



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização da resposta de anticorpos de ligação e
neutralizantes em indivíduos portugueses infetados por VIH-1,
contra a gp120 de isolados VIH-1 circulantes em Angola

Patrícia Borges

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS COM ESPECIALIZAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM
MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Fevereiro 2019



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização da resposta de anticorpos de ligação e neutralizantes em indivíduos portugueses infetados por VIH-1, contra a gp120 de isolados VIH-1 circulantes em Angola

Autor: Patrícia Alexandra Costa Borges

Orientador: Investigador Doutor José Marcelino

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, com especialização em Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Apoio financeiro de Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pelo projeto HIVERA 0001/2013.

Apresentações científicas resultantes deste trabalho

Patrícia Borges, Rute Marcelino, Rita Calado, Francisco Martin, Paloma Gonçalves, Nuno Janeiro, Miguel Neno, Cláudia Afonso, Robert Badura, Filipa Gramacho, Pedro Brogueira, Kamal Mansinho, Emília Valadas, Luís Caldeira, Nuno Taveira and José M. Marcelino (2018). “Antibody neutralization and its determinants in HIV-1 infected patients from Portugal: implications for vaccine design and efficacy”. 3rd International Congress of CiiEM – Research and Innovation in Human & Health Sciences, Monte da Caparica, Portugal. 20 a 22 de junho de 2018 (Anexo 1)

(Abstract number: P008)

Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao Investigador Doutor José Marcelino, por esta oportunidade e por toda a ajuda e empenho, pelos ensinamentos e pela confiança que foi depositando em mim ao longo destes anos.

Agradeço também a todas as pessoas que conheci no IHMT, colegas, amigos, docentes e não docentes, pelo bom acolhimento e pela disponibilidade constante em ajudar.

Obrigada aos amigos me acompanham desde cedo, por todo o apoio, amizade e por nunca me deixarem ir abaixo. Um obrigada especial à Inês Almeida e à Pilar Simões, por toda a ajuda, e ao Pedro Borges, pelo apoio e motivação.

Obrigada aos amigos que conheci neste instituto, que tornaram toda esta jornada melhor, em especial à Paloma Gonçalves, Mónica Ferreira, Raquel Quitéria e Catarina Caseiro.

Por fim, um grande obrigada à minha família. Por nunca me deixarem perder a determinação e pela confiança que sempre depositaram em mim. O maior obrigada de todos aos meus pais, por estarem sempre comigo e por serem os meus pilares.

Obrigada.

Índice

Apresentações científicas resultantes deste trabalho	iii
Agradecimentos	iv
Índice	v
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	vii
Índice de Gráficos	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento histórico e geográfico do VIH/SIDA	1
1.2 Panorama epidemiológico do VIH-1 em Portugal	3
1.3 Classificação, Morfologia e Estrutura genómica do VIH-1	4
1.3.1 Ciclo Replicativo do VIH-1	7
1.3.2 Invólucro do VIH: gp120 e gp41	9
1.3.3 Gp120 e a região C2V3C3.....	10
1.3.4 Diversidade genética associada ao VIH-1	13
1.4 Patogénese do VIH-1: curso natural de infeção	14
1.4.1 Transmissão, mecanismos de disseminação e sintomas	14
1.4.2 Caracterização da resposta imunitária	15
1.4.3 Papel dos anticorpos na infeção do VIH-1	17
1.4.4 Perspetivas de combate à SIDA: da terapia à vacinação	19
2. Material e Métodos.....	21

2.1 Expressão das Proteínas	21
2.2 Purificação Proteica	22
2.3 Quantificação Proteica	22
2.4 Antigenicidade dos Péptidos por ELISA	24
2.5 Atividade Neutralizante	26
2.5.1 As células TZM-bl.....	26
2.5.2 Ensaio de Neutralização	29
3. Resultados e Discussão.....	32
3.1 Anticorpos de ligação.....	32
3.1.1 Reatividade aos péptidos	33
3.1.2 Antigenicidade dos péptidos.....	35
3.1.3 Carga viral <i>versus</i> anticorpos de ligação	38
3.1.4 Número de células T CD4 ⁺ <i>versus</i> anticorpos de ligação.....	40
3.2 Neutralização dos vírus	41
3.2.1 Atividade neutralizante	42
3.2.2 Carga viral <i>versus</i> anticorpos neutralizantes	46
4. Considerações Finais	52
5. Referências Bibliográficas.....	55
6. Anexos.....	64
Anexo 1 – Poster	64
Anexo 2 – Meios e Soluções	65

Índice de Figuras

Figura 1. Modelos de disseminação do VIH-1 a partir de África (adaptado de [14]).	2
Figura 2. Estrutura morfológica e genoma do VIH-1 (adaptado de [27, 28]).	5
Figura 3. Ciclo replicativo do VIH. [26]	8

Figura 4. Constituição do complexo gp160 do VIH-1 [36].	10
Figura 5. Estrutura dos domínios da glicoproteína gp120 do VIH-1 (adaptado de [37]).	10
Figura 6. Locais de ligação na gp120 e anticorpos neutralizantes associados [42].	12
Figura 7. Evolução típica durante as primeiras semanas dos principais marcadores virais e sorológicos após a infeção pelo VIH-1 [46].	15
Figura 8. Diferentes tipos de ELISA [55].	24
Figura 9. Esquema da câmara de Neubauer, utilizado para a contagem de células [63].	28
Figura 10. Células TZM-bl após 24, 48 e 72 horas de crescimento.	28
Figura 11. Esquema da microplaca usado nos ensaios de neutralização.	30
Figura 12. Depleção das células T CD4 ⁺ mediada pelo péptido 3S [68].	41

Índice de Tabelas

Tabela 1. Quadro esquemático dos genes estruturais e acessórios do VIH-1, proteínas codificadas e as suas características (adaptado de [25]).	6
Tabela 2. Características dos isolados de VIH-1. Estágio de infeção da amostra da qual o vírus foi isolado: E (precoce), estágios de Fiebig I a IV; I (intermediário), estágios de Fiebig V e VI; L (tardia), estágio de Fiebig VI a crónico.	26
Tabela 3. Dados amostrais relativos aos péptidos AG, B, C, G e H da gp120 e EC26 e 3S da gp41.	32
Tabela 4. Reatividade a cada um dos péptidos, comparando indivíduos sob terapia antirretroviral (C/ART) com indivíduos drug naïve (S/ART).	37
Tabela 5. Valores médios de reatividade dos plasmas C/ART e S/ART e respetivo p value, em função da existência ou não de carga viral detetável.	39
Tabela 6. Resposta neutralizante dos indivíduos com e sem terapia contra o painel de vírus testados.	42
Tabela 7. Atividade neutralizante de plasmas positivos para VIH-1 contra pseudovírus tier 2 de VIH-1.	45
Tabela 8. Percentagens médias de neutralização para cada um dos vírus, em função da carga viral e da condição terapêutica.	48
Tabela 9. Estudo de possíveis associações entre atividade neutralizante para cada vírus e carga viral e número de células T CD4 ⁺ .	50

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Curva-padrão obtida com base na absorvância versus concentrações de albumina de soro bovino.....	23
Gráfico 2. Reatividade de plasmas positivos para VIH-1 contra péptidos da gp120 e da gp41.	34
Gráfico 3. Reatividade de plasmas sob terapia antirretroviral (C/ART) e drug naïve (S/ART) a determinado número de péptidos.	34
Gráfico 4. Antigenicidade dos péptidos.....	35
Gráfico 5A e 5B. Antigenicidade dos péptidos da gp120 e da gp41 ao plasma de indivíduos sob terapia antirretroviral (c/ART) (A) e de indivíduos drug naïve (s/ART) (B).	36
Gráfico 6A e 6B. Reatividade mediana dos plasmas de indivíduos sob terapia antirretroviral (A) e drug naïve (B) contra cada um dos péptidos.	37
Gráfico 7. Reatividade média dos plasmas provenientes de indivíduos sob terapia antirretroviral aos péptidos, em função da sua carga viral.	38
Gráfico 8. Reatividade média dos plasmas provenientes de indivíduos drug naïve aos péptidos, em função da sua carga viral.	39
Gráfico 9. Reatividade dos anticorpos anti-3S ao péptido 3S, em função do número de células T CD4 ⁺	40
Gráfico 10. Frequência de neutralização de cada vírus.	43
Gráfico 11. Atividade neutralizante dos diferentes plasmas face ao painel de vírus em estudo.	44
Gráfico 12. Frequência de neutralização dos vírus tier 2.	46
Gráfico 13. Percentagem média de neutralização de cada um dos vírus, em função da carga viral dos plasmas.	47
Gráfico 14A e 14B: Atividade neutralizante dos plasmas de indivíduos c/ART (A) e s/ART (B) ao vírus tier 1 pNL4.3, em função do número de células T CD4 ⁺ e da carga viral.	48
Gráfico 15A, 15B, 15C, 15D, 15E e 15F. Atividade neutralizante dos plasmas de indivíduos c/ART aos vírus tier 2 TRO11 (A), 246F3 (B), PCH119 (C), PCE1176 (D),	

BJOX2000 (E) e PCE0217 (F), em função do número de células T CD4⁺ e da carga viral.
..... 49

Lista de Siglas e Abreviaturas

ART – Terapia antirretroviral

BSA – Albumina de soro bovino

CA – Cápside Viral

CCR5 – Receptores de β -quimiocinas

CRF – Formas recombinantes circulantes

CXCR4 - Receptores de β -quimiocinas

DMEM - Dulbecco's modified eagle's medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimático

gpSU – Glicoproteína de superfície

gpTM – Glicoproteína transmembranar

IFN – Interferão

IN - Integrase

IPTG - Isopropil- β -D-galactosídeo

LTR – Repetições terminais longas

MAbs – Anticorpos monoclonais

mRNA – RNA mensageiro

NAbs – Anticorpos neutralizantes

nNAbs – Anticorpos não neutralizantes

Ptt – *Pan troglodytes*

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcriptase reversa

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia

UNAIDS – Programa das Nações Unidas para VIH/SIDA

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VIH-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

Resumo

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana constitui, mesmo após largos anos da sua identificação, uma preocupação a nível global, não sendo, ainda, totalmente conhecido o papel dos anticorpos na infecção por este agente etiológico.

Este estudo tem como principal foco a caracterização da resposta de anticorpos de ligação (nNAb) e de neutralização (NAb) em indivíduos portugueses infetados por VIH-1.

Foram previamente colhidos os plasmas de 406 doentes em Hospitais de Lisboa sob consentimento informado, tendo o estudo sido aprovado pelas Comissões de Ética do Centro Académico de Medicina de Lisboa/Centro Hospitalar Lisboa Norte (CAML/CHLN) e do Hospital Egas Moniz.

Analisou-se, através do método ELISA, a resposta dos anticorpos de ligação contra polipéptidos da região C2V3C3 da gp120 de vários subtipos de HIV-1 (AG, B, C, G e H), bem como contra péptidos de uma região conservada da gp41 (EC26 e 3S).

Estudou-se ainda a atividade neutralizante contra pseudovírus tier 1 (pNL4.3) e tier 2 de diferentes subtipos (B, C, AC e BC), recorrendo a células TZM-bl.

Das 406 amostras testadas em ELISA, 87.7% reagiu com pelo menos um dos 7 polipéptidos. O polipéptido proveniente do subtipo AG foi o mais antigénico (60.8%), seguido por H (54.9%), B (51.0%), G (50.7%), C (48.5%), 3S (12.8%) e EC26 (11.6%). Observou-se uma correlação entre o número de péptidos reconhecidos e o nível da resposta por parte dos anticorpos de ligação ($p=0.003$ para amostras s/ART e $p<0.0001$ para amostras c/ART).

O pseudovírus tier 1 pNL4.3 foi neutralizado por 87% das amostras de plasmas de indivíduos c/ART e 77% das amostras de plasmas de indivíduos *drug naïve*. Dos 39 indivíduos sob terapia antirretroviral testados contra pseudovírus tier 2, 59% foi capaz de neutralizar os 6 pseudovírus, 30.8% neutralizou de 1 a 5 estirpes e 10.3% dos indivíduos não foi capaz de neutralizar nenhuma delas.

A potência de neutralização (%) do pNL4.3 foi superior em indivíduos sob terapia antirretroviral (79.4% vs 60.2%). A maior potência de neutralização entre os vírus tier 2 correspondeu à estirpe PCH119 (82%), seguido de PCE0217 (79%), TRO11 e 246F3 (72%), BJOX2000 (69%) e por último PCE1176 (62%).

Observou-se uma correlação estatística entre a média da absorvância lida na resposta dos anticorpos de ligação de cada um dos plasmas e a percentagem média de neutralização dos vírus ($p=0.047$), bem como entre o número de vírus neutralizados e a percentagem média de neutralização ($p<0.0001$).

Em suma, a resposta antigénica eficaz contra a região C2V3C3 proveniente de diferentes subtipos de VIH-1 é acompanhada por elevados níveis de anticorpos neutralizantes em indivíduos infetados com VIH-1 em Portugal, podendo ser um ponto de partida para o desenvolvimento de uma vacina contra este agente patogénico.

Palavras-chave: VIH-1; região C2V3C3; glicoproteínas; anticorpos de ligação; ELISA; anticorpos neutralizantes; Neutralização.

Abstract

Human Immunodeficiency Virus infection constitutes, even after many years of its identification, a concern at a global level, and the role of antibodies in the infection by this etiological agent is not yet fully known.

This study has as main focus the characterization of the response of binding antibodies (nNAb) and neutralizing antibodies (NAb) in portuguese individuals infected by HIV-1.

Plasmas of 406 patients were previously collected at the Lisbon Hospitals with informed consent, and the study was approved by the Ethics Committee of the Lisbon Medical Center/Centro Hospitalar Lisboa Norte (CAML/CHLN) and Egas Moniz Hospital.

The non-neutralizing antibodies response against gp120 C2V3C3 region polypeptides from many HIV-1 subtypes (AG, B, C, G and H), and against a gp41 conserved region peptides (EC26 and 3S) were analyzed by ELISA.

Neutralizing activity against tier 1 virus (pNL4.3) and tier 2 of different subtypes (B, C, AC and BC) was studied using TZM-bl cells.

Of the 406 samples tested by ELISA, 87.7% reacted with at least one of the 7 polypeptides. The polypeptide from the AG subtype was the most antigenic (60.8%), followed by H (54.9%), B (51.0%), G (50.7%), C (48.5%), 3S (12.8%) and EC26 (11.6%). There was a correlation between the number of recognized peptides and the response by binding antibodies ($p=0.003$ for samples without ART and $p<0.0001$ for samples with ART).

The pseudovirus tier 1 pNL4.3 was neutralized by 87% of the plasmas from individuals with ART and 77% of the plasmas from individuals without ART. Of the 39 individuals under antiretroviral therapy tested against pseudovirus tier 2, 59% were able to neutralize the 6 pseudoviruses, 30.8% neutralized 1 to 5 viruses and 10.3% of individuals were not able to neutralize any virus.

The neutralizing potency (%) of pNL4.3 was higher in people receiving antiretroviral therapy (79.4% vs 60.2%). The highest neutralizing potency among the tier 2 viruses was PCH119 (82%), followed by PCE0217 (79%), TRO11 and 246F3 (both with 72%), BJOX2000 (69%) and PCE1176 (62%).

A statistical correlation was found between the mean absorbance read on the binding antibody response from each sample and the mean percentage of virus neutralization ($p=0.047$), as well as between the number of virus recognized and the mean percentage of neutralization ($p<0.0001$).

In conclusion, the effective antigenic response against the C2V3C3 region from different HIV-1 subtypes is accompanied by high levels of neutralizing antibodies in individuals infected with HIV-1 in Portugal, being able to be a starting point for the development of a vaccine against this pathogen.

Keywords: HIV-1; C2V3C3 region; glycoproteins; binding antibodies; ELISA; neutralizing antibodies.

1. Introdução

Em pleno século XXI, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa o paradigma das doenças infecciosas, destacando-se dentro das causas de pandemia contínua, sendo o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) o seu agente etiológico. Esta patologia imunossupressora constitui assim um grave problema de Saúde Pública a nível mundial, afetando cerca de 36.9 milhões de indivíduos [1]. Estima-se que, em Portugal, vivam atualmente 40 mil pessoas infetadas por VIH [2], constituindo, por isso, um dos países europeus com maior prevalência [3, 4].

A adoção global de algumas medidas de prevenção do VIH tais como a redução de riscos comportamentais, circuncisão masculina voluntária e a profilaxia pré-exposição [5] induziram efeitos significativos nas taxas de transmissão do vírus. No entanto, continua a ser fundamental a composição de uma vacina capaz de induzir anticorpos neutralizantes específicos para o agente patogénico em causa [6].

Os anticorpos neutralizantes (NAbs) são um componente fundamental para uma resposta imune eficiente em humanos face a inúmeros agentes patogénicos. Contudo, o seu papel na infeção por VIH ainda é incerto [7].

Com o propósito de ir ao encontro do panorama exposto acima, o objetivo deste trabalho consiste em caracterizar a resposta de anticorpos de ligação e neutralizantes no plasma de doentes portugueses infetados por VIH-1, utilizando polipéptidos da gp120 de isolados primários do VIH-1 (dos subtipos AG, B, C, G e H) de Angola, e péptidos da gp41, tendo em conta que estas glicoproteínas dispostas no vírus são responsáveis pela ligação e fusão com a célula hospedeira.

1.1 Enquadramento histórico e geográfico do VIH/SIDA

A primeira infeção por VIH-1 num humano foi detetada em 1959 em África, na República Democrática do Congo [8]. No entanto, a SIDA foi pela primeira vez identificada enquanto nova doença no verão de 1981 nos Estados Unidos, pelo Centro de Prevenção e Controlo de Doenças [9], quando um crescente número de jovens do sexo masculino homossexuais, previamente saudáveis, começou a desenvolver quadros de pneumonia atípica, causados pelo microrganismo oportunista *Pneumocystis jirovecii*; e

de lesões cutâneas, vinhosas, nodulares, denominadas como sarcomas de Kaposi, uma das primeiras doenças oportunistas reconhecidas na infecção pelo VIH [10].

Através de análises filogenéticas concluiu-se que o vírus teve a sua origem em populações de símios, nomeadamente *Pan troglodytes* (Ptt) e *Cercocebus atys*, portadores do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) [8]. Suspeita-se assim de transmissão zoonótica para a espécie humana.

Em 1984, o vírus foi denominado de vírus linfotrópico das células T humanas tipo III ou vírus da linfadenopatia associada (HTLV-III/LAV, do inglês Human T-cell Lyphotropic Virus-type III/Lymphadenophaty-associated vírus), sendo mais tarde intitulado de Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) [11]. Estão identificados atualmente dois tipos de VIH: VIH-1, com origem no vírus SIVcpz (proveniente do chipanzé Ptt); e VIH-2, com origem no SIVsm (proveniente do *Cercocebus atys*) [12], sendo que cada um deles desenvolveu vários subtipos por via mutagénica. O VIH-2, menos predominante que o VIH-1, apresenta algumas particularidades tais como menor infeciosidade e patogenicidade, sendo mais predominante na zona ocidental do continente africano [8, 13].

O VIH disseminou-se da República Democrática do Congo (África) para o Haiti e posteriormente para os Estados Unidos da América, de acordo com os modelos esquematizados na Figura 1.

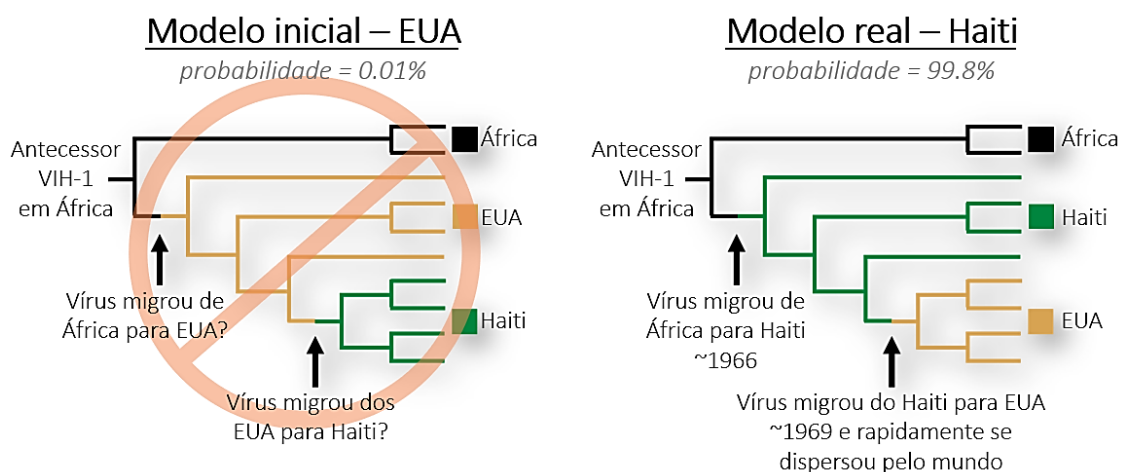


Figura 1. Modelos de disseminação do VIH-1 a partir de África (adaptado de [14]).

Assim, ao longo do tempo, foram ocorrendo múltiplas transmissões do VIH-1 que se acredita que tenham constituído eventos de transmissão independentes do SIVcpz para os humanos, originando quatro grupos filogeneticamente distintos: M, O, N e P [3, 8].

Destaca-se o grupo M (*main* ou *major*), responsável pela maioria dos casos de infeção a nível mundial [15, 16], podendo este grupo ser ainda dividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), com mais de noventa formas recombinantes circulantes diferentes (CRF) [17]. Este fenómeno origina uma elevada diversidade genética que deve ser continuamente mantida sob vigilância, avaliando os padrões geográficos de dispersão do vírus que atualmente se apresentam bem caracterizados. Sabe-se que é possível encontrar todos os subtipos do grupo M do VIH-1 na África Subsaariana, sendo este o local com maior variabilidade genética [3, 18].

