JD, Williams I, Shaw GM, Borrow P. Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *AIDS* 18: 749–755, 2004.

Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* 3(2), 212-7, 1997.

Halfon P, Durant J, Clevenbergh P, Carsenti H, Celis L, Khiri H, De Smet K, De Brauer A, Hulstaert F, Dellamonica P. Kinetics of disappearance of resistance mutations and reappearance of wild-type during structured treatment interruptions. *AIDS*. 2003 Jun 13;17(9):1351-61.

Hammer J, Belunis C, Bolin D, Papadopoulos J, Walsky R, Higelin J, Sinigaglia F, Nagy Z: High affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4456-4460, 1994.

Harcourt GC, Garrard S, Davenport MP, Edwards A, Philips RE. HIV-1 variation diminishes CD4 T lymphocyte recognition. *J. Exp. Med.* 188: 1785-1793, 1998.

Heeney JL. The critical role of CD4(+) T-cell help in immunity to HIV. *Vaccine*. May 6; 20(15):1961-3,2002.

HIV Databases. Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/>

HIV Drug Resistance Database. Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/>

Ho DD. Time to hit HIV, early and hard. *N. Engl. J. Med.* 333: 450-451, 1995.

Iwai LK, Yoshida M, Sadahiro A, da Silva WR, Marin ML, Goldberg AC, Juliano MA, Juliano L, Shikanai-Yasuda MA, Kalil J, Cunha-Neto E, Travassos LR. T-cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43-derived peptides in patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Apr;14(4):474-6. Epub 2007 Feb 28.

Interpretação Brasileira do teste de genotipagem. Disponível em: <http://clinmaldb.usp.br:8083/hiv/resistencia/resistencia.html>

Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, Juliano MA, Hammer J, Juliano J, Sette A, Kalil J, Travassos LR, Cunha-Neto E. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary PBMC responses from sensitized individuals. *Mol. Med.* 9:9-12, 2003.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature.* Feb20;421(6925):852-6.2003

Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Perelson AS, Ho DD. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus infected macaques. *J. Exp. Med.* 189: 991, 1999.

Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Bennett D, Brant A, Cong ME, Spira T, Shafer RW, Heneine W. Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. *PLoS ONE*. 2007 Jul 25;2(7):e638.

Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 188: 2199-2204, 1998.

Karlsson AC, Deeks SG, Barbour JD, Heiken BD, Younger SR, Hoh R, Lane M, Sällberg M, Ortiz GM, Demarest JF, Liegler T, Grant RM, Martin JN, Nixon DF. Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene. *J. Virol.* 77: 6743-6752, 2003.

Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, Jones GM, Leath S, Boots LJ, Davey V, Pantaleo G, Demarest JF, Carter C, Wan-nebo C, Yannelli JR, Rosenberg SA, Lane HC. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat. Med.* 1: 330–336, 1995.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J.Virol.* 68: 4650–55, 1994.

Lei 9.313 em novembro de 1996. Disponível em :
<http://www.aids.gov.br/assistencia/lei9313.htm>

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994 May 2;171(1):131-7.

Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):147-54. Review.

Mahnke L, Clifford D. Cytotoxic T cell recognition of an HIV-1 reverse transcriptase variant peptide incorporating the K103N drug resistance mutation. *AIDS Res Ther.* 2006 Sep 14;3:21.

Mason RD, Bowmer MI, Howley CM, Gallant M, Myers JCE, Grant MD. Antiretroviral Drug Resistance Mutations Sustain or Enhance CTL Recognition of Common HIV-1 Pol Epitopes. *J.Immunol.* 172: 7212–7219, 2004.

Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T cell responses during chronic viral infection. *J Virol.* 68: 8056-8063, 1994.

McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Ann. Rev. Immunol.* 15: 271-296, 1997.

McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410: 980-987, 2001.

Meister GE, Roberts CG, Berzofsky JA, De Groot AS. Two novel T cell epitope prediction algorithms based on MHC-binding motifs; comparison of predicted and published epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* and HIV protein sequences. *Vaccine* 13: 581-591, 1995.

Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zöllner B, Jessen H, Schewe K, Fenske S, Gellermann H, Stellbrink HJ. Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS.* 2005 Nov 4;19(16):1819-25.

Miller V. Resistance to Protease Inhibitors. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Vol. 26, Suppl. 1, March 1, 2001

Montaner JSG, Hogg R, Raboud J, Harrigan R, O'Shaughnessy M. Antiretroviral treatment in 1998. *Lancet* 352: 1919–22, 1998.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimarães L, Guimarães MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, Mayer A. V3 region polymorphism 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* 10: 569-576, 1994.

Mortara L, Letourneur F, Gras-Masse H, Venet A, Guillet JG, Bourgault-Villada I. Selection of virus variants and emergence of virus escape mutants after immunization with an epitope vaccine. *J. Virol.* 72: 1403-10, 1998.

Mueller SM, Schaetz B, Eismann K, Bergmann S, Bauerle M, Schmitt-Haendle M, Walter H, Schmidt B, Korn K, Sticht H, Spriewald B, Harrer EG, Harrer T. Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol.* 2007 Mar;81(6):2887-98. Epub 2007 Jan 3.

Myint L, Ariyoshi K, Yan H, Frater AJ, Auwanit W, Pathipvanith P, Yamada K, Matsuda M, Chiba T, Fujita K, McClure M, Weber JN, Sugiura W. Mutagenically separated PCR assay for rapid detection of M41L and K70R zidovudine resistance mutations in CRF01_AE (subtype E) human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec;46(12):3861-8.

