

LEANDRO FAGUNDES TAROSSO

**Resposta Vif- e Nef-específica
mediada por células T CD8+ em indivíduos HIV-1-positivos
que espontaneamente controlam a replicação viral**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges
Kallás

São Paulo

2010

LEANDRO FAGUNDES TAROSSO

**Resposta Vif- e Nef-específica
mediada por células T CD8+ em indivíduos HIV-1-positivos
que espontaneamente controlam a replicação viral**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges
Kallás

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tarosso, Leandro Fagundes

Resposta Vif- e Nef-específica mediada por células T CD8+ em indivíduos HIV-1-positivos que espontaneamente controlam a replicação viral / Leandro Fagundes Tarosso. -- São Paulo, 2010.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.HIV-1/imunologia 2.Paciente HIV positivo não progressor 3.Linfócitos T CD8-positivos 4.Proteína Vif 5.Carga viral 6.Interferon gama/análise 7.Peptídeos

USP/FM/DBD-264/10

Aos que este desafiador conjunto de nove genes abateu.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Esper G Kallás, pela orientação precisa sem ser restrita, constante mesmo quando não é presencial, amena sem ser frouxa, impulsionadora sem precisar ser compulsória.

A todos familiares, amigos, amores e colegas que acreditaram em mim e no êxito desta etapa. Gratidão também àqueles que, ao contrário, não acreditaram e me fizeram querer mostrar que erraram.

À Coordenação para o Aperfeiçoamento do Ensino Superior, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Instituto de Investigação em Imunologia e aos *National Institutes of Health* pelo apoio financeiro pessoal e ao projeto.

Aos seguintes colaboradores por executar partes específicas deste trabalho:

À Dra Mariana M. Sauer e à equipe do Centro de Controle de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de São Paulo pelo atendimento aos pacientes.

Ao Dr Sabri Sanabani e à Dra Ester C Sabino, da Fundação Pró-Sangue de São Paulo, pelo seqüenciamento genético viral.

À Dra Maria Teresa Maidana-Giret e ao Hernán E Bermudez-Asa, do Laboratório de Imunologia II da Universidade Federal de São Paulo, pela tipagem de alelos de HLA de classe I.

À Helena I. Tomiyama, da Universidade Federal de São Paulo, pela supervisão do laboratório.

Ao Dr Alessandro Sette e ao Dr John Sidney, do *La Jolla Institute for Allergy and Immunology*, em La Jolla, EUA, pela predição e síntese de peptídeos.

À Shari Piaskovski, da Universidade de Wisconsin-Madison, EUA, pela leitura de placas de ELISPOT.

Ao Dr Ricardo S. Diaz e a sua equipe, do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, pelos testes de contagem de linfócitos T CD4+ e quantificação de carga viral plasmática.

Ao Dr Jorge Kalil Filho pelo apoio da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e por suas valiosas sugestões.

Ao Dr. David Watkins, Universidade de Wisconsin-Madison, EUA, pelo fundamental papel no delineamento, análise e interpretação dos resultados.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências:

Adaptado de *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Carneiro da Cunha, A. *et al.* 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:

List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS	11
3. MÉTODOS.....	12
3.1 Considerações Éticas	12
3.2 Sujeitos da pesquisa.....	12
3.3 Contagens de células T CD4+ e quantificação de carga viral plasmática	13
3.4 Tipagem dos alelos de HLA de classe I dos <i>loci</i> A e B.....	14
3.5. Seqüenciamento de <i>vif</i> e <i>nef</i> de HIV-1	15
3.6 Predição e síntese de epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I	16
3.7. Ensaio de ELISPOT (<i>Enzyme-linked immunospot</i>) para Interferon Gama (IFN- γ).....	17
Tabela 1 - Número de peptídeos testados para cada paciente nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ	19
Figura 1. Comparação dos resultados obtidos com os experimentos de ELISPOT-IFN- γ com os peptídeos 15-meros e os HLA-restritos, para um paciente	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Contagens de células T CD4+ e quantificação da carga plasmática de HIV-1	21
Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes estudados	22
Figura 2. Carga viral plasmática de HIV-1 nos pacientes estudados, durante seu acompanhamento clínico	23
4.2. Superrepresentação de <i>HLA-B*57</i> nos indivíduos controladores da replicação viral.....	23
Figura 3. Freqüência de indivíduos HIV-1 positivos portadores dos diversos alelos de HLA de classe I dos <i>loci</i> A e B	24
4.3 Caracterização do genoma e da diversidade genética do HIV-1	24
Figura 4. Árvores filogenéticas baseadas em seqüências de <i>vif</i> e <i>nef</i> de HIV-1 dos seis pacientes estudados aqui e outras seqüências de referência	26
4.4 Predição de epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I	27
4.5 Respostas imunes celulares detectadas contra peptídeos 15-meros da seqüência do consenso B de HIV-1	27

Tabela 3 - Peptídeos que estimularam respostas positivas detectados nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ	29
Figura 5. Alinhamentos das seqüências genéticas virais e mapas das respostas imunes celulares detectadas.....	30
4.6 Epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I revelaram maior amplitude resposta imune celular mais ampla do que peptídeos 15-meros do consenso B de HIV-1	32
Figura 6. Respostas imunes celulares contra peptídeos de Vif e Nef detectadas com peptídeos 15-meros e HLA-restritos	35
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	44
7. ANEXOS.....	45
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAPPESQ).....	45
Anexo II. Aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).....	47
Anexo III. Aceite para publicação de artigo científico	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação dos resultados obtidos com os experimentos de ELISPOT-IFN- γ com os peptídeos 15-meros e os HLA-restritos, para um paciente.....	20
Figura 2.	Carga viral plasmática de HIV-1 nos pacientes estudados, durante seu acompanhamento clínico.....	23
Figura 3.	Freqüência de indivíduos HIV-1 positivos portadores dos diversos alelos de HLA de classe I dos <i>loci</i> A e B.....	24
Figura 4.	Árvores filogenéticas baseadas em seqüências de <i>vif</i> e <i>nef</i> de HIV-1 dos seis pacientes estudados aqui e outras seqüências de referência.	26
Figura 5.	Alinhamentos das seqüências genéticas virais e mapas das respostas imunes celulares detectadas.....	30
Figura 6.	Respostas imunes celulares contra peptídeos de Vif e Nef detectadas com peptídeos 15-meros e HLA-restritos.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de peptídeos testados para cada paciente nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ	19
Tabela 2.	Características clínicas dos pacientes estudados.....	22
Tabela 3.	Peptídeos que estimularam respostas positivas detectadas nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa	aminoácidos
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ANN	<i>artificial neural network</i>
ARB	<i>average relative binding</i>
ART	terapia antirretroviral
BCIP/NBT	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
<i>et al.</i>	e outros
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked Immuno sensitive assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FITC	isoticianato de fluoresceína
GBV-C	vírus GB do tipo C
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN- γ	interferon gama
kb	quilobase
mg	miligrama
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mL	mililitro
mm ³	milímetro cúbico
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
°C	grau centígrado
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	ficoeritrina

PerCP	proteína de clorofila peridinina
PSCL	<i>positional scanning combinatorial library</i>
R10	meio RPMI suplementado de 10% de SFB
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i>
s	segundo
SFB	soro fetal bovino
SIV	vírus da imunodeficiência símia
SMM	<i>stabilized matrix method</i>
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
UFP	unidade formadora de ponto
µg	micrograma
µL	microlitro
%	porcentagem
9-mero	nonâmero
10-mero	decâmero
15-mero	pentadecâmero

RESUMO

Indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) que controlam a replicação viral, mesmo na ausência de tratamento com drogas antirretrovirais, representam um exemplo de contenção bem-sucedida do vírus. O entendimento das respostas imunes antivirais presentes nestes indivíduos pode auxiliar no delineamento de vacinas, particularmente no caso de estratégias vacinais desenvolvidas para induzir um fenótipo de controle da replicação viral e, assim, diminuir o ritmo da progressão à AIDS e/ou a taxa de transmissão para terceiros. A resposta imune celular contra HIV-1 é geralmente mapeada em ensaios de ELISPOT-IFN- γ empregando-se peptídeos pentadecâmeros sobrepostos por 11 aminoácidos sintetizados a partir de seqüências consensuais do vírus. Contudo, este método pode subestimar a detecção da real amplitude da resposta imune celular contra epitopos contidos na seqüência autóloga do vírus infectivo. Neste trabalho, foram comparadas respostas imunes celulares contra peptídeos 15-meros baseados nas seqüências de *vif* e *nef* do consenso do subtipo B do HIV-1 e respostas imunes contra peptídeos HLA-restritos de nove ou 10 aminoácidos baseados tanto nas seqüências de *vif* e *nef* do consenso do subtipo B do HIV-1, quanto nas seqüências autólogas dos vírus seqüenciados a partir de seis pacientes controladores da replicação do HIV-1. Nossa análise revelou que três dos seis pacientes investigados mostraram maior amplitude de resposta imune celular contra epitopos em Vif e Nef quando os peptídeos HLA-restritos foram empregados, tenham sido eles preditos a partir da seqüência consensual ou a partir das

seqüências do vírus autólogo. O número de respostas positivas aumentou de quatro para 16 em Vif e de oito para 22 em Nef, com o uso dos reagentes HLA-restritos. Estes resultados sugerem que emprego de peptídeos 15-meros pode sub-representar a amplitude real da resposta imune celular envolvidas no controle da replicação do HIV-1 e que o conhecimento acerca das respostas imunes de sucesso em indivíduos controladores pode ser melhorado e ampliado com a revisão dos métodos empregados.

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals who spontaneously control viral replication represent an example of successful containment of the AIDS virus. Understanding the anti-viral immune responses in these individuals may help in vaccine design, particularly vaccine strategies designed to induce a controller phenotype and thus, prevent disease progression and decrease risk of transmission. Immune responses against HIV-1 are normally screened using 15-mer peptides overlapped by 11 amino acids from HIV-1 consensus sequences in ELISPOT-IFN- γ assays. However, this method may underestimate the real breadth of the cellular immune responses against the autologous sequence of the infecting virus. We compared cellular immune responses against *nef* and *vif*-encoded consensus B 15-mer peptides to responses against HLA class I-predicted minimal optimal epitopes from consensus B and autologous sequences in six patients who have controlled HIV-1 replication. Interestingly, our analysis revealed that three of our patients had broader cellular immune responses against Vif- and Nef-HLA class I-predicted minimal optimal epitopes from either autologous viruses or from the consensus B sequence, when compared to responses against the 15-mer HIV-1 consensus B peptides. The number of positive responses against epitopes in these two HIV-1 proteins increased from four to 16 for Vif and from eight to 22 for Nef. These findings suggest that immune responses assessed using 15-mers peptides may underrepresent the real breadth of the immune control of the infecting virus and the knowledge about the successful responses in

controller individuals could be improved after reviewing the employed methods.

1. INTRODUÇÃO

Mesmo com os avanços na prevenção de novos casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) e na redução das mortes anuais relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o número de pessoas vivendo com o HIV-1 continua aumentando. O adoecimento relacionado à AIDS ainda é uma das principais causas de óbito em todo o mundo e projeta-se que continue sendo uma significativa causa global de mortalidade prematura nas próximas décadas. A infecção atinge hoje 33,4 milhões de pessoas, com 2,7 milhões de novos casos e 2,0 milhões de mortes somente no ano de 2008 (UNAIDS, 2009).

No Brasil, foram notificados 544 846 mil casos de AIDS e 183 mil óbitos até junho de 2009. Somente no primeiro semestre do mesmo ano, foram notificados 13.661 novos casos. A epidemia no Brasil atinge, em sua maioria, homens (razão homem:mulher de 1,9) e heterossexuais (30,6 % dos homens e 90,9% das mulheres infectadas), com taxa de incidência anual de casos de AIDS de 18,2 casos para cada 100 mil habitantes em 2009 (PN-DST/AIDS, 2009).

A terapia antirretroviral (ART) combinada diminuiu substancialmente a morbidade e a mortalidade entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 desde o início de seu uso, em 1996. Estudos observacionais sugerem que esta forma de tratamento reduz as taxas de progressão à AIDS e à morte em vários anos, tanto em pacientes já imunodeficientes como em pacientes

com altas contagens de linfócitos T CD4+ (Sterne *et al.*, 2009). Contudo, o uso das drogas antirretrovirais pode ser inconveniente aos pacientes e ter efeitos colaterais tais como náusea, diarreia, cefaléia, lipodistrofia e lipoatrofia, hepatite, insuficiência renal, toxicidade mitocondrial, e doença cardiovascular (Andiman *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2009). Contudo, ainda permanece em expansão, a partir de longo acompanhamento clínico de grandes coortes de pacientes HIV-1-positivos em tratamento, o conhecimento sobre a total gama de efeitos colaterais que estes medicamentos podem induzir.

O sucesso das drogas antirretrovirais é dependente da estrita aderência ao tratamento. Aderência subótima está associada com falha terapêutica e emergência de linhagens virais resistentes (Bangsberg *et al.*, 2000; Roge *et al.*, 2004). Dados de Torres-Madriz (2010) mostram que a baixa aderência é comum entre os tratados, aumentando com o passar do tempo de tratamento. Além disso, o estigma causado pelo uso das drogas anti-HIV-1 naqueles que as tomam é um outro fator limitante ao sucesso do tratamento (Aggleton, 2005), uma vez que doses no mínimo diárias são necessárias e o tratamento é para toda a vida.

A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 progride para AIDS dentro de 10 a 15 anos de infecção se não forem tratados com drogas antirretrovirais. Entretanto, um raro grupo de indivíduos, chamados de controladores e controladores de elite, permanece assintomático, tendo cargas virais plasmáticas muito baixas ou mesmo indetectáveis e contagens

altas de células T CD4+ periféricas (Betts *et al.*, 2006; Emu *et al.*, 2008; Lambotte *et al.*, 2005; Pantaleo *et al.*, 1995).

Além do benefício individual da baixa carga viral plasmática em um paciente infectado, diversos estudos têm mostrado o benefício que tal situação de controle viral tem sobre a epidemia em termos do risco de transmissão do HIV-1, que é menor quando os níveis de RNA do vírus no plasma estão abaixo de 2 000 cópias/mL, um nível no qual a progressão à AIDS é também lenta (Gray *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2001; Quinn *et al.*, 2000). O estudo WITS (*Women and Infants Transmission Study*), em 1999 (Garcia *et al.*), com mais de 550 pares de mães e filhos, descreveu que o risco de transmissão vertical foi de 0% quando a carga viral materna esteve abaixo de 1 000 cópias/mL. Em uma coorte de casais heterossexuais sorodiscordantes, a taxa de transmissão por coito foi maior nas fases inicial e terminal da infecção, justamente quando o caso-índice apresentava maiores níveis de carga viral plasmática de HIV-1 (Wawer *et al.*, 2005).