O subtipo C é mais predominante na África ocidental, Índia e China, sendo responsável por 50% das infeções mundiais, ao passo que os subtipos A, B, G e D representam 12, 10, 6 e 3%, respetivamente, com o subtipo B mais abundante na América, Europa Ocidental e Oceânia. No entanto, devido a migrações, muitos subtipos não-B estão a começar a circular também nestas áreas. Os subtipos F, H, J e K são responsáveis por quase 1% das infeções a nível mundial e sabe-se atualmente que mais de 20% das infeções de VIH no mundo são por vírus recombinantes [3, 18].

1.2 Panorama epidemiológico do VIH-1 em Portugal

A SIDA é uma das doenças infecciosas mais devastadoras da história da humanidade, tendo o seu agente etiológico sido responsável por quase 75 milhões de infeções desde a sua identificação [19].

Contrariamente ao resto da Europa, Portugal apresenta um grande contraste de distribuição dos diferentes subtipos de VIH-1, sendo um país com um padrão molecular de infeção único a este nível. Verifica-se uma maior prevalência do subtipo B, seguido do subtipo G, tendo este padrão específico promovido o surgimento de formas recombinantes destes subtipos, como por exemplo o CFR14_BG, que se acredita ter surgido em Portugal no início da década de 90, tendo-se depois alastrado para Espanha e para o resto da Europa [3, 20]. Isto assenta em grande parte na História de expansão e colonização do continente africano.

Os primeiros casos de infecção em Portugal datam de 1983, tendo em 1985 sido criado um sistema de vigilância epidemiológica, o qual assenta na caracterização da epidemia em Portugal, análise de tendências em grupos populacionais e categorias de transmissão, contribuindo na orientação de estratégias de combate mais eficazes. A notificação clínica dos casos de doença apenas foi obrigatória a partir de 2005, existindo no país cerca de 57.574 casos de infecção por VIH, com diagnóstico até final de 2017. Em suma, 91.7% das pessoas que vivem com a infecção estão diagnosticadas, das quais 86.8% estão a ser tratadas e 90.3% destas têm carga viral indetetável (≤ 200 cópias/ml) [21].

1.3 Classificação, Morfologia e Estrutura genómica do VIH-1

O VIH é um vírus pertencente à família *Retroviridae*, sendo usualmente intitulado de retrovírus. A sua principal característica é fazer uso da enzima transcriptase reversa (RT) para sintetizar uma cadeia de DNA a partir da molécula de RNA viral [22].

Faz parte da sub-família *Orthoretrovirinae* e é classificado como sendo do género *Lentivirus*. Esta designação tem origem no seu longo período de incubação [23, 24]. A infecção por VIH-1 apresenta uma fase crónica com um longo período de latência clínica, replicação viral persistente e envolvimento do sistema nervoso central.

Do ponto de vista morfológico, o virião apresenta uma forma esférica, com um diâmetro de aproximadamente 110 nm, revestido por um invólucro ou bicamada lipídica proveniente da membrana citoplasmática da célula hospedeira. O invólucro do VIH-1 é um trímero composto por três cópias de heterodímeros associados de forma não covalente, que engloba a glicoproteína superfície (gpSU) de 120kDa (gp120) e a glicoproteína transmembranar (gpTM) com 41kDA (gp41) (Figura 2) [25]. A gpSU é responsável pela interação com os receptores celulares, nomeadamente com o receptor CD4, enquanto a gpTM é necessária para mediar a fusão entre a membrana viral e a membrana da célula alvo. Desta forma, os componentes estruturais mais importantes codificados pelo gene *env* são as glicoproteínas do invólucro, que derivam da glicoproteína precursora gp160 [13, 26].

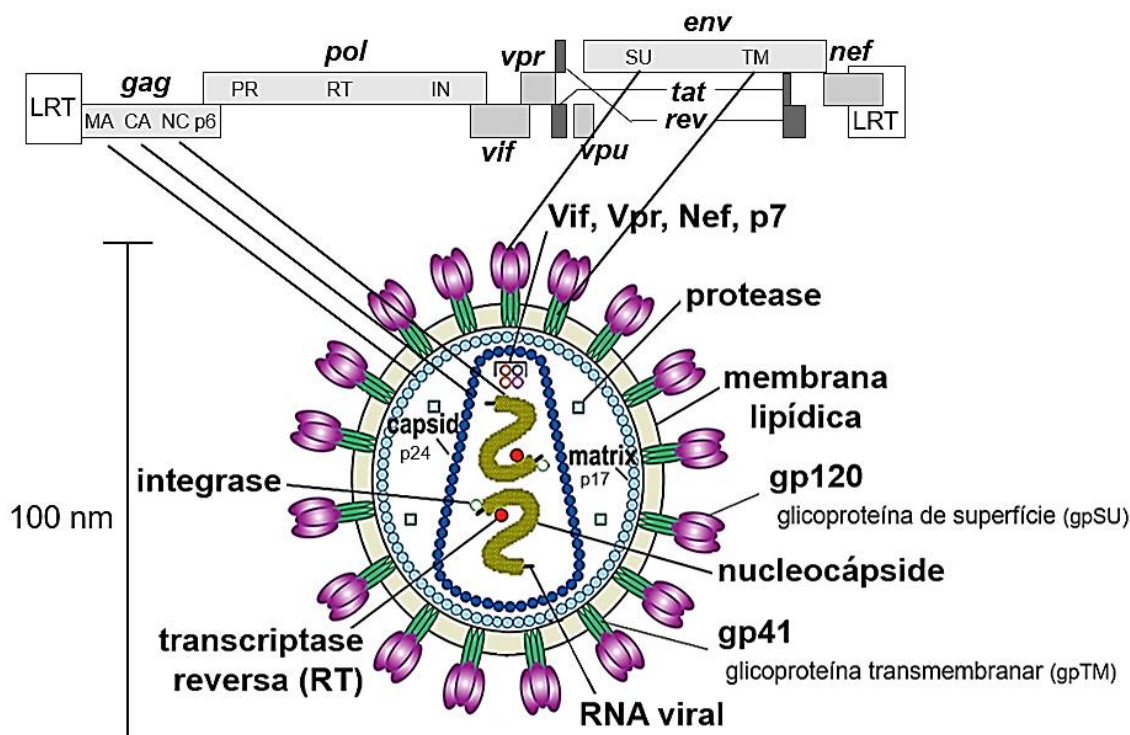


Figura 2. Estrutura morfológica e genoma do VIH-1 (adaptado de [27, 28]).

A matriz é uma estrutura proteica composta pela proteína p17, que reveste a cápside viral, composta pela proteína p24. A cápside viral (CA) contém duas cópias do RNA viral e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, fundamentais no ciclo replicativo do vírus, dado que a célula hospedeira não é capaz de as sintetizar [13].

O genoma do VIH-1 é composto por duas cópias idênticas de moléculas de RNA de cadeia simples de aproximadamente 9.2 kb, flanqueadas por sequências repetitivas terminais longas (LTR – *Long Terminal Repeats*) em ambos os lados, com a presença de genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*) que codificam os componentes necessários para o ciclo de replicação e também genes acessórios (não-estruturais) que participam na modulação do mesmo - *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Estes genes apresentam-se sempre pela ordem 5'-*gag-pol-env*-3' em todos os retrovírus, como representado anteriormente na Figura 2.

As regiões LTR são responsáveis pelo controlo da iniciação e da transcrição do genoma viral, adquirindo um papel de regulador da produção de viriões [12, 29].

Na Tabela 1 encontram-se as proteínas codificadas por cada gene, bem como as respetivas características [25].

Tabela 1. Quadro esquemático dos genes estruturais e acessórios do VIH-1, proteínas codificadas e as suas características (adaptado de [25]).

Gene	Proteína	Características
<i>gag</i>	Matriz (MA, p17)	Entre a cápside e o invólucro viral
	Cápside viral (CA, p24)	Forma o “core” viral
	Nucleocápside (NC, p7)	Intimamente ligada ao RNA genómico
<i>pol</i>	Protease (PR, p15)	Cliva precursores das proteínas Gag e Pol para maturação do virião
	Transcriptase reversa (RT, p51/66)	Converte RNA viral para DNA
	Integrase (IN, p32)	Incorpora o DNA viral no DNA cromossómico do hospedeiro (provírus)
<i>env</i>	Glicoproteína de Superfície (gpSU) – gp120	<ul style="list-style-type: none"> • Responsável pela ligação aos receptores celulares (CD4 e receptor das quimiocinas) que culmina com a fusão do vírus com a célula • Principal determinante antigénico • Elevada variabilidade genética
	Glicoproteína transmembranar (gpTM) – gp41	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente hidrofóbica, parte da sua molécula está inserida na bicamada lipídica do invólucro viral • Está ligada à SU por ligações não covalentes (heterodímeros SU-TM) • A sua região N-terminal, externa ao invólucro viral, está aparentemente envolvida na trimerização dos heterodímeros SU-TM • Envolvida no processo de fusão vírus-célula (péptido de fusão)
<i>tat</i>	Tat (14 kDA); precoce	Promove expressão dos genes do vírus
<i>rev</i>	Rev (19 kDA); precoce	Processamento e transporte do mRNA
<i>nef</i>	Nef (27 kDA); precoce	Transdução do sinal celular; <i>Feedback</i> negativo do receptor CD4 na superfície celular; apoptose
<i>vif</i>	Vif (23 kDA); tardia	Aumenta a infeciosidade dos viriões da descendência
<i>vpr</i>	Vpr (14 kDA); tardia	Bloqueio do ciclo na fase G2; permite reentrada do DNA transcrito no núcleo
<i>vpu</i>	Vpu (16 kDA); tardia	Libertação correta dos viriões

1.3.1 Ciclo Replicativo do VIH-1

O ciclo replicativo do vírus está dividido em duas fases: a primeira corresponde à infeção da célula e a segunda diz respeito à expressão génica e formação de novos viriões [4].

O VIH-1 infeta glóbulos brancos, mais especificamente linfócitos *T-helper*, que apresentam na sua superfície os receptores CD4 (células T CD4⁺), aos quais se ligam as glicoproteínas gp120 presentes no invólucro [30]. Esta ligação deve-se à elevada afinidade da gp120 aos componentes da membrana externa da célula hospedeira [22].

Após a ligação da gp120 ao receptor CD4, dá-se uma alteração conformacional que facilita a interação da gp120 com o receptor de quimiocinas CCR5, expondo o domínio hidrofóbico (péptido de fusão) da gp41. A gp41 insere-se na membrana celular e permite, assim, a fusão da membrana celular com o invólucro viral. Esta etapa favorece a entrada da cápside viral (e, conseqüentemente, do material genético do vírus) na célula hospedeira [22, 31] (Figura 3).

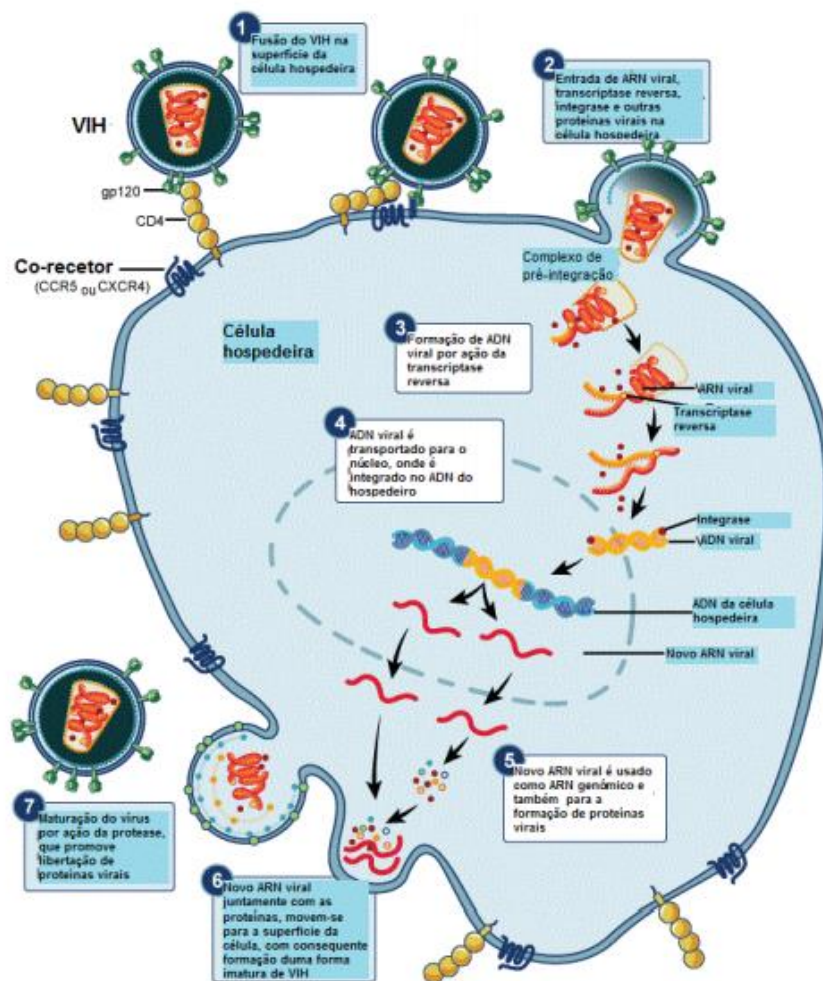


Figura 3. Ciclo replicativo do VIH. [26]

Com a descapsidação, isto é, a desagregação da cápside, o RNA genómico é libertado no citoplasma da célula hospedeira. Pela ação da enzima transcriptase reversa (RT), ocorre a transcrição reversa de RNA para DNA complementar (de sentido negativo e que servirá de molde para a cadeia de polaridade positiva), dando origem ao dímero RNA/DNA [12, 22]. O RNA é, depois, degradado pela ação da RNase e é sintetizada uma nova cadeia de DNA, pela enzima DNA polimerase. A dupla cadeia de DNA penetra no núcleo da célula hospedeira através de poros na membrana nuclear e é então integrada no genoma da célula, por ação da enzima viral integrase (IN), sob a forma de provírus [22, 32, 33].

Na etapa seguinte o vírus passa a usar a maquinaria da célula a seu favor, de forma a produzir novos vírus [12, 22, 30]. Para tal, ocorre, pela ação da RNA polimerase II, a síntese do RNA mensageiro (mRNA) viral, que é depois traduzido em proteínas víricas.

As primeiras proteínas a serem sintetizadas são as reguladoras da transcrição (*tat*, *ver* e *nef*) e, posteriormente, as estruturais (centrais e do invólucro) [13]. O sinal emitido pela região 5' do LTR, as proteínas reguladoras e alguns fatores celulares como a RNA polimerase, são determinantes no início da transcrição, sendo a partir do DNA proviral que são sintetizadas as novas cópias de RNA viral e os mRNAs [12]. A transcrição dos mRNA referentes aos genes *env*, *gag* e *pol* dá origem a proteínas precursoras das proteínas estruturais, que se reúnem com moléculas de RNA viral para, ao passar pela membrana e adquirir um invólucro, formar uma nova partícula viral, por gemulação [12].

Os viriões, nesta fase, encontram-se imaturos e incapazes de infectar novas células. É necessário que ocorra, durante ou pouco depois da saída do vírus por gemulação, o processamento das proteínas centrais pela ação da enzima protease. Esta clivagem proteásica das poliproteínas *gag* e *pol* é fundamental para a maturação do novo vírus, que passa a ter capacidade de iniciar um novo ciclo replicativo [12, 13].

1.3.2 Invólucro do VIH: gp120 e gp41

Na membrana lipídica do VIH-1 encontram-se ancorados cerca de 14 (\pm 7) complexos gp160, oriundos da proteína precursora gp160, codificada pelo gene *env*.

O complexo gp160 é um complexo trimérico composto por uma glicoproteína gp41 associada de forma não covalente a três glicoproteínas gp120 [34], conforme demonstrado na Figura 4. Sendo a gp120 a mais externa, é a responsável pela ligação do vírus às células alvo. A gp41 atravessa o invólucro viral e é necessária para a fusão do invólucro com a membrana celular, permitindo a penetração do vírus [35].

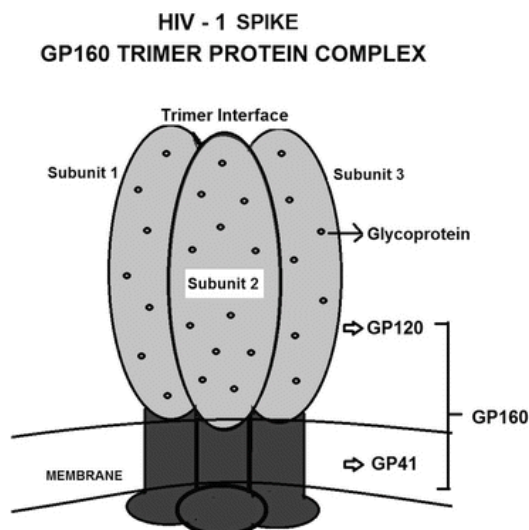


Figura 4. Constituição do complexo gp160 do VIH-1 [36].

A interação sequencial entre a glicoproteína de superfície (gp120) e os receptores celulares (CD4 e receptores de quimiocinas) determina a entrada do VIH-1 na célula [34]. A gp120 induz anticorpos neutralizantes (NABs) e não neutralizantes (nNABs) do vírus durante a infecção natural. Os anticorpos neutralizantes normalmente reconhecem epitopos conservados ou variáveis perto das regiões de ligação ao receptor [34].

Deste modo, a gp120 é um elemento importante na superfície do vírus, sendo um alvo para os anticorpos neutralizantes [35].

1.3.3 Gp120 e a região C2V3C3

A glicoproteína de superfície (gp120) é composta por cinco regiões variáveis, classificadas de V1 a V5, intercaladas com cinco regiões conservadas, C1 a C5 [35]. As regiões variáveis tendem a formar um anel (*loop*), estabilizado por pontes persulfureto,

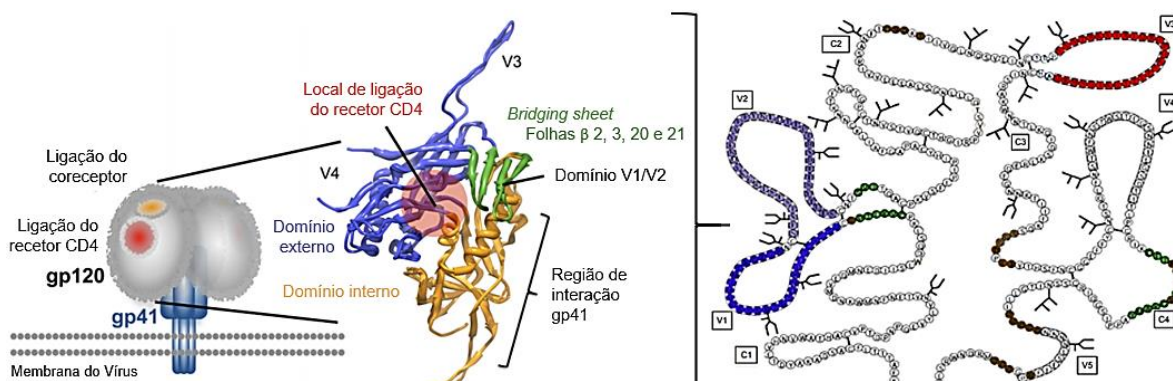


Figura 5. Estrutura dos domínios da glicoproteína gp120 do VIH-1 (adaptado de [37]).

sendo que na sua conformação nativa, esta gpSU apresenta um domínio interno, contendo uma região terminal N/C de interação com a gp41; um domínio externo e uma *bridging sheet*, uma área altamente conservada que consiste em 4 folhas β que unem os dois domínios. Estes três domínios revelam-se importantes na ligação ao receptor CD4 e, posteriormente, ao receptor de quimiocinas (co-receptor). O local de ligação do receptor CD4 está localizado num anel entre o domínio interno e externo e acima da *bridging sheet*, visível a vermelho, na Figura 5 [37, 38].

Durante a infeção, as regiões C2 e C3 associam-se para formar o local de ligação às células CD4, ligação essa que requer a presença de diversas regiões conservadas da gp120 [26].

Aquando da ligação da gp120 com o receptor CD4, ocorrem alterações conformacionais que expõem a *bridging sheet*, estabilizando-a, permitindo ao vírus utilizar o co-receptor CCR5 (R5) durante a infeção precoce, seguido do receptor CXCR4 (X4) numa infeção mais tardia [34, 39]. A maioria das estirpes de VIH-1 isoladas de indivíduos infetados usam CD4 e CCR5 para penetrar na célula hospedeira, comum em indivíduos em fase aguda ou assintomática. Células T-helper tipo 1 (Th1), que expressam altos níveis de CCR5, estão implicadas na manutenção do status de assintomático. A mudança do co-receptor (de X4 para R5) está relacionada com a progressão da infeção, sendo que, segundo estudos anteriores, a suscetibilidade da célula para a infeção por VIH-1 depende do rácio CD4/co-receptor e dos níveis do receptor durante a ativação e/ou diferenciação da célula [40].

Grande parte das regiões C2 e C3 fazem parte da região hidrofóbica formada na gp120 [35]. Foi sugerido anteriormente que este núcleo (core) abriga vários epitopos destinados a anticorpos neutralizantes, sobrepondo-se aos locais de ligação dos CD4, receptor primário, e co-receptor [35]. Por outro lado, a região V3 (bem como a V1 e a V2) encontra-se bem exposta na superfície da gp120 monomérica [41], sendo que geralmente a deleção destas regiões variáveis proporciona o aumento da afinidade na ligação entre os anticorpos e os epitopos que se sobrepõem ao local de ligação dos CD4 e dos co-receptores. Isto sugere que estas regiões variáveis possam proteger epitopos conservados da ação dos anticorpos [35].

