



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **CONSTRUÇÃO DE UM ENV QUIMÉRICO HIV-1/HIV-2**

Trabalho submetido por  
**Inês Brito Figueiredo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**outubro de 2014**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CONSTRUÇÃO DE UM ENV QUIMÉRICO HIV-1/HIV-2

Trabalho submetido por  
**Inês Brito Figueiredo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Helena Barroso**

**Outubro de 2014**





## **Dedicatória**

*Aos meus pais e avós, que sempre me apoiaram em todas as decisões e tornaram possível a concretização deste sonho.*

*“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre a começar, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.” Fernando Pessoa*

## **Agradecimentos**

*O espaço limitado desta secção, não me permite agradecer como gostaria, a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e contribuíram no sentido de concretizar mais uma etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, com um profundo sentimento de reconhecimento.*

*Em primeiro lugar, à **Prof. Doutora Helena Barroso**, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicional que muito elevaram os meus conhecimentos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer saber sempre mais e a vontade de querer fazer melhor. Grata não só pela oportunidade que me concedeu, mas também pela confiança que em mim depositou, desde o início, e pelo sentido de responsabilidade que me incutiu neste últimos dois anos.*

*Ao **Prof. Doutor Nuno Taveira** e ao **Doutor Pedro Borrego**, pelo apoio, incentivo e motivação durante a realização deste projeto e todo o conhecimento partilhado.*

*À **Prof. Doutora Perpétua Gomes**, que despertou em mim o gosto pelos desafios desta área, contando sempre com o seu entusiasmo contagiante, motivação e palavra amiga.*

*Aos meus amigos e colegas, **Inês Miranda, Telma Mangerico, Margarida Esteves, João Aguiar, Françoise Madureira, Hugo Nascimento e Leonor Ferreira**, pela amizade, apoio, carinho, e motivação.*

*À equipa da farmácia **SantaRita** pela transmissão dos conhecimentos fundamentais do estágio curricular, profissionalismo, disponibilidade, empenho e amizade.*

*À **Rita Ramalhte, Natacha Inácio, Susana Gonçalves e Sandra Ribeiro**, pela amizade, paciência e força ao longo dos últimos dois anos.*

*Por último, mas não menos importante, aos meus pais **Fernanda e Carlos**, por tudo o que me ensinaram, pelo incentivo, motivação, apoio, paciência e amor incondicional que me concederam ao longo destes cinco anos da minha vida académica.*

*A todos, um Muito Obrigada!*



## Resumo

**Introdução:** O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa, a nível mundial, um dos principais problemas de saúde pública. O agente etiológico responsável por esta pandemia é o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), que afeta 35 milhões de pessoas em todo o mundo.

**Objetivos:** Construção dum *env* quimérico contendo a região C2, V3 e C3 do VIH-2 e as restantes do VIH-1 e reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144 (gp120 da CRF\_01\_AE com uma porção da gp41 dum subtipo B (LAI)), onde a região C2, V3 e C3 do VIH-1 foi substituída pela homóloga do VIH-2. Os dois *envs* serão testados quando à sua capacidade de indução de anticorpos amplamente neutralizantes contra o VIH-1 e o VIH-2.

**Metodologia:** Para a amplificação tanto da região C2V3C3 do VIH-2 como do *env* do VIH-1, procedeu-se à escolha de *primers* que reuniam as condições ideais para a correta concretização do processo. Recorreu-se à técnica de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) para a amplificação de cada região e à técnica de eletroforese para a confirmação de que os fragmentos correspondentes às regiões em estudo (593pb para a C2V3C3 e 1190pb para o *megaprimer*) foram efetivamente amplificados. Com recurso ao programa *MEGA6*, foi possível, não só a substituição da região C2V3C3 do VIH-1 pela mesma região do VIH-2, como a confirmação de que a proteína final seria funcional.

**Resultados:** Foi possível a correta amplificação da região C2V3C3 do *env* do VIH-2, observando-se um fragmento de 593pb, confirmando o sucesso do processo de amplificação e da escolha apropriada dos *primers* utilizados. Todavia, tornou-se impossível a amplificação do *megaprimer*.

**Conclusão:** Neste projeto, verificou-se a correta amplificação da região C2V3C3 do *env* do VIH-2. No entanto, tornou-se impossível amplificar o *megaprimer*. É, contudo, de considerar, a desafiante e inovadora estratégia introduzida, com o propósito de analisar, em ratinhos, a resposta em anticorpos de ligação contra a gp120 do VIH-1 e VIH-2 e a resposta em anticorpos de neutralização para o VIH-1 e VIH-2.

**Palavras-Chave:** VIH-1; VIH-2; Anticorpos neutralizantes; *env* quimérico.



## ABSTRACT

**Background:** Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is, globally, one of the major public health problems. The etiological agent responsible for this pandemic is the Human Immunodeficiency Virus (HIV), which affects 35 million people worldwide.