Assim, estratégias de imunização que, ainda que não sejam completamente protetoras da aquisição da infecção, sejam capazes de reduzir a replicação viral, teriam potencial positivo sobre o crescimento da pandemia (Johnston e Fauci, 2007; Tonks, 2007) bem como na melhora dos sintomas e prolongamento da sobrevida em indivíduos infectados. Desta forma, o entendimento dos mecanismos pelos quais indivíduos controladores debelam espontaneamente a replicação viral pode beneficiar o desenvolvimento de vacinas que visam o controle do vírus, a definição de

correlatos de proteção e a identificação de novos alvos de intervenção farmacológica (Walker, 2007).

O completo entendimento das razões pelas quais estes pacientes são capazes de controlar a replicação viral permanece não esclarecido. Indivíduos controladores desenvolvem resposta imune potente contra o vírus, mas os mecanismos de controle são difíceis de avaliar, além de serem, provavelmente, de natureza multifatorial. Diversos estudos demonstraram que alguns destes indivíduos foram infectados por vírus com menor capacidade replicativa, os quais possuem polimorfismos incomuns em *nef* (Rhodes *et al.*, 2000; Salvi *et al.*, 1998), *vpr* (Lum *et al.*, 2003) e outros genes virais (Alexander *et al.*, 2000). Potentes respostas imunes mediadas por células T CD4+ (Rosenberg *et al.*, 1997) e CD8+ (Harrer *et al.*, 1996) também foram detectadas em alguns controladores. Acredita-se que estas respostas desempenhem um papel principal e estejam ativamente atuando na contenção da replicação do HIV-1 (Migueles *et al.*, 2002; Migueles *et al.*, 2008).

A definição dos mecanismos imunes responsáveis pelo controle da replicação do HIV-1, nas fases aguda e crônica da infecção, é fundamental para a compreensão da imunopatogênese da AIDS, bem como para estabelecer objetivos de estratégias vacinais. Um grande número de observações clínicas e experimentais tem indicado que linfócitos T CD8+ vírus-específicos estão implicados neste processo. Dois estudos pioneiros sugeriram que as respostas mediadas por célula T CD8+ citotóxicas HIV-1-específicas são um componente importante associado com o declínio da

multiplicação viral que segue o término da fase aguda da infecção (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994). Estes estudos demonstraram que a redução da viremia do HIV-1, neste momento específico da infecção, está associado ao aparecimento de linfócitos T CD8+ HIV-1-específicos e que a ausência de tais células associa-se com prolongamento de sintomas, viremia e antigenemia persistentes e baixa contagem de células T CD4+. Alguns alelos de MHC (*Major Histocompatibility Complex*), como os alelos *HLA-B*57* e *HLA-B*27*, estão consistentemente superrepresentadas em coortes de controladores (Migueles *et al.*, 2000; Saez-Cirion *et al.*, 2007b), sugerindo um importante papel de células T CD8+, as quais reconhecem alvos antigênicos ligados a moléculas de classe I do HLA em indivíduos que contém a replicação viral sem o auxílio de antirretrovirais (Carrington, 2003; Kaslow, 2001; Migueles *et al.*, 2000; Saez-Cirion *et al.*, 2007a). O escape viral em um epitopo imunodominante que se liga ao *HLA-B*27* foi associado com progressão para AIDS em (i) controladores adultos (Keet, 1999), (ii) crianças *HLA-B*27*-positivas que receberam vírus mutantes de suas mães (Goulder, 2001) e (iii) uma criança que havia inicialmente controlado a infecção (Feeney, 2004).

Experimentos com o principal modelo animal para estudo da infecção por vírus de imunodeficiência primatas, os macacos resos indianos susceptíveis à infecção por vírus de imunodeficiência símea (SIV), também mostraram que o entendimento do controle espontâneo da infecção pode ser útil para o desenvolvimento de novas estratégias de imunização. A frequência de certos alelos de MHC de classe I esteve aumentada,

particularmente *Mamu-B*17*, em um grupo de macacos resos indianos infectados com a cepa SIV_{mac}239 que apresentavam controle da viremia durante a fase crônica, com cargas virais plasmáticas menores do que 500 cópias/mL por períodos de até cinco anos, (Yant *et al.*, 2006). Após depleção dos linfócitos T CD8⁺ circulantes com anticorpo monoclonal anti-CD8 M-T807 em seis destes macacos, houve aumento de duas ordens de magnitude na replicação viral nestes animais. Os linfócitos T CD8⁺ voltaram à circulação ao mesmo tempo em que voltou a ocorrer o controle sobre a replicação viral em todos os seis macacos controladores estudados (Friedrich *et al.*, 2007).

A atividade destas células, ao contrário do que ocorre na resposta imune humoral, parece estar direcionada contra uma ampla gama de variantes virais, seletivamente destruindo células infectadas. Embora se acredite que somente anticorpos possam, de fato, proteger contra infecção, espera-se que uma vacina de célula T CD8⁺ possa conter parcialmente ou totalmente a replicação do HIV-1 (Cohen, 2007).

Para caracterizar respostas imunes mediadas por células T CD8⁺ em controladores, mapeamentos das respostas antivirais com peptídeos de 15 aminoácidos (aa) (15-meros) baseados em seqüências genéticas consensuais que recobrem todo o proteoma viral têm sido realizados (Draenert *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2000; Kiecker *et al.*, 2004). Contudo, este método pode subestimar a amplitude das respostas imunes contra a seqüência autóloga do vírus infectante, uma vez que, de forma geral no caso do HIV-1, ela é significativamente diferente da seqüência consensual.

Além disso, as respostas detectadas podem ser subestimadas empregando-se 15-meros porquanto as células T CD8+ preferencialmente reconhecem epitopos com oito a 11 aminoácidos.

Respostas imunes potentes mediadas por células T CD8+ citotóxicas específicas para epitopos de Vif e Nef, duas proteínas acessórias dos vírus de imunodeficiência de primatas, foram detectadas nos macacos resos infectados com SIV controladores da replicação viral no experimento de depleção de seus linfócitos T CD8+ (Friedrich *et al.*, 2007). Enquanto Nef já foi utilizada como imunógeno vacinal (Priddy *et al.*, 2008; Gorse *et al.*, 2008), Vif não foi ainda testada em nenhuma das formulações de vacinas contra HIV-1 que chegaram a ensaios clínicos avançados até hoje.

Em seqüências de Vif já estudadas, observou-se extensa conservação de aminoácidos, sugerindo sua importância funcional. De fato, um estudo de mutagênese do HIV-1 demonstrou que mutantes em Vif exibiram redução de até 25% na capacidade infectiva em um único ciclo replicativo (Simon *et al.*, 1999). Além disso, Vif é enriquecida com aminoácidos triptofanos, os quais são freqüentemente os resíduos primários de ancoragem para algumas moléculas de MHC de classe I, incluindo aquelas associadas à progressão lenta para AIDS (Kiepiela *et al.*, 2004; Migueles *et al.*, 2000; Yant *et al.*, 2006). Desta forma, a geração de respostas imunes celulares contra Vif e Nef pode ser um mecanismo especialmente potente de supressão viral e, assim, estas proteínas são portadoras de epitopos possivelmente importantes para imunidade induzida por vacinas. Juntas, estas informações argumentam a favor da hipótese de que respostas

citotóxicas direcionadas a epitopos em Vif podem ser potentes elementos envolvidos no controle e na supressão do HIV-1, assim como visto em macacos resos controladores infectados com SIV. E ainda, que a estimulação destas respostas por meio de imunização pode levar à indução de imunidade eficiente contra o HIV-1.

O escape à resposta imune celular é um dos maiores desafios à geração de uma vacina capaz de estimular o controle da replicação viral (McMichael *et al.*, 2010). O reconhecimento de uma ampla gama de epitopos do HIV-1 pode superar este empecilho, tanto por criar possibilidades extras de reconhecimento se mutações surgirem e forem capazes de anular as respostas estimuladas, quanto por elevarem a probabilidade de reconhecimento de epitopos virais obrigatoriamente tipo selvagem, ou seja, em seqüências protéicas virais funcionalmente críticas e não tolerantes a mutações (Betts *et al.*, 2001). Assim, os estudos que se destinam a caracterizar as respostas imunes celulares envolvidas no controle espontâneo e eficaz da replicação viral em indivíduos controladores precisam ser suficientemente sensíveis para detectar tais respostas em sua total e real amplitude.

Altfeld *et al.* (2003) demonstraram o aumento no poder de detecção de respostas imunes direcionadas a epitopos das proteínas acessórias Tat e Vpr do HIV-1 ao utilizar seqüências virais autólogas para síntese dos peptídeos utilizados como estímulos em ensaios imunológicos. Eles concluíram que a investigação da reatividade contra este tipo de proteínas é mais propensa a ser subestimada quando se emprega seqüências

consensuais para síntese dos peptídeos, uma vez que as proteínas acessórias são menos conservadas que as estruturais e apresentam maior variação quando comparadas às seqüências de consensos.

Já foram realizados mapeamentos das respostas mediadas por células T CD8+ específicas contra Vif do consenso B de HIV-1 e foram identificados 18 epitopos, restritos por cinco moléculas de HLA de classe I do *locus* A e nove moléculas do *locus* B (Korber *et al.*, 2005).

No presente estudo, buscou-se caracterizar de forma altamente sensível e específica as respostas imunes celulares contra epitopos de Vif e Nef presentes em uma coorte de indivíduos infectados pelo HIV-1, acompanhados desde a infecção precoce, que apresentam controle da replicação viral por pelo menos três anos. Foi realizado mapeamento das respostas imunes por meio de ensaios de ELISPOT (*Enzyme-linked Immunospot assay*)-IFN- γ utilizando-se peptídeos de 15 aa de comprimento, sobrepostos por 11 aa, que cobrem toda a extensão das seqüências consensuais das duas proteínas investigadas. Além disso, a partir de dados gerados por seqüenciamento genético dos vírus infectantes em cada um dos seis indivíduos controladores estudados e das tipagens dos seus alelos de HLA de classe I, foi possível prever, por ferramentas de bioinformática, epitopos autólogos restritos às moléculas de HLA de classe I. Tais epitopos foram sintetizados e testados em novos ensaios de ELISPOT-IFN- γ . Os resultados demonstraram que, empregando-se esta abordagem mais específica e sensível, foi possível detectar maior amplitude de resposta imune contra epitopos nas duas proteínas virais investigadas e que, assim,

a resposta imune em indivíduos controladores da replicação viral pode ser maior do que previamente descrita.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o poder de detecção de respostas imunes celulares da metodologia tradicional de mapeamento baseado em seqüência do consenso B de HIV-1 e comparar tal poder de detecção com uma abordagem mais sensível e específica baseada no uso de epitopos autólogos e restritos a moléculas de HLA de classe I.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar, em uma coorte de indivíduos que vivem com HIV-1 acompanhados prospectivamente desde a infecção precoce, controladores da replicação viral sem uso de antirretrovirais.

Tipar os alelos de HLA de classe I dos *loci* A e B dos pacientes controladores da replicação do HIV-1.

Seqüenciar os genes *vif* e *nef* do HIV-1 destes pacientes.

Predizer epitopos em Vif e Nef, com nove a 10 aminoácidos de comprimento, baseados nas seqüências autólogas seqüenciadas, restritos a moléculas de HLA de classe I.

Caracterizar resposta imune celular contra epitopos de Vif e Nef de HIV-1 em indivíduos controladores da replicação viral.

3. MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Termo de consentimento livre e esclarecido foi lido e assinado por todos os pacientes incluídos neste estudo, o qual foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de São Paulo (número do processo: 0041/08), Universidade de São Paulo (número do processo: 4 537) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (número do processo: 14 781).

3.2 Sujeitos da pesquisa

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas de seis indivíduos do sexo masculino provenientes da coorte de infecção recente pelo HIV-1, da Universidade Federal de São Paulo (Kallas *et al.*, 2004). Os pacientes foram considerados como recentemente infectados pelo HIV-1 quando obtiveram resultados positivos em testes de ELISA e *Western Blot* para HIV-1, conforme algoritmo do Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2003), e obtiveram resultados negativos em um teste de ELISA para HIV-1 menos sensível (*Vironostika HIV-1 micro-ELISA system*, BioMérieux, Durham, NC, EUA). Os detalhes da formação de tal coorte foram publicados por Kallas *et al.* (2004). Os seis pacientes estudados aqui foram classificados como controladores da replicação viral uma vez que a maioria de suas quantificações de carga viral plasmática, em um período de

dois anos, foi menor do que 1 000 cópias/mL, sem uso de terapia antirretroviral.

3.3 Contagens de células T CD4+ e quantificação de carga viral plasmática

Contagens absolutas de células T CD4+ periféricas foram realizadas por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD3, conjugados aos fluorocromos Isotocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE) e Proteína de Clorofila Peridina (PerCP), respectivamente. Cinquenta microlitros de sangue total foram incubados com 20 µL do reagente *TriTEST* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), o qual contém concentrações equiparáveis dos três anticorpos. Após incubação de 15 minutos, as amostras foram lisadas por adição de 450 µL de solução *BD FACS Lysing* (1:10; v/v). Após nova incubação por 15 minutos, a aquisição foi realizada em citômetro *BD FACSCalibur* (BD) por meio do *software MultiSet* (BD). Os valores (células/mm³) destas populações celulares foram calculados com base em *beads* de referência presentes nos tubos empregados para os testes (*BD TruCount Tubes*, BD).

O RNA de HIV-1 presente no plasma foi quantificado, a partir de amostras de sangue periférico coletadas em EDTA e fracionadas em até 4 horas após a coleta, por meio da amplificação de uma região do gene *gag* do RNA viral em um ensaio quantitativo de RT-PCR (*reverse transcriptase - polymerase chain reaction*) (*Amplicor Monitor*, Roche, Brandenburg, NJ, EUA) até janeiro de 2007. Após tal data, o ensaio foi substituído pelo ensaio

de ramificação do DNA, mais sensível (*Versant® - branched DNA HIV-1.0 ASSAY*, Bayer Health Care LLC, Tarrytown, NY, EUA).

3.4 Tipagem dos alelos de HLA de classe I dos *loci* A e B

Os alelos de HLA de classe I dos *loci* A e B dos seis pacientes controladores e de um grupo ainda maior de 161 indivíduos HIV-1 positivos acompanhados desde a infecção recente foram tipados com resolução média utilizando-se amplificação específica por PCR (*polymerase chain reaction*) com o ensaio comercial *PeI-Freez SSP UniTray* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Foram adicionados DNA genômico isolado de células sangüíneas, enzima DNA polimerase *Taq* e água a cada um dos 96 poços de uma placa, cada um contendo iniciadores de amplificação por PCR, bases nucleotídicas e soluções tamponantes. Assim, a presença de diversos alelos dos *loci* A, B e Cw foi testada simultaneamente neste ensaio. As placas, contendo os reagentes citados, misturados, foram submetidas a cinco ciclos de amplificação de 96°C, por 25 s, 70 °C, por 50 s e 72 °C, por 45 s, 21 ciclos de 96 °C, por 25 s, 65 °C, por 50 s e 72 °C, por 45 s, e quatro ciclos de 96 °C, por 25 s, 55 °C, por 60 s e 72 °C, por 120 s em termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os produtos da amplificação foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 2 % e as bandas separadas foram observadas após coloração com Brometo de Etídeo em transluminador de luz ultravioleta. A presença de banda no gel é analisada

como a positividade para o alelo testado no poço onde ocorreu a amplificação genômica.