Os anticorpos neutralizantes reconhecem regiões conservadas e variáveis da gp120 e as regiões V2 e V3 contêm epítopos para anticorpos neutralizantes “strain-restricted” [34].

Anticorpos com uma ação neutralizante mais ampla reconhecem epítopos conservados e descontínuos em três regiões da gp120. Os mais abundantes são os que se relacionam com o local de ligação aos CD4 (CD4BS – de CD4 binding site) e impedem a ligação CD4-gp120 [34]. Menos comuns são os anticorpos contra epítopos induzidos ou expostos aquando da ligação aos CD4 (CD4i) [34] (Figura 6). Tanto os anticorpos CD4i como os específicos da região V3 interrompem a ligação dos complexos gp120-CD4 aos receptores de quimiocinas [34]. Um terceiro epítopo de neutralização na gp120 é definido por um anticorpo monoclonal, 2G12, que não bloqueia eficientemente a ligação dos receptores [34].

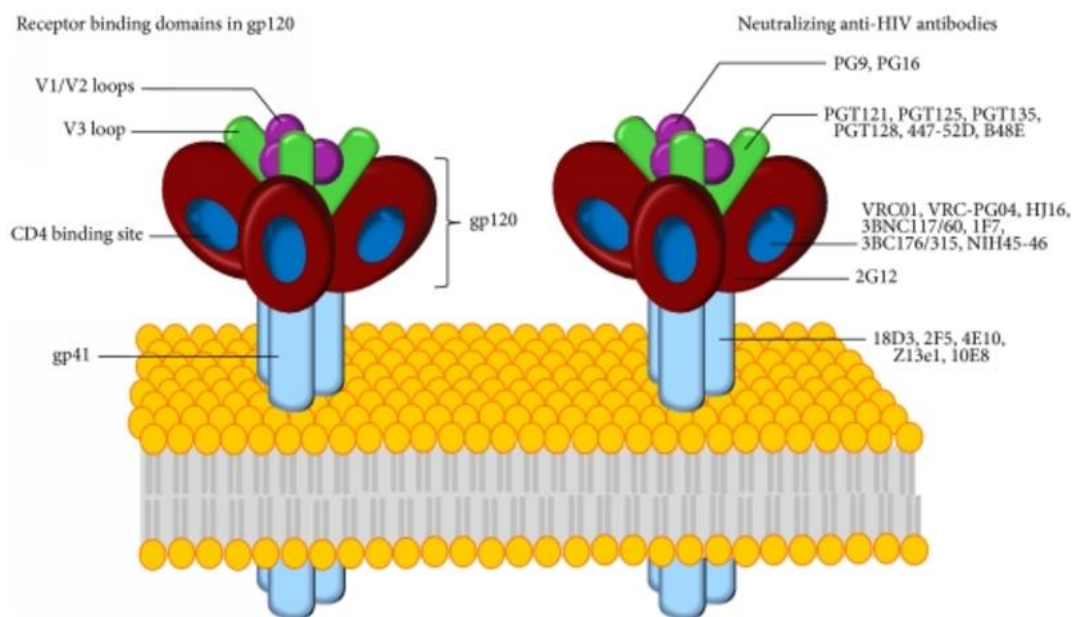


Figura 6. Locais de ligação na gp120 e anticorpos neutralizantes associados [42].

O core da gp120 não possui os *loops* variáveis V1/V2 e V3, bem como as sequências amino e carboxi-terminais, que interagem com a glicoproteína gp41, e é enzimaticamente desglicosilada [34]. Apesar destas modificações, o core da gp120 liga-se aos CD4 e a anticorpos contra epítopos CD4BS e CD4i [34], mantendo a integridade estrutural.

Assim, a elevada variabilidade dos *loops* das regiões hipervariáveis da gp120 e a sua capacidade de resguardar tridimensionalmente as regiões conservadas até ao contacto com o receptor CD4 é crucial para o vírus conseguir escapar ao reconhecimento imunológico do hospedeiro, destacando a região V3 da gp120 do VIH-1, altamente exposta e acessível durante o processo de infeção, que tem sido relatada como envolvida no tropismo celular através da promoção da ligação a co-receptores, tanto CCR5 como o CXCR4, para a entrada do vírus na célula alvo, sendo alvo de acessibilidade e neutralização para anticorpos específicos para o VIH-1 [20, 39].

Esta região de interesse (V3), intercalada nas regiões C2 e C3, apresenta uma elevada diversidade genética, que se traduz em diversidade de aminoácidos e que, aliada à evolução genética das sequências das glicoproteínas do invólucro, confere uma vantagem ao vírus para conseguir evitar os anticorpos neutralizantes. No VIH-1 não se verifica uma atividade imunossupressora da região C2V3C3. Contudo, sabe-se que a região V3 é determinante na utilização de co-receptores, retendo epitopos antigénicos e neutralizantes, que são expostos aquando da ligação ao receptor CD4, sendo extremamente imunogénica *in vivo* [20, 43].

1.3.4 Diversidade genética associada ao VIH-1

O VIH está entre os agentes patogénicos mais variáveis na espécie humana e desde o seu aparecimento em África que o VIH-1 tem sofrido constante evolução devido à variabilidade genética inerente ao retrovírus e à crescente globalização da sociedade [3, 18].

A circulação de certos subtipos nas mesmas áreas geográficas, permitiu a coinfeção de indivíduos por vírus de diferentes subtipos resultando na criação de formas recombinantes, caracterizadas por terem sequências distintas no seu genoma correspondente a sequências consenso de diferentes subtipos criando mosaicos de genomas denominados CRF (*Circulating Recombinant Forms*). Cabe assim saber se estas formas recombinantes são resultado de apenas processos de deriva genética ou se apresentam alguma vantagem replicativa e, se tal se verificar, saber o que confere essa vantagem permitindo a evolução do vírus e a interação com o hospedeiro [18].

Por outro lado, o genoma do vírus modifica-se rapidamente dentro do hospedeiro devido à alta taxa de erros da transcriptase reversa, recombinação, mutações e rearranjos, sendo que não há uma enzima a corrigir os erros durante a retrotranscrição de RNA para DNA [22]. Assim, o mecanismo mais comum de variabilidade genética ocorre aquando da infeção de uma célula alvo, na qual a transcriptase reversa sintetiza as cadeias de DNA a partir das cadeias de RNA genómico, alternando entre as duas informações, sendo que caso estas sequências sejam divergentes podem resultar numa nova recombinação genética [18, 22, 39].

As regiões hipervariáveis do *env* são as zonas onde as mutações ocorrem mais facilmente, estando mais expostas ao sistema imunitário. Tendo em conta que os anticorpos são dirigidos a estas regiões, a mutação das mesmas constitui um mecanismo de fuga à neutralização imunológica [13].

1.4 Patogénese do VIH-1: curso natural de infeção

A patogénese da infeção pelo VIH-1 e a progressão para a SIDA são consequências das propriedades deste retrovírus e da resposta imunitária mediada pelo hospedeiro, onde o equilíbrio entre a eficácia destes dois fatores determina o resultado da infeção, desde o surgimento da doença até à sobrevivência a longo prazo [18, 25].

A replicação do VIH-1 ocorre no interior das células infetadas, mais frequentemente, células do sistema imunitário local (por exemplo, células T, macrófagos, células dendríticas), mas também células da mucosa vaginal ou colorretal [25].

1.4.1 Transmissão, mecanismos de disseminação e sintomas

Tendo em conta que atualmente a infeção por VIH permanece sem cura, a melhor abordagem para tentar minimizar o seu impacto passa por intervenções direcionadas para reduzir a transmissão do vírus [44].

A transmissão é feita através do contacto com determinados fluídos orgânicos: sémen, fluído vaginal, sangue (partilha de seringas/agulhas contaminadas e transmissão vertical na gravidez) e leite materno (transmissão vertical na amamentação) [13].

O VIH pode ainda encontrar-se nas lágrimas, no suor e na saliva de uma pessoa infetada, contudo, a quantidade de vírus aí existente não é suficiente para conseguir ser transmitido, visto que a transmissão do VIH está altamente dependente das propriedades biológicas do vírus isolado, da sua concentração no fluído corporal infetado e da suscetibilidade do hospedeiro [25, 45].

1.4.2 Caracterização da resposta imunitária

No decorrer da infeção pelo VIH, o sistema imunitário do indivíduo infetado produz, entre outras proteínas, anticorpos contra o vírus. O curso natural de infeção está esquematizado na Figura 7, começando com a fase aguda, que compreende os eventos imediatamente após a exposição e transmissão, no qual ocorre o crescimento viral do VIH-1, replicando-se na mucosa, submucosa e tecidos linforeticulares drenantes, não sendo detetado no plasma. Esta fase é denominada de eclipse, durando geralmente cerca de 7 a 21 dias, com disseminação viral pelo hospedeiro [45].

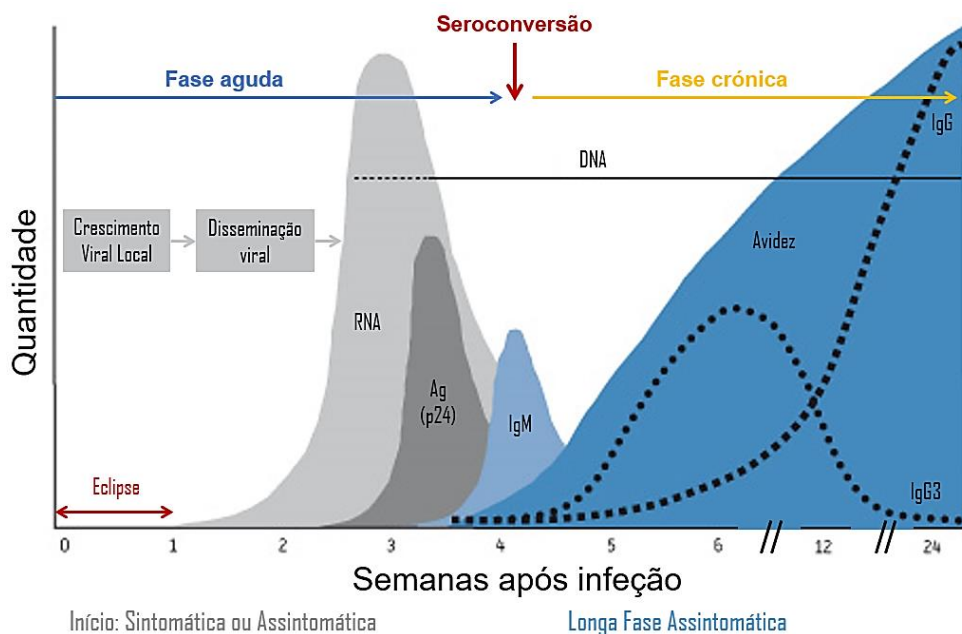


Figura 7. Evolução típica durante as primeiras semanas dos principais marcadores virais e sorológicos após a infeção pelo VIH-1 [46].

Ocorre assim um aumento da concentração do RNA viral, que pode ser detetado por meio de ensaios clínicos quantitativos usados para monitorizar a carga viral, com concentrações superiores a 50 cópias de RNA por mililitro de plasma. Durante esta fase,

observam-se diversos marcadores virais e anticorpos no sangue, o que coincide com o pico da virémia no plasma, ao fim de 3 a 4 semanas após a infecção, sendo nesta fase que os indivíduos infetados começam a sentir sintomas, normalmente semelhantes a uma síndrome gripal [45].

Independentemente da via de transmissão, existem determinados tipos de células expostos à infecção precoce, como os linfócitos T CD4⁺, as células de Langerhans e as células dendríticas. O aumento do número de cópias do RNA viral provoca a destruição irreversível dos reservatórios de células T auxiliares e o estabelecimento do período de latência viral, no qual ocorre a integração silenciosa do DNA do VIH-1 no genoma da célula, bloqueando a ação do sistema imunitário [45].

Numa infecção recente, nos primeiros dias após o início da virémia, o antígeno p24 (p24Ag) é geralmente detetável. Porém, à medida que o sistema imunitário inicia uma resposta, os níveis do vírus e de p24 decrescem, tornando-se indetetáveis até cerca de 10 anos depois, quando se progride para um estado de degradação do sistema do hospedeiro associada à progressão de uma doença oportunista. Na maioria dos casos, o RNA permanece detetável, embora em níveis muito mais baixos do que na fase aguda, sendo que a presença de p24Ag e/ou altos níveis de RNA após o período de seroconversão são geralmente indicativos da progressão rápida da doença. A resposta imunitária inicial é tipicamente assegurada pelos IgM, geralmente atingindo o pico máximo entre 1 a 2 semanas e caindo depois para níveis basais [46].

Apesar da enorme variabilidade das formas recombinantes do VIH-1, estas possuem comportamentos biológicos e clínicos muito semelhantes entre si, resultando num mesmo padrão clínico, embora com ligeiras diferenças, relativamente à velocidade de progressão da SIDA, que é mais rápida em indivíduos infetados com o subtipo D do que com o subtipo A. Uma análise comparativa das posições do gene *env* apresentando seleção positiva em vários subtipos do grupo M e do grupo O indicou que as regiões selecionadas eram as mesmas nos diferentes grupos e subtipos, destacando a proteína gp120 dos subtipos B e C, para as quais foram sugeridos arranjos estruturais diferenciais na região C3-V4 da proteína [18].

1.4.3 Papel dos anticorpos na infecção do VIH-1

Com a infecção pelo VIH, o sistema imunitário produz anticorpos contra o vírus, os quais são detetáveis no sangue através da realização de testes simples, sendo que quando os resultados são positivos, considera-se que a pessoa infetada é seropositiva. Contudo, o indivíduo pode não exibir quaisquer sintomas da doença, aparentando um estado saudável durante um período de tempo que pode atingir vários anos, com o vírus presente no organismo e capaz de ser transmitido a outra pessoa [47].

Existe, assim, toda uma interação mediada por respostas imunitárias inatas e humorais que atuam de forma a tentar prevenir a infecção ou controlar a replicação viral. Um dos fatores importantes nestas respostas é a presença de anticorpos neutralizantes (NAbs), os quais são direcionados para os antígenos do invólucro viral gp120 e gp41, por estarem envolvidos na entrada do vírus na célula hospedeira e por poderem bloquear e prevenir a infecção, através da sua ligação a regiões específicas presentes nestas glicoproteínas, no qual a região V3 do domínio C2V3C3 é um dos alvos preferenciais dos NAbs [48].

Tendo em conta que ainda não foi formulada uma proteção contra VIH, o papel dos anticorpos neutralizantes na imunidade protetora contra VIH-1 não é totalmente conhecido. No entanto, tendo em conta o comportamento dos mesmos face a outros vírus, assume-se que NAbs têm um papel na proteção contra a infecção por VIH-1. Anticorpos capazes de neutralizar VIH-1 desenvolvem-se após alguns anos [6]. Contudo, a imunização com formas monoméricas da gp120 do HIV-1 induz anticorpos que neutralizam vírus adaptados a linhas de células T (T-cell line-adapted – TCLA) [6], mas que têm apenas uma atividade neutralizante marginal contra isolados primários do HIV-1 [6].

Anticorpos monoclonais (MAbs) que melhor neutralizam isolados primários podem-se ligar à gp120, mas tem sido sugerido que a capacidade neutralizante desses anticorpos se correlacione mais com a eficiência de ligação a epitopos expostos na forma oligomérica da gp120, uma vez que a mesma se assemelha mais à estrutura nativa de gp120/gp41 do VIH-1 [6].

Em estudos de depleção de anticorpos, os anticorpos que se ligaram a epitopos lineares e dependentes da conformação da gp120 ou ao péptido da região V3 da gp120 foram descritos como tendo um papel na neutralização de vírus adaptados [6]. Observou-se também que os anticorpos anti-gp120 são capazes de neutralizar isolados primários de VIH-1. Estes resultados sugerem que os epitopos relevantes na neutralização do VIH-1 se localizem nas glicoproteínas do Env e que a otimização da apresentação destes epitopos nas vacinas possa melhorar a sua imunogenicidade. De notar que caso não haja ligação aos epitopos, tal pode dever-se à reduzida acessibilidade aos mesmos ou à sua baixa concentração.

O local de ligação do co-receptor não é exibido até após a ligação do CD4. Isto sugere que este mesmo local possa ser suscetível ao reconhecimento dos anticorpos. Vários estudos demonstraram que estirpes de VIH que não precisem do CD4 para entrar na célula são altamente sensíveis à ação dos anticorpos neutralizantes [35]. Devido à pressão seletiva dirigida por anticorpos neutralizantes *in vivo*, a prevalência destas estirpes é geralmente baixa. Contudo, na ausência de anticorpos neutralizantes em circulação, estes vírus podem ocorrer mais frequentemente [35].

Segundo estudos anteriores, os anticorpos monoclonais humanos ligam-se exclusivamente à gp120. Por outro lado, a gp120 possui epitopos para dois anticorpos monoclonais, b12 e 2G12, capazes de neutralizar um largo espectro de vírus primários, sendo b12, até à data do artigo em questão, o anticorpo anti-gp120 com maior nível de potência neutralizante e mais abrangente [35].

Outro local que tem despertado interesse na gp120 é o epitopo localizado na região V3, reconhecido pelo anticorpo 447-52D [35, 49]. A sequência dos epitopos onde se ligam estes anticorpos é Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR) e situa-se no centro da região V3. Esta é a sequência predominante em estirpes do subtipo B, levando a região V3 a adoptar uma conformação diferente [35, 49]. Em estirpes não-B a arginina (Arg) é substituída por glutamina (Gln), preservando a conformação em β -hairpin [35]. O anticorpo 447-52D pode ter maior capacidade neutralizante em vírus do subtipo B do que outros anticorpos anti-V3 já descritos, devido à sua forma de interação com a região V3. No entanto, algumas interações entre o 447-52D e a V3 podem dificultar a imunização. A região V3 parece estar inacessível aos anticorpos em certas estirpes do subtipo B [35].

1.4.4 Perspetivas de combate à SIDA: da terapia à vacinação

O VIH continua a ser um problema de Saúde Pública global, com cerca de 1.8 milhões de novos casos de infeção no mundo a cada ano e em que 30% da população infetada não conhece o seu diagnóstico [1].

Apesar de ao longo dos últimos trinta anos os pacientes infetados terem sido sujeitos a terapias antirretrovirais, esta terapêutica somente previne a progressão da doença através da supressão da replicação do vírus, sendo necessário o doseamento da carga viral ao longo de toda a vida do paciente, o que encarta custos elevados, efeitos secundários e resistência mutacional, sendo que apenas uma vacina segura e eficaz permitiria controlar a pandemia global de SIDA. Contudo, existem alguns obstáculos que impedem a sua concretização, como a grande diversidade genética do vírus e também a falta de comparabilidade direta entre os estudos pré-clínicos e os ensaios clínicos, em termos da fórmula vacinal, regimes e programas de administração e análises usadas [50].

Apesar da sua complexidade, um potencial componente mais eficaz das vacinas virais são os anticorpos específicos do vírus, produzidos por indução das células para que inativem ou neutralizem o agente [48]. O facto de ter sido sugerido que as regiões variáveis da gp120 pudessem proteger epitopos reconhecidos eficazmente pelos anticorpos, constitui mais um obstáculo para o desenho de uma vacina [35].

Uma vacina induz a produção de anticorpos neutralizantes específicos para o agente patogénico em causa [6]. Anticorpos que neutralizam isolados primários de VIH-1 surgem durante a infeção, mas são difíceis de obter por imunização com produtos vacinais atuais compostos por formas monoméricas da glicoproteína gp120 do invólucro.

Foi sugerido anteriormente que a gp120 é a estrutura crucial reconhecida pelos anticorpos neutralizantes, tornando o conhecimento das estruturas oligoméricas da gp120 importante no desenvolvimento de vacinas [35].

Estudos anteriores sugerem que a resposta limitada por parte dos anticorpos neutralizantes gerada pelas vacinas baseadas na gp120 possa estar relacionada com a apresentação ineficaz e a consequente baixa acessibilidade a epitopos relevantes [6]. Em

ensaios clínicos recentes a imunização com gp120 recombinante não induziu anticorpos neutralizantes contra múltiplos isolados de VIH-1 [35].

Face a estas dificuldades, duas estratégias abordadas atualmente na indução de anticorpos anti-gp120 amplamente neutralizantes são a reconstituição das espículas do invólucro viral ou o *design* de um antígeno adaptado, tendo por base as interações entre as espículas e os anticorpos neutralizantes e a estrutura da gp120 [35].

2. Material e Métodos

2.1 Expressão das Proteínas

A expressão de polipéptidos recombinantes da região C2V3C3 da gp120 dos subtipos AG, B, C, G e H do VIH-1 foi obtida a partir de colónias de bactérias *E. coli* TOP10, previamente clonadas com fragmentos de DNA da região C2V3C3 dos diferentes subtipos de VIH-1 em estudo.

As colónias bacterianas respeitantes a cada polipéptido foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido¹, contendo 5 µl de ampicilina e 50 µl de glicerol (pré-inóculo), sendo incubado durante a noite numa estufa de agitação orbital (150 rpm) e a 37°C. O pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer, contendo 250 ml de meio LB líquido e 250 µl de ampicilina, e foi incubado a 250 rpm e a 37°C.

O crescimento da cultura bacteriana foi monitorizado através de leituras de densidade ótica a 600nm (DO₆₀₀) num espectrofotómetro (*ThermoFisher Scientific*), tendo a incubação sido interrompida quando o crescimento bacteriano atingiu um valor de DO de 0,8.

A síntese proteica foi induzida com 2.5 ml de isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG) a 100mM (*Sigma-Aldrich*), para se obter uma concentração final de 1mM. Após uma incubação de 2 horas a 37°C e a 250 rpm, centrifugou-se a cultura durante 10 minutos a 4°C, a 3800rpm, de forma a sedimentar as células e descartou-se o sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 5 ml de guanidina (9M), num agitador horizontal durante 15 minutos à temperatura ambiente, promovendo a lise da membrana e a consequente libertação dos polipéptidos produzidos [51]. Centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 4°C, a 3800 rpm e recolheu-se e guardou-se o sobrenadante a -20°C.