**Objectives:** The construction of a chimeric *env* containing the C2, V3 and C3 regions of HIV-2 with the remaining regions of HIV-1 and the reconstruction of the sequence used in the RV144 clinical trial (gp120 of CRF\_01\_AE with a portion of gp41 from subtype B (LAI)), in which, the C2, V3 and C3 regions of HIV-1 were substituted by the same regions from HIV-2. The two *envs* will be tested with regards to their ability to induce broadly neutralizing antibodies against HIV-1 and HIV-2.

**Methods:** To amplify the C2V3C3 region of HIV-2 as well as the *env* of HIV-1, the *primers* which had the ideal conditions to correctly complete the process were chosen. The PCR technique (Polymerase Chain Reaction) was selected to amplify each region and the electrophoresis technique was used to confirm that the fragments corresponding to the studied regions (593pb for C2V3C3 and 1190pb for the *megaprimer*) were, in fact, amplified. By using the *MEGA6* program, not only was it possible to substitute the C2V3C3 region in HIV-1 with the same region in HIV-2, but also, to confirm that the resulting protein would be functional.

**Results:** The correct amplification of the C2V3C3 region of the *env* of HIV-2 was verified, having a fragment of 593pb been observed, confirming the success of the amplification process and the correct choice of used primers. However, the amplification of the *megaprimer* turned out to be impossible.

**Conclusion:** In this project, the correct amplification of the C2V3C3 region of the *env* of HIV-2 was confirmed; however, amplifying the *megaprimer* resulted impossible. Nevertheless, the used strategy should be considered innovative with the aim of analyzing, in mice, the response of connection antibodies towards gp120 of HIV-1 and HIV-2 and the response of broadly neutralization antibodies towards HIV-1 and HIV-2.

**Keywords:** HIV-1; HIV-2; Neutralizing antibodies; Chimeric *env*.



## Índice Geral

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	11
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	14
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	15
<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	17
<b>1. Introdução</b> .....	17
1.1. Situação no Mundo e em Portugal .....	17
1.2. História natural do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) .....	22
1.3. Origem e variabilidade genética do VIH .....	23
1.4. Partícula viral e organização genómica.....	29
1.5. Diferenças biológicas entre o VIH-1 e o VIH-2 .....	33
1.6. Curso natural da infeção por VIH .....	36
1.6.1. Infeção primária ou síndrome de infeção aguda.....	40
1.6.2. Infeção crónica: Período de latência clínica .....	42
1.6.3. Doença avançada: síndrome de imunodeficiência adquirida .....	42
1.6.4. Respostas imunitárias específicas para o VIH .....	44
1.6.4.1. Respostas celulares e humorais.....	44
1.7. Estratégias para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a SIDA.....	50
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	55
<b>2. Objetivos</b> .....	55
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b> .....	57
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	57
3.1. Recolha das amostras de VIH-1 e VIH-2.....	57
3.2. Escolha dos <i>Primers</i> (oligonucleótidos).....	57
3.3. Técnica de PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	60
3.4. Eletroforese .....	64
3.5. Reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144 .....	66
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão</b> .....	69
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	69

4.1. Amplificação da região C2V3C3 do ENV de VIH-2.....	69
4.2. Amplificação do ENV do VIH-1.....	70
4.3. Reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144.....	80
<b>Capítulo 5 - Conclusões</b> .....	<b>85</b>
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>85</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>86</b>

## ANEXOS

**Anexo 1:** Características dos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI após análise no programa *PerlPrimer*

**Anexo 2:** Características dos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após análise no programa *PerlPrimer*

**Anexo 3:** Características dos novos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI após análise no programa *PerlPrimer*

**Anexo 4:** Características dos novos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após análise no programa *PerlPrimer*

**Anexo 5:** Características dos novos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI e dos novos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após receção

**Anexo 6:** Marcadores de pesos moleculares

**Anexo 7:** Protocolo de purificação de produtos de PCR

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** - Estimativa global do número de adultos e crianças infetadas com o VIH em 2013.....18

**Figura 2** – Número de indivíduos com acesso à terapêutica antirretroviral e percentagem de pessoas infetados pelo VIH e a receber terapêutica antirretroviral, pertencentes a países com médio/baixo rendimento económico em 2013.....19