3.5 Seqüenciamento de *vif* e *nef* de HIV-1

O genoma completo do HIV-1 proviral, ou seja, a seqüência genética do vírus inserida no genoma do hospedeiro, foi obtido a partir de DNA isolado de CMSP (células mononucleares do sangue periférico) coletadas na visita mais precoce dos pacientes, após ingressarem na coorte. Foram amplificados cinco fragmentos sobrepostos de 1,8 a 3,0 kb cada, usando a técnica de *nested-PCR*, e seqüenciados em seqüenciador automático (*ABI 3130; Applied Biosystems*), como descrito previamente (Sanabani *et al.*, 2006). Os dados a partir dos fragmentos seqüenciados foram editados e as seqüências foram montadas de forma contígua pelo programa *Sequencher* 4.0 (*Gene Code Corp*, Ann Arbor, MI, EUA). As seqüências de *vif* e *nef* foram alinhadas com seqüências de referência empregando-se o programa *Clustal_X* 1.81 e posteriormente editadas manualmente (Thompson *et al.*, 1997). Árvores filogenéticas foram criadas pelo método de máxima verossimilhança implementado no programa *PHYML* (Anisimova e Gascuel, 2006) utilizando o modelo de substituição GTR + I + G e uma árvore *BIONJ* de partida. Procura heurística por verossimilhança foi realizada pelo algoritmo SPR de troca entre clados. A divergência baseada na substituição de aminoácidos por posição dentro das seqüências de *Vif* e *Nef* foi calculada pelo método de correção de Poisson com o programa *Mega* 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

3.6 Predição e síntese de epítopos restritos ao HLA de classe I

Foi utilizada uma abordagem multivariada para predição de epítopos, baseada no uso consensual de vários métodos preditivos disponíveis (Peters *et al.*, 2006). Entre estes métodos, foram empregados os algoritmos ARB (*average relative binding*), SMM (*stabilized matrix method*) e ANN (*artificial neural network*), disponíveis na base de dados IEDB (*Immune Epitope Database*). Também foram utilizados os métodos matriciais disponíveis em NetMHC e matrizes PSCL (*positional scanning combinatorial library*). ARB, SMM e ANN predizem a afinidade quantitativa de ligação. ANN é um modelo não-linear e ARB e SMM geram matrizes de pontuação para a afinidade de ligação predita (You, 2007; Zhang *et al.*, 2008). As seqüências protéicas de Vif e Nef do consenso B do HIV-1 e dos vírus autólogos isolados dos seis pacientes controladores foram rastreadas para identificar peptídeos 9-meros ou 10-meros que potencialmente se ligariam às moléculas de HLA de classe I, *locus* A e B, destes seis pacientes.

A todos os peptídeos rastreados foram dadas pontuações de potencial ligação às moléculas de HLA e estes peptídeos foram então ordenados em uma lista de acordo com suas pontuações. Quando houve mais de um método disponível para a predição de ligação uma molécula de HLA específica, os peptídeos foram reordenados com base na pontuação mediana obtida com os métodos empregados. Quando não houve um algoritmo disponível para um alelo de HLA específico, as predições foram baseadas em um algoritmo para outro alelo na mesma família ou um alelo dentro do mesmo supertipo de HLA. Os 2,5 % peptídeos melhor pontuados

foram escolhidos para serem sintetizados como material bruto liofilizado. Foram, então, ressuspensos na concentração de 20 mg/mL em DMSO (dimetil-sulfóxido) (100%) e, posteriormente, diluídos nas concentrações necessárias também em DMSO (100%).

3.7 Ensaio de *Enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) para interferon gama (IFN- γ)

Foram realizados dois grupos de experimentos de ELISPOT para detecção da produção de IFN- γ antígeno-específica. No primeiro, foram utilizados peptídeos 15-meros sobrepostos por 11 aa correspondentes às proteínas completas Vif e Nef do consenso B de HIV-1 (*NIH AIDS Research and Reagent Program*, Rockville, MD, EUA) na concentração final de 10 μ g/mL. No segundo grupo de experimentos, foram utilizados peptídeos de nove ou 10 aa preditos para se ligar às moléculas de HLA de classe I dos *loci* A e B dos seis pacientes estudados na mesma concentração. Para cada paciente, o número de peptídeos restritos a moléculas de HLA variou de 70 a 110. Destes, alguns foram preditos baseados na seqüência do consenso B do HIV-1 e outros baseados nas seqüências autólogas produzidas (Tabela 1). Resumidamente, placas de 96 poços de fundo chato de nitrocelulose (*Multiscreen*, *Millipore*, Bedford, MA, EUA) foram sensibilizadas com 0,5 μ g de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (*Mabtech*, Nacka, Suécia) por 2 h a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS(1x) e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 10 % de soro fetal bovino (R10), que foi adicionado por

30 minutos a 37 °C em pressão de CO₂ de 5 %. Em seguida, 1,0x10⁵ CMSP, ressuspendidas em R10, foram adicionadas aos poços. Os poços também contiveram cada um dos peptídeos de Vif ou Nef, Concanavalina-A (controle positivo) ou somente 2,0 µL de DMSO (100%) sem nenhum peptídeo (controle negativo). As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C em 5 % de pressão de CO₂ e, após este período, as células foram descartadas. Após lavagem das placas cinco vezes com PBST(1x) (PBS(1x) contendo 0,05 % de *Tween 20*), 0,05µg de anticorpo monoclonal anti-IFN-γ biotilado (*Mabtech*) foram adicionados e as placas foram incubadas por mais 2 horas em temperatura ambiente. Seguindo cinco outras lavagens adicionais com PBST(1x), 0,07 µg de fosfatase alcalina (*Vector Laboratories Inc.*, Burlingane, CA, EUA), em 50 µL de PBS(1x) foram adicionados em cada poço e mantidos por 1 hora em temperatura ambiente. Após outras cinco lavagens com PBST(1x), 50 µL do substrato BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium*) (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EUA) foram adicionados e as placas foram mantidas em temperatura ambiente até ser visível a identificação clara de pontos nos poços. Os pontos foram contados empregando-se estereomicroscópio automatizado (KS ELISPOT, Zeiss, Oberkochem, Alemanha) ou o equipamento AID reader (AID, Oberkochem, Alemanha). As respostas imunes celulares específicas às proteínas do HIV-1 testadas foram registradas tendo como unidade o número de unidades formadoras de pontos (UFP/1,0x10⁶ células), após subtração do valor de pontos registrado no poço do controle negativo. Uma resposta imune celular contra um determinado peptídeo foi

considerada positiva quando o número de UFP excedeu $55 \text{ UFP}/1,0 \times 10^6$ células e foi pelo menos quatro vezes maior do que o número de $\text{UFP}/1,0 \times 10^6$ células no poço do controle negativo (Coplan *et al.*, 2005) (Figura 1).

Tabela 1 - Número de peptídeos testados para cada paciente nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ

PACIENTE	EPITOPOS RESTRITOS A MOLÉCULAS DE HLA-I			PEPTÍDEOS 15-MEROS DO CONSENSO B
	TOTAL	Seqüências autólogas	Seqüência do consenso B	
1022	70 (Vif: 35; Nef: 35)	34 (Vif: 16; Nef: 18)	36 (Vif: 19; Nef: 17)	95 (Vif: 46; Nef: 49)
1068	84 (Vif: 38; Nef: 46)	35 (Vif: 16; Nef: 19)	49 (Vif: 22; Nef: 27)	95 (Vif: 46; Nef: 49)
1073	100 (Vif: 51; Nef: 49)	51 (Vif: 28; Nef: 23)	49 (Vif: 23; Nef: 26)	95 (Vif: 46; Nef: 49)
1098	94 (Vif: 53; Nef: 41)	42 (Vif: 27; Nef: 15)	52 (Vif: 26; Nef: 26)	95 (Vif: 46; Nef: 49)
1103	100 (Vif: 47; Nef: 53)	44 (Vif: 23; Nef: 21)	56 (Vif: 24; Nef: 32)	95 (Vif: 46; Nef: 49)
2017	110 (Vif: 57; Nef: 53)	50 (Vif: 26; Nef: 24)	60 (Vif: 31; Nef: 29)	95 (Vif: 46; Nef: 49)

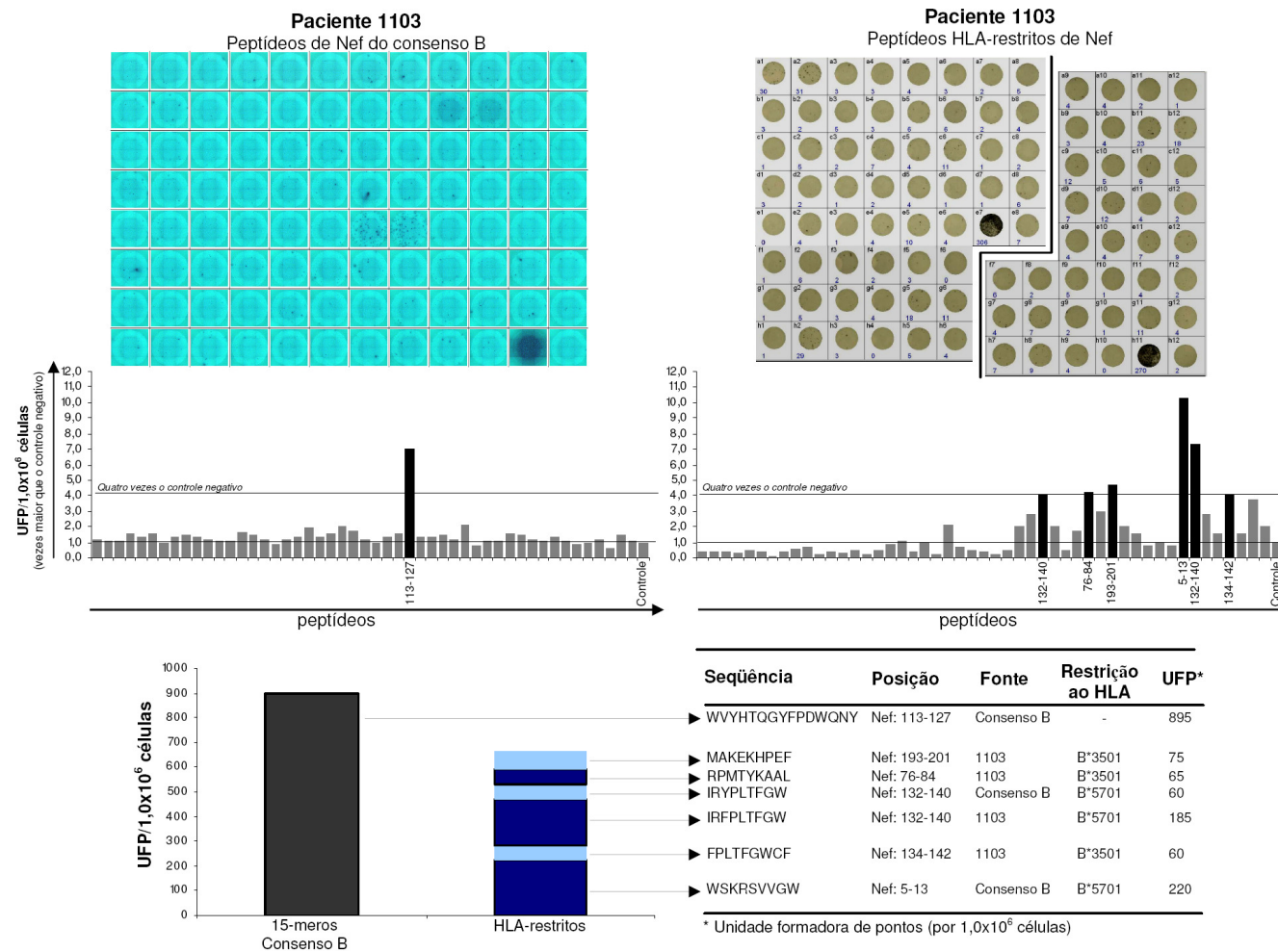


Figura 1. Comparação dos resultados obtidos com os experimentos de ELISPOT-IFN- γ com os peptídeos 15-meros e os HLA-restritos, para um paciente (Legenda na página oposta).

Figura 1. Comparação dos resultados obtidos com os experimentos de ELISPOT-IFN- γ com os peptídeos 15-meros e os HLA-restritos, para um paciente. A figura mostra duas placas de ELISPOT nas quais foram testados 46 peptídeos 15-meros sobrepostos por 11 aa que recobrem toda a extensão da seqüência do consenso B da proteína Nef (placa acima, à esquerda) e peptídeos preditos para se ligar nas moléculas de HLA de classe I do paciente 1103 a partir das seqüências do consenso B do HIV-1 e autóloga (placa acima, à direita). Abaixo das placas, os gráficos com os valores de UFP/ $1,0 \times 10^6$ células que cada peptídeo testado foi capaz de gerar nos ensaios. Na parte inferior da figura, à esquerda, gráficos de barras sobrepostas onde cada pedaço da barra corresponde a um peptídeo positivo nos ensaios e sua altura, assim como a altura total da barra, corresponde ao valor de UFP/ $1,0 \times 10^6$ células. Na parte inferior da figura, à direita, as seqüências dos peptídeos positivos representados no gráfico de barras ao lado.

4. RESULTADOS

No presente estudo, foram investigadas respostas imunes celulares em seis indivíduos infectados pelo HIV-1 controladores da replicação viral. Todos os pacientes possuíam infecção documentada por pelo menos três anos, com duração média, entre os seis, de quatro anos. Foram realizados ensaios de ELISPOT-IFN- γ com peptídeos 15-meros sobrepostos por 11 aa, recobrando por completo as seqüências de Vif e Nef do consenso B de HIV-1. Também foram utilizados peptídeos restritos a moléculas de HLA de classe I preditos a partir da mesma seqüência do consenso B e também a partir de seqüências autólogas dos vírus destes seis pacientes estudados.