¹ (a constituição dos meios e soluções encontra-se descrita no Anexo 2)

2.2 Purificação Proteica

A purificação dos polipéptidos foi realizada por imunoafinidade, utilizando partículas magnéticas “Dynabeads” revestidas com anticorpos específicos para regiões de histidinas.

O sobrenadante da cultura foi diluído 1:1 em tampão fosfato salino (PBS) e transferido para tubos tipo Falcon de 15 ml contendo 200 µl de partículas magnéticas. Os tubos foram colocados num agitador orbital, à temperatura ambiente, por 10 minutos, ocorrendo a ligação entre as esferas e os péptidos com regiões de histidinas. Colocou-se os tubos no Magnet (*DynaMag by ThermoFisher Scientific*) e descartou-se o sobrenadante, obtendo apenas com as esferas com as proteínas. Procedeu-se a quatro lavagens com 1 ml de tampão (PBS), e colocou-se os tubos no agitador orbital durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante após levar ao Magnet. Após a última lavagem adicionou-se 500 µl de tampão de eluição (tampão imidazole a 0.3M), responsável pela quebra da ligação entre os anticorpos presentes nas esferas e as caudas de histidina nos péptidos. Para tal, levou-se a agitar 5 minutos no agitador orbital. Por último, colocaram-se os tubos no Magnet e recolheu-se o sobrenadante contendo os polipéptidos. Guardou-se o sobrenadante a -20°C.

2.3 Quantificação Proteica

O doseamento proteico foi realizado segundo o método colorimétrico de Bradford em microplacas de 96 poços e de acordo com o protocolo “Quick-Start” [52], permitindo a determinação da concentração proteica numa determinada amostra.

Determinou-se uma curva-padrão a partir de diferentes concentrações da proteína BSA (albumina de soro bovino). O reagente de Bradford possui o componente corante Coomassie Brilliant Blue G-250, que se torna azul quando se liga à arginina e aos aminoácidos aromáticos, permitindo, através da medição da absorvância, determinar a concentração proteica [53, 54].

Utilizou-se, em triplicado, concentrações de 1,25 a 20 µg de BSA/ml e obteve-se a seguinte equação da recta: $y = 0,0239x + 0,389$, em que x corresponde à concentração da proteína e y à absorvância lida a 595nm.

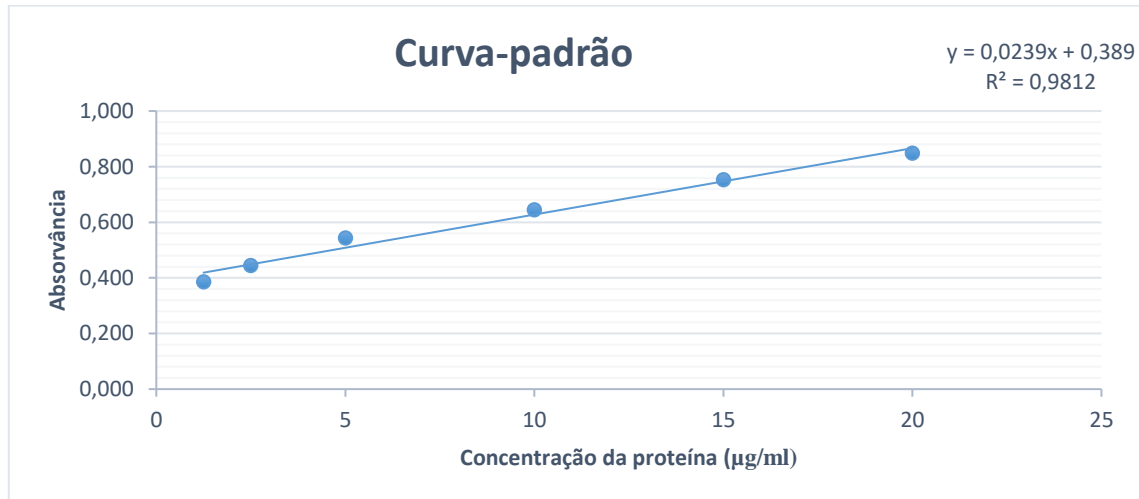


Gráfico 1. Curva-padrão obtida com base na absorvância versus concentrações de albumina de soro bovino.

Para o doseamento dos péptidos recombinantes adicionou-se em poços da microplaca 150 µl de água destilada e 150 µl do reagente de Bradford, sendo denominada como “branco”. Noutros poços, adicionou-se 125 µl de água destilada, 25 µl da solução proteica purificada e 150 µl do reagente de Bradford, lendo-se a absorvância a 595nm num espectrofotómetro (*Bio-Rad*).

Para a determinação da quantidade de proteína purificada, descontou-se o valor da absorvância do “branco”, ao valor da absorvância da amostra proteica. Substituindo as absorvâncias obtidas na equação da recta, foi possível dosear os péptidos.

Após a utilização final das bactérias, procedeu-se ao congelamento a -80°C das mesmas. Para tal, a 500 µl de meio LB líquido, num tubo de congelação, juntou-se uma ançada de bactérias e posteriormente 500 µl de glicerol a 50%.

2.4 Antigenicidade dos Péptidos por ELISA

O teste ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”) consiste na adsorção do antígeno ao fundo do poço da microplaca, sendo posteriormente reconhecido pelo anticorpo específico. Este complexo será reconhecido por um anticorpo conjugado com uma enzima que, na presença do respetivo substrato, emitirá cor, permitindo analisar a presença de anticorpos específicos para o antígeno em estudo.

O objetivo deste passo reside em avaliar a antigenicidade dos polipéptidos recombinantes da região C2V3C3 de vários subtipos de VIH-1. Os plasmas de 406 indivíduos portugueses, infetados com VIH-1, recolhidos em Lisboa, no Hospital de Egas Moniz e no Hospital de Santa Maria foram analisados através de um teste ELISA indireto (Figura 8). Os respetivos plasmas foram também testados contra os péptidos 3S e EC26 provenientes da gp41 do VIH-1.

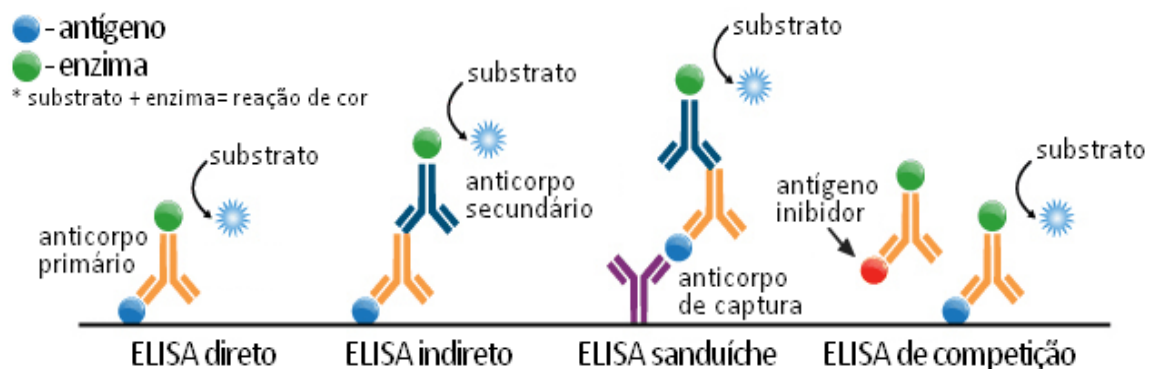


Figura 8. Diferentes tipos de ELISA [55].

Os poços da microplaca de poliestireno (*InterMed Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp*) foram inicialmente forrados com 100 μ l dos péptidos recombinantes provenientes da região C3V3C3 da gp120 dos subtipos AG, B, C, G e H de VIH-1, a uma concentração de 5 μ g/ml em tampão bicarbonato de sódio. A microplaca foi guardada a 4°C durante a noite.

Após a adsorção dos péptidos, lavou-se 2 vezes (*Microplate Washer by Biotek*) com tampão de lavagem, o tampão Tris salino (TBS), contendo 0.05% Tween-20 (TBS-T). Adicionou-se 150 µl de bloqueante (gelatina a 1% em tampão TBS) a cada poço e incubou-se durante 1 hora, à temperatura ambiente, sendo a principal função do bloqueante a de evitar que ocorram ligações inespecíficas [56].

Lavou-se novamente a microplaca (3 vezes) e adicionou-se 100 µl de cada plasma (diluído 1:100 em TBS-T com 0.1% de gelatina) a cada poço. Deixou-se a incubar durante 1 hora, a temperatura ambiente, permitindo a ligação entre o antigénio e os anticorpos específicos presentes nas amostras. O controlo negativo consiste numa mistura de 10 plasmas de indivíduos negativos (não infetados com VIH-1).

Lavou-se a microplaca (5 vezes) e adicionou-se a cada poço 100 µl de anticorpo de cabra anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:2000 em TBS-T com 0,1% de gelatina) (*Sigma-Aldrich*).

Após a incubação de 1 hora à temperatura ambiente, lavou-se a microplaca (5 vezes) e adicionou-se a cada poço 100 µl de substrato da enzima (p-nitrofenilfosfato) (*Sigma-Aldrich*). Depois de 15 minutos de incubação no escuro leu-se a absorvância a 405nm num luminómetro (*Microplate Reader Biotek*).

Na presença de anticorpos específicos para o antigénio testado, o resultado será um tom amarelo, de intensidade diretamente proporcional à quantidade de anticorpos ligados ao péptido testado.

Os valores usados para a análise estatística correspondem ao rácio entre a absorvância de cada amostra e o *cut-off*, sendo a reação positiva para rácios superiores a 1. O valor de *cutoff* é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Cut - off} = \text{média dos valores de absorvância dos plasmas negativos} \\ + 2 \times \text{desvio padrão dos controlos negativos}$$

2.5 Atividade Neutralizante

Para a realização dos ensaios de neutralização utilizaram-se células TZM-bl e um painel de pseudovírus constituído por 6 estirpes de VIH-1 tier 2 e um isolado tier 1 [57]. Os pseudovírus utilizados correspondem a subtipos de VIH-1 distintos e provenientes de diferentes locais (Tabela 2) [58, 59]:

Tabela 2. Características dos isolados de VIH-1. Estágio de infeção da amostra da qual o vírus foi isolado: E (precoce), estágios de Fiebig I a IV; I (intermediário), estágios de Fiebig V e VI; L (tardia), estágio de Fiebig VI a crónico.

Tier	Referência original do isolado	Referência comum do isolado	Origem	Subtipo	Estadio
1	HIV-1 _{NL4.3}	pNL4.3		B	
	246_F3_C10_2	246F3	Tanzânia	AC	I
	BJOX002000.03.2	BJOX2000	China	CRF07_BC	E
	PCH119.10	PCH119	China	CRF07_BC	L
2	PCE1176_A3	PCE1176	Malawi	C	E
	TRO.11	TRO11	Itália	B	E
	PCE703010217_B6	PCE0217	Malawi	C	I

Numa primeira fase, testou-se o pseudovírus pNL4.3 contra 276 plasmas (da mesma população) selecionados com base na reatividade dos plasmas contra os polipéptidos, sendo 245 provenientes de indivíduos sob terapia antirretroviral e 31 *drug naïve*. Ensaio com vírus tier 1 permitiram detetar anticorpos neutralizantes presentes nas várias amostras [60], pelo que foram selecionados 39 plasmas sob terapia antirretroviral para prosseguir a análise da atividade neutralizante de cada plasma com vírus tier 2.

2.5.1 As células TZM-bl

A linha celular TZM-bl, designada anteriormente de JC53-bl, corresponde a uma linha de células HeLa positiva para CXCR4 e modificada de forma a expressar CD4 e CCR5 [60, 61]. No entanto, TZM-bl, derivada de JC.53, contém várias cópias integradas

dos genes da luciferase e da β -galactosidase, sob o controlo de um promotor proveniente de VIH-1 [62], sendo estes os genes-reporter possíveis.

É uma linha celular utilizada frequentemente em ensaios de neutralização de VIH [60], por ser permissiva a vários tipos, incluindo isolados primários e pseudovírus.

As células são conservadas em azoto líquido, num criotubo contendo DMSO (sulfóxido de dimetilo - *Sigma-Aldrich*) e soro fetal (1:24). Para o descongelamento das células, colocou-se por breves segundos o tudo em banho maria a 37°C. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, ressuspendeu-se as células, transferindo-as para 30 ml de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - *Sigma-Aldrich*) previamente aquecido. Centrifugou-se durante 6 minutos a 1000 rpm, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 5 ml de meio DMEM completo (suplementado com 10% soro bovino fetal, 1% L-glutamina e 0.5% penicilina/streptomicina), também aquecido anteriormente.

As células foram colocadas num frasco de crescimento T25 e prefez-se até 8 ml com o mesmo meio. O frasco foi incubado na estufa (*ThermoFisher Scientific*) por cerca de 72 horas, nas condições óptimas de crescimento das células: 37°C, 5% CO₂ e 95% de humidade.

Após 72 horas de crescimento, as células apresentam-se em camada, aderidas à parede e fundo do frasco e entre si. Descartou-se o meio, adicionando-se depois 5 ml de tampão PBS (10 ml nas passagens seguintes) e agitou-se o frasco, permitindo a lavagem das células. Removeu-se o tampão e adicionou-se 3.5 ml de tripsina (5 ml nas passagens seguintes), que tem como função promover o desagregamento das células. Após 90 segundos de incubação a temperatura ambiente, removeu-se a tripsina e incubou-se o frasco durante 4 minutos a 37°C. Por fim, ressuspendeu-se as células em 5 ml de meio DMEM completo (10 ml nas passagens seguintes) e procedeu-se à contagem das células.

Para a contagem das células, misturou-se, num micropoço, 90 μ l de uma solução corante azul tripiano (*Bio-Rad*) e 10 μ l da suspensão celular, colocando posteriormente 10 μ l dessa mistura na câmara de Neubauer, previamente preparada. Através de um microscópio ótico (*Biomed*), contou-se o número de células presentes em cada um dos quadrantes representados na Figura 9 com a letra W. A partir da contagem estimou-se o

número de células existente por cada ml de meio no frasco, sendo o objetivo transferir cerca de 1 milhão de células para o novo frasco de crescimento (agora T75), contendo 12 ml de meio DMEM completo.

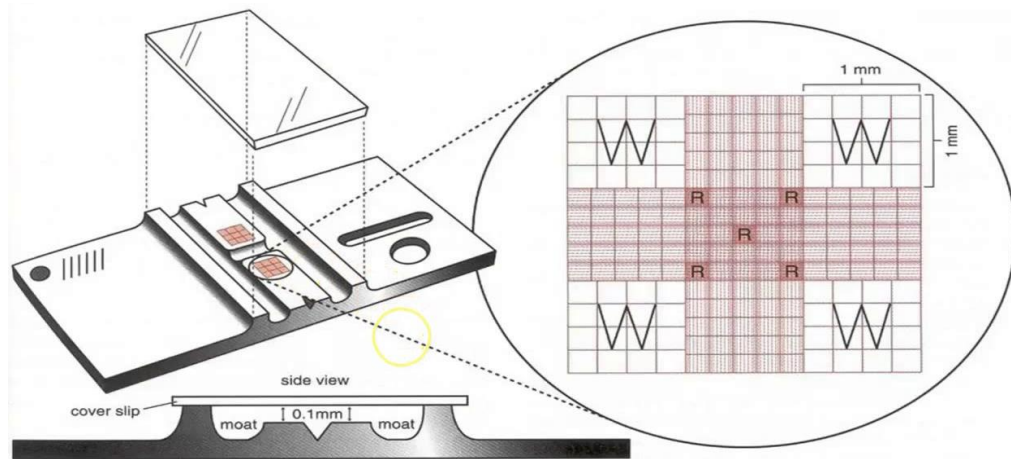


Figura 9. Esquema da câmara de Neubauer, utilizado para a contagem de células [63].

Ao fim da terceira passagem, estima-se que as células estejam no seu ponto ótimo para os ensaios de neutralização. Preparou-se a microplaca de 96 poços (BioLite 96 Well Multidish - *ThermoFisher Scientific*), colocando 100 μ l da suspensão de células em cada um dos poços (corresponde a aproximadamente 10 mil células por poço). Incubou-se a microplaca na estufa, até as células atingirem cerca 70% de confluência (último segmento da Figura 10).

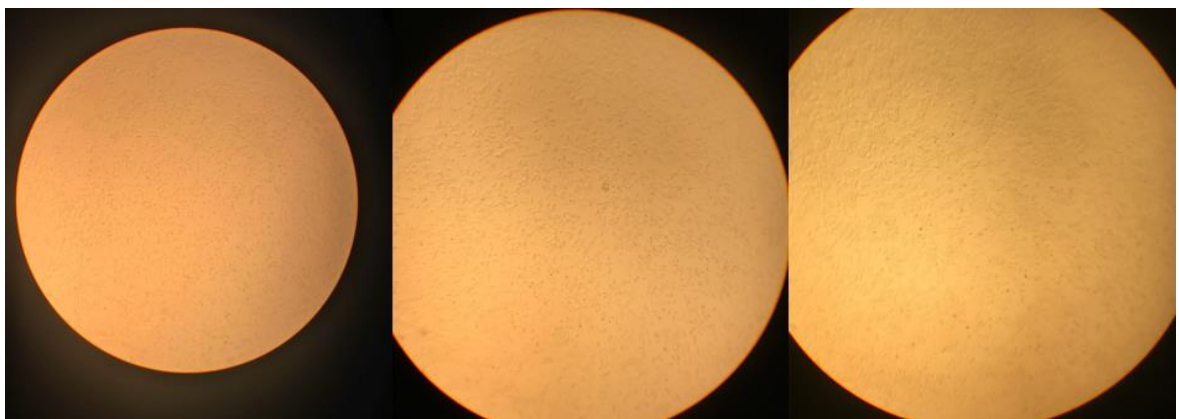


Figura 10. Células T2M-bl após 24, 48 e 72 horas de crescimento.

2.5.2 Ensaio de Neutralização

Neste ensaio pretende-se avaliar a presença de anticorpos neutralizantes nos plasmas dos indivíduos infetados pelo VIH-1. Como tal, ocorre interação entre os anticorpos específicos e o vírus. Diz-se que o vírus é neutralizado quando há uma redução na capacidade do vírus infetar as células.

Começou-se por colocar os plasmas em banho maria a 56°C, por 30 minutos, de forma a promover a inativação de proteínas ou de intervenientes do sistema complemento que pudessem interferir com o ensaio.

De notar que todo o meio de cultura usado neste ensaio é meio DMEM completo, suplementado com Dextran a 19.6 µg/ml, que promove o aumento da infeção das células por parte dos vírus. Esta concentração ótima foi verificada a partir de ensaios baseados em diluições sucessivas deste reagente, em que a concentração ideal promovesse a infeção de 50% das células ao fim de 48h de incubação nas condições ótimas de crescimento das células TZM-bl.

A microplaca inclui poços que terão apenas células (CC) e poços que terão células e vírus (mas sem anticorpo) (CV), servindo de controlo do ensaio. Os restantes poços, como representado na Figura 11, estão destinados aos diferentes plasmas em estudo, analisados em duplicado (S), incluindo uma pool de plasmas negativos para VIH-1, que serve de controlo negativo (CN). Assim sendo, numa primeira fase, ocorre a interação entre vírus e anticorpos numa nova microplaca, sendo adicionado a cada poço 125 µl de meio, 2.5 µl de plasma (1:100) e 125 µl de vírus em meio. Os poços destinados ao controlo do crescimento celular (CC), levam apenas 250 µl de meio e os poços do controlo da infeção (CV) levam 125 µl de meio e 125 µl de vírus em meio. A microplaca foi incubada na estufa, nas condições ótimas de crescimento das células por 1 hora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	CV	S1									
B	CC	CV	S1									
C	CC	CV	S2									
D	CC	CV	S2									
E												
F												
G												CN
H												CN

Figura 11. Esquema da microplaca usado nos ensaios de neutralização.

Após o período de incubação, removeu-se o meio presente na microplaca onde se procedeu ao crescimento celular e as alíquotas da mistura de vírus e anticorpos foram adicionadas às células TZM-bl, agora por 48 horas nas mesmas condições.

A atividade neutralizante de cada plasma foi determinada através de uma leitura da luminescência, de acordo com o protocolo “Procedure for Firefly Luciferase Glow Assay” (Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay Kit - *Thermo Scientific*) [64]. Para tal, removeu-se 170 µl de sobrenadante de cada poço e de adicionou-se 60 µl de substrato da luciferase, homogeneizando-se. Depois de incubar a microplaca num local sem luminosidade e à temperatura ambiente por 2 minutos, transferiu-se 85 µl de cada poço para uma nova microplaca (96-well Flat Clear Bottom White Polystyrene TC-treated Microplates - *Costar*). Leu-se a luminescência no luminómetro (*Microplate Reader Biotek*) a um comprimento de onda de 613nm.

As células TZM-bl contêm uma alteração no seu genoma, tendo sido inserido o gene para a expressão da enzima luciferase, gene repórter neste ensaio, com cerca de 62kDa [60]. Isto faz com que o substrato utilizado seja degradado, emitindo luminescência. Portanto, a atividade da luciferase é quantificada em RLUs e é diretamente proporcional ao número de partículas virais presentes no meio, sendo possível determinar a percentagem de neutralização de determinado vírus para cada plasma a partir da fórmula [60]:

$$\text{Neutralização (\%)} = \left(1 - \frac{S-CC}{CV-CC}\right) \times 100$$

S: média da absorvância da amostra (células, vírus e plasma); CC: média da absorvância do controlo das células (células); CV: média da absorvância do controlo dos vírus (células e vírus)

De notar que o ensaio de neutralização só é considerado válido quando a média de RLUs obtida em CV é dez vezes superior à obtida em CC, variando este último valor, num ensaio normal, entre 900 e 1500 RLUs.