<b>Figura 3</b> - Casos de infecção VIH/SIDA notificados, distribuição das idades à data de diagnóstico por sexo e grupo etário.....	21
<b>Figura 4</b> – Distribuição dos diferentes subtipos de VIH-1 no continente africano em 2012.....	26
<b>Figura 5</b> – Distribuição mundial dos diferentes subtipos e formas recombinantes do VIH-1 em 2012. A prevalência de VIH-1 em cada região está evidenciada pelas diferentes tonalidades de vermelho, consoante a informação fornecida pela legenda da imagem.....	27
<b>Figura 6</b> - Ciclo de replicação do VIH.....	30
<b>Figura 7</b> - Representação dos genomas do VIH-1 e VIH-2. As caixas cinzentas representam os genes estruturais; as caixas azuis, os genes regulatórios e as caixas rosa, indicam os genes acessórios.....	31
<b>Figura 8</b> - Estrutura do VIH-1.....	31
<b>Figura 9</b> – Representação das cinco regiões variáveis (V1-V5) e das cinco regiões conservadas (C1-C5) da gp120 do VIH.....	32
<b>Figura 10</b> – Interação da proteína acessória <i>Vpx</i> com a ubiquitina ligase (E3), com consequente degradação proteossomal da SAMHD1.....	39
<b>Figura 11</b> – História Natural da infecção por VIH.....	41
<b>Figura 12</b> – Cronologia da resposta imunitária humoral contra o VIH-1.....	47
<b>Figura 13</b> – Sequências das enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	60
<b>Figura 14</b> - Ligação do recetor CD4 à gp120, com consequente alteração conformacional e formação da <i>Bridging Sheet</i> .....	62
<b>Figura 15</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR da região C2V3C3 do VIH-2..	69
<b>Figura 16</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	70
<b>Figura 17</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	71
<b>Figura 18</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	72

<b>Figura 19</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	72
<b>Figura 20</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	73
<b>Figura 21</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR da região C2V3C3 do VIH-2..	74
<b>Figura 22</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	75
<b>Figura 23</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	76
<b>Figura 24</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> a 45°C.....	76
<b>Figura 25</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> a 42°C.....	76
<b>Figura 26</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	77
<b>Figura 27</b> - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR <i>megaprimer</i> .....	78
<b>Figura 28</b> - Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1.....	79
<b>Figura 29</b> - Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1 a 49°C.....	79
<b>Figura 30</b> - Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1 a 47°C.....	80
<b>Figura 31</b> – Reconstrução da sequência no programa <i>MEGA6</i> .....	81
<b>Figura 32</b> - Informações obtidas a partir do programa <i>PerlPrimer</i> relativas aos <i>primers</i> HIV2C2V3C3 FW e HIV2C2V3C3 RV, respectivamente.....	101
<b>Figura 33</b> - Informações obtidas a partir do programa <i>PerlPrimer</i> relativas aos <i>primers</i> HIV1ENV FW e HIV1ENV RV, respectivamente.....	102
<b>Figura 34</b> – Informações obtidas a partir do programa <i>PerlPrimer</i> relativas aos novos <i>primers</i> HIV2C2V3C3 FW e HIV2C2V3C3V RV, respectivamente.....	103
<b>Figura 35</b> – Informações obtidas a partir do programa <i>PerlPrimer</i> relativas aos novos <i>primers</i> HIV1ENZ FW e HIV1ENZ RV, respectivamente.....	104
<b>Figura 36</b> - Marcador <i>100bp DNA Ladder</i> .....	107
<b>Figura 37</b> – Marcador <i>Lambda DNA/ HindIII</i> .....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados epidemiológicos sobre a SIDA em 2013.....	17
<b>Tabela 2</b> - Casos de infeção VIH diagnosticados em 2012: distribuição segundo a categoria de transmissão e estadio.....	20
<b>Tabela 3</b> – Características dos <i>primers</i> para a região C2V3C3 do VIH-2.....	58
<b>Tabela 4</b> – Características dos <i>primers</i> para amplificação do <i>env</i> do VIH-1.....	59
<b>Tabela 5</b> - Características dos novos <i>primers</i> para a região C2V3C3 do VIH-2.....	105
<b>Tabela 6</b> – Características dos novos <i>primers</i> para amplificação do <i>env</i> do VIH-1...	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**VIH** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**VIH-1** - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

**VIH-2** - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2

**VIS** - Vírus da Imunodeficiência Símia

**VIS<sub>cpz</sub>** - Vírus da Imunodeficiência Símia que infeta chimpanzés

**VIS<sub>SM</sub>** - Vírus da Imunodeficiência Símia que infeta a espécie *sooty mangabeys*

**URF** - Forma Recombinante Única

**CRFs** - Formas Recombinantes Circulatórias

**ARN** - Ácido Ribonucleico

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**SU** - Glicoproteína exterior ou de superfície