4.1 Contagens de células T CD4+ e quantificação da carga plasmática de HIV-1

Os seis pacientes relataram ser homossexuais e provavelmente foram infectados por coito desprotegido. Todos foram acompanhados clinicamente desde o diagnóstico da infecção na fase precoce. Os níveis de RNA viral no plasma e as contagens de células T CD4+ periféricas foram determinados aproximadamente a cada três meses, por pelo menos 1 200 dias. A maioria das quantificações de carga viral plasmática esteve abaixo de 1 000 cópias/mL para todos os pacientes e a média das contagens de células T CD4+ em sangue periférico foi de 642 células/mm³, variando de 353 a 1 097 células/mm³ (Tabela 2). Somente dois indivíduos (1068 e 1022) tiveram cargas virais ocasionais acima de 2 000 cópias/mL durante seu

acompanhamento clínico. O paciente 1098 teve cargas virais esporádicas acima de 1 000 e 2 000 cópias/mL. Os pacientes 1073, 1103 e 2017 apresentaram valores de RNA viral no plasma sempre abaixo dos limites de detecção dos testes empregados, 400 cópias/mL e 50 cópias/mL para os testes da *Roche* e da *Versant*, respectivamente (Figura 2). Nenhum paciente é homozigoto para o polimorfismo *CCR5Δ32*, relacionado com proteção à infecção e progressão da doença (Liu R. *et al.*, 1996) e somente o paciente 1068 foi heterozigoto para o alelo *CCR5Δ32*. Também foi investigada a presença de infecção ativa por GBV-C, associada a benefício para o curso da infecção pelo HIV-1 (Rodriguez *et al.*, 2003; Tillmann *et al.*, 2001), e nenhum dos seis pacientes apresentou resultado positivo para amplificação do RNA de GBV-C.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes estudados

PACIENTE	ALELOS DE HLA-I		CARGA VIRAL MAIS ALTA (cópias/mL)	VARIACÃO DAS CONTAGENS DE CÉLULAS T CD4+ (células/mm ³)	ACOMPANHAMENTO CLÍNICO (dias)
	<i>Locus</i> A	<i>Locus</i> B			
1022	02 02	14 52	2 090	384-819	2 063
1068	03 29	70 58	7 260	721-1 035	1 546
1073	01 34	35 57	< 400	433-762	1 498
1098	03 26	27 57	807	654-882	1 169
1103	01 02	35 57	< 400	601-909	1 162
2017	02 11	39 53	< 400	518-1030	1 904

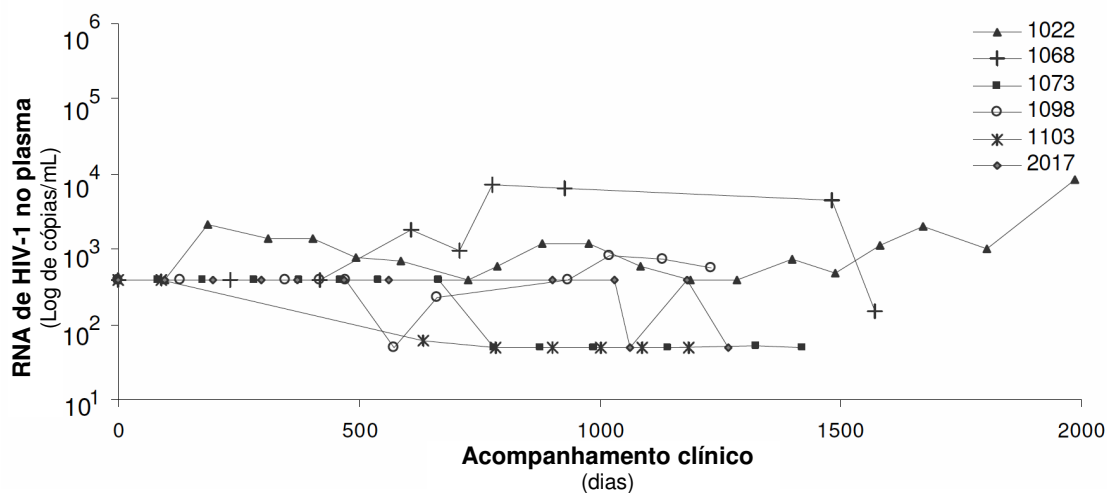


Figura 2. Carga viral plasmática de HIV-1 nos pacientes estudados, durante seu acompanhamento clínico. Quantificações de carga viral plasmática de HIV-1, nos seis pacientes investigados, foram realizadas pelos ensaios de RT-PCR ou bDNA, como descritos. Os gráficos mostram os valores em cópias/mL em escala logarítmica.

4.2 Superrepresentação de *HLA-B*57* nos indivíduos controladores da replicação viral

Cento e sessenta e um indivíduos que participam da coorte de infecção recente pelo HIV-1 tiveram seus alelos de HLA de classe I tipados. Entre os seis controladores, incluídos nesta coorte, três (50 %) são portadores do alelo *HLA-B*57* (Tabela 2, Figura 3), que tem sido associado à menor replicação do HIV-1 em outras coortes de pacientes controladores (Bailey *et al.*, 2006; Migueles *et al.*, 2000). Em contraste, a frequência geral de indivíduos portadores deste alelo em todos os 161 indivíduos da coorte tipados foi de 9,9 % (16 indivíduos).

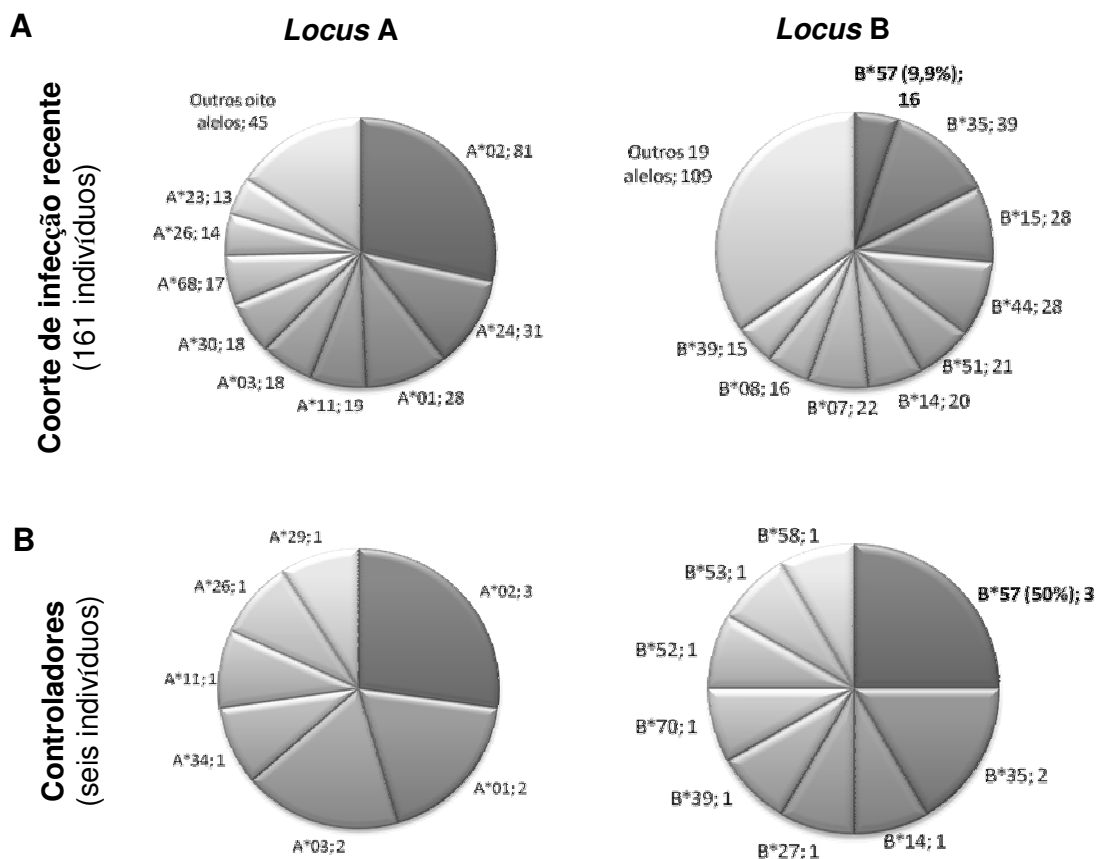


Figura 3. Freqüência de indivíduos HIV-1 positivos portadores dos diversos alelos de HLA de classe I dos *loci* A e B. Distribuição da positividade de alelos de HLA de classe I dos *loci* A e B em 161 pacientes da coorte de infecção recente pelo HIV-1 da Universidade Federal de São Paulo (**A**) e nos seis pacientes controladores, da mesma coorte, estudados aqui (**B**). A freqüência de indivíduos portadores do alelo *B*57* é destacada por estar superrepresentada no grupo de controladores.

4.3 Caracterização do genoma e da diversidade genética do HIV-1

A análise filogenética das seqüências nucleotídicas de *vif* e *nef* mostrou que todos os seis pacientes controladores foram infectados com vírus do subtipo B. As seqüências de *vif* e *nef* dos vírus isolados dos seis pacientes controladores segregaram-se randomicamente entre seqüências de referência do subtipo B e outras seqüências de pacientes não controladores sem aparente agrupamento em clados específicos (Figura 4).

Os vírus infectivos de todos os pacientes controladores apresentaram uma organização genômica intacta com matrizes abertas de leitura transcricional. Nenhuma inserção ou deleção grosseira foi observada tanto em *vif*, quanto em *nef*. Entre os seis controladores, as seqüências autólogas de Vif e Nef de HIV-1 diferiram da seqüência do consenso B do HIV-1 por um valor médio de 15,1 % e 13,6 %, respectivamente. As médias das distâncias entre as seqüências autólogas e a seqüência do consenso B dentro dos epitopos positivos de Vif e Nef, relatados adiante, foram de 19,4 % (variação: 9,7 % - 28,3 %) e 18,1% (variação: 10,8 % - 25,4 %), respectivamente.

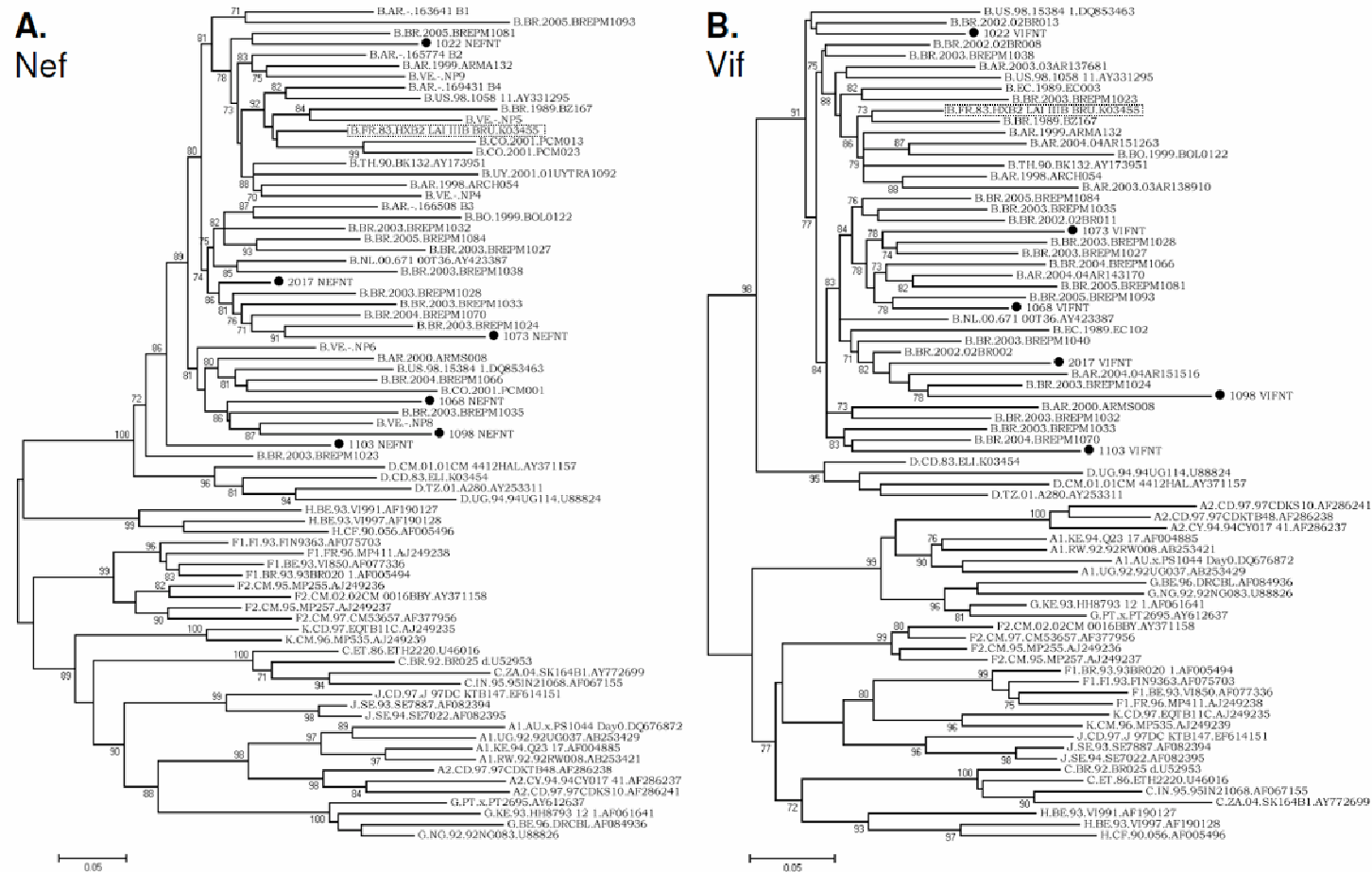


Figura 4. Árvores filogenéticas baseadas em seqüências de *vif* e *nef* de HIV-1 dos seis pacientes estudados aqui e outras seqüências de referência (Legenda na página oposta).

Figura 4. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança. Árvores construídas a partir de seqüências de *nef* (A) e *vif* (B) a partir dos vírus isolados dos seis pacientes controladores estudados aqui (círculos sólidos pretos) e de seqüências de referência, para as mesmas proteínas, de todos os subtipos conhecidos de HIV-1 obtidas a partir do banco de dados de LANL (ramos nomeados) são mostradas. As seqüências de *nef* e *vif* do isolado HXB2_LAI_IIIB_BRU (K03455) HXB2 são mostradas em caixas pontilhadas. As árvores estão enraizadas em pontos médios. Os valores de aLRT ≥ 70 % estão indicados nos nós das árvores. O agrupamento das seqüências referentes aos vírus dos seis pacientes controladores com outras seqüências do subtipo B do HIV-1 é evidente nas árvores de *nef* e *vif* (aLRT ≥ 85 %)

4.4 Predição de epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I

Células T CD8+ preferencialmente reconhecem peptídeos de oito a 11 aa de comprimento ligados a moléculas de MHC de classe I. Respostas mediadas por células T CD8+ contra peptídeos 15-meros baseados em seqüências consensuais do HIV-1 podem, desta forma, não ser capazes de capturar completamente a complexidade do reconhecimento antigênico mediado por células T *in vivo*. Para abordar este ponto, as seqüências protéicas completas de Vif e Nef dos vírus autólogos foram rastreadas a procura de epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I. As seqüências de Vif e Nef do consenso B de HIV-1 foram, da mesma forma, rastreadas. Foram identificados 558 peptídeos de nove ou 10 aa de comprimento, restritos a moléculas de HLA de classe I dos seis controladores (70 a 110 peptídeos por paciente) (Tabela 1). Depois de sintetizados, estes 558 peptídeos foram utilizados individualmente em ensaios de ELISPOT-IFN- γ .