3. Resultados e Discussão

A análise teve como objetivo caracterizar a presença de anticorpos de ligação e neutralizantes no plasma de 406 doentes portugueses infetados por VIH-1, contra polipéptidos da região C2V3C3 da gp120 (AG, B, C, G e H) de isolados primários do VIH-1 de Angola. Uma vez que estes plasmas tinham sido anteriormente testados também contra péptidos da gp41 (EC26 e 3S), esses resultados obtidos foram incluídos no estudo. Recolheu-se dados clínicos dos indivíduos que compõem esta população: data da confirmação da infeção, idade, sexo, condição terapêutica (terapia antirretroviral vs ausência de terapia), carga viral e número de linfócitos T CD4⁺.

A análise foi realizada com base nos programas Excel 2013 e GraphPad Prism 5.1.

3.1 Anticorpos de ligação

A população em estudo é composta por 406 indivíduos, dos quais 119 são do sexo masculino e 287 são do sexo feminino. A média das idades é de 48.3 (± 11.3) anos. Destes 406 indivíduos, 372 estão sob terapia antirretroviral e 34 são indivíduos *drug naïve*. As características clínicas gerais acerca da amostra para cada um dos péptidos encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Dados amostrais relativos aos péptidos AG, B, C, G e H da gp120 e EC26 e 3S da gp41.

Péptido	Reatividade	n(sexo)	n(terapia)		Idade ($\bar{x} \pm \sigma$)	CD4 ($\bar{x} \pm \sigma$)	Carga Viral Detetável ($\bar{x} \pm \sigma$)		
			F	M				c/ART	s/ART
AG	+	n=248	176	72	222	26	48.9 \pm 11.64	631.30 \pm 325.53	3.60 \pm 1.28 (n=61)
	-	n=158	111	47	150	8	47.5 \pm 10.83	663.80 \pm 362.53	3.02 \pm 1.13 (n=42)
B	+	n=208	148	60	188	20	48.3 \pm 11.42	615.86 \pm 316.87	3.61 \pm 1.32 (n=51)
	-	n=197	138	59	183	14	48.4 \pm 11.29	671.17 \pm 361.34	3.12 \pm 1.14 (n=52)
C	+	n=198	142	56	182	16	49.1 \pm 11.95	595.54 \pm 338.91	3.55 \pm 1.26 (n=52)

	-	n=207	145	62	189	18	47.6±10.68	688.35±335.66	3.18±1.23 (n=51)
G	+	n=207	150	57	187	20	49.4±11.46	629.72±380.43	3.55±1.30 (n=54)
	-	n=199	137	62	185	14	47.2±11.12	658.92±350.68	3.17±1.17 (n=49)
H	+	n=224	152	72	204	20	48.5±11.23	606.25±332.50	3.50±1.26 (n=57)
	-	n=181	135	46	167	14	48.1±11.48	687.97±344.67	3.14±1.21 (n=46)
EC26	+	n=47	34	13	42	5	45.4±11.35	701.15±344.11	2.89±1.12 (n=14)
	-	n=359	253	106	330	29	48.7±11.29	636.10±339.57	3.44±1.26 (n=89)
3S	+	n=52	34	18	51	1	47.6±11.16	608.85±380.63	3.19±1.35 (n=17)
	-	n=354	253	101	321	33	48.4±11.37	649.18±334.32	3.40±1.24 (n=86)

Legenda: (+) reatividade positiva; (-) reatividade negativa; (F) feminino; (M) masculino; ($\bar{x} \pm \sigma$) média \pm desvio padrão.

De acordo com a tabela anterior, avaliou-se a antigenicidade de cada um dos péptidos em estudo, definida como a frequência com que os plasmas testados reagiram contra determinado péptido; bem como a reatividade aos péptidos, definida como o número de péptidos a que cada plasma demonstrou reatividade.

3.1.1 Reatividade aos péptidos

Os resultados obtidos nos testes ELISA permitiram a elaboração do Gráfico 2, que demonstra quantos plasmas positivos para VIH-1 reagiram contra determinada quantidade de péptidos provenientes da gp120 e da gp41. Observou-se que 50 plasmas (12.3%) não reagiram contra nenhum péptido e apenas 1 plasma (0.2%) reagiu contra os 7 péptidos, indicando-nos ser este o único plasma com anticorpos de ligação contra todos os péptidos testados. Contra 5 péptidos, houve reação por parte de 91 plasmas (22.4%) e 67 plasmas (16.5%) reagiram apenas contra 2. De uma forma geral, 61.4% dos plasmas testados reage contra 1 a 4 péptidos e 26.3% reage com pelo menos 5 péptidos.

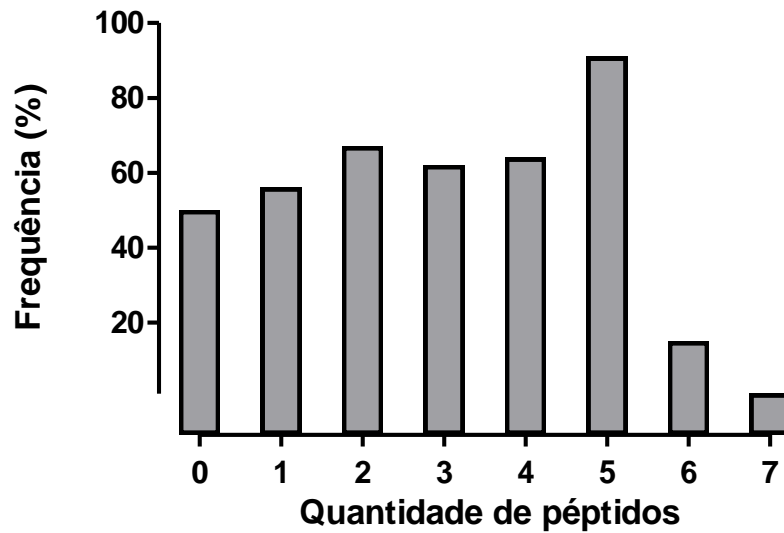


Gráfico 2. Reatividade de plasmas positivos para VIH-1 contra péptidos da gp120 e da gp41.

Tendo em conta a terapia antirretroviral nos resultados obtidos, dividiu-se em dois grupos de estudo: indivíduos sob terapia antirretroviral (C/ART) (n = 372) e indivíduos *drug naïve* (S/ART) (n = 34) e refez-se a análise anterior, conforme apresentado no Gráfico 3.

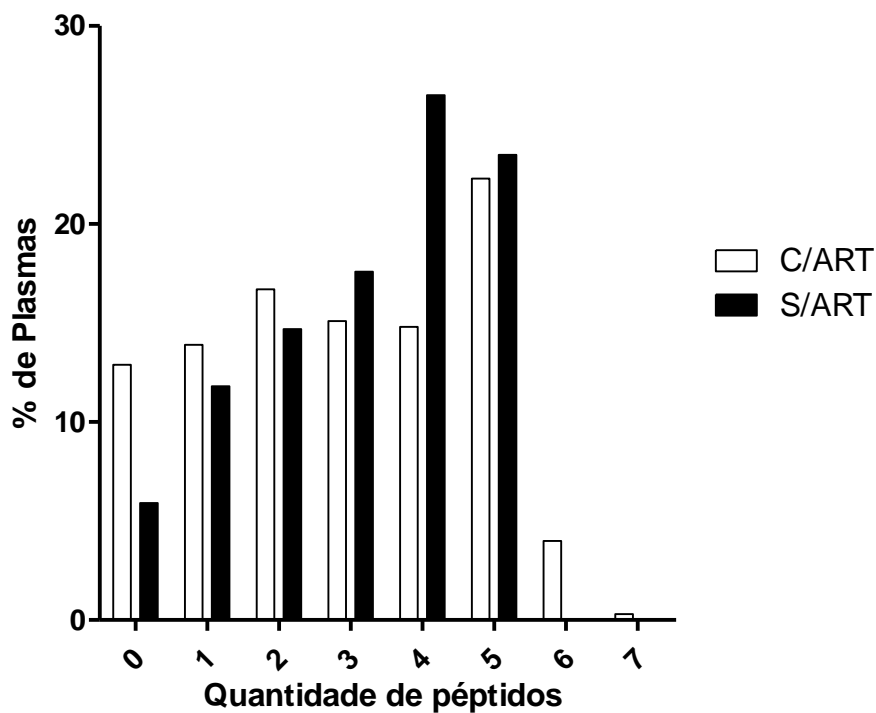


Gráfico 3. Reatividade de plasmas sob terapia antirretroviral (C/ART) e drug naïve (S/ART) a determinado número de péptidos.

De acordo com o Gráfico 3 observou-se que, de entre os plasmas de 372 indivíduos sob terapia antirretroviral, 12.9% (48 plasmas) não reagiu contra qualquer péptido e apenas 0.3% (1 plasma) reagiu contra todos eles. 13.9% dos plasmas reagiu contra apenas 1 péptido, 16.7% contra 2, 15.1% contra 3, 14.8% contra 4, 22.3% contra 5 e 4% reagiu contra 6 péptidos. Relativamente aos 34 indivíduos *drug naïve*, 5.9% (2 plasmas) não reagiu contra nenhum dos péptidos e nenhum plasma reagiu contra 6 ou 7 péptidos. 11.8% dos plasmas reagiu contra apenas 1 péptido, 14.7% contra 2, 17.6% contra 3, 26.5% contra 4 e 23.5% reagiu contra 5 péptidos. Verificou-se, através de testes t, que as médias de reatividade aos péptidos não são significativamente diferentes.

Por outro lado, verificou-se a existência de uma correlação negativa entre a quantidade de péptidos reconhecidos e o número de células T CD4⁺ ($p = 0.012$, $r = -0.1303$).

3.1.2 Antigenicidade dos péptidos

O Gráfico 4 representa a frequência com que os anticorpos anti-C2V3C3 da gp120 e anti-EC26 e anti-3S da gp41 dos 406 indivíduos incluídos no estudo reagiram contra determinado péptido recombinante e as respetivas percentagens, de uma forma geral.

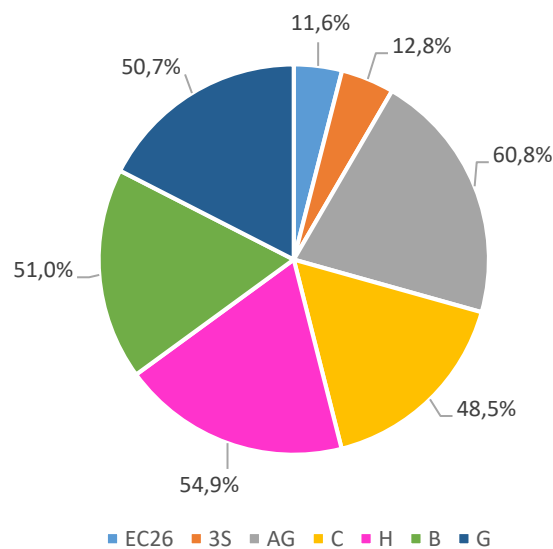


Gráfico 4. Antigenicidade dos péptidos.

Pela análise do gráfico anterior, conclui-se que o péptido mais antigénico é o AG, provocando reação por parte de 60.8% dos plasmas. Verifica-se, também, uma maior

resposta de anticorpos de ligação quando testados contra péptidos da região C2V3C3, do que contra os péptidos EC26 (11.6%) e 3S (12.8%) da gp41.

Refez-se a análise anterior, após a divisão em dois grupos, tendo em conta a terapia antirretroviral, obtendo-se o Gráfico 5A para indivíduos sob terapia antirretroviral (c/ART) e o Gráfico 5B para indivíduos *drug naïve* (s/ART).

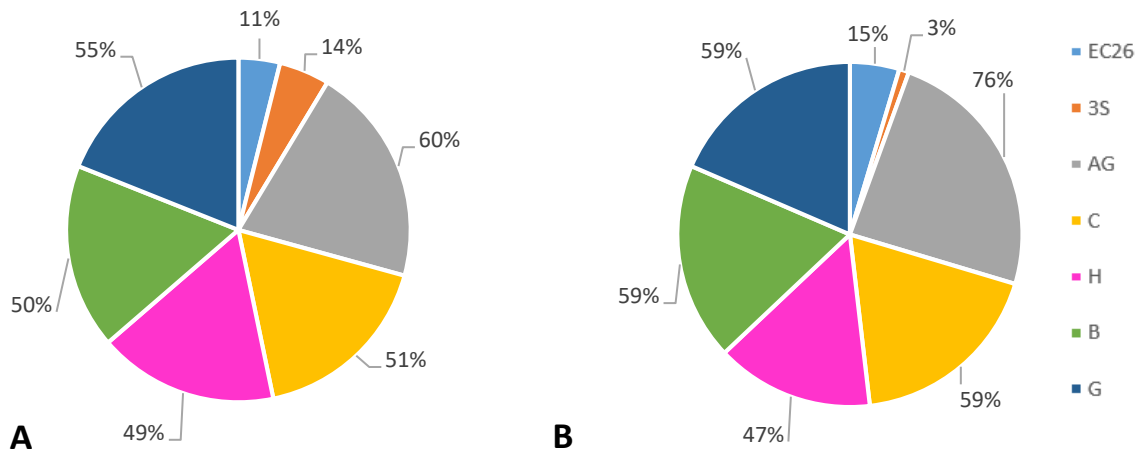


Gráfico 5A e 5B. Antigenicidade dos péptidos da gp120 e da gp41 ao plasma de indivíduos sob terapia antirretroviral (c/ART) (A) e de indivíduos *drug naïve* (s/ART) (B).

Conforme representado nos gráficos anteriores, os resultados são similares aos obtidos na análise geral: o péptido que apresenta maior resposta antigénica é o AG, para o qual 60% dos indivíduos c/ART e 76% dos indivíduos s/ART apresentam anticorpos de ligação. Relativamente aos péptidos da gp41, os resultados continuam a indicar menores níveis de antigenicidade. Os resultados obtidos são suportados pelo facto de os polipéptidos resultantes da região C2V3C3 da gp120 serem compostos por um maior número de aminoácidos que os péptidos resultantes da gp41 [65, 66, 67], levando a que os primeiros tenham mais locais de ligação expostos e, por essa razão, exista uma maior probabilidade de resposta por parte dos anticorpos de ligação aos epitopos disponíveis.

Com base nos valores de OD/Cut-off obtidos para cada um dos péptidos, dentro de cada grupo, construiu-se a Tabela 4 e obteve-se os Gráficos 6A e 6B.

Tabela 4. Reatividade a cada um dos péptidos, comparando indivíduos sob terapia antirretroviral (C/ART) com indivíduos *drug naïve* (S/ART).

C/ ART (n=372)			S/ ART (n=34)	
Péptido	n _{rp}	Nível de absorvância	n _{rp}	Nível de absorvância
EC26	42	1.785[1.203;2.490]	5	2.680[1.465;3.580]
3S	51	2.010[1.280;3.180]	1	2.240
AG	222	1.645[1.268;2.170]	26	1.420[1.193;1.643]
B	188	1.405[1.210;1.698]	20	1.310[1.143;1.630]
C	182	1.385[1.210;1.720]	16	1.275[1.115;1.470]
G	187	1.560[1.240;2.030]	20	1.450[1.278;1.618]
H	204	1.405[1.220;1.798]	20	1.365[1.213;1.623]

Legenda: (n) número de plasmas testados; (n_{rp}) número de plasmas com reatividade positiva contra cada péptido; (Nível de absorvância) mediana [IQR25;IQR75].

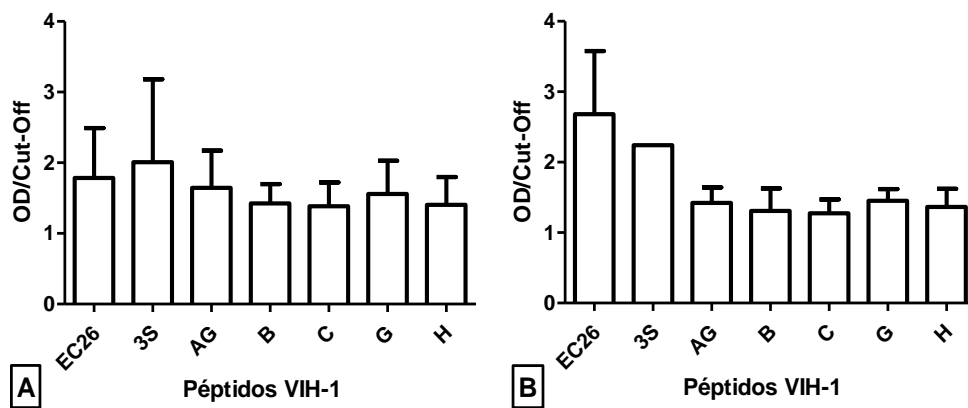


Gráfico 6A e 6B. Reatividade mediana dos plasmas de indivíduos sob terapia antirretroviral (A) e *drug naïve* (B) contra cada um dos péptidos.

Tendo em conta a Tabela 4 e os Gráficos 6A e 6B, observa-se que apesar de os péptidos da gp41 serem aqueles em que se verificou reação por parte do menor número de plasmas, são aqueles em que se observou reações mais elevadas, tanto para indivíduos sob terapia antirretroviral, como para indivíduos *drug naïve*. Este resultado deve-se ao facto de a gp41 ser menos variável que a gp120, proporcionando uma maior afinidade nas ligações entre anticorpos e epitopos [35].

Concluiu-se, também, que há uma correlação estatística entre o número de péptidos reconhecidos e a resposta dos anticorpos de ligação, tanto em pacientes *c*/ART como *s*/ART, sendo os seus valores de $p = 0.000$ e 0.003 , respetivamente.

Realizou-se um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA) para analisar as variâncias dos sete péptidos dentro de cada grupo e um teste t-Student para analisar as variâncias entre o mesmo péptido em grupos diferentes. No grupo dos indivíduos sob terapia há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre os péptidos 3S e B, C e H, e entre os péptidos AG e B, C e H. Relativamente ao grupo *drug naïve*, não se encontrou diferenças significativas entre os péptidos. Comparando o mesmo péptido, entre os dois grupos, o teste demonstra não haver diferenças significativas.

3.1.3 Carga viral versus anticorpos de ligação

A partir dos dois grupos formados anteriormente, com base na terapia antirretroviral, formaram-se dois novos subgrupos, consoante a carga viral. Tem carga viral detetável um indivíduo cuja amostra apresente 20 ou mais cópias de RNA viral/ml.

De forma a compreender o efeito da carga viral na produção de anticorpos de ligação, calculou-se os valores médios de reatividade para cada péptido e representou-se nos Gráficos 7 e 8.

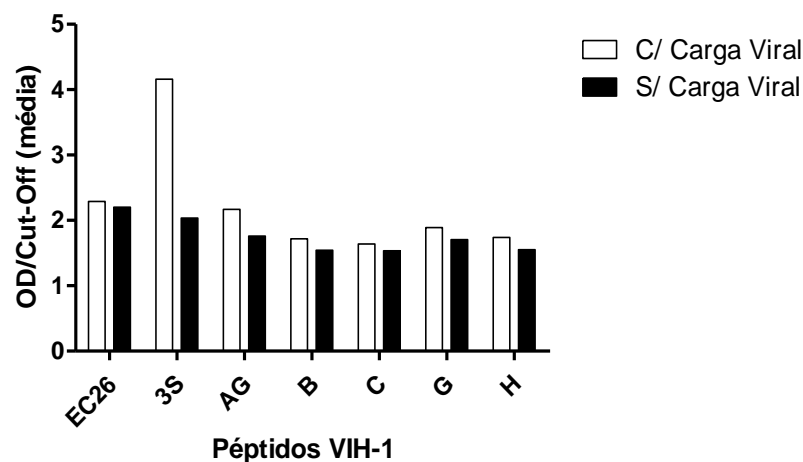


Gráfico 7. Reatividade média dos plasmas provenientes de indivíduos sob terapia antirretroviral aos péptidos, em função da sua carga viral.

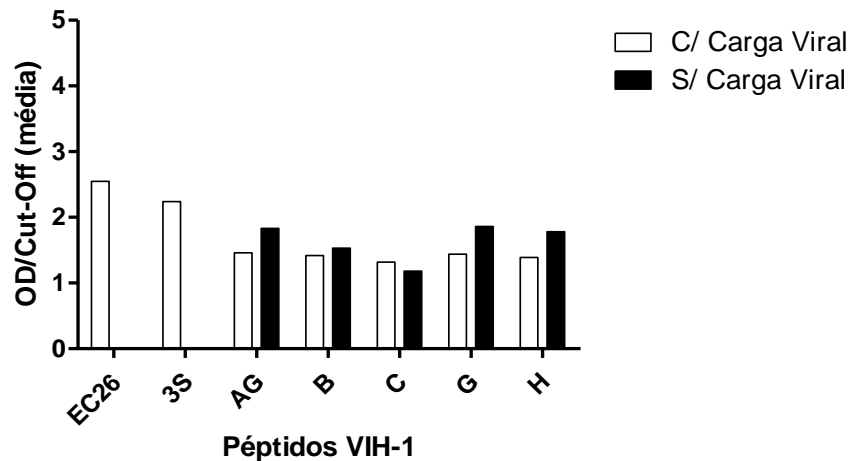


Gráfico 8. Reatividade média dos plasmas provenientes de indivíduos drug naïve aos péptidos, em função da sua carga viral.

Tendo por base o Gráfico 7, é possível observar médias de reatividade superiores no grupo de plasmas com carga viral detetável, sugerindo uma maior produção de anticorpos de ligação neste caso ($p = 0.045$). Por outro lado, o Gráfico 8 não nos permite concluir o mesmo, revelando ainda a ausência de reação contra os péptidos EC26 e 3S em indivíduos sem carga viral detetável e valores médios mais elevados nos mesmos indivíduos face a todos os péptidos da região C2V3C3 da gp120, excepto o péptido do subtipo C.