**TM** - Glicoproteína transmembranar

**gp** – Glicoproteína

**TRIM5 $\alpha$**  - *Tripartite motif protein 5 alpha*

**APOBEC3** - *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3*

**SAMHD1** - *Sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1*

**E3** – Ubiquitina ligase

**TARV** – Terapêutica antirretroviral

**CDC** - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

**BST-2** - *Bone marrow stromal cell antigen 2*

**CTL** – Linfócitos T citotóxicos

**MHC** – Complexo *major* de histocompatibilidade

**NK** – *Natural Killer Cell*

**TNF** - *tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerização em cadeia)

**Tm** – Temperatura de fusão

**pb** - par de bases

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

## Capítulo 1 - Introdução

### 1. Introdução

#### 1.1. Situação no Mundo e em Portugal

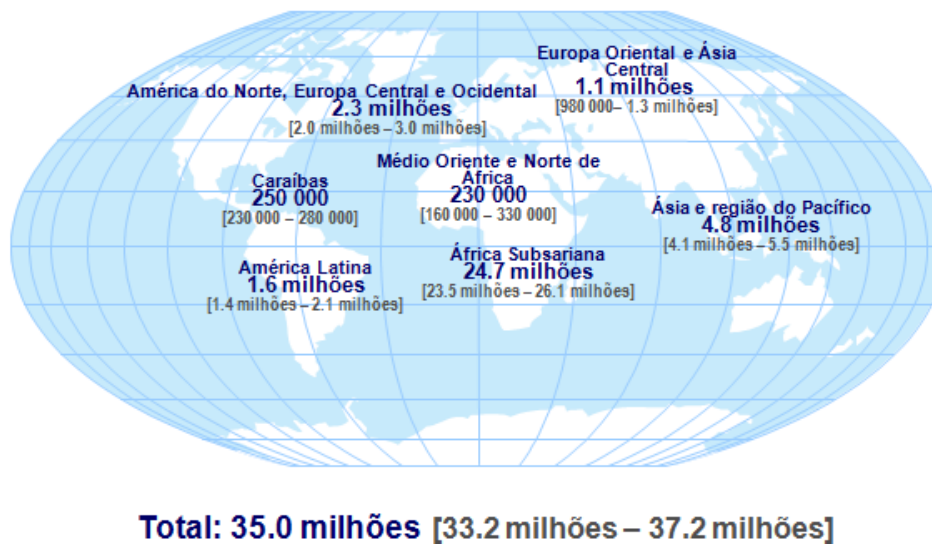
O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa, a nível mundial, um dos principais problemas de saúde pública. O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é o responsável por esta pandemia, afetando mais de 35 milhões de pessoas em todo o mundo, dos quais 3,2 Milhões são crianças com menos de quinze anos de idade, segundo dados de 2013 fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo a mesma fonte, o número de novas infeções por este vírus em 2013 foi de 2,1 Milhões (1,9 Milhões adultos e 240 000 crianças com menos de quinze anos), menos que em 2012, no entanto, 1,5 Milhões de pessoas morreram com SIDA em 2013 (**tabela 1**). De notar ainda que a prevalência do VIH a nível mundial é de 0,8%, sendo que para os homens a percentagem é de 0,3 e para as mulheres 0,5, isto para idades compreendidas entre os 15 e os 24 anos (UNAIDS, 2013).

**Tabela 1** - Dados epidemiológicos sobre a SIDA em 2013. Adaptado de (WHO, 2014)

#### Resumo Global da Epidemia da SIDA | 2013

<b>Número de indivíduos que vivem com VIH em 2013</b>	<b>Total</b>	<b>35.0 milhões</b> [33.1 milhões – 37.2 milhões]
	<b>Adultos</b>	31.8 milhões [30.1 milhões – 33.7 milhões]
	<b>Mulheres</b>	16.0 milhões [15.2 milhões – 16.9 milhões]
	<b>Crianças (&lt;15 anos)</b>	3.2 milhões [2.9 milhões – 3.5 milhões]
<b>Novos casos de indivíduos infetados com VIH em 2013</b>	<b>Total</b>	<b>2.1 milhões</b> [1.9 milhões – 2.4 milhões]
	<b>Adultos</b>	1.9 milhões [1.7 milhões – 2.1 milhões]
	<b>Crianças (&lt;15 anos)</b>	240 000 [210 000 – 280 000]
<b>Mortes por SIDA em 2013</b>	<b>Total</b>	<b>1.5 milhões</b> [1.4 milhões – 1.7 milhões]
	<b>Adultos</b>	1.3 milhões [1.2 milhões – 1.5 milhões]
	<b>Crianças (&lt;15 anos)</b>	190 000 [170 000 – 220 000]

A região da África subsariana é, sem dúvida, das mais afetadas por esta pandemia, com quase 1 em cada 25 adultos infetados com o VIH, representando cerca de 71% da população mundial com VIH. Esta região abrange, não só o maior número de pessoas infetadas (24,7 Milhões), como também o maior número de novos casos de infeção (1,5 Milhões), prevalência (4,7%) e de mortes por SIDA (1,1 Milhões) (United Nations & AIDS, 2013). A prevalência de VIH nesta região é cerca de 25 vezes maior do que na Ásia, sendo que quase 5 milhões de pessoas vivem infetados nas regiões do sul, sudeste e este asiático. Em contrapartida, a região menos afetada é a do Médio Oriente e Norte de África, com 230 000 indivíduos infetados, 25 000 novos casos de infeção e 15 000 mortes por SIDA (United Nations & AIDS, 2013) (**figura 1**).