4.5 Respostas imunes celulares detectadas contra peptídeos 15-meros da seqüência do consenso B de HIV-1

Células mononucleares do sangue periférico de cinco dos seis pacientes controladores reconheceram epitopos em Nef e dois deles reconheceram epitopos em Vif, por meio dos ensaios de ELISPOT-IFN- γ com peptídeos 15-meros da seqüência do consenso B de HIV-1. Dos 49 peptídeos 15-meros que cobrem seqüência de Nef (205 aa de comprimento), cinco foram reativos. Quatro peptídeos 15-meros dos 46 que correspondem à seqüência inteira de Vif (191 aa de comprimento) induziram produção

significativa de IFN- γ nos ensaios de ELISPOT (Tabela 3, Figura 5). A região compreendida entre os aminoácidos 61 e 95 da seqüência do consenso B de Nef conteve mais epitopos de células T do que qualquer outra região nesta proteína; seis das oito respostas positivas detectadas estiveram localizadas nesta região. Contudo, concentração topográfica similar de epitopos positivos não foi observada em Vif (Tabela 3, Figura 5).

Tabela 3 - Peptídeos que estimularam respostas positivas detectados nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ

PACIENTE	PEPTÍDEOS 15-MEROS DO CONSENSO B						PEPTÍDEOS HLA-RESTRITOS DAS SEQÜÊNCIAS AUTÓLOGAS E DA SEQÜÊNCIA DO CONSENSO B										
	Nef			Vif			Nef					Vif					
	Seqüência	Posição	UFP*	Seqüência	Posição	UFP*	Seqüência	Posição	Fonte**	Restrição ao HLA	UFP*	Seqüência	Posição	Fonte**	Restrição ao HLA	UFP*	
1022	RPMTYKAAVDLSHFL	Nef: 77-91	850	nenhuma resposta			AALDLSHFL	Nef: 87-95	1022		A*0201	515	DRWNKPQK1	Vif: 172-180	Consensus	B*1402	185
	YKAAVDLSHFLKEKG	Nef: 81-95	860														
	QVPLRPMTYKAAVDL	Nef: 73-87	705	VKHHMYISGKAKGWF	Vif: 25-39	1360	WSKRSVVGW	Nef: 5-13	Consenso B		B*5801	1560	RIRTWKSLVK	Vif: 17-26	Consenso B	A*0301	1645
	RPMTYKAAVDLSHFL	Nef: 77-91	1450	MYISGKAKGWFYRHH	Vif: 29-43	925	AANNADCAW	Nef: 49-57	Consenso B		B*5801	1175	ISGKAKGWFY	Vif: 31-40	Consenso B	A*2902	1695
1068	YKAAVDLSHFLKEKG	Nef: 81-95	290				RYPLTFGWCF	Nef: 134-143	Consenso B		A*2902	760	HLGGVSI EW	Vif: 80-89	Consenso B	B*5801	550
							QVPLRPMTYK	Nef: 73-82	Consenso B/1068		A*0301	965	LALAALITPK	Vif: 148-157	Consenso B	A*0301	410
							KAAVDLSHF	Nef: 82-90	Consenso B/1068		B*5801	780	ALAALITPKK	Vif: 149-158	Consenso B	A*0301	300
							KLKRIGDGW	Nef: 4-13	1068		B*5801	1665	KSLVKHHMYI	Vif: 22-31	Consenso B/1068	B*5801	390
							LSKRIGDGW	Nef: 5-13	1068		B*5801	1710	RIKRWKSLVK	Vif: 17-26	1068	A*0301	1535
							TAATNADCAW	Nef: 48-57	1068		B*5801	2320	KGWVYKHHY	Vif: 36-44	1068	B*5801	1330
							AATNADCAW	Nef: 49-57	1068		B*5801	1770					
1073	no response			nenhuma resposta			nenhuma resposta					nenhuma resposta					
	WVYHTQGYFPDWQNY	Nef: 113-127	525	nenhuma resposta			WSKRSVVGW	Nef: 5-13	Consenso B		B*5701	120	nenhuma resposta				
1098							KRSVVGWPTV	Nef: 7-16	Consenso B		B*2705	80					
							AATNPDCAW	Nef: 48-56	1098		B*5701	80					
							MTYTAALDL	Nef: 80-88	1098		B*5701	100					
1103	WVYHTQGYFPDWQNY	Nef: 113-127	895	nenhuma resposta			WSKRSVVGW	Nef: 5-13	Consenso B		B*5701	220	DARLVITYYW	Vif: 61-70	Consenso B	B*5701	460
							IRYPLTFGW	Nef: 132-140	Consenso B		B*5701	60	ENRWQVMIVW	Vif: 2-11	Consenso B/1103	B*5701	125
							RPMTYKAAL	Nef: 76-84	1103		B*3501	65	HLGGVSI EW	Vif: 80-89	Consenso B/1103	B*5701	335
							IRFPLTFGW	Nef: 132-140	1103		B*5701	185	VAKLTEDRW	Vif: 166-174	1103	B*5701	225
							FPLTFGWCF	Nef: 134-142	1103		B*3501	60					
							MAKEKHPEF	Nef: 193-201	1103		B*3501	75					
2017	QEEEEVGFPVRPQVP			Nef: 61-75	205	VSPRCEYQAGHNKVG	Vif: 129-143	120	nenhuma resposta					nenhuma resposta			
							CEYQAGHNKVGSLQY	Vif: 133-147	200								

* por 10⁶ células

** As colunas "Fonte" indicam se os peptídeos HLA-restritos foram preditos a partir da seqüência do consenso B ou a partir de seqüências autólogas. Em alguns casos, a seqüência do consenso B e a seqüência são idênticas e então a fonte do peptídeo está indicada como "Consenso B/[Paciente]".

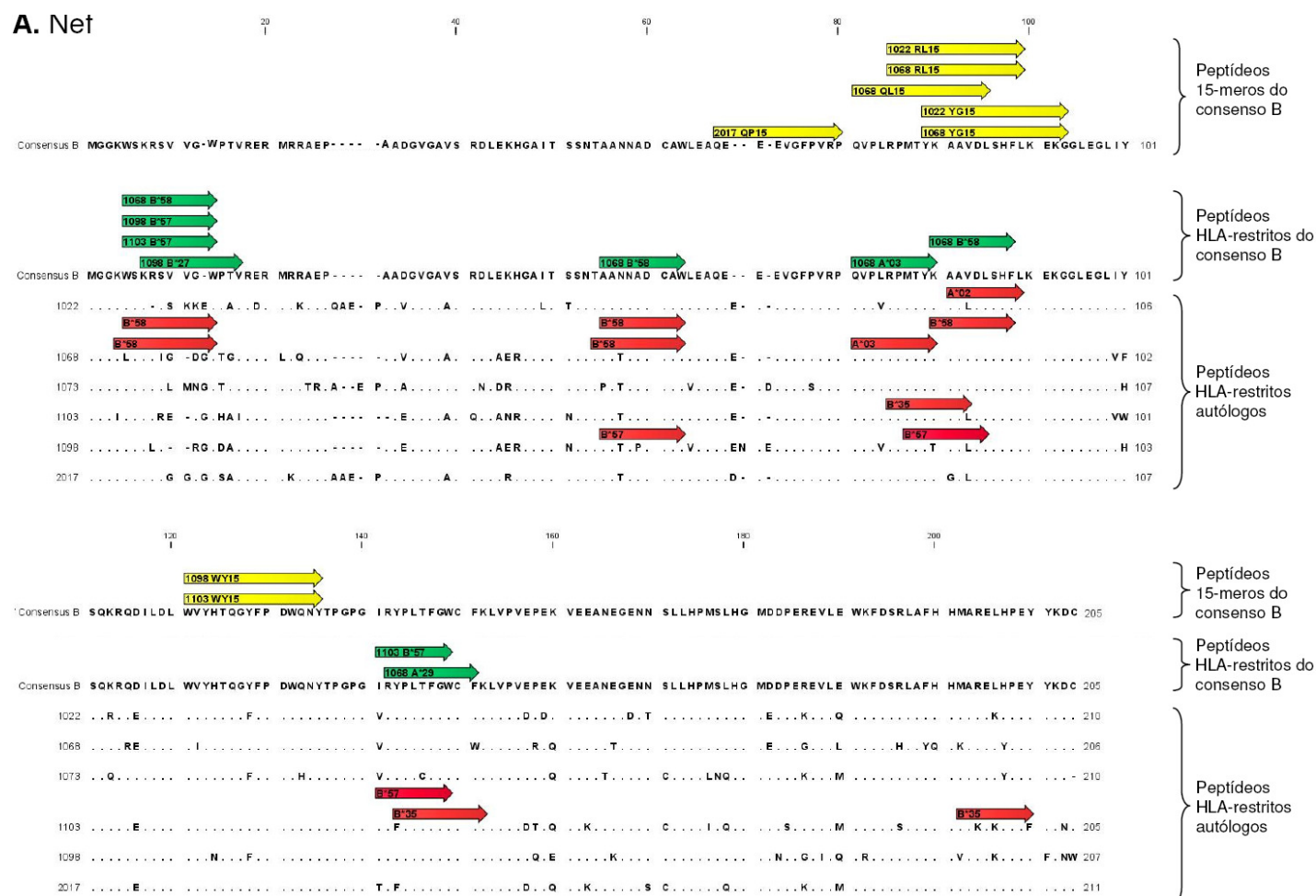


Figura 5. Alinhamentos das seqüências genéticas virais e mapas das respostas imunes celulares detectadas **(A)**

(Legenda na página oposta à página 31).

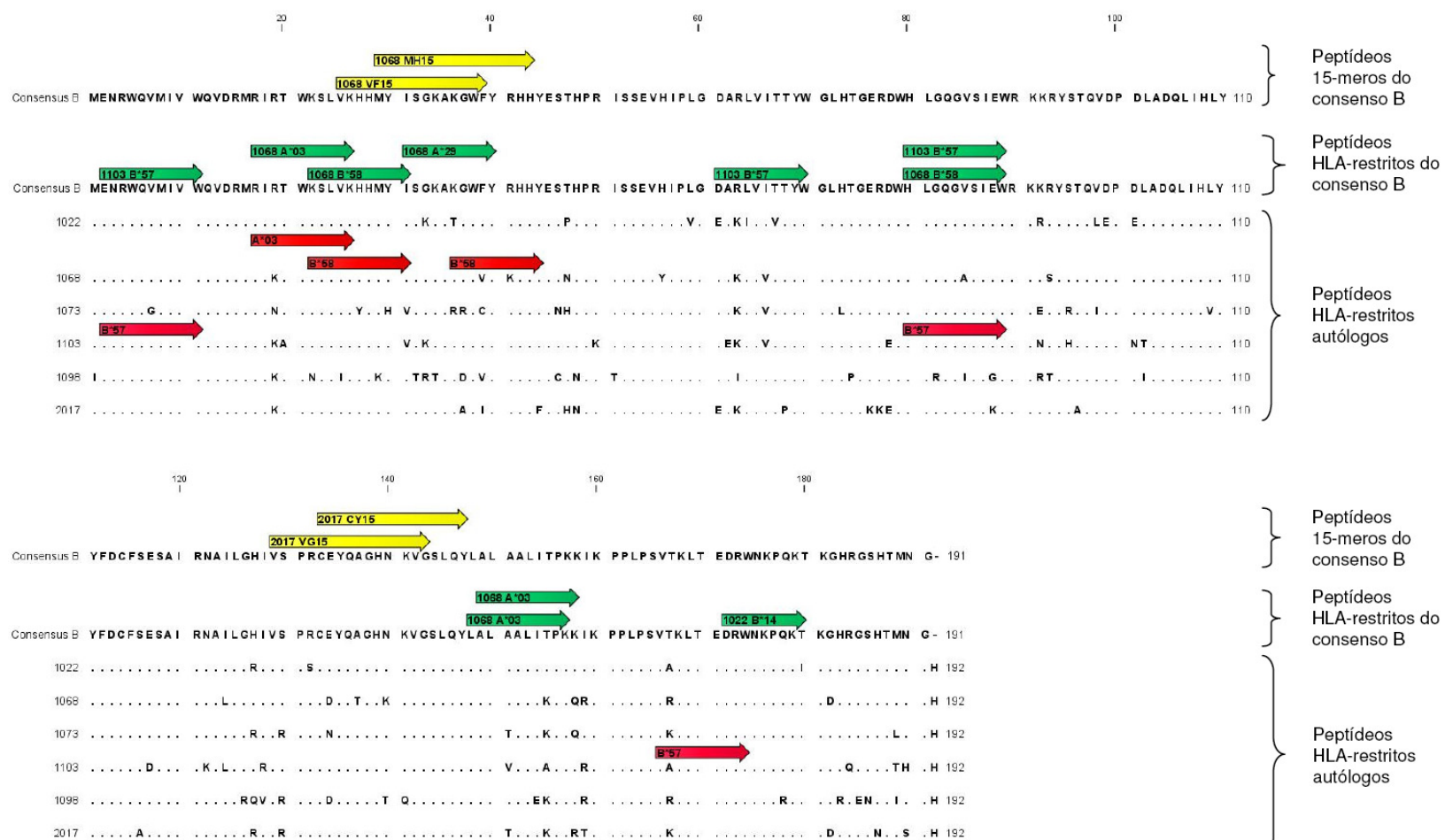


Figura 5. Alinhamentos das seqüências genéticas virais e mapas das respostas imunes celulares detectadas (B) (Legenda na página oposta).

Figura 5. Alinhamentos das seqüências genéticas virais e mapas das respostas imunes celulares detectadas. As seqüências dos vírus isoladas a partir dos seis controladores foram alinhadas à seqüência do consenso B do HIV-1. As setas representam os peptídeos que estimularam respostas positivas de produção de IFN- γ . **(A)** Na primeira seqüência, de Nef do consenso B do HIV-1, está o mapa das respostas imunes contra os peptídeos 15-meros sobrepostos por 11aa. As seqüências abaixo suportam os mapas das respostas imunes detectadas contra epitopos HLA-restritos, de nove ou 10 aa de comprimento, preditos a partir das seqüências do consenso B ou autólogas, para cada um dos seis pacientes controladores estudados. **(B)** Seqüências de Vif (ver a legenda da Figura 5A para a explicação).