Okazaki T, Pendleton CD, Sarobe P, Thomas EK, Iyengar S, Harro C, Schwartz D, Berzofsky JA. Epitope enhancement of a CD4 HIV epitope toward the development of the next generation HIV vaccine. *J Immunol.* Mar15;176(6):3753-9, 2006.

Padow M, Lai L, Fisher RJ, Zhou YC, Wu X, Kappes JC, Towler EM. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 containing HERV-K protease. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Dec 10;16(18):1973-80.

Paolucci S, Baldanti F, Campanini G, Zavattoni M, Cattaneo E, Dossena L, Gerna G. Analysis of HIV drug-resistant quasispecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naive and HAART patients. *J Med Virol.* 2001 Oct;65(2):207-17.

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

Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the Intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2049-56.

Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 85-96, 1995a.

Rammensee HG, Friede T, Stevanović S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228, 1995b.

Report on the global AIDS epidemic 2008. Disponível em: <http://www.unaids.org/en>

Resistance Database. Disponível em: <http://hivdb.stanford.edu>

Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. Jun 4;393(6684):474-8, 1998.

Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, Sidney J, Sette A, Kalil J, Mello LE, Cunha-Neto E, Rodrigues MM. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4⁺ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect.* 2006 Jul;8(8):2130-7. Epub 2006 Jun 2.

Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams AS, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450, 1997.

Rosenberg ES, Altfield M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJR, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407: 523-526, 2000.

Rowland-Jones SL, Pinheiro S, Kaul R, Hansasuta P, Gillespie G, Dong T, Plummer FA, Bwayo JB, Fidler S, Weber J, McMichael A, Appay V. How important is the “quality” of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? *Immunology Letters*, 79: 15-20, 2001.

Saag MS, Hahn BH, Gibbons J, Li Y, Parks ES, Parks WP, Shaw GM. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* 334: 440–4, 1988.

Saag MS. The impact of highly active antiretroviral therapy on HIV-specific immune function. *AIDS* 15 (suppl 2):S4-S10, 2000.

Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Durate AJ, Mayer A, Busch MP. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS* 10, 1579-1584, 1996.

Sá-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2007 Jan;47(1):97-102.

Sa-Filho D, Costa LJ, Oliveira CF, Guimarães APC, Accetturi CA, Tanuri A, Diaz RS. Analysis of the protease sequences of HIV-1 infected individuals after Indinavir monotherapy. *J. Clin. Virol.* 28: 186-202, 2003.

Samri A, Haas G, Duntze J, Bouley J-M, Calvez V, Katlama C, Autran B. Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. *J. Virol.* 74: 9306-9312, 2000.

Schmitt M, Harrer E, Goldwisch A, Bäuerle M, Graedner I, Kalden JR, Harrer T. Specific recognition of lamivudine-resistant HIV-1 by cytotoxic T lymphocytes. *AIDS* 14: 653-658, 2000.

Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res.* 62: 2600-2605, 2002.

Seqüência da protease do HIV-1, isolado HXB2 (99 aminoácidos) (disponível em <http://www.hiv-web.lanl.gov/content/index>

Shafer RW, Kantor R, Gonzales MJ. The genetic basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. *AIDS Reviews* 2: 211-228, 2000.

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

Sidney J, Southwood S, Oseroff C, del Guercio MF, Sette A, and Grey HM. The measurement of MHC/peptide interactions by gel infiltration. In: *Current Protocols in Immunology*. Edited by Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1998. pp. 18.3.1–18.3.19. 36.

Siliciano RF, Lawton T, Knall C, Karr RW, Berman P, Gregory T, Reinherz EL. Analysis of host-virus interactions in AIDS with antigen p120 T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ T cell depletion. *Cell* 54: 561–575, 1988.

Southwood, S., J. Sidney, A. Kondo, M.F. del Guercio, E. Appella, S. Hoffman, R.T. Kubo, R.W. Chesnut, H.M. Grey, and A. Sette. 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* 160:3363–3373.

Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, Lindquist C, Levy JA. 1999. Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 2;96(3):1030-5.

Stratov I, Dale CJ, Chea S, McCluskey J, Kent SJ. Induction of T-Cell Immunity to Antiretroviral Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 79(2): 7728–7737, 2005.

Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.* 17: 555–561, 1999.

Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20: 60-66, 1999.

van der Burg SH, Geluk A, van der Kruk M, Pontesilli O, Hovenkamp E, Franken KL, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4⁺ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J Immunol.* 162(1):152, 1999.

Véras NM, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Dec;23(12):1481-90.

von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol.* Feb; 70(2):1072-9, 1996.

Willberg CB, McConnell JJ, Eriksson EM, Bragg LA, York VA, Liegler TJ, Hecht FM, Grant RM, Nixon DF. Immunity to HIV-1 is influenced by continued natural exposure to exogenous virus. *PLoS Pathog.* 2008 Oct;4(10):e1000185. Epub 2008 Oct 24.

Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:249-84. Review.

Yu XG, Addo MM, Rosenberg ES, Rodriguez WR, Lee PK, Fitzpatrick CA, Johnston MN, Strick D, Goulder PJ, Walker BD, Altfeld M. Consistent patterns in the development and immunodominance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺ T-cell responses following acute HIV-1 infection. *J Virol.* Sep; 76(17):8690-701, 2002.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* Dec 21;188(12):2205-13, 1998.