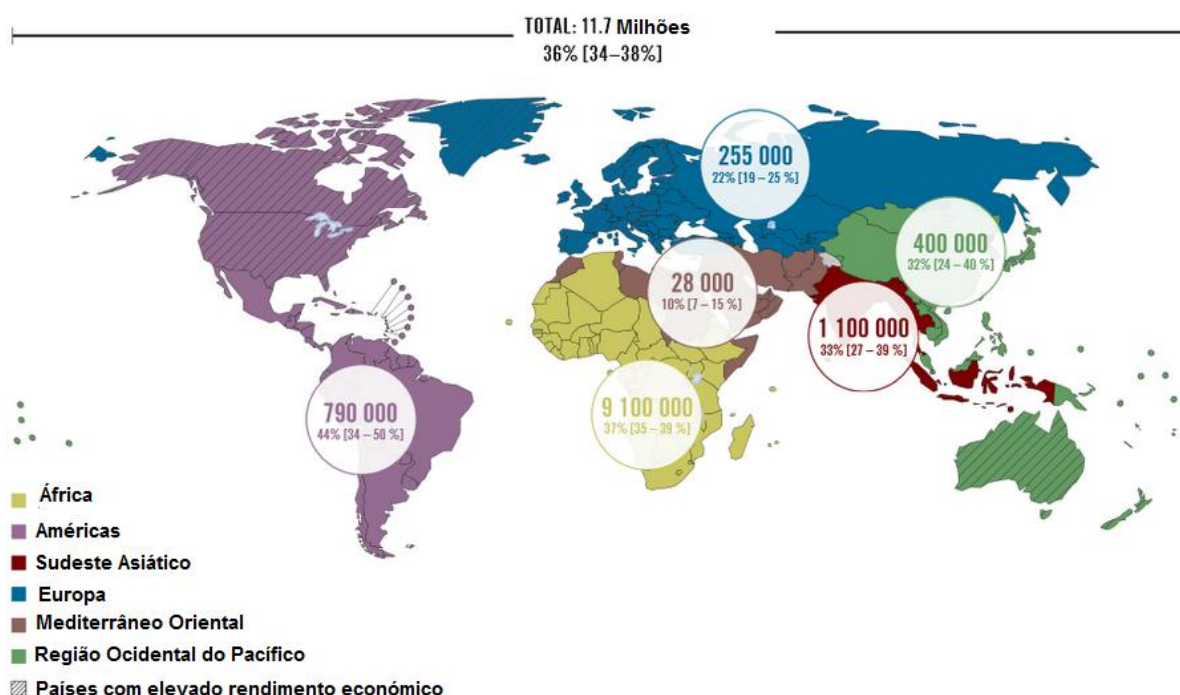
WHO – HIV department | August 7, 2014



**Figura 1** - Estimativa global do número de adultos e crianças infetadas com o VIH em 2013. Adaptado de (WHO, 2014)

A mesma fonte refere que, globalmente, no final de 2013, 12,9 Milhões de pessoas estavam a receber terapêutica antirretroviral, dos quais, 11,7 milhões pertencem a países com médio/baixo rendimento económico (**figura 2**). Significa isto que, três em cada cinco indivíduos infetados, ou seja, 22 Milhões, continuam sem acesso à terapêutica. Em contrapartida, a nível pediátrico, os números não são tão animadores, tendo-se registado, o ano passado, menos de uma em cada quatro crianças a ter acesso à terapêutica antirretroviral, ou seja, apenas 24% das crianças infetadas tem acesso à mesma terapêutica (United Nations & AIDS, 2013).

Das regiões onde o número de infetados é elevado, a América Latina e as Caraíbas são as que apresentam uma maior percentagem de acesso à terapêutica seguida da região da África subsariana. Em último, encontra-se a região do Norte de África e o Médio Oriente, com uma percentagem de acesso à terapêutica de apenas 10% (WHO, 2014) (**figura 2**). Em 2013, a cada dia houveram 6000 novos casos de pessoas infetadas em todo o mundo, dos quais: 68% tiveram lugar na região da África Subsariana; 700 correspondem a crianças com menos de 15 anos e 5 200 a indivíduos com mais de 15 anos (47% em mulheres e 33% em indivíduos entre os 15 e os 24 anos) (World Health Organization: WHO, 2014; World Health Organization, 2014).