4.6 Epitopos restritos a moléculas de HLA de classe I revelaram maior amplitude de resposta imune celular do que os peptídeos 15-meros do consenso B de HIV-1.

Células T de três pacientes controladores reconheceram epitopos adicionais quando os ensaios de ELISPOT-IFN- γ foram realizados com os peptídeos HLA-restritos, em comparação com os ensaios realizados utilizando-se os peptídeos 15-meros do consenso B do HIV-1. Para os epitopos de Nef restritos a moléculas de HLA de classe I, 22 respostas positivas foram detectadas (Tabela 3, Figura 5A). Para os epitopos restritos a HLA de classe I em Vif, houve 16 respostas positivas para produção de IFN- γ (Tabela 3, Figura 5B). Para as duas proteínas investigadas, foram encontradas respostas positivas restritas a oito moléculas de HLA de classe I. A maioria destas respostas foi restrita a alelos do *locus* B (74 %) e foi direcionada contra epitopos em Nef (63 %).

Assim como nos ensaios que empregaram peptídeos 15-meros do consenso B recobrando Nef, células T preferencialmente reconheceram epitopos HLA-restritos na região entre os aminoácidos 61 e 95 desta proteína. Nesta região, estiveram presente sete das 22 respostas encontradas. Ainda, foi observada uma concentração adicional de respostas de células T contra peptídeos HLA-restritos na região dos 20 primeiros aminoácidos de Nef (Figura 5A). Seis respostas positivas foram detectadas nesta região. Em contraste, análise das respostas HLA-restritas contra Vif não revelou qualquer região com tal enriquecimento de epitopos reconhecidos (Figura 5B).

Foram identificadas três regiões (duas em Nef e uma em Vif), onde peptídeos 15-meros (Figura 5, setas amarelas) geraram respostas positivas não vistas após estímulo com peptídeos HLA-restritos (Figura 5, setas verdes e vermelhas). De forma específica, o peptídeo Nef WY15 foi reconhecido pelos pacientes 1103 e 1098; Nef QP15 foi reconhecido pelo paciente 2017; e Vif VG15 e Vif CY15 foram reconhecidos pelo paciente 2017. Nenhum peptídeo com nove ou 10 aminoácidos foi predito nestas exatas regiões pelas ferramentas de bioinformática empregadas a partir das seqüências autólogas ou do consenso B e dos respectivos alelos de HLA dos *loci* A e B. Este pequeno número de epitopos, entretanto, cuja resposta foi exclusiva para os peptídeos 15-meros não prejudicou a habilidade geral de detecção de um maior número de respostas imunes celulares usando a abordagem de predição de epitopos baseada em alelos de HLA de classe I.

Mais respostas celulares foram detectadas contra Vif e Nef quando foram utilizados epitopos HLA-restritos do que quando foi empregada a metodologia convencional testando peptídeos 15-meros do consenso B (Figura 6A e 6B, respectivamente). De fato, dois aspectos do reconhecimento mediado por células T foram maiores pelo emprego de tal abordagem mais específica: o número de epitopos capazes de gerar respostas positivas e o número total de UFP detectadas nos ensaios de ELISPOT-IFN- γ (Figuras 6C e 6D, respectivamente), ou seja, a amplitude e a magnitude da resposta imune.

Também foi comparada a habilidade das CMSP dos seis pacientes controladores de reconhecer peptídeos 15-meros do consenso B, peptídeos

HLA-restritos preditos a partir da seqüência do consenso B e peptídeos HLA-restritos preditos a partir das respectivas seqüências autólogas geradas. A reatividade foi maior (em termos de freqüência e de número de epitopos reconhecidos) simplesmente pelo emprego dos peptídeos HLA-restritos, tendo sido eles preditos a partir da seqüência consensual do subtipo B do HIV-1 ou a partir das seqüências dos vírus autólogos.

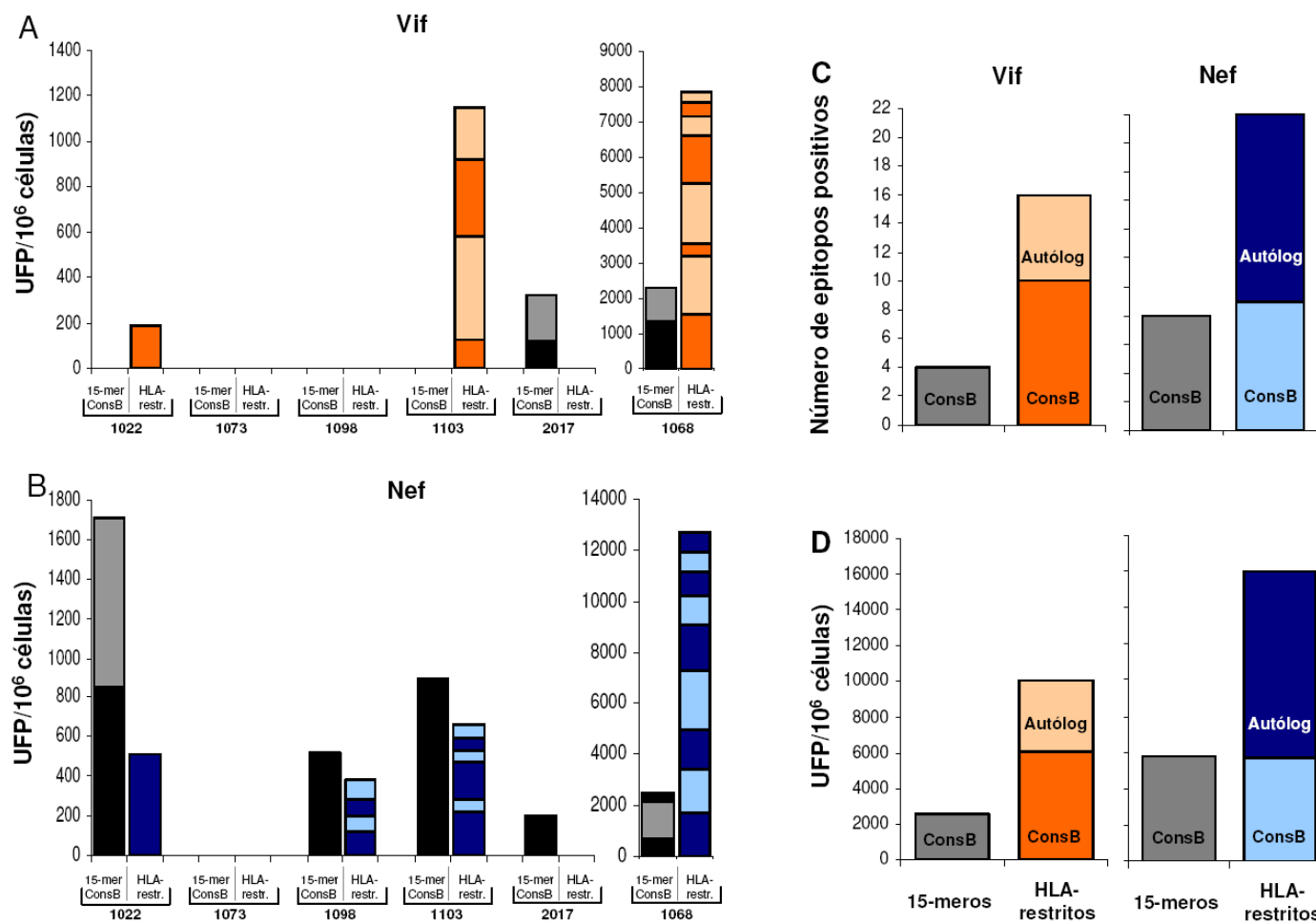


Figura 6. Respostas imunes celulares contra peptídeos de Vif e Nef detectadas com peptídeos 15-meros e HLA-restritos (Legenda na página oposta).

Figura 6. Respostas imunes celulares contra peptídeos de Vif e Nef detectadas com peptídeos 15-meros e HLA-restritos. As barras sobrepostas mostram o número de UFP/ $1,0 \times 10^6$ células identificados nos ensaios de ELISPOT para cada um dos seis pacientes controladores para os peptídeos de Nef (**A**) e de Vif (**B**). Cada porção da barra indica um peptídeo e sua altura representa o valor de UFP/ $1,0 \times 10^6$ células, conforme o eixo x do gráfico. A barra da esquerda, para cada paciente, mostra as respostas positivas detectadas com os peptídeos 15-meros do consenso B (15-mer/ConsB) e a barra da direita, para cada paciente, mostra as respostas positivas detectadas com os peptídeos HLA-restritos (HLA-restr.). Reatividade das CMSP nos ensaios de ELISPOT contra os peptídeos 15-meros e HLA-restritos preditos a partir da seqüência do consenso B e a partir das seqüências autólogas em termos de número de epitopos reconhecidos (**C**) e em termos da magnitude da resposta, mensurada como UFP/ $1,0 \times 10^6$ células (**D**).

De fato, tanto quando foi utilizada a seqüência do consenso B do HIV-1, quanto quando foram utilizadas as seqüências autólogas para predição dos epitopos HLA-restritos de nove ou 10 aa, foi identificado um maior número de respostas positivas. O número de respostas positivas aumentou de quatro para 16 em Vif e de oito para 22 em Nef. Para Vif, três dos seis pacientes controladores tiveram aumento de resposta detectável contra os peptídeos HLA-restritos, enquanto dois pacientes permaneceram sem respostas detectáveis (Figura 5A). Para Nef, três dos seis controladores tiveram mais respostas positivas contra os peptídeos HLA-restritos e um paciente manteve-se sem respostas detectáveis (Figura 5B). De forma interessante, a predição de epitopos HLA-restritos baseada na seqüência do consenso B mostrou-se mais sensível para Vif, enquanto a predição de epitopos HLA-restritos baseada nas seqüências autólogas dos vírus dos seis pacientes mostrou-se mais sensível para Nef (Tabela 3, Figuras 6C e 6D).

5. DISCUSSÃO

Controladores da replicação do HIV-1 representam cerca de 1% dos indivíduos infectados pelo vírus (Deeks e Walker, 2007). Os seis pacientes controladores estudados aqui têm sido monitorados por pelo menos três anos desde a identificação do estágio precoce da infecção pelo HIV-1. De forma geral, eles apresentaram contagens de células T CD4+ (valor médio durante todo o acompanhamento clínico de 642 células/mm³) e valores de carga viral plasmática (<2 000 cópias/mL) similares aos dados previamente relatados em outras coortes de pacientes também controladores (Deeks e Walker, 2007; Lambotte *et al.*, 2005; Pereyra *et al.*, 2008). Neste estudo, foi demonstrado que a investigação de respostas de células T em indivíduos que espontaneamente controlam a replicação viral a partir do uso de peptídeos 15-meros do consenso pode ser menos sensível quando comparada com a investigação de tais respostas imunes empregando-se epitopos HLA-restritos. De fato, por meio dos peptídeos HLA-restritos, foi revelada maior amplitude de respostas imunes celulares contra epitopos de Vif e Nef nestes seis indivíduos estudados.

Uma vez que a carga viral relaciona-se com a transmissão e progressão para a doença (Garcia *et al.*, 1999; Wawer *et al.*, 2005), a compreensão mais detalhada dos mecanismos pelos quais alguns indivíduos infectados espontaneamente controlam a replicação do HIV-1 pode auxiliar no desenvolvimento de vacinas capazes de aumentar o

controle da infecção, reduzir o risco de transmissão e desacelerar a progressão para doença (Maciel *et al.*, 2008; Pereyra *et al.*, 2008; Walker, 2007). É, desta forma, crucial definir claramente as respostas imunes celulares protetoras em coortes de sujeitos infectados pelo HIV-1 que controlam com sucesso a replicação viral e, então, buscar formas de gerar respostas similares por meio de vacinação.

Alguns alelos de HLA de classe I podem influenciar aspectos do desenvolvimento da infecção pelo HIV-1, incluindo o controle da viremia (Deeks e Walker, 2007; Kiepiela *et al.*, 2004; Lambotte *et al.*, 2005; Migueles *et al.*, 2000). Frequência aumentada do alelo *HLA-B*57* (aproximadamente 85 %) foi descrita em controladores do HIV-1 em diversos estudos (Migueles *et al.*, 2000; Emu *et al.*, 2008; Lambotte *et al.*, 2005). Não inesperadamente, o mesmo enriquecimento da frequência de portadores deste alelo, nos seis pacientes controladores estudados aqui, foi também encontrado. Três dos seis foram positivos para *HLA-B*57*. Na coorte inteira de infecção recente pelo HIV-1, a frequência de indivíduos portadores deste alelo foi 9,9 % (16 de 161 pacientes). Apesar da forte associação com o controle viral, ainda não é claro se o *HLA-B*57* medeia seus efeitos inteiramente via respostas de células T CD8+ específicas ao HIV-1 ou por outros mecanismos. Tem sido demonstrado que, apesar de portadores deste alelo geralmente apresentarem potentes respostas de células T contra um ou mais epitopos virais altamente conservados, o escape do vírus a estas respostas não está plenamente associado com retomada da capacidade replicativa viral (Bailey *et al.*, 2006). Ainda, é bem

conhecido que alguns indivíduos controlam a replicação do vírus mesmo sem ser portadores de alelos “protetores” de HLA (Emu *et al.*, 2008).

Vif, um gene auxiliar dos vírus de imunodeficiência de primatas, é necessário para a replicação do HIV-1 em linfócitos e macrófagos (Chowdhury *et al.*, 1996; Gabuzda *et al.*, 1992; Zimmerman *et al.*, 2002) e é mantido intacto, *in vivo*, em pessoas infectadas (Sova *et al.*, 1995). Foi recentemente demonstrado que Vif antagoniza os fatores antivirais do hospedeiro APOBEC3G e APOBEC3F, ligando-se a eles e promovendo sua degradação. Hassaïne *et al.* (2000) demonstraram que uma assinatura protéica precisa em Vif, a mutação Ser132Arg, correlaciona-se com uma redução de cinco vezes na capacidade replicativa viral em progressores lentos da infecção pelo HIV-1. Aqui, o seqüenciamento do gene *vif* mostrou que somente o paciente 1022 apresentou vírus portador desta mutação (Figura 5B). Em contraste, o resíduo extremamente conservado ¹⁴⁴SLAQXLA¹⁴⁹, conhecido por ser um dos sítios de ligação a APOBEC (Liu B. *et al.*, 2004), esteve intacto nos seis controladores descritos aqui.