Analisando a Tabela 5, onde estão presentes as médias e respetivos desvios padrão de reatividade, é possível verificar que apenas na amostra sob terapia antirretroviral há uma correlação entre péptidos e carga viral. Isto é, o aumento de produção de anticorpos de ligação anti-3S ($p = 0.0072$, $r = 0.3719$) e anti-AG ($p = 0.0027$, $r = 0.2001$) está estatisticamente relacionado com níveis de carga viral superiores, obtendo-se valores de p inferiores a 0.05 para estes dois péptidos.

Tabela 5. Valores médios de reatividade dos plasmas C/ART e S/ART e respetivo p value, em função da existência ou não de carga viral detetável.

Grupo de Indivíduos	Péptido	C/Carga Viral ($\bar{x} \pm \sigma$)	S/Carga Viral ($\bar{x} \pm \sigma$)	p value
C/ART	EC26	2.30 ± 1.748	2.20 ± 1.403	0.6058
	3S	4.16 ± 3.471	2.03 ± 1.129	0.0072
	AG	2.17 ± 1.159	1.76 ± 0.726	0.0027

	B	1.72 ± 0.642	1.54 ± 0.547	0.1142
	C	1.64 ± 0.586	1.53 ± 0.568	0.1199
	G	1.89 ± 1.049	1.71 ± 0.654	0.4384
	H	1.74 ± 0.747	1.55 ± 0.525	0.0833
S/ART	EC26	2.55 ± 1.063	Não houve reação	0.3500
	3S	2.24 ± 0	Não houve reação	*
	AG	1.46 ± 0.363	1.83 ± 0.822	0.3651
	B	1.42 ± 0.396	1.53 ± 0.244	0.0582
	C	1.32 ± 0.239	1.18 ± 0	0.3377
	G	1.44 ± 0.197	1.86 ± 1.005	0.7002
	H	1.39 ± 0.228	1.78 ± 0.803	0.6512

Legenda: ($\bar{x} \pm \sigma$) média ± desvio padrão; (*) impossível calcular p value, devido a pares insuficientes (n=1).

3.1.4 Número de células T CD4⁺ versus anticorpos de ligação

De entre os péptidos testados, o péptido 3S é o único em que se verifica uma associação estatística com o número de células T CD4⁺ ($p = 0.0003$). Esta correlação negativa ($r = -0.4842$) indica-nos que indivíduos com maior número de células T CD4⁺ têm níveis de reatividade a este péptido inferiores (Gráfico 9).

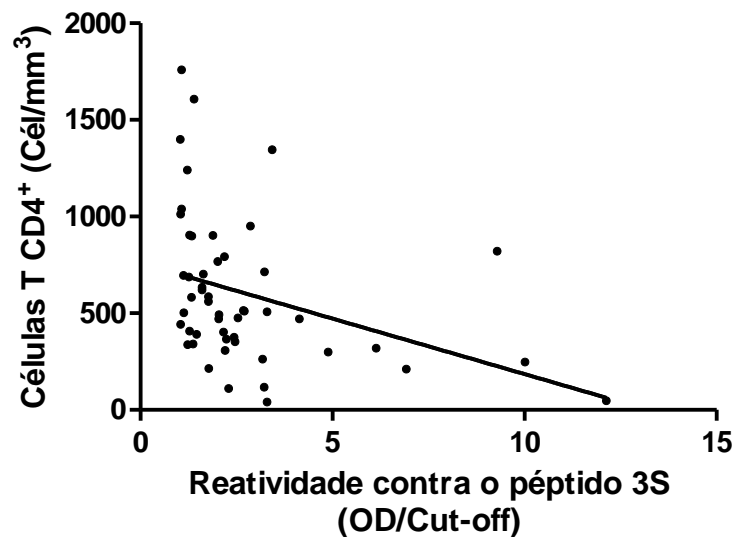


Gráfico 9. Reatividade dos anticorpos anti-3S ao péptido 3S, em função do número de células T CD4⁺.

No entanto, estudos longitudinais anteriores mostram que a produção de anticorpos anti-3S está inversamente correlacionada com a diminuição da depleção das células T CD4⁺ ao longo do tempo. Esta relação é explicada tendo em conta o processo de depleção das células T CD4⁺ mediado pelo péptido 3S: quando o Env, numa célula T CD4⁺ infetada, se liga ao receptor CD4 de uma célula não infetada, o péptido 3S da gp41 interage com o complemento gC1qR da célula T CD4⁺ não infetada. Isto induz uma regulação positiva do ligando NKp44 presente na superfície da célula não infetada, que se liga posteriormente à NKp44 expressa na célula NK. A célula *Natural Killer*, devido à sua atividade citotóxica, leva à depleção da célula T CD4⁺ não infetada, conforme demonstrado na Figura 12 [68]. A discrepância entre os resultados dos dois estudos pode ser explicada pelas diferenças entre as técnicas adoptadas e as respetivas sensibilidades.

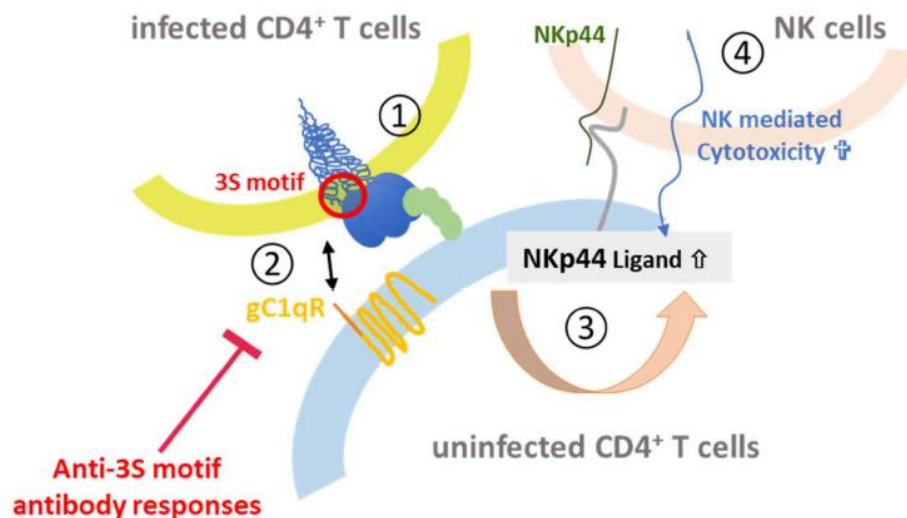


Figura 12. Depleção das células T CD4⁺ mediada pelo péptido 3S [68].

3.2 Neutralização dos vírus

Após a análise dos anticorpos de ligação, resultante dos ensaios ELISA, segue-se a análise dos resultados obtidos nos ensaios de neutralização.

Dos plasmas dos 406 indivíduos testados anteriormente, selecionaram-se 245 plasmas de indivíduos sob terapia antirretroviral e 31 plasmas de indivíduos *drug naïve* para testar contra o pseudovírus tier 1 pNL4.3, tendo sido neutralizado por 86.5% do primeiro grupo e 77.4% do segundo.

Para ensaios de neutralização com vírus tier 2, foram usados 6 pseudovírus que fazem parte do painel de vírus padrão e foram selecionados 39 plasmas de indivíduos sob terapia antirretroviral cujo resultado da neutralização do vírus pNL4.3 foi positivo.

3.2.1 Atividade neutralizante

A Tabela 6 resume os dados obtidos acerca dos ensaios de neutralização, indicando a quantidade de plasmas que reagiram a determinado vírus (frequência), bem como valores médios de neutralização obtidos para cada um dos vírus em estudo.

Tabela 6. Resposta neutralizante dos indivíduos com e sem terapia contra o painel de vírus testados.

Grupo de Indivíduos	Vírus	Plasmas testados (n)	Plasmas com atividade neutralizante (n)	Neutralização média (%)*
C/ART	pNL4.3	245	212	79.40 ± 1.683
	TRO11	39	28	71.13 ± 4.690
	246F3	39	28	74.45 ± 4.397
	PCH119	39	32	72.43 ± 4.330
	PCE1176	39	24	75.32 ± 5.287
	BJOX2000	39	27	76.17 ± 4.449
	PCE0217	39	31	77.90 ± 3.733
S/ART	pNL4.3	31	24	60.21 ± 3.249

Legenda: (n) número de plasmas; (*) neutralização média, em percentagem, dos plasmas com atividade neutralizante.

Numa primeira análise observa-se, pela tabela, que os plasmas sob terapia antirretroviral obtiveram valores médios de neutralização superiores, comparando com os valores obtidos na neutralização do pNL4.3 por parte dos indivíduos *drug naïve* (60%), sendo que os indivíduos c/ART reagiram mais eficazmente quando testados contra o pseudovírus tier 1 (pNL4.3).

Com base no número de plasmas com atividade neutralizante, determinou-se a frequência de neutralização de cada um dos vírus, como representado no Gráfico 10.

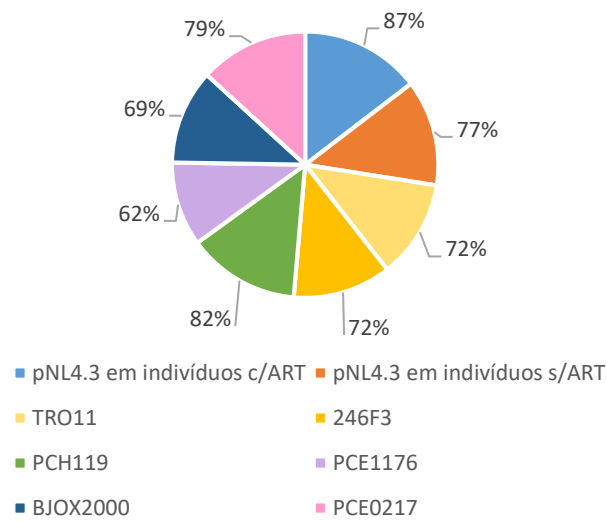


Gráfico 10. Frequência de neutralização de cada vírus.

No gráfico anterior observa-se que o vírus mais neutralizado é o pNL4.3 quando testado com plasmas provenientes de indivíduos sob terapia (87%), seguido pelo PCH119 perante o mesmo grupo de indivíduos (82%). Por outro lado, apenas 62% do grupo c/ART demonstrou ser capaz de neutralizar o vírus PCE1176, obtendo uma frequência de neutralização ainda menor que a obtida para o pNL4.3 perante plasmas de indivíduos *drug naïve* (77%).

A elevada frequência de neutralização do pseudovírus PCH119 (82%) pode ser interpretada como resultante de um possível reconhecimento por parte dos anticorpos, já que se trata de um recombinante entre os subtipos B e C. O possível reconhecimento dever-se-ia ao facto de os plasmas terem sido recolhidos em hospitais de Lisboa, onde o subtipo predominante é o B [69].

Estes resultados vão de encontro ao esperado, uma vez que, no caso dos vírus tier 1, um número crescente de epitopos fica exposto à medida que o trímero (formado pelas glicoproteínas gp120 e gp41) se abre, tornando o vírus mais sensível à neutralização por certos anticorpos [70], sendo tipicamente definido como mais fácil de neutralizar. Os vírus tier 2 são conhecidos por apresentarem uma sensibilidade moderada à neutralização mediada por anticorpos, já que foram associados em estudos recentes a uma conformação predominantemente fechada do trímero do Env e, por esta razão, apresentam menos epitopos expostos [57, 70].

Pelo Gráfico 11 (e conforme sintetizado na Tabela 6), que demonstra como os plasmas reagiram contra cada um dos vírus, é possível verificar que, em relação ao vírus tier 1, os plasmas testados conseguiram neutralizar mais facilmente o vírus quando se tratava de indivíduos sob terapia antirretroviral, conseguindo uma neutralização média de 79.4%, face a 60.2% de neutralização do pNL4.3 conseguida pelos plasmas de indivíduos *drug naïve*. Em relação aos vírus tier 2, a amostra de indivíduos c/ART foi capaz de neutralizar mais eficazmente o vírus PCE0217 (77.9%), tendo sido o TRO11 o vírus com resultados de neutralização menos eficazes (71.1%).

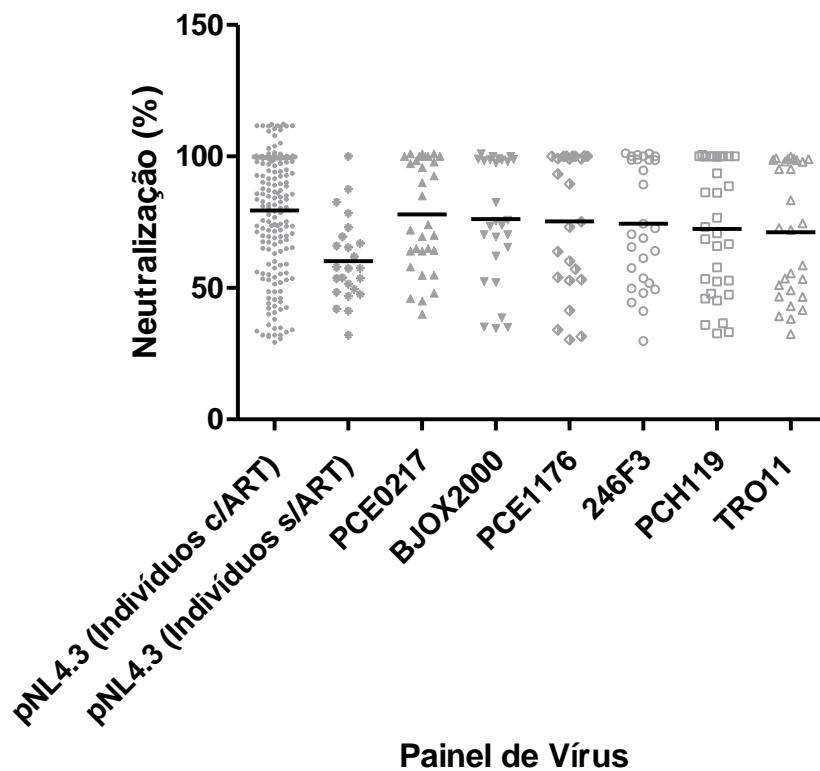


Gráfico 11. Atividade neutralizante dos diferentes plasmas face ao painel de vírus em estudo.

Os resultados de neutralização dos vírus tier 2 obtidos com os 39 plasmas de indivíduos sob terapia antirretroviral encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade neutralizante de plasmas positivos para VIH-1 contra pseudovírus tier 2 de VIH-1.

Plasma	RNA Viral (log)	CD4	NT Vírus VIH-1 Tier 2 (%)						Média NT (%)
			TRO11	246F3	PCH119	PCE1176	BJOX2000	PCE0217	
5	0	827	-	-	47,4	-	-	-	47,4
6	2,61	185	-	-	-	-	-	-	0,0
31	4,72	710	41,6	57,6	73,2	41,4	62,2	58,0	55,7
34	0	533	-	44,4	-	-	38,7	64,3	49,1
35	0	950	32,4	-	47,8	-	35,0	40,0	38,8
38	0	353	99,1	100	100	99,2	98,7	100	99,4
41	3,63	583	46,7	51,8	36,5	34,1	34,7	45,0	41,5
46	0	421	95,2	94,7	93,5	89,6	97,5	95,8	94,4
54	2,89	267	55,6	68,9	76,7	31,6	52,1	64,0	58,2
63	5,24	63	95,2	101,2	99,8	99,1	100,1	100,0	99,2
75	0	390	98,1	100	100	100	99,2	101	99,7
82	0	1608	-	-	45,9	-	-	-	45,9
90	0	1039	99,9	100	100	100	98,9	101	99,9
152	0	702	-	-	-	-	-	-	0,0
164	0	376	-	-	-	-	-	-	0,0
173	2,69	888	49,1	41,2	66,7	63,8	69,4	70,0	60,0
182	0	1315	-	48,0	33,2	-	-	69,5	50,2
192	4,53	179	39,2	53,7	32,7	-	-	48,0	43,4
234	0	515	98,9	98,8	99,9	100	98,0	97,9	98,9
238	0	337	99,2	101	100	100	101	100	100,1
244	0	609	-	65,6	52,8	30,3	-	54,8	50,9
246	3,93	76	99,3	98,7	100	100	100	100	99,8
247	0	1092	53,3	49,4	70,8	93,3	82,6	85	72,4
253	0	919	98,6	100,6	100,5	100,2	98,4	100,1	99,7
298	0	299	97,9	98,5	100	100	99,1	101	99,3
302	0	817	98,7	98,7	100	99,1	98,8	97,3	98,8
311	0	823	-	-	57,8	-	35,2	74,1	55,7
314	1,99	847	72,1	61,3	65,9	57,2	65,5	64,0	64,3
318	0	850	-	-	-	-	-	-	0,0
328	0	55	74,5	70,4	86,3	73,2	70,3	90,1	77,5
342	5,47	40	46,6	-	53,4	-	-	54,9	51,6
361	2,49	438	58,6	74,4	86,2	60,2	75,8	98,4	75,6
373	0	573	72,8	89,3	88,7	75,2	73,5	92,7	82,0
593	0	1078	53,5	29,8	-	-	-	-	41,6
600	2,20	403	83,3	49,8	45,2	54,1	75,4	72,0	63,3
725	5,21	118	51,0	-	-	-	-	-	51,0
748	1,81	128	43,0	64,0	52,4	52,8	70,3	65,0	57,9
749	5,89	48	38,2	72,7	68,6	53,2	73,9	65,0	61,9
760	0	511	-	-	35,9	-	52,4	46,0	44,8

Legenda: (-) Neutralização < 30%

Numa análise à frequência de neutralização dos vírus tier 2 (Gráfico 12), verificou-se a presença de anticorpos neutralizantes contra os 6 vírus por parte 23 plasmas (59%), sendo que nenhum dos plasmas foi capaz de neutralizar um total de 5 vírus. No entanto, 4 plasmas (10%) não foram capazes de neutralizar nenhum dos vírus e 12 plasmas (31%) neutralizaram entre 1 a 4 vírus tier 2.

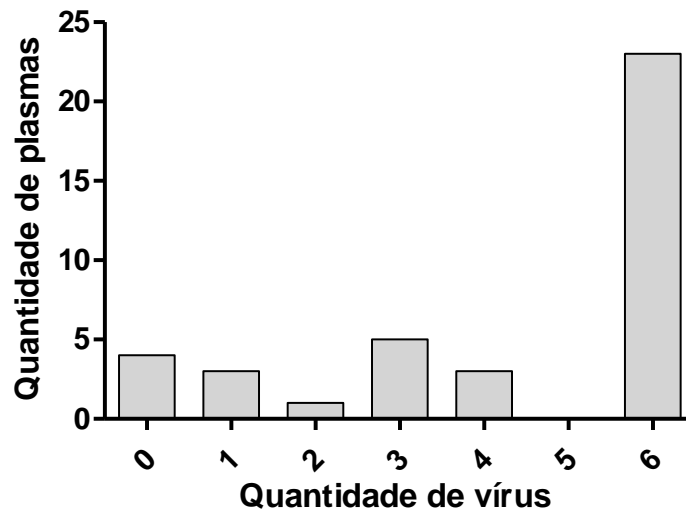


Gráfico 12. Frequência de neutralização dos vírus tier 2.

Estudou-se possíveis correlações no grupo de indivíduos c/ART, verificando-se a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre o número de vírus neutralizados e a percentagem média de neutralização, sendo $p < 0.0001$, e entre a média da absorvância lida na resposta dos anticorpos de ligação e a percentagem média de neutralização dos vírus, sendo $p = 0.047$.

3.2.2 Carga viral versus anticorpos neutralizantes

Tal como realizado com os resultados relativos aos anticorpos de ligação, procurou-se avaliar a associação entre a resposta dos anticorpos neutralizantes e a carga viral. No Gráfico 13, estão representadas as percentagens médias de neutralização de cada um dos vírus em estudo, tendo em conta a carga viral.

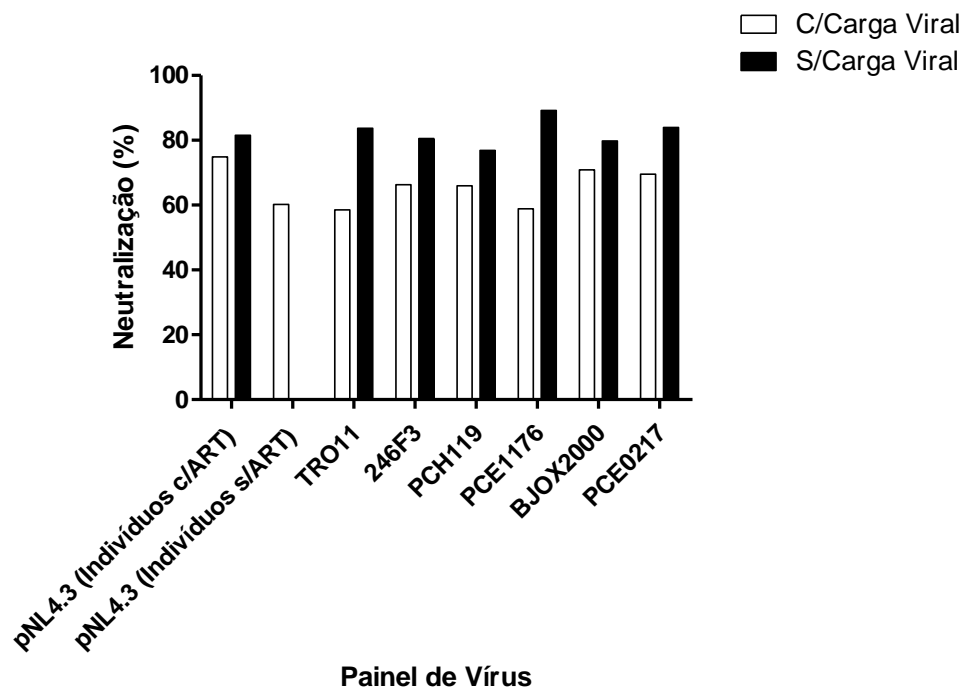


Gráfico 13. Percentagem média de neutralização de cada um dos vírus, em função da carga viral dos plasmas.