**Figura 2** – Número de indivíduos com acesso à terapêutica antirretroviral e percentagem de pessoas infetadas pelo VIH e a receber terapêutica antirretroviral, pertencentes a países com médio/baixo rendimento económico em 2013. Adaptado de (WHO, 2014)

Em Portugal, têm-se vindo a registar cada vez mais casos de indivíduos infetados com o VIH, tendo-se verificado um aumento significativo de 2001 para 2011, passando de 34 000 casos para 48 000 casos. Em 2011 foram registados 14 000 casos de mulheres infetadas com mais de 15 anos, menos de 500 mortes por SIDA e uma prevalência de VIH de 0,7% (indivíduos infetados com idades compreendidas entre os 15 e os 49 anos) (UNAIDS, 2013; WHO, 2013). Entre 1 de janeiro e 31 de dezembro de 2012, foram recebidas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, & em colaboração com Programa Nacional para a

Infeção VIH/SIDA, 2013), no Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infeciosas, notificações de **1 707 casos** de infeção pelo VIH, referentes a **1551 novos casos** e a **156 casos** em que se verificou **evolução de estadio**. Do número total de casos notificados (1 707): **776** (45,5%) foram diagnosticados nesse mesmo período; os restantes **931** (54,5%) foram diagnosticados em anos anteriores mas a sua notificação só foi rececionada durante 2012; **41,1%** residiam no distrito de **Lisboa**; a maioria (**70,7%**) registou-se em **homens**; a **idade mediana à data de diagnóstico** foi de **41 anos**; **28,4%** dos casos referiam ter **nascido fora de território nacional**.

A sua classificação de acordo com o estadio clínico revela que **391 casos (50,4%)** foram identificados como **portadores assintomáticos**, enquanto **247 (31,8%)** se encontravam no estadio de **SIDA**. A **transmissão heterossexual** foi assinalada na maioria dos casos, com **490 (63,1%)** e **187 (24,1%)** a indicarem **transmissão homo ou bissexual**. A transmissão associada ao **consumo de drogas** foi registada em **78 casos**, que correspondem a **10,0%** do total de diagnósticos para o ano em análise (**tabela 2**).

**Tabela 2** - Casos de infeção VIH diagnosticados em 2012: distribuição segundo a categoria de transmissão e estadio (Departamento de Doenças Infeciosas *et al.*, 2013)

Categoria de transmissão	Estadio clínico			Total
	Portador AssIntomático (PA)	Sintomático não - SIDA	SIDA	
Heterossexual	238	89	163	490
Toxicodependente	23	18	37	78
Homo ou bissexual	118	30	39	187
Homo/toxicodependente	1	0	0	1
Transfusionado	*1	0	0	*1
Mãe/filho	3	1	1	5
Não referida	7	0	7	14
<b>Total</b>	<b>391</b>	<b>138</b>	<b>247</b>	<b>776</b>

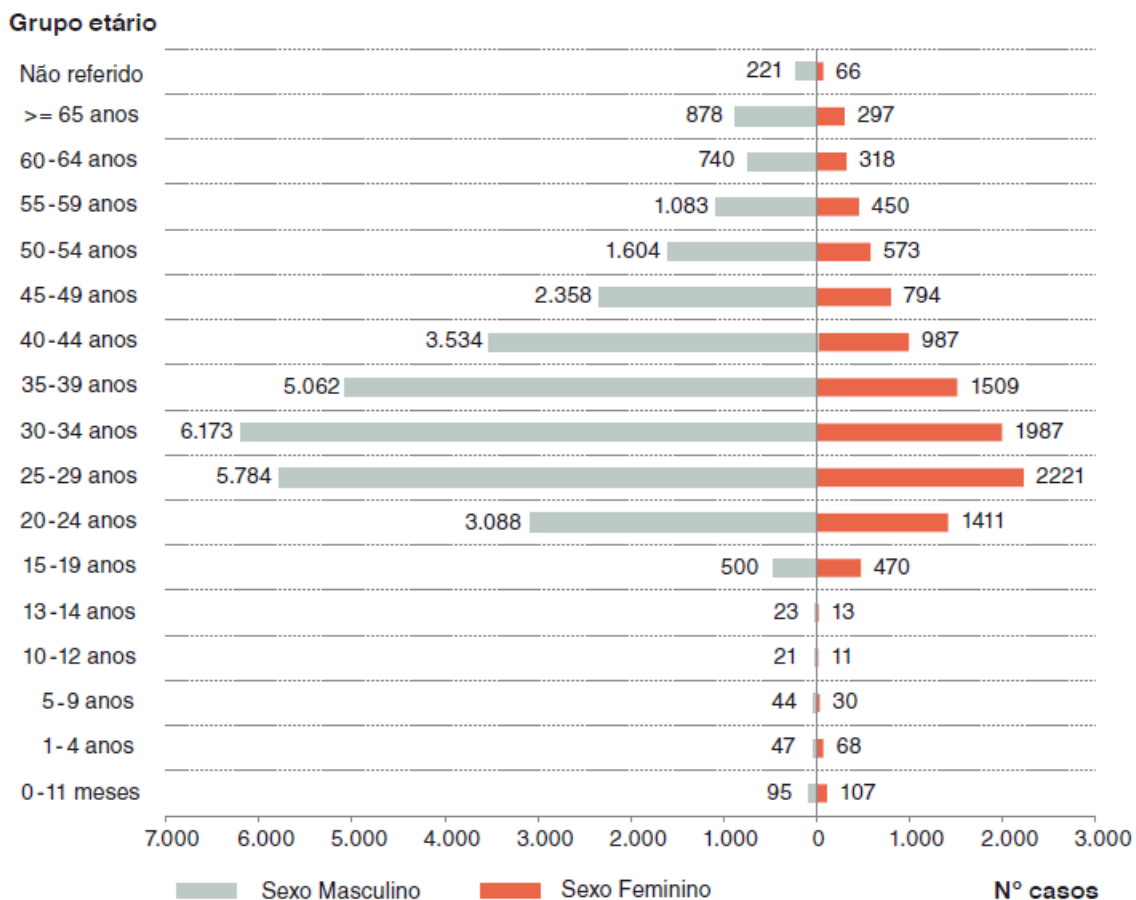
Nota: \* Transfusão ocorrida fora de Portugal.