A importância de Nef na patogenicidade do HIV-1 foi investigada após transmissão do vírus a partir de um doador de sangue HIV-1-positivo para seis receptores. As contagens de células T CD4+ destes seis indivíduos estiveram estáveis e normais por 10 a 14 anos após a transfusão. Seqüenciamento de seus vírus apresentou seqüências portando deleções similares em *nef*. No presente estudo, não foi encontrado nenhum marcador genético em *nef* que pudesse demonstrar a transmissão de uma cepa viral atenuada aos seis pacientes controladores. Análise filogenética das

seqüências de *nef* e *vif* (Figuras 4A e 4B, respectivamente) revelou que os genes virais seqüenciados a partir dos seis indivíduos controladores distribuíram entre os genes de vírus de outros indivíduos recentemente infectados pelo HIV-1, porém não controladores da replicação viral, sem aparente agrupamento em clados específicos. Estas observações estão de acordo com comparações realizadas ao nível de bases nucleotídicas únicas de todos os genes codificantes do HIV-1 entre 95 controladores de elite e pessoas com infecção progressiva. No referido estudo, a habilidade do controle espontâneo da replicação do HIV-1 não foi atribuída a nenhum polimorfismo genético específico ou defeitos genéticos grosseiros no genoma viral (Miura *et al.*, 2008).

Estudos da história natural da infecção por vírus de imunodeficiência de primatas em coortes de humanos infectados pelo HIV-1 e macacos infectados por SIV mostraram que a imunidade mediada por células pode controlar a replicação destes vírus (Deeks e Walker, 2007). Friedrich *et al.* (2007) examinaram macacos resos indianos que apresentaram controle robusto e durável da viremia de SIV_{mac}239 durante a infecção crônica. Após depleção dos linfócitos T CD8⁺ destes animais, eles descobriram que respostas de células T CD8⁺ específicas a Nef e Vif, juntamente com respostas de células T CD4⁺ contra Gag, eram responsáveis pelo controle da replicação do SIV_{mac}239. Enquanto Nef e Gag tenham já sido empregadas no desenvolvimento de vacinas, Vif não foi utilizado como um imunógeno vacinal até o momento. Desta forma, é possível que a geração

de respostas imunes celulares mediadas por células T CD8+ citotóxicas contra Vif possa ser um importante e potente mecanismo de supressão viral.

Para otimizar um método de investigação das respostas de células T CD8+ direcionadas ao HIV-1 por mensuração intracelular de citocinas por citometria de fluxo, Betts *et al.* (2001) compararam respostas a peptídeos 15-meros sobrepostos por 11 aa de Gag de HIV-1 a respostas geradas por epitopos otimizados de oito a 11 aa de comprimento e observaram considerável diferença na reatividade. Eles conjecturaram que os painéis de peptídeos 15-meros sobrepostos podem subestimar a detecção da resposta HIV-1-específica total. Isto poderia ser explicado por vários fatores tais como a localização da seqüência reconhecida dentro do peptídeo 15-mero, os efeitos da sobreposição dos aminoácidos nos peptídeos e potenciais diferenças nas seqüências entre os peptídeos e os vírus autólogos. De fato, entre os pacientes investigados no presente estudo, as seqüências autólogas de *vif* e *nef* de HIV-1 diferiram da seqüência do consenso B do HIV-1 por valores médios de 15,1 % e 13,6 %, respectivamente.

Um estudo prévio avaliou as respostas imunes celulares contra outras proteínas do HIV-1 utilizando seqüências autólogas do vírus. Altfeld *et al.* (2003) demonstraram a maior utilidade do uso de seqüências autólogas para detectar respostas imunes a Tat e Vpr. Eles também sugeriram que as respostas imunes podem ser subestimadas pelo uso de ensaios empregando peptídeos baseadas em seqüências consensuais. Contudo, o mesmo efeito não pode ser detectado para as respostas direcionadas a Gag,

o que poderia refletir menor diversidade estrutural desta proteína, comparada as proteínas acessórias Tat e Vpr.

No presente estudo, algumas regiões em Nef e Vif foram capazes de gerar respostas positivas quando foram empregados peptídeos 15-meros mas não quando foram utilizados peptídeos HLA-restritos (por exemplo, o peptídeo Nef WY15 e o peptídeo Vif VG15, Figura 5). Uma vez que os peptídeos 15-meros são capazes de estimular tanto células T CD4+ quanto células T CD8+ (Betts *et al.*, 2001), é possível que algumas destas respostas específicas exclusivamente detectadas com peptídeos 15-meros tenham sido mediadas por células T CD4+ ou, ainda, sejam mediadas por células T CD8+ mas restritas a moléculas de HLA de classe I do *locus* Cw. Em contraste, os peptídeos preditos para se ligar a moléculas de HLA de classe I de tamanho menor, nove ou 10 aa, são supostamente capazes de estimular somente células T CD8+. Desta forma, poder-se-ia esperar maior detecção de respostas positivas contra os reagentes 15-meros. Contudo, nos seis pacientes investigados neste estudo, os peptídeos HLA-restritos foram capazes de detectar mais respostas positivas do que foram capazes os peptídeos 15-meros, sugerindo que os epitopos HLA-restritos preditos são melhores na investigação de respostas imunes de linfócitos T CD8+ do que os peptídeos 15-meros. A inabilidade das ferramentas de bioinformática empregadas para predizer estes epitopos particulares, detectados somente com os reagentes 15-meros, e mutações virais, incluindo as de escape, também poderiam explicar porque estas respostas somente foram detectadas no primeiro grupo de experimentos de ELISPOT-IFN- γ . Aqui,

não foi investigada a ocorrência de mutações de escape por meio de seqüenciamento genético viral em um segundo momento do acompanhamento clínico dos pacientes estudados.

Em conjunto, os dados apresentados sugerem que respostas imunes celulares contra Vif e Nef e, possivelmente, outras proteínas acessórias de vírus de imunodeficiência de primatas, podem ser mais amplas do que tem sido demonstrado em outros estudos. Os peptídeos preditos para ligação a moléculas de HLA de classe I a partir de seqüências autólogas aumentaram a habilidade de detectar respostas celulares positivas contra peptídeos em Nef mas não em Vif. Mesmo assim, peptídeos HLA-restritos de Vif também se mostraram mais sensíveis nos ensaios realizados, uma vez que a predição de peptídeos baseada na seqüência do consenso B do HIV-1 gerou maior detecção de respostas positivas em dois dos seis pacientes e, em um outro paciente, os peptídeos HLA-restritos baseados nas seqüências autólogas foram mais sensíveis, enquanto dois pacientes permaneceram sem respostas detectáveis. Como conclusão, este estudo sugere que a seleção de peptídeos baseada nos alelos de HLA de classe I do indivíduo cujas respostas imunes serão investigadas, seja a partir de seqüências autólogas ou consensuais, pode ser importante na definição de respostas mediadas por células T CD8+ antígeno-específicas não somente em indivíduos que controlam com sucesso a replicação viral, mas em qualquer indivíduo infectado pelo HIV-1.

6. CONCLUSÕES

O mapeamento das respostas imunes celulares direcionadas contra Vif e Nef de HIV-1 por meio de predição de epitopos HLA-I-restritos mostrou que a resposta imune celular nos indivíduos controladores da replicação do HIV-1 é ampla.

Desta forma, após comparação dos resultados obtidos com o mapeamento por ELISPOT utilizando peptídeos 15-meros baseados na seqüência consenso do subtipo B com os resultados obtidos pelo mapeamento utilizando epitopos HLA-I-restritos, foi possível demonstrar que os mapeamentos convencionais podem subestimar a amplitude de respostas imunes celulares em indivíduos HIV-1-positivos.

O uso dos epitopos HLA-I-restritos preditos a partir de seqüências virais autólogas ou consensuais podem aumentar a sensibilidade dos ensaios de ELISPOT-IFN- γ .

7. ANEXOS

Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAPPEQ)



1

**PARECER CONSUBSTANCIADO – CAPPEQ - HCFMUSP
PROTOCOLO DE PESQUISA CAPPEQ Nº 1391/09**

TÍTULO DA PESQUISA: RESPOSTA VIF-ESPECÍFICA MEDIADA POR CÉLULAS T CD8+ EM INDIVÍDUOS QUE CONTROLAM A REPLICAÇÃO DO HIV

PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: Dr. Esper Georges Kallás

PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Leandro Fagundes Tarosso

INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

ÁREA TEMÁTICA: Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Consiste de projeto de pesquisa multicentrico com finalidade academica e cooperação estrangeira que pretende demonstrar o papel de linfocitos CD8+ T especificos para Vif na replicação de HIV . Esse estudo pode propiciar informações importantes na criação de uma vacina, bem como demais terapias imunologicas. O presente projeto consta ser multicentrico e os autores apresentam a aprovação com recomendação do protocolo pela CONEP.

O centro coordenador é o da UNIFESP, os autores apresentam documento de que o presente projeto é igual ao aprovado pela UNIFESP e pela CONEP.

O Termo de Consentimento possui 3 páginas e sua linguagem é simples e de fácil entendimento.

Diante do exposto a CAPPesq de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto, podendo ser iniciado pois conta a aprovação da CONEP para o 1º Centro – “Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/EPM”.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa
27/01/2010



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/01/2010, **APROVOU** os documentos abaixo referentes ao Protocolo de Pesquisa nº **1391/09**, intitulado: **“Resposta Vif-específica mediada por células T CD8+ em indivíduos que controlam a replicação do HIV”**, apresentado pelo **Departamento de Clínica Médica**.

- Protocolo do Estudo versão de 28/05/2009.
- Manual do Estudo 2009.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra “c”).

Este Projeto, apresentado pelo Primeiro-Centro “Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/EPM” foi aprovado pela CONEP (Parecer nº522/2008 datado de 20/08/2008).

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Esper Georges Kallás**

Pesquisador(a) Executante: **Leandro Fagundes Tarosso**

CAPPesq, 27 de janeiro de 2010 de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 522/2008

04/1/08

Registro CONEP: 14781 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0020.1.174.000-08

Processo nº 25000.060449/2008-13

Projeto de Pesquisa: "Resposta Vif-específica mediada por células T CD8+ em indivíduos que controlam a replicação do HIV – Protocolo AI073230-01A1, Versão em português de 13/07/07 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Versão de 13/07/07

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallas

Instituição: Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (1º Centro)

CEP de origem: UNIFESP/EPM/SP

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) - National Institutes of Health.

Sumário Geral do Protocolo

Para o desenvolvimento de uma vacina contra a AIDS, será importante definir as respostas eficazes mediadas por linfócitos T CD8+ contra alvos vacinais no HIV e no SIV. Estes linfócitos devem ser direcionados contra epítopos que sejam derivados de regiões do genoma viral nas quais as variações genéticas sejam pouco toleradas devido ao custo ao *fitness* viral, e sejam reconhecidos por linfócitos T CD8+ que eficientemente controlam a replicação viral *in vitro* em linfócitos T CD4+ autólogos.

O objetivo geral deste estudo é determinar o papel de respostas de linfócitos T CD4+ e T CD8+ Vif-específicas no controle da replicação viral preservando a resposta imunológica em indivíduos infectados pelo HIV. Esta informação irá provavelmente ser usada no planejamento de uma vacina anti-HIV candidata, baseada em cepas circulantes no país e em respostas imunológicas de pacientes brasileiros.

Os objetivos específicos serão: I) Sequenciar o gene *Vif* autólogo obtido a partir de, pelo menos, 16 indivíduos infectados que controlam a replicação viral e 16 que são incapazes de controlá-la. II) Utilizar os alelos de HLA destes indivíduos para prever os epítopos nas seqüências de *Vif* autólogos reconhecidos por linfócitos T CD8+. III) Investigar se linfócitos T CD8+ destes indivíduos respondem aos peptídeos de tamanhos mínimos e características ótimas por meio dos ensaios de CIC e ELISPOT. IV) Determinar se linfócitos T CD8+ Vif-específicos controlam a replicação viral através do novo Ensaio de Supressão Viral (ESV).

Os indivíduos serão identificados na Clínica de Atendimento de Doenças Infecciosas de Universidade Federal de São Paulo. Serão recrutados 32 indivíduos infectados pelo HIV-1 que preencham os critérios de inclusão de carga viral para controladores e não controladores de viremia. Serão incluídos neste estudo, indivíduos com idade entre 18 e 21 anos, crianças com menos de 18 anos não serão recrutadas ou estudadas neste projeto, mas esperamos que sejam beneficiadas indiretamente pelos resultados obtidos.

Os indivíduos incluídos no estudo participarão de visitas iniciais e de seguimento para avaliação de seu histórico clínico e exame médico. Amostras de sangue serão obtidas para ensaios laboratoriais. Médicos treinados conduzirão as visitas clínicas. Elas incluirão informação comportamental detalhada relacionada com características sociais, estado de saúde incluindo sintomatologia, história sexual, de exposição a drogas, estado psicológico e atitudes de risco para DSTs. As amostras de sangue serão obtidas usando venipunção; soro, plasma e PBMCs serão processados e armazenados.

Todos os participantes infectados pelo HIV serão atendidos, entrevistados e terão amostras coletadas em uma clínica de atendimento onde sua infecção pelo HIV será também monitorada por um especialista em doenças infecciosas. Todo o processo de pesquisa será conduzido segundo as recomendações de Boas Práticas Clínicas e Boas Práticas de Laboratório

Cont. Parecer CONEP N°522/2008

Os estudos clínicos desenvolvidos na UNIFESP/SP são confidenciais e anônimos. Toda a equipe do projeto será treinada nos procedimentos para manter a confidencialidade dos sujeitos de pesquisa.

Os participantes podem se sentir desconfortável com algumas das perguntas do estudo. Os tópicos sensíveis incluem uso de drogas, comportamento sexual, violência e atividades ilegais. Os participantes, entretanto, podem escolher não responder qualquer pergunta e poderão parar em qualquer parte do estudo ou do processo de avaliação. O estudo incluirá a assistência clínica, o acesso a serviço social e de avaliação de saúde mental para participantes com diagnóstico de novas infecções. Um pequeno risco de lesão menor ou infecção pela coleta de sangue será reduzido com a participação de técnicos coletores experientes.

Os participantes poderão se beneficiar de um diagnóstico mais rápido do que o padrão para a infecção pelo HIV, levando a uma atenção médica apropriada, prevenção de doenças oportunistas, e terapia anti-retroviral. Eles receberão também aconselhamento para redução de risco, testes de DSTs, e aconselhamento e encaminhamento para tratamento das DSTs diagnosticadas. Receberão ainda aconselhamento para evitar discriminação social como consequência do diagnóstico do HIV, esclarecendo os mecanismos da doença e como esta pode ser apropriadamente tratada.

Local de Realização

O país de origem são os Estados Unidos da América. No Brasil haverá a inclusão de 40 participantes, sendo 20 no centro em tela. Os centros brasileiros participantes serão: Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias – UNIFESP – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UNIFESP/SP e Universidade Federal da Bahia/BA.

Apresentação do Protocolo

A proposta apresentada é importante, pois poderá viabilizar possíveis estudos para uma vacina anti-HIV. Tem como hipótese que os indivíduos infectados pelo HIV, que controlam a replicação viral, desenvolvem respostas efetivas de linfócitos T CD8+ específicas ao Vif.