Tendo por base o gráfico anterior, é possível observar valores médios de neutralização superiores no grupo de indivíduos sem carga viral, indo de encontro a estudos anteriores onde se demonstrou haver uma correlação inversamente proporcional entre a potência de neutralização e os níveis de carga viral ($p < 0.0001$, $r = -0.9013$) [71]. Isto traduz-se numa maior resposta por parte dos anticorpos neutralizantes em plasmas com cargas virais mais baixas, já que, devido à terapia antirretroviral, a carga viral diminui, permitindo o aumento do número de células T CD4⁺ em circulação e levando a níveis superiores de neutralização dos vírus, tal como demonstrado em estudos anteriores [72].

Por outro lado, não foi possível estudar os níveis de neutralização do vírus tier 1 pNL4.3 em indivíduos *drug naïve* em função da carga viral, uma vez que neste grupo só foi possível testar indivíduos com cargas virais detetáveis.

Analisando a Tabela 8, onde estão presentes as percentagens médias de neutralização de cada vírus (representado no gráfico anterior) e respetivos desvios padrão, é possível verificar que apenas na amostra sob terapia antirretroviral há uma correlação entre a neutralização e a carga viral, tal como observado em relação aos anticorpos de ligação. Assim sendo, o aumento de produção de anticorpos com capacidade de

neutralizar os vírus pNL4.3 ($p = 0.0209$), TRO11 ($p = 0.0045$) e PCE1176 ($p = 0.0120$) está estatisticamente relacionada com a ausência de carga viral em níveis detetáveis, obtendo-se valores de p inferiores a 0.05 para estas associações.

Tabela 8. Percentagens médias de neutralização para cada um dos vírus, em função da carga viral e da condição terapêutica.

Grupo de Indivíduos	Vírus	C/Carga Viral	S/Carga Viral	p value
C/ART	pNL4.3	74.91 ± 2.821	81.56 ± 2.070	0.0209
	TRO11	58.54 ± 5.525	83.72 ± 6.036	0.0045
	246F3	66.28 ± 5.336	80.58 ± 6.277	0.3858
	PCH119	65.95 ± 6.010	76.87 ± 5.934	0.2327
	PCE1176	58.86 ± 6.805	89.24 ± 5.570	0.0120
	BJOX2000	70.85 ± 5.660	79.83 ± 6.405	0.4923
	PCE0217	69.56 ± 5.196	83.92 ± 4.847	0.0692
S/ART	pNL4.3	60.21 ± 3.249	*	0.5392

Legenda: (*) nenhum plasma deste grupo foi testado.

De forma a perceber a relação entre a percentagem de neutralização, a carga viral e o número de células T CD4⁺, fez-se uma análise para cada uma das estirpes de vírus, selecionando apenas plasmas com cargas virais detetáveis, resultando nos gráficos seguintes.

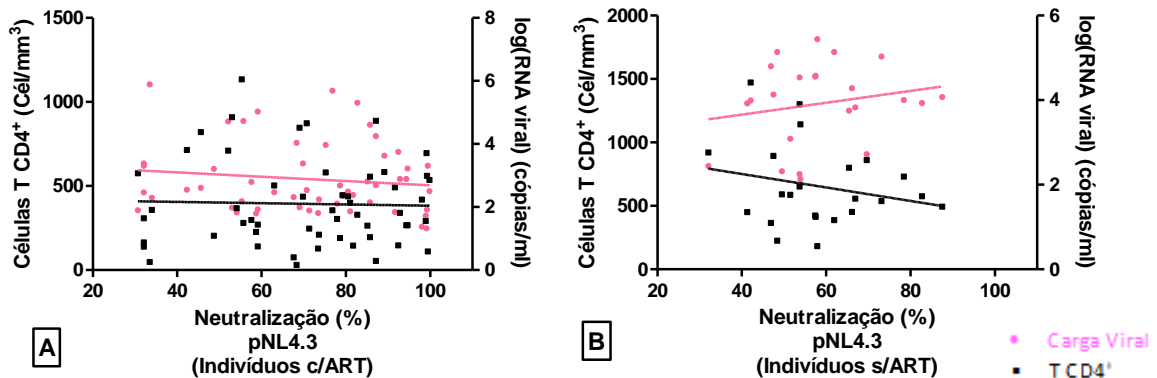


Gráfico 14A e 14B: Atividade neutralizante dos plasmas de indivíduos c/ART (A) e s/ART (B) ao vírus tier 1 pNL4.3, em função do número de células T CD4⁺ e da carga viral.

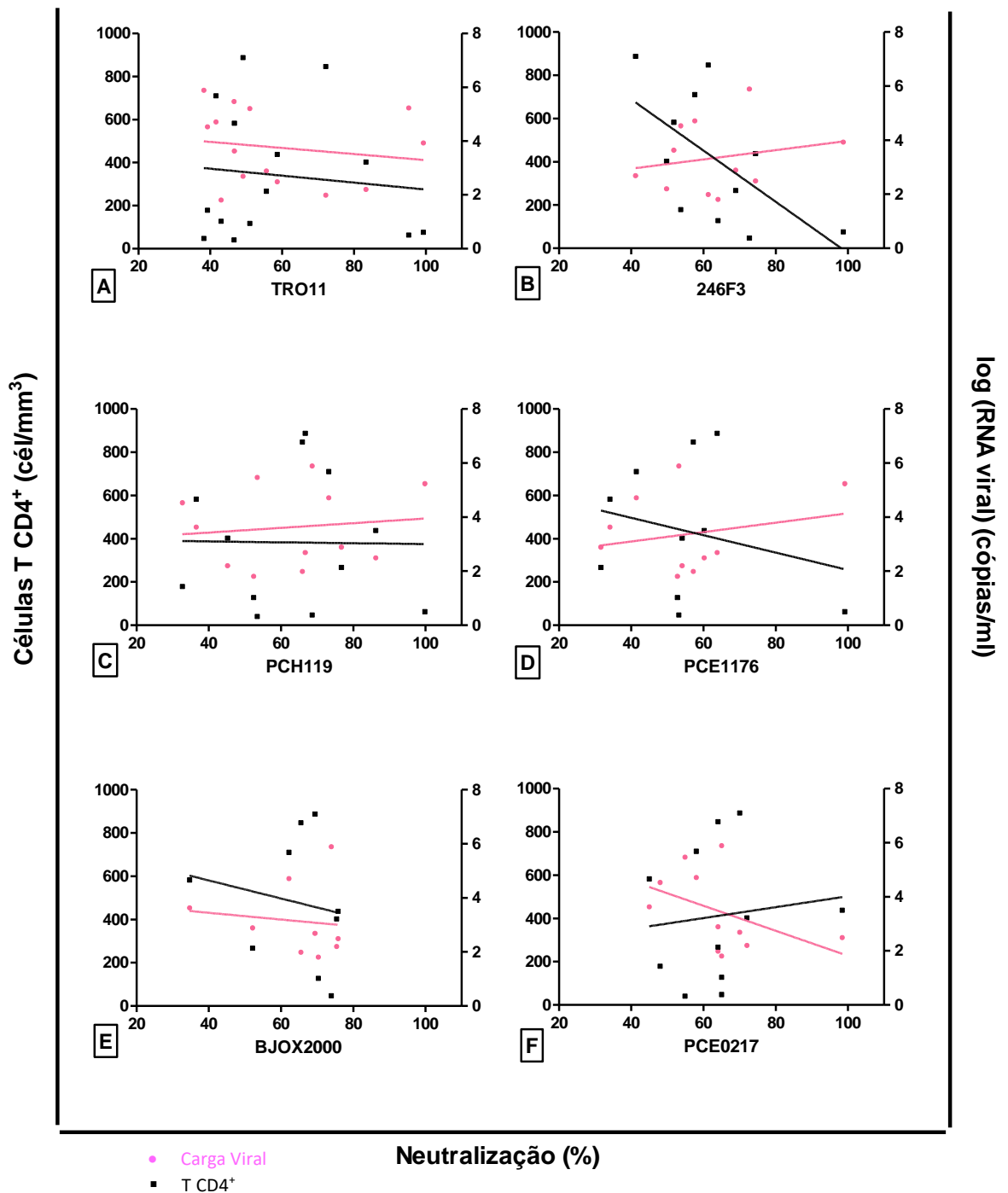


Gráfico 15A, 15B, 15C, 15D, 15E e 15F. Atividade neutralizante dos plasmas de indivíduos c/ART aos vírus tier 2 TRO11 (A), 246F3 (B), PCH119 (C), PCE1176 (D), BJOX2000 (E) e PCE0217 (F), em função do número de células T CD4+ e da carga viral.

Lembrando que para o vírus pNL4.3 é possível efetuar uma comparação de acordo com a condição terapêutica, observou-se que, apesar de em ambos os grupos o aumento dos valores percentuais de neutralização acompanhar uma redução no número de células

T CD4⁺, nos indivíduos sob terapia antirretroviral a neutralização tende a aumentar na presença de cargas virais mais reduzidas, sendo que nos indivíduos *drug naïve* a neutralização aumenta com a carga viral.

Quanto aos vírus tier 2, em todos eles se observa uma neutralização mais eficiente perante um menor número de células T CD4⁺. Porém, os vírus TRO11 e PCE0217 comportam-se de forma diferente dos restantes no que toca ao efeito da carga viral, uma vez que a neutralização destes dois vírus é mais eficiente perante cargas virais mais reduzidas, enquanto que nos restantes o aumento da carga viral acompanha o aumento do valor percentual da neutralização.

Tal como resumido na Tabela 9, em nenhum dos casos o valor de p é inferior a 0.05, pelo que nenhuma associação é suportada estatisticamente, com excepção da associação estatística entre o aumento da neutralização do vírus 246F3 e a redução do número de células T CD4⁺ (p = 0.05; r = -0.6000). Esta associação poderá ser explicada caso se trate de um grupo de indivíduos em que a terapêutica antirretroviral tenha sido instituída recentemente. Ou seja, no início da terapia, o indivíduo infetado caracteriza-se por altos níveis de cargas virais e um baixo número de células T CD4⁺. No entanto, com a ação dos fármacos antirretrovirais, a neutralização do vírus passa a ser mais eficiente.

Tabela 9. Estudo de possíveis associações entre atividade neutralizante para cada vírus e carga viral e número de células T CD4⁺.

Grupo de Indivíduos	Vírus	Neutralização vs	
		Carga Viral	Células T CD4 ⁺
C/ART	pNL4.3	p = 0.5276 r = -0.08871	p = 0.9847 r = 0.002702
	TRO11	p = 0.2738 r = -0.3143	p = 0.8170 r = 0.06813
	246F3	p = 0.6696 r = 0.1455	p = 0.0500 r = -0.6000
	PCH119	p = 0.4986 r = 0.2168	p = 0.9656 r = -0.01399
	PCE1176	p = 0.8548 r = -0.06667	p = 0.8028 r = 0.09091
	BJOX2000	p = 0.3807 r = -0.3333	p = 0.4064 r = -0.3167
	PCE0217	p = 0.1232 r = -0.4932	p = 0.6879 r = 0.1370

S/ART	pNL4.3	p = 0.5635 r = 0.1270	p = 0.5304 r = -0.1379
--------------	--------	--------------------------	---------------------------

Por outro lado, ao realizar um teste estatístico, verifica-se uma correlação entre o número de células T CD4⁺ e o número de cópias de RNA viral tanto para indivíduos s/ART (p = 0.001), como para indivíduos sob terapia (p < 0.0001).

4. Considerações Finais

O VIH-1 representa atualmente uma preocupação a nível global enquanto patologia imunossupressora. Apesar de vários estudos já efetuados, ainda não foi possível produzir uma vacina eficaz contra o vírus. A ausência de uma vacina está relacionada maioritariamente com as propriedades biológicas do vírus, que lhe permitem desenvolver múltiplos mecanismos de escape aos anticorpos, bem como devido à sua grande variabilidade [68].

O sistema imunitário induz a produção de anticorpos neutralizantes aquando a infeção, ligando-se às proteínas do invólucro viral e, conseqüentemente, impedindo a entrada do vírus nas células [65].

Estudos atuais baseiam-se nos locais de ligação dos CD4, nas regiões V2 e V3 e na interface gp120/gp41 [68]. A região C2V3C3 foi descrita como sendo um alvo preferencial na indução de anticorpos neutralizantes [65, 72, 73].

A estrutura abordada na composição das vacinas baseia-se na síntese ou na expressão destes epitopos como péptidos recombinantes, usados como imunogénios na indução de anticorpos amplamente neutralizantes aquando da vacinação [68].

O estudo desenvolvido permitiu caracterizar a resposta de anticorpos de ligação e neutralizantes presentes em 406 plasmas de indivíduos portugueses infetados por VIH-1, sendo 119 do sexo masculino e 287 do sexo feminino. Quanto à condição terapêutica, sabe-se que 372 estão sob terapia antirretroviral, sendo os restantes considerados *drug naïve*. Esta caracterização foi realizada contra polipéptidos da gp120 (dos subtipos AG, B, C, G e H) de isolados primários do VIH-1 que circulam em Angola e contra os péptidos 3S e EC26 da gp41 de VIH-1.

Em relação aos ensaios imunoenzimáticos, observou-se que, de um modo geral, a grande parte dos plasmas testados reagiu contra dois a cinco péptidos, sendo que apenas um plasmas reagiu contra os sete péptidos em estudo. Observou-se ainda que os péptidos recombinantes da região C2V3C3 da gp120 são mais antigénicos que os péptidos da gp41. Sendo AG o péptido recombinante em que se observa reação por um maior número de indivíduos, tanto sob terapia antirretroviral como *drug naïve*, pode ser usado como ponto

de partida para uma futura vacina contra o VIH-1. No entanto, em ambos os grupos de indivíduos (c/ART e s/ART), os péptidos da gp41 são aqueles onde se observou melhor resposta por parte dos anticorpos de ligação.

Verificou-se haver uma correlação estatisticamente significativa entre o número de péptidos reconhecidos e a média da resposta de anticorpos de ligação.

Análises estatísticas permitiram observar que, em indivíduos sob terapia antirretroviral, há uma maior resposta por parte dos anticorpos de ligação quando se trata de plasmas com carga viral detetável, havendo uma associação estatística entre a carga viral e o aumento de produção de anticorpos anti-3S e anti-AG.

Relativamente aos ensaios de neutralização, verificou-se que, como esperado, os vírus tier 2 são menos sensíveis aos anticorpos neutralizantes. Observou-se que o vírus tier 1 é mais facilmente neutralizado quando se trata de indivíduos sob terapia antirretroviral, confirmando o efeito da ART no controlo da infeção.

Ainda acerca dos indivíduos sob terapia antirretroviral, o pseudovírus tier 2 com maior resposta por parte da amostra é o PCH119, apesar de ser o PCE0217 a obter uma percentagem média de neutralização mais elevada. De referir que grande parte dos plasmas testados demonstrou atividade neutralizante contra os 6 vírus tier 2, abrindo perspectivas para estudos futuros.

Por fim, verificou-se a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre o número de vírus neutralizados e a percentagem média de neutralização, e entre a média da absorvância lida na resposta dos anticorpos de ligação e a percentagem média de neutralização dos vírus.

De forma a dar continuidade ao presente estudo e apontando aqui uma potencial investigação, seria relevante purificar os anticorpos IgG a partir do plasma de indivíduos infetados com VIH-1, fazer ensaios de neutralização com os anticorpos purificados, otimizar o protocolo e estimar o título de neutralização de cada um dos vírus, isto é, determinar a quantidade de anticorpos necessária para neutralizar 50% do vírus (ID50). Outra análise relevante seria perceber o efeito da terapia na neutralização.

Em suma, este estudo veio demonstrar que estes péptidos podem contribuir em novas investigações no âmbito do desenvolvimento de uma vacina contra o VIH-1, sendo

que a resposta limitada por parte dos anticorpos gerada pelas vacinas de gp120 pode ser explicada devido à ausência ou falta de acessibilidade a epitopos relevantes. Assim sendo, a otimização da apresentação destes epitopos nas vacinas permitirá melhorar a sua eficácia [6].

5. Referências Bibliográficas

- [1] UNAIDS, 2017. *Global HIV Statistics*. [Em linha]
Disponível em: www.unaids.org
[Consultado a 15/03/2018]
- [2] UNAIDS, 2017. *Country factsheets Portugal 2017*. [Em linha]
Disponível em: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/portugal/>
[Consultado a 15/03/2018]
- [3] Carvalho, A., Costa, P., Triunfante, V., Branca, F., Rodrigues, F., Santos, C. L., Correia-Neves, M., Saraiva, M., Lecour, H., Castro, A. G., Pedrosa, J. & Osório, N. S., 2015. Analysis of a Local HIV-1 Epidemic in Portugal Highlights Established Transmission of Non-B and Non-G Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 53, no. 5, pp. 1506-1514, doi:10.1128/JCM.03611-14.
- [4] ANEKI, 2018. *Countries in Europe with the Most People Living with HIV/AIDs*. [Em linha]
Disponível em: http://www.aneki.com/europe_aids.html
[Consultado a 11/09/2018]
- [5] UNAIDS, 2018. *HIV prevention*. [Em linha]
Disponível em: <http://www.unaids.org/en/topic/prevention>
[Consultado a 02/05/2018]
- [6] Stamatou, N. M., Mascola, J. R., Kalyanaraman, V. S., Louder, M. K., Frampton, L. M., Birx, D. L. & Vancott, T. C., 1998. Neutralizing Antibodies from the Sera of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals Bind to Monomeric gp120 and Oligomeric gp140. *Journal of Virology*, vol. 72, no. 12, pp. 9656-9667, doi:0022-538X/98/\$04.00+0.
- [7] Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X.; Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. & Shaw, G. M., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature: letters to nature*. vol. 422, pp. 307-312, doi:10.1038/nature01609.

- [8] AVERT, 2018. *Origin of HIV & AIDS*. [Em linha]
Disponível em <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/origin>
[Consultado a 22/03/2018]
- [9] CDC, 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men New York City and California. *MMWR. Morbidity Mortality Weekly Report*, vol. 30, pp. 305-308.
- [10] Fonseca, B. A. L., Bollela, V. R. & Neto, R. J. P., 1999. Sarcoma de Kaposi e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: características desta associação, incluindo novos conceitos sobre patogênese e tratamento. *Medicina (Ribeirão Preto.)*, vol. 32, pp. 26-39.
- [11] Vasconcelos, M. A., 1996. *Enciclopédia de Medicina*. 3ª Ed. Portugal: Selecções do Reader's Digest.
- [12] Antunes, F., 2012. *Manual Sobre Doenças Infecciosas*. 2ª Ed. Portugal: Permanyer Portugal, pp. 203-250.
- [13] Gomes, C. D., 2015. *Vírus da Imunodeficiência Humana: O desenvolvimento de uma vacina*. Porto: Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa
- [14] Jensen, M. N., 2007. *HIV's Path Out of Africa: Haiti, the U.S., then the World*. College of Science. [Em linha]
Disponível em: <https://uanews.arizona.edu/story/hiv-s-path-out-of-africa-haiti-the-u-s-then-the-world>
[Consultado a 28/02/2018]
- [15] AVERT, 2018. *HIV Strains and Types*. [Em linha]
Disponível em: <https://www.avert.org/professionals/hiv-science/types-strains>
[Consultado a 22/03/2018]
- [16] Reis Pereira, P., 2010. *Subtipos do HIV-1 e associação com características demográfico-epidemiológicas em pacientes atendidos em Hospital de referência em Porto Alegre, Brasil*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. [Em linha]
Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/21437>
[Consultado a 25/09/2018]

- [17] Los Alamos HIV database, 2018. *HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)*. [Em linha]
Disponível em:
<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
[Consultado a 28/06/2018]
- [18] Ramirez, B. C., Simon-Loriere, E., Galetto, R. & Negroni, M., 2008. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Research*, vol. 134, pp. 64-73, doi:10.1016/j.virus.2008.01.007.
- [19] Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., Tatem, A. J., Sousa, J. D., Arinaminpathy, N., Pèpin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O. G. & Lemey, P., 2014. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, vol. 346, no. 6205, pp. 56-61, doi:10.1126/science.1256739.
- [20] Barroso, H., Borrego, P., Bártolo, I., Marcelino, J. M., Família, C., Quintas, A. & Taveira, N., 2011. Evolutionary and structural features of the C2, V3 and C3 envelope regions underlying the differences in HIV-1 and HIV-2 biology and infection. *PLoS One*, vol. 6, no. 1, e14548, pp. 1-12, doi:10.1371/journal.pone.0014548.
- [21] Programa Nacional Para a Infecção VIH e SIDA, 2018. *INFEÇÃO VIH E SIDA, Desafios e Estratégias*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde.
- [22] Antunes, F., 2001. *Manual sobre SIDA*. 1ª Ed. Permanyer Portugal, pp. 13-38.
- [23] Durand, S. & Cimarelli, A., 2018. The Inside Out of Lentiviral Vectors. *Viruses*, vol. 3(2), pp. 132–159.
- [24] Mestrovic, T., 2018. *What is Lentivirus*. Medical News. [Em linha]
Disponível em: [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Lentivirus-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Lentivirus-(Portuguese).aspx)
[Consultado a 03/10/2018]
- [25] Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Buttò, S., 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*, vol. 41, no. 1, pp. 5-14, doi:10.4415/ANN_10_01_02.