Os casos classificados como “**sintomáticos não-SIDA**” adquiriram esta designação em 2003 pelo Centro de Vigilância Epidemiológica para a Infeção VIH/SIDA na Europa (EuroHIV), que estabeleceu novo agrupamento para os casos de infeção pelo VIH. Estes são então caraterizados, com base na presença de sintomatologia característica destas infeções, no entanto, não apresentam qualquer patologia da lista de doenças de SIDA, tendo a termo de exemplo a Linfadenopatia Persistente Generalizada.

Verifica-se ainda que, nos casos diagnosticados em 2012 e em que existe informação para esta variável (**762 casos**): o **contato sexual** foi a forma mais frequente de transmissão da infeção (**88,8%**); os casos incluídos na categoria de **transmissão homo/bissexual** correspondem a **34,1%** dos casos diagnosticados em **homens**; em **32 (4,1%)** dos casos diagnosticados em 2012 foi identificada infeção pelo **VIH do tipo 2** (Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, em colaboração com Programa Nacional para a Infeção VIH/SIDA., 2013).

Dados referentes a um estudo efetuado o ano passado indicam que, num período de 30 anos, entre 1983 e 31 de dezembro de 2012, foram notificados e registados na base de dados nacional, **42 580 casos** de infeção VIH/SIDA nos diferentes estadios da infeção, sendo que, 26,6% correspondem a indivíduos do sexo feminino e 73,4% a indivíduos do sexo masculino (Martins, Kislaya, & Nunes, 2013).

Quanto à distribuição etária dos casos em que a idade à data de diagnóstico é conhecida, **82,6%** dos indivíduos infetados encontram-se nos escalões etários entre os **20 e os 49 anos (figura 3)**.



**Figura 3** - Casos de infecção VIH/SIDA notificados, distribuição das idades à data de diagnóstico por sexo e grupo etário (Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, em colaboração com Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA., 2013)

Apesar de mais de 95% dos casos de infeções notificados se deverem a infeção por VIH-1, Portugal é o país da Europa com maior prevalência de infeções por VIH-2, representando quase 4% dos casos. Paralelamente, países historicamente relacionados com Portugal, como o Brasil, Moçambique, Índia e Angola, apresentam igualmente, maior frequência de infeções por VIH-2, comparativamente a outros países (Carvalho *et al.*, 2012).

## 1.2. História natural do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)

Em 1981 foi descrito pela primeira vez SIDA, ainda que sem a atual designação. Na altura, foram observados sintomas de imunossupressão em jovens americanos homossexuais com sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis carinii* (hoje *Pneumocystis jiroveci*) (Gallo & Montagnier, 2003). Um ano depois, o Centro de Controle e Prevenção de Doença (CDC) atribuiu a este estado de imunossupressão, a designação de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, após os sintomas anteriormente descritos, terem sido associados aos de outros indivíduos provenientes de outros países (Gallo & Montagnier, 2003; Sharp & Hahn, 2010).