Os currículos *Lattes* dos pesquisadores, muito maior que o próprio projeto de pesquisa, valida o mesmo para executarem o projeto.

Não haverá o envio de material para o exterior, pois todas as amostras serão armazenadas no Brasil.

O projeto pretende explorar se os linfócitos T CD8+Vif-específico de indivíduos capazes de controlar a replicação viral, que responde a peptídeos de tamanho mínimo e características ótimas, usando para isso marcação de citocinas intracelulares por citometria de fluxo e ELISPOT. Será determinado por meio de um novo ensaio de supressão viral, se respostas mediadas por linfócitos T CD8+ Vif específico controlam a replicação da carga viral.

O projeto prevê a análise retrospectiva e prospectiva de indivíduos HIV- positivos recentes infectados recrutados no ano de 2002 na UNIFESP/SP em estudo que teve a parceria do Programa Nacional de AIDS e o Programa Municipal de São Paulo e 300 portadores cronicamente infectados acompanhado pela Universidade Federal da Bahia/UFBA/BA, com o objetivo aumentar a capacidade de identificar de indivíduos capazes de controlar a replicação do HIV e também aumentar a diversidade genética dos indivíduos. No protocolo é possível certificar que foi elaborado por pesquisadores brasileiros baseado na pesquisa anteriormente realizada no Brasil em 2002.

O projeto está previsto para acontecer durante 48 meses.

O projeto descreve de forma clara como será aplicado o TCLE levando em consideração as pessoas com dificuldades de leitura, quando será realizada por membro da equipe com uma testemunha presente.

Comentários/Considerações

1. Contêm incoerência em relação aos números de participantes informado na Folha de Rosto - 40 pessoas, com o estudo - 32 pessoas, além disso, consta a participação total de 60 indivíduos, entretanto, por meio das informações do estudo, conclui-se que a pesquisa será realizada somente no Brasil, portanto, pede-se esclarecer o número correto de participantes no estudo, os países participantes e por fim adequar às informações na Folha de Rosto.
2. O pesquisador apresenta uma carta justificando a não apresentação da aprovação no país de origem em razão do recrutamento ser somente no Brasil. Tal justificativa, não foi aceita

Cont. Parecer CONEP N° 522/2008

por esta Comissão, uma vez que independente de haver ou não recrutamento no país de origem a aprovação se faz necessária. Pede-se atender aos itens VII.1 e VII.2 da Res. 292/99.

3. O Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE contém linguagem clara e acessível, contém as informações referentes ao objetivo e procedimentos, além de descrição dos benefícios, no entanto a parte destinada para as assinaturas encontra-se em uma página isolada. Pede-se incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

OBS: No Brasil, além do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP, está prevista a participação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP/SP e da Universidade Federal da Bahia/BA.

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS n° 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 20 de agosto de 2008.


Gyselle Saddi Tannous
 Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO III. Aceite para publicação de artigo científico

PLoS ONE Decision [09-PONE-RA-15027R1]

PLoSONE@plos.org <PLoSONE@plos.org>
 Reply-To: mario.ostrowski@gmail.com
 To: leandro.tarosso@gmail.com
 Cc: tarosso@usp.br

Tue, May 25, 2010 at 11:12 AM

Re: Unexpected Diversity of Cellular Immune Responses Against Nef and Vif in HIV-1-Infected Patients who Spontaneously Control Viral Replication

Dear Dr. Tarosso,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLoS ONE. PLEASE NOTE THERE ARE STILL A NUMBER OF GRAMMATICAL ERRORS IN THE MANUSCRIPT AND GO OVER THEM WITH SPELL CHECK OR MANUALLY TO CORRECT THEM.

However, before your manuscript can be formally accepted, your files will be checked by the PLoS ONE production staff. Once they have completed these checks, they will return your manuscript to you so that you may attend to their requests and make any changes that you feel necessary.

To speed the publication of your paper you should look very closely at the merged pdf of your manuscript created by the Journal Management System. You should consider this text to have the status of a production proof. Your paper will be tagged and laid out to produce professional pdf and online versions. However, the text you have supplied will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you have supplied it.


OUR PRODUCTION SYSTEM DOES NOT INCLUDE AN AUTHOR PROOFING STEP AND SO THIS MAY BE YOUR LAST OPPORTUNITY TO CORRECT ANY ERRORS THAT ARE PRESENT IN YOUR MANUSCRIPT. THE CORRESPONDING AUTHOR IS RESPONSIBLE ON BEHALF OF ALL CO-AUTHORS FOR THE ACCURACY OF ALL CONTENT, INCLUDING SPELLING OF NAMES AND CURRENT AFFILIATIONS OF ALL THE AUTHORS, SO PLEASE ENSURE THESE HAVE BEEN CHECKED CAREFULLY.

You should pay particular attention to the following pieces of information stored in the Journal Management System. These will also be entered into your published manuscript and, again, this may be your final opportunity to correct any errors or inaccuracies therein:

1. Financial Disclosure
2. Competing Interests
3. Titles for all Supporting Information files
4. Legends for all Supporting Information files
5. Author Contributions
6. Running Head

You will be able to upload your corrected files and update your manuscript information as soon as you have received an email from our production staff. If you have any problems please contact the Publications Assistants at plosone@plos.org.

At this stage you should also indicate your agreement to the PLoS Open Access license at the following URL:



(N.B. Please take care not to forward this email to any third party as the above link will allow access to your account in the PLoS ONE Journal Management System.)

Thank you again for supporting Open Access publishing. We look forward to publishing your paper in PLoS ONE.

Best regards,

Dr. Mario Ostrowski
 Academic Editor, PLoS ONE

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH *et al.* Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol.* 2000; 74(9):4361-4376.
- Altfeld M, Addo MM, Shankarappa R, Lee PK, Allen TM, Yu XG *et al.* Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1-specific T-cell responses to highly variable regions by using peptides based on autologous virus sequences. *J Virol.* 2003; 77(13):7330-7340.
- Andiman WA, Chernoff MC, Mitchell C, Purswani M, Oleske J, Williams PL *et al.* Incidence of persistent renal dysfunction in human immunodeficiency virus-infected children: associations with the use of antiretrovirals, and other nephrotoxic medications and risk factors. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(7):619-625.
- Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol.* 2006; 55(4):539-552.
- Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med.* 2006; 203(5):1357-1369.

Bangsberg DR, Hecht FM, Charlebois ED, Zolopa AR, Holodniy M, Sheiner L *et al.* Adherence to protease inhibitors, HIV-1 viral load, and development of drug resistance in an indigent population. *AIDS*. 2000; 14(4):357-366.

Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol*. 2001; 75(24):11983-11991.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2006; 107(12):4781-4789.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994; 68(9):6103-6110.

BRASIL. Ministerio da Saude. Portaria n.º 59/GM. 2003.

Carrington M, O'Brien, SJ The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med*. 2003; 54(535-551).

Chowdhury IH, Chao W, Potash MJ, Sova P, Gendelman HE, Volsky DJ. vif-negative human immunodeficiency virus type 1 persistently replicates in primary macrophages, producing attenuated progeny virus. *J Virol*. 1996; 70(8):5336-5345.

Cohen J. AIDS research. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science*. 2007; 318(5847):28-29.

Coplan PM, Gupta SB, Dubey SA, Pitisuttithum P, Nikas A, Mbewe B *et al*. Cross-reactivity of anti-HIV-1 T cell immune responses among the major HIV-1 clades in HIV-1-positive individuals from 4 continents. *J Infect Dis*. 2005; 191(9):1427-1434.

Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007; 27(3):406-416.

Draenert R, Altfeld M, Brander C, Basgoz N, Corcoran C, Wurcel AG *et al*. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods*. 2003; 275(1-2):19-29.

Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN *et al*. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol*. 2008; 82(11):5398-5407.

Feeney M, Tang, Y, Roosevelt, KA, Leslie, AJ, McIntosh, K, Karthas, N, Walker, BD, Goulder, PJ. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term nonprogressing child. *J Virol*. 2004; 78(8927-8930).

Friedrich TC, Valentine LE, Yant LJ, Rakasz EG, Piaskowski SM, Furlott JR *et al.* Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol.* 2007; 81(7):3465-3476.

Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA *et al.* Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 1992; 66(11):6489-6495.

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

Gorse GJ, Baden LR, Wecker M, Newman MJ, Ferrari G, Weinhold KJ *et al.* Safety and immunogenicity of cytotoxic T-lymphocyte poly-epitope, DNA plasmid (EP HIV-1090) vaccine in healthy, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-uninfected adults. *Vaccine.* 2008; 26(2):215-223.

Goulder P, Brander, JC, Tang, Y, Tremblay, C, Colbert, RA, Addo, MM, Rosenberg, ES, Nguyen, T, Allen, R, Trocha, A, Altfeld, M, He, S, Bunce, M, Funkhouser, R, Pelton, SI, Burchett, SK, McIntosh, K, Korber, BT, Walker, BD. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature.* 2001; 412(334-338).

Gray RH, Li X, Wawer MJ, Gange SJ, Serwadda D, Sewankambo NK *et al.* Stochastic simulation of the impact of antiretroviral therapy and HIV vaccines on HIV transmission; Rakai, Uganda. *AIDS*. 2003; 17(13):1941-1951.

Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F *et al.* Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2001; 357(9263):1149-1153.

Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP *et al.* Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol*. 1996; 156(7):2616-2623.

Hassaine G, Agostini I, Candotti D, Bessou G, Caballero M, Agut H *et al.* Characterization of human immunodeficiency virus type 1 vif gene in long-term asymptomatic individuals. *Virology*. 2000; 276(1):169-180.

Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine--evolving concepts. *N Engl J Med*. 2007; 356(20):2073-2081.

Kallas EG, Bassichetto KC, Oliveira SM, Goldenberg I, Bortoloto R, Moreno DM *et al.* Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion

- (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(6):399-406.
- Kaslow R, Rivers, C, Tang, J, Bender, TJ, Goepfert, PA, El Habib, R, Weinhold, K, Mulligan, MJ. Polymorphisms in HLA class I genes associated with both favorable prognosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection and positive cytotoxic T-lymphocyte responses to ALVAC-HIV recombinant canarypox vaccines. *J Virol.* 2001; 75(8681-8689).
- Keet I, Tang, J, Klein, MR, LeBlanc, S, Enger, C, Rivers, C, Apple, RJ, Mann, D, Goedert, JJ, Miedema, F, Kaslow, RA. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis.* 1999; 180(299-309).
- Kern F, Faulhaber N, Frommel C, Khatamzas E, Prosch S, Schonemann C *et al.* Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol.* 2000; 30(6):1676-1682.
- Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert R *et al.* Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol.* 2004; 65(5):523-536.
- Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the

potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*. 2004; 432(7018):769-775.

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W *et al*. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994; 68(7):4650-4655.

Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L *et al*. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(7):1053-1056.

Liu B, Yu X, Luo K, Yu Y, Yu XF. Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J Virol*. 2004; 78(4):2072-2081.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R *et al*. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996; 86(3):367-377.

Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ *et al*. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest*. 2003; 111(10):1547-1554.

Maciel M, Jr., Kellathur SN, Chikhlikar P, Dhalia R, Sidney J, Sette A *et al*. Comprehensive analysis of T cell epitope discovery strategies

using 17DD yellow fever virus structural proteins and BALB/c (H2d) mice model. *Virology*. 2008; 378(1):105-117.

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(1):11-23.

Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW *et al*. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol*. 2002; 3(11):1061-1068.

Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA *et al*. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008; 29(6):1009-1021.

Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L *et al*. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(6):2709-2714.

Miura T, Brockman MA, Brumme CJ, Brumme ZL, Carlson JM, Pereyra F *et al*. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *J Virol*. 2008; 82(17):8422-8430.

- Moreno S, Miralles C, Negredo E, Domingo P, Estrada V, Gutierrez F *et al.* Disorders of body fat distribution in HIV-1-infected patients. *AIDS Rev.* 2009; 11(3):126-134.
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF *et al.* Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1995; 332(4):209-216.
- Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A *et al.* Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008; 197(4):563-571.
- Peters B, Bui HH, Frankild S, Nielson M, Lundegaard C, Kostem E *et al.* A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules. *PLoS Comput Biol.* 2006; 2(6):e65.
- PN-DST/AIDS. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. 2009.
- Priddy FH, Brown D, Kublin J, Monahan K, Wright DP, Lalezari J *et al.* Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(11):1769-1781.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 342(13):921-929.

- Rhodes DI, Ashton L, Solomon A, Carr A, Cooper D, Kaldor J *et al.* Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. *J Virol.* 2000; 74(22):10581-10588.
- Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 2003; 187(3):504-507.
- Roge BT, Barfod TS, Kirk O, Katzenstein TL, Obel N, Nielsen H *et al.* Resistance profiles and adherence at primary virological failure in three different highly active antiretroviral therapy regimens: analysis of failure rates in a randomized study. *HIV Med.* 2004; 5(5):344-351.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* 1997; 278(5342):1447-1450.
- Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007a; 104(16):6776-6781.

- Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol.* 2007b; 28(12):532-540.
- Salvi R, Garbuglia AR, Di Caro A, Pulciani S, Montella F, Benedetto A. Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol.* 1998; 72(5):3646-3657.
- Sanabani S, Neto WK, de Sa Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM *et al.* Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(2):171-176.
- Simon JH, Sheehy AM, Carpenter EA, Fouchier RA, Malim MH. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol.* 1999; 73(4):2675-2681.
- Sova P, van Ranst M, Gupta P, Balachandran R, Chao W, Itescu S *et al.* Conservation of an intact human immunodeficiency virus type 1 vif gene in vitro and in vivo. *J Virol.* 1995; 69(4):2557-2564.
- Sterne JA, May M, Costagliola D, de Wolf F, Phillips AN, Harris R *et al.* Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet.* 2009; 373(9672):1352-1363.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8):1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(24):4876-4882.
- Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC *et al.* Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001; 345(10):715-724.
- Tonks A. Quest for the AIDS vaccine. *BMJ.* 2007; 334(7608):1346-1348.
- Torres-Madriz G, Lerner D, Ruthazer R, Rogers WH, Wilson IB. Work-related Barriers and Facilitators to Antiretroviral Therapy Adherence in Persons Living with HIV Infection. *AIDS Behav.* 2010; -(-):-.
- UNAIDS. AIDS Epidemic update: November 2009. 2009.
- Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 2007; 15(4):134-136.
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O *et al.* Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis.* 2005; 191(9):1403-1409.

Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, May GE, Maness NJ, Enz AM *et al.* The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol.* 2006; 80(10):5074-5077.

Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE *et al.* Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Web Server issue):W513-518.

Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC *et al.* Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature.* 2002; 415(6867):88-92.

Zuk DM, Hughes CA, Foisy MM, Robinson JL, Singh AE, Houston S. Adverse effects of antiretrovirals in HIV-infected pregnant women. *Ann Pharmacother.* 2009; 43(6):1028-1035.