- [26] Figueiredo, I. B., 2014. *CONSTRUÇÃO DE UM ENV QUIMÉRICO HIV-1/HIV-2*. Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada.
- [27] Barqasho, B., 2009. *HMBG1 and other soluble factors in HIV-1 pathogenesis*. Karolinska Institutet/ Department of Laboratory Medicine. ISBN: 978-91-7409-318-6.
- [28] Project Inform, 2016. *HIV Structure & Function*. [Em linha] Disponível em: <https://www.projectinform.org/glossary/hiv-structure-function/> [Consultado a 06/09/2018]
- [29] HIV Databases, 2017. *Landmarks of the HIV genome*. [Em linha] Disponível em: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html> [Consultado a 04/10/2018]
- [30] Merck Sharp & Dohme. *Enciclopédia Médica, Volume 11: Infecções*. QUIDNOVI, pp. 91-98.
- [31] Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W., & Sodroski, J., 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *Journal of Virology*, vol. 64, no. 12, pp. 5701-7.
- [32] Lundquist, C. A., Zhou, J., & Aiken, C., 2004. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T cells by enhancing virion-associated gp120 levels: coreceptor-dependent requirement for Nef in viral replication. *Journal of Virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6287-96, doi:10.1128/JVI.78.12.6287-6296.2004.
- [33] Cullen, B. R., 1991. Regulation of human immunodeficiency virus replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 45, pp. 219-50, doi:10.1146/annurev.mi.45.100191.001251.
- [34] Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. G., 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature: letters to nature*, vol. 393, pp. 705-711.
- [35] Pantophlet, R. & Burton, D. R., 2006. GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annual Review of Immunology*, vol. 24, pp. 739-769.

- [36] Nilofer, C., Mohanapriya, A. & Kanguane, P., 2017. HIV-1 Envelope (ENV) GP160 Trimer Protein Complex SPIKE as a Recombinant Macromolecular Assembly Vaccine Component Candidate: Current Opinion. Em: Shapshak P. et al. (eds) *Global Virology II - HIV and NeuroAIDS*, pp. 939-951. Springer, New York, NY. Online ISBN: 978-1-4939-7290-6.
- [37] Guttman, M., Kahn, M., Garcia, N. K., Hu, S. L., & Lee, K. K., 2012. Solution Structure, Conformational Dynamics, and CD4-Induced Activation in Full-Length, Glycosylated, Monomeric HIV gp120. *Journal of Virology*, vol. 86, no. 16, pp. 8750-8764, doi:10.1128/JVI.07224-11.
- [38] Yoon, V., Fridkis-Hareli, M., Munisamy, S., Lee, J., Anastasiades, D., & Stevceva, L., 2010. The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 8, pp. 741-749.
- [39] Kupfer, B., Sing, T., Schüffler, P., Hall, R., Kurz, R., McKeown, A., Schneeweis K.E., Eberl, W., Oldenburg, J., Brackmann, H.H., Rockstroh, J.K., Spengler, U., Däumer, M.P., Kaiser, R., Lengauer, T. & Matz, B., 2007. Fifteen Years Of Env C2V3C3 Evolution in Six Individuals Infected Clonally with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Medical Virology*, vol. 79, pp. 1629-1639, doi:10.1002/jmv.20976.
- [40] Martínez-Muñoz, L., Barroso, R., Dyrhaug, S. I., Navarro, G., Lucas, P., Soriano, S. F., Vega, B., Costas, C., Muñoz-Fernández, M. A., Santiago, C., Rodríguez Frade, J. M., Franco, R. & Mellado, M., 2014. CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120_{IIIb} binding to the cell surface. *PNAS*, vol. 111, no. 19, E1960-E1969, doi:10.1073/pnas.1322887111.
- [41] Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R. & Sodroski, J., 1994. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, vol. 68, no. 1, pp. 469–484.
- [42] Liu, H., Bi, W., Wang, Q., Lu, L. & Jiang, S., 2015. Receptor Binding Domain Based HIV Vaccines. *BioMed Research International*, vol. 4, pp. 1-9, doi:10.1155/2015/594109.
- [43] Pádua, E., Parreira, R., Tendeiro, R., Nunes, B., Castela, J., Soares, I., Mouzinho, A., Reis, E., & Paixão, M. T., 2009. Potential Impact of Viral Load and Genetic Makeup of HIV Type 1 on Mother-to-Child Transmission: Characterization of

- env*-C2V3C3 and *nef* Sequences. *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 25, no. 11, pp. 1171-1177, doi:10.1089/aid.2009.0103.
- [44] Sagar, M., 2010. HIV-1 Transmission Biology: Selection and Characteristics of Infecting Viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 202, suppl. 2, S289-S296, doi:10.1086/655656.
- [45] Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J., & Haynes, B. F., 2011. Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 20, pp. 1943-1954, doi:10.1056/NEJMra1011874.
- [46] Murphy, G., & Parry, J. V., 2008. Assays for the Detection of Recent Infections with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Eurosurveillance*, vol. 13, no. 36, pp. 4-10, pii:18966.
- [47] Serviço Nacional de Saúde, 2016. *Infeção por VIH/SIDA: Perguntas mais frequentes*. [Em linha]
Disponível em:
<http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/VIHSIDAF AQ.aspx>
[Consultado a 05/11/2018]
- [48] Mascola, J. R., & Haynes, B. F., 2013. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunological Reviews*, vol. 254, no. 1, pp. 225-244, doi:10.1111/imr.12075.
- [49] Gorny, M. K., Conley, A. J., Karwowska, S., Buchbinder, A., Xu, J. Y., Emini, E. A., Koenig, S., Zoella-Pazner, S., 1992. Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *Journal of Virology*, vol. 66, no. 12, pp. 7538-7542.
- [50] Gargan, S., Ahmed, S., Mahony, R., Bannan, C., Napoletano, S., O'farrelly, C., Borrow, P., Bergin, C. & Stevenson, N. J., 2018. HIV-1 Promotes the Degradation of Components of the Type 1 IFN JAK/STAT Pathway and Blocks Anti-viral ISG Induction. *EBioMedicine*, vol. 30, pp. 203-216, doi:10.1016/j.ebioem.2018.03.006.
- [51] Rodrigues, J., 2017. *Guanidina*. FCIências. [Em linha]
Disponível em: <https://www.fcencias.com/2017/05/25/guanidina-molecula-da-semana/>

- [Consultado a 10/11/2018]
- [52] Bio-Rad, *Quick Start™ Bradford Protein Assay: Instruction Manual*. [Em linha]
Disponível em:
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
[Consultado a 25/06/2016]
- [53] Scienco, *Reagente Scienco Bradford*. [Em linha]
Disponível em: <http://www.scienco.bio.br/produtos/reagente-scienco-bradford>
[Consultado a 25/10/2018]
- [54] Bio-Rad, *Colorimetric Protein Assays*. [Em linha]
Disponível em:
http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1069.pdf
[Consultado a 25/10/2018]
- [55] Câmara, B., 2013. *ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*. Biomedicina Padrão. [Em linha]
Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/05/elisa.html>
[Consultado a 11/06/2016]
- [56] Gibbs, *Effective Blocking Procedures*. Corning Life Sciences. [Em linha]
Disponível em: [effective blocking procedures.pdf](#)
[Consultado a 08/11/2018]
- [57] Seaman, M., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A., Coffey, R. T., Harris, L., Wood, B., Daniels, M. G., Bhattacharya, T., Lapedes, A., Polonis, V. R., McCutchan, F. E., Gilbert, P. B., Self, S. G., Korber, B. T., Montefiori, D. C. & Mascola, J. R., 2010. Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, vol. 84, no. 3, pp. 1439-1452, doi:10.1128/JVI.02108-09.
- [58] NIH AIDS Reagent Program, *Panel of Global HIV-1 Env Clones*. [Em linha]
Disponível em:
https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=molecular_clones&id=961
[Consultado a 15/01/2018]
- [59] NIH AIDS Reagent Program, *HIV-1 NL4-3*. [Em linha]
Disponível em: <https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=viruses&id=52>
[Consultado a 15/01/2018]

- [60] Montefiori, D., 2006. *Protocol for Mesuring Neutralizing Antibodies Against HIV-1, SIV and SHIV Using a Luciferase Reporter Gene Assay in TZM-BL Cells*. Duke University, USA. [Em linha]
Disponível em:
http://www.europrise.org/documents/NEUTNET/SOPS/2_Duke_TZMbl.pdf
[Consultado a 15/01/2018]
- [61] Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B. & Kabat, D., 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infection by macrophage tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, vol. 72, no. 4, pp. 2855-2864.
- [62] NIH AIDS Reagent Program, 2015. *TZM-bl Cells*. [Em linha]
Disponível em:
https://www.aidsreagent.org/reagentdetail.cfm?t=cell_lines&id=333
[Consultado a 13/11/2017]
- [63] Rodrigues, G., 2018. *Hematologia Clínica*. [Em linha]
Disponível em:
<http://hematologiaclinicafarma.blogspot.com/2018/04/automacao-do-laboratorio-de-hematologia.html>
[Consultado a 03/05/2018]
- [64] Thermo Scientific, 2018. *Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay Kit: Instructions*. [Em linha]
Disponível em:
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011882_Pierce_Firefly_Luc_OneStep_GLw_Asy_UG.pdf
[Consultado a 31/01/2018]
- [65] Lopes de Almeida, D., 2016. *Papel das regiões C2-V3-C3 na indução de anticorpos neutralizantes anti-VIH-2*. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.
- [66] Vieillard, V., Le Grand, R., Dausset, J. & Debré, P., 2008. A vaccine strategy against AIDS: An HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L and CD4⁺

- T cell depletion in SHIV-infected macaques. *PNAS*, vol. 105, no. 6, pp. 2100-2104, doi:10.1073/pnas.0711629105.
- [67] Ringel, O., Müller, K., Koch, J., Brill, B., Wolf, T., Stephan, C., Vieillard, V., Debré, P. & Dietrich, U., 2018. Optimization of the EC26-2A4 Epitope in the gp41 Membrane Proximal External Region Targeted by Neutralizing Antibodies from an Elite Controller. *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 34, no. 4, pp. 365-374, doi: 10.1089/aid.2017.0250.
- [68] Ringel, O., Vieillard, V., Debré, P., Eichler, J., Büning, H. & Dietrich, U., 2018. The Hard Way towards an Antibody-Based HIV-1 Env Vaccine: Lessons from Other Viruses. *Viruses*, vol. 10, no. 197, pp. 1-22, doi:10.3390/v10040197.
- [69] Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Franco, M., Piedade, J., Sousa, J. G., Canas-Ferreira, W., 2002. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 Infection in Portugal: High Prevalence of Non-B Subtypes. *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 18, no. 5, pp.313-325.
- [70] Montefiori, D. C., Roederer, M., Morris, L. & Seaman, M. S., 2018. Neutralization Tiers of HIV-1. *Current Opinion HIV AIDS*, vol. 13, no. 2, pp. 128-136, doi:10.1097/COH.0000000000000442.
- [71] Lucar, O., Su, B., Potard, V., Samri, A., Autran, B., Moog, C., Debré, P. & Vieillard, V., 2017. Neutralizing Antibodies Against a Specific Human Immunodeficiency Virus gp41 Epitope are Associated With Long-term Non-progressor Status. *EBioMedicine*, vol. 22, pp.122-132
- [72] Marcelino, J. M., Borrego, P., Nilsson, C., Família, C., Barroso, H., Maltez, F., Doroana, M., Antunes, F., Quintas, A. & Taveira, N., 2012. Resistance to antibody neutralization in HIV-2 infection occurs in late stage disease and is associated with X4 tropism. *AIDS*, vol. 26, no. 18, pp. 2275-84, doi: 10.1097/QAD.0b013e328359a89d.
- [73] Marcelino, J. M., Borrego, P., Rocha, C., Barroso, H., Quintas, A., Novo, C. & Taveira, N., 2010. Potent and Broadly Reactive HIV-2 Neutralizing Antibodies Elicited by a Vaccinia Virus Vector Prime-C2V3C3 Polypeptide Boost Immunization Strategy. *Journal of Virology*, vol. 84, no. 23, pp. 12429-12436, doi: 10.1128/JVI.01102-10.

6. Anexos

Anexo 1 – Poster



Antibody neutralization and its determinants in HIV-1 infected patients from Portugal: implications for vaccine design and efficacy

Patrícia Borges¹, Rute Marcelino¹, Rita Calado², Francisco Martin², Paloma Gonçalves¹, Nuno Janeiro³, Miguel Neno³, Claudia Afonso³, Robert Badura³, Filipa Gramacho³, Pedro Brogueira⁴, Kamal Mansinho⁴, Emília Valadas³, Luís Caldeira³, Nuno Taveira^{2,5} and José M. Marcelino¹

¹Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal; ²Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; ³Clinica Universitária de Doenças Infecciosas, Faculty of Medicine, Santa Maria University Hospital, University of Lisbon, Lisbon, Portugal; ⁴Serviço de Doenças Infecciosas, HEM-Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal; ⁵Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiEM), Instituto Universitário Egas Moniz, Caparica, Portugal.

Introduction

Characterizing the antibody response, both neutralizing (NAb) and nonneutralizing (nNAb), in Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) infected patients from Portugal may provide useful insights for vaccine design to protect against HIV infection. We make the first detailed characterization of the Nab and nNAb response in Portuguese patients infected with HIV-1 and identify its determinants.

Material and Methods

Plasma samples from a total of 403 patients, 372 on antiretroviral therapy (ART) and 31 drug naïve, were analysed for neutralizing activity against a reference cross-clade Env-pseudotyped tier 2 virus panel (n=6, subtypes B, C, AC, and CRF07_BC) and one tier one isolate (NL4.3, subtype B) in a single cycle assay in TZM-bl cells [1]. Binding antibody activity to polypeptides comprising the C2V3C3 envelope regions from different HIV-1 clades (CRF02_AG, B, C, G and H) and peptides from a conserved region in gp41 (3S and EC262A4) was evaluated in ELISA assays. Informed consent for blood collection and study participation was obtained from all participants. The study was approved by the Ethical Boards of the Faculty of Medicine, University of Lisbon and Hospital Egas Moniz.

Results

Of the 403 plasma samples tested in ELISA assays, 87.7% reacted with at least one polypeptide. The polypeptide from virus CRF02_AG was the most antigenic (61.1%) followed by H (55.1%), B (51.1%), G (50.9%), C (48.9%), 3S (12.9%) and EC262A4 (11.7%), (Graph 1).



Graph 1. Antigenicity of the gp41 and C2V3C3 polypeptides for the IgG antibodies present in the plasma samples (n=403).

There was a weak but significant positive correlation between the number of peptides recognized and levels of binding antibodies ($r=0.2678$, $p=0.0117$) (Fig 1).

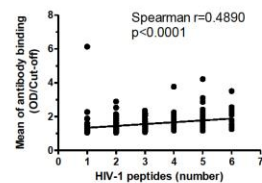


Figure 1. Correlation analysis of IgG binding antibodies versus peptides recognized.

Tier 1 (NL4.3) virus was neutralized by most plasma samples [87.9% (188/214) from patients on ART and 77.4% (24/31) from drug naïve patients], (Fig 2A). Out of 39 plasma samples tested against the reference tier 2 panel of pseudoviruses, 23 (59.0%) neutralized all viruses (median 83.4% neutralization) and 14 (35.6%) neutralized between 1-5 viruses (median 48.9% neutralization) (Table 1). A positive correlation was observed between neutralizing potency (% of neutralization) and breadth as defined by the number of viruses neutralized ($r=0.7336$, $p<0.0001$) (Fig 3). Potency of neutralization was higher in treated than in untreated patients (79.4% vs 60.2%, $p<0.0001$), (Fig 2B). The virus PCH119 (clade CRF07_BC) was neutralized by most (82%) plasma samples whereas PCE1176 (clade C) was neutralized by only 61.5% of plasma samples (Table 1).

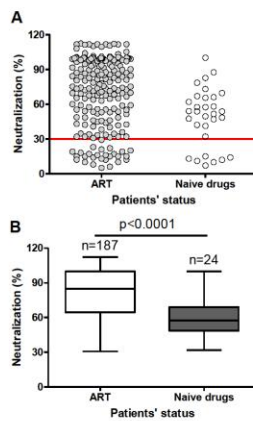


Figure 2. Neutralizing activity (A) and potency (B) of plasmas from ART and naive drugs patients against NL4.3 virus. The horizontal red line represents the cut-off value; plasma samples with values neutralization (%) >30 are considered with neutralizing activity.

Table 1. Neutralizing activity of HIV-1 plasmas (diluted 1:100) against HIV-1 tier 2 viruses

Plasma ID	HIV-1 Env-pseudotyped tier 2 virus						Mean Neutralization (%)
	TR011	246F3	PCH119	PCE1176	BK000000	PCR022F	
5	-	-	47.4	-	-	-	47.4
6	-	-	-	-	-	-	-
8	41.6	57.6	73.2	41.4	-	62.2	58.0
34	-	46.4	-	-	-	36.7	64.3
35	32.4	-	47.8	-	-	35.0	65.0
38	95.1	100	100	95.2	98.7	100	98.4
41	46.7	51.8	36.5	34.1	34.7	45.0	61.5
46	95.2	94.7	93.5	89.6	97.5	95.8	94.4
54	55.6	68.9	76.7	31.6	52.1	64.0	58.2
63	95.2	105.2	95.8	95.1	100.1	100.0	95.2
75	98.1	100	100	100	95.2	101	99.7
82	-	-	45.9	-	-	-	45.9
90	98.3	100	100	100	98.5	101	95.9
152	-	-	-	-	-	-	-
164	-	-	-	-	-	-	-
172	49.1	41.2	66.7	63.8	69.4	70.0	60.0
182	-	48.0	33.2	-	-	69.5	56.2
192	36.2	53.7	32.7	-	-	48.0	42.4
234	96.9	98.8	99.9	100	96.0	97.9	96.9
238	99.2	101	100	100	101	100	100.1
244	-	65.6	52.8	36.3	-	54.8	50.9
246	99.3	98.7	100	100	100	100	99.8
247	53.3	49.4	70.8	59.3	82.6	85	72.4
278	96.6	100.6	100.5	100.2	96.4	100.1	99.7
298	97.9	98.5	100	100	99.1	101	99.3
302	96.7	96.7	100	99.1	96.8	97.3	96.8
311	-	-	37.8	-	35.2	74.1	50.7
314	72.1	61.3	65.9	57.2	60.5	64.0	64.3
318	-	-	-	-	-	-	-
328	74.5	70.4	86.3	73.2	70.3	90.1	77.5
342	46.6	-	53.4	-	-	54.9	52.8
361	56.9	74.4	86.2	66.2	75.8	98.4	75.6
373	72.8	89.3	88.7	75.2	73.5	92.7	82.0
599	53.5	29.8	-	-	-	-	41.6
600	93.3	49.8	45.2	54.1	75.4	73.0	63.3
725	51.0	-	-	-	-	-	51.0
746	43.0	84.0	52.4	52.8	76.3	65.0	57.8
749	38.2	72.7	66.8	53.2	73.9	60.0	61.0
790	-	-	35.9	-	52.4	46.0	44.8

(-) Neutralization < 30%

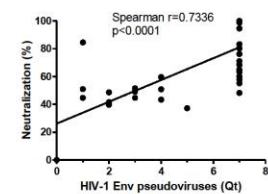


Figure 3. Correlation between neutralization potency and breadth of HIV-1 plasmas samples (n=39).

Discussion and conclusions

The remarkably high prevalence of HIV-1 infected individuals from Portugal with cross-clade neutralizing activity is consistent with the long-term antigenic stimulation of this population by highly diverse HIV-1 clades. Binding antibody response against the C2V3C3 envelope region is a good indicator of neutralization potency in HIV-1 infected individuals from Portugal and it may also be a good indicator of vaccine

References

1. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature. 2003 Mar 20;422(6929):307-12

Acknowledgments

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), through the project HIVERA 0001/2013.



Anexo 2 – Meios e Soluções

Meio LB Líquido

Pesar 15g LB comercial + 5g NaCl (1,5%) para 1 litro de meio

Adicionar 950ml de água, agitar com magnet e acertar o pH=7,0

Perfazer até 1 litro, autoclavar 20 minutos

Meio LB sólido

Pesar 15g LB comercial + 5g NaCl (1,5%) para 1 litro de meio

Adicionar 950ml de água, agitar com magnet e acertar o pH=7,0

Adicionar 15g de Agar

Perfazer até 1 litro, autoclavar 20 minutos

Tampão de Guanidina 9M

Pesar 57,3g Guanidina + 0,284g Na₂HPO₄ + 2,92g NaCl

Adicionar 100ml de água destilada e acertar o pH=7,4

Filtrar a solução

IPTG 100 mM

Pesar 238mg de IPTG por cada 10ml de água

Tampão de Lavagem 2x (purificação) (wash buffer 2x)

Pesar 2,84g Na₂HPO₄ + 7g NaCl + 40µl Tween 20

Adicionar 200ml de água destilada

Tampão de Eluição

Pesar 2,04g Imidazole + 0,71g Na₂HPO₄ + 1,75g NaCl + 10µl Tween 20

Adicionar 100ml de água destilada

Acertar o pH=8,0

Tampão de bicarbonato de sódio 0,05M

Pesar 0,21g NaHCO₃

Adicionar 50ml de água destilada

Acertar o pH=9,6

Ampicilina 100mg/ml

Pesar 1g ampicilina

Adicionar 10ml água destilada

TBS 10x

Pesar 15,76g Tris + 87,6g NaCl

Adicionar 1 litro de água destilada

Acertar o pH=7,6

TBS-T

100ml de TBS 10x + 900ml de água destilada + 500µl de Tween20

Bloqueante – Gelatina 1%

80ml de TBS 1x + 0,8g de gelatina

Gelatina 0,1%

50ml de gelatina 0,1%: 5ml de gelatina 1% + 45ml de TBS-T

Meio DMEM Completo

500ml meio DMEM + 5ml L-glutamina + 2,5ml penicilina/streptomicina + 50ml soro fetal