Em 1983, Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi isolaram o primeiro vírus proveniente de um indivíduo com SIDA, no Instituto Pasteur, em França. (Lever & Berkhout, 2008; Lippincott Williams & Wilkins, 2009) Foi identificado como um retrovírus pertencente à família dos vírus linfotrópicos das células-T humanas (HTLV), no entanto, distinto dos anteriormente isolados (HTLV-1 e HTLV-2). No ano seguinte, um grupo de investigadores americanos liderados por Robert Gallo, isolou um retrovírus com características semelhantes, que designou de HTLV-3, tendo sido mais tarde classificado como Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1, o agente causador de SIDA (Gallo & Montagnier, 2003).

Um novo retrovírus, distinto do VIH-1, foi isolado em 1986, em indivíduos provenientes da Guiné-Bissau e das ilhas de Cabo-Verde, que se encontravam internados num hospital de Lisboa e com clínica semelhante a SIDA. Graças à

colaboração entre o Instituto Pasteur e o trabalho da Professora Doutora Maria Odette Santos-Ferreira, foi possível o isolamento e consequente caracterização do segundo tipo do vírus do VIH, o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2 (Reeves & Doms, 2002).

Em 2008, foi atribuído o Prémio Nobel da Medicina a Luc Montagnier e a Françoise Barré-Sinoussi, pela descoberta do causador do maior problema de saúde pública a nível mundial, o VIH. Esta descoberta contribuiu não só para avanços a nível da medicina, como também, para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamentos valiosos para esta doença devastadora (Lever & Berkhout, 2008; Lippincott Williams & Wilkins, 2009).

### 1.3. Origem e variabilidade genética do VIH

Apesar de considerados lentivírus humanos, o VIH-1 e o VIH-2, não apresentam como hospedeiros naturais os seres humanos. Diversos estudos têm demonstrado que ambos os tipos de VIH foram introduzidos na população humana através de transmissões zoonóticas, entre primatas não humanos e humanos. Com base em evidências moleculares, presume-se que o ancestral mais plausível do VIH-1 e do VIH-2, sejam o Vírus da Imunodeficiência Símia (VIS), infetando chimpanzés ( $VIS_{cpz}$ ) e *sooty mangabeys* (*Cercocebus atys*) ( $VIS_{SM}$ ), respetivamente (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Suligoi, & Buttò, 2010; Miyamoto *et al.*, 2012; Paraskevis *et al.*, 2003; Sharp & Hahn, 2010, 2011).

Dados epidemiológicos e análises filogenéticas evidenciam que o VIH-1 está geneticamente mais relacionado com a subespécie de vírus de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*, do que com qualquer outro vírus símio. Estes chimpanzés podem ser infetados com o VIS, tendo a estirpe  $VIS_{cpz}$ , grande homologia com o VIH-1 (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Horn & Hahn, 2005; Paraskevis *et al.*, 2003; Sharp & Hahn, 2011). Em contrapartida, o reservatório primário do ancestral do VIH-2, é o primata *sooty mangabey*, igualmente conhecido como macaco verde africano. Este primata é o hospedeiro do  $VIS_{SM}$ , sendo predominante na região Ocidental de África (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Sharp & Hahn, 2010).

Estudos revelam que existem 30% a 40% de semelhança com os produtos codificados pelo gene *env* e 60% de homologia com os produtos codificados pelos genes *gag* e *pol* entre o VIH-1 e o VIH-2. Em contrapartida, as sequências de aminoácidos do VIH-2

apresentam uma homologia muito mais elevada com VIS<sub>SM</sub>, sugerindo uma maior proximidade genética com este último do que com o VIH-1 (Kannangai, David, & Sridharan, 2012; Sharp & Hahn, 2011).

O VIH possui uma elevada taxa de mutação, como consequência de erros decorridos durante o ciclo de replicação, mais concretamente, durante o processo de transcrição reversa. Outro aspeto que contribui para a diversidade genética do vírus, é a possibilidade de incorporação de mais de uma cópia do ADN viral no ADN cromossomal do hospedeiro (Gao *et al.*, 2011; Hu & Temin, 1990; Ward *et al.*, 2013). Como resultado, são obtidas estirpes víricas recombinantes, que podem ser viáveis e transmissíveis. De notar ainda que a co-circulação de múltiplos subtipos do VIH num local específico, favorece episódios de co-infecção. No caso do VIH-1, esta recombinação pode tanto ocorrer entre vírus do mesmo subtipo como entre vírus de diferentes subtipos (recombinação intersubtipo) (Abecasis *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005). Genomas obtidos por recombinação intersubtipo são bastante comuns, no entanto, a maioria encontra-se em indivíduos duplamente infetados. Quando não ocorre disseminação para fora do seu local de origem a forma recombinante designa-se por Forma Recombinante Única (URF) (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). A forma recombinante é classificada como Forma Recombinante Circulatória (CRF) quando documentada em pelo menos três indivíduos sem ligação epidemiológica direta, e torna-se numa das espécies circulatórias da epidemia do VIH (Abecasis *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2011; HIV Databases, 2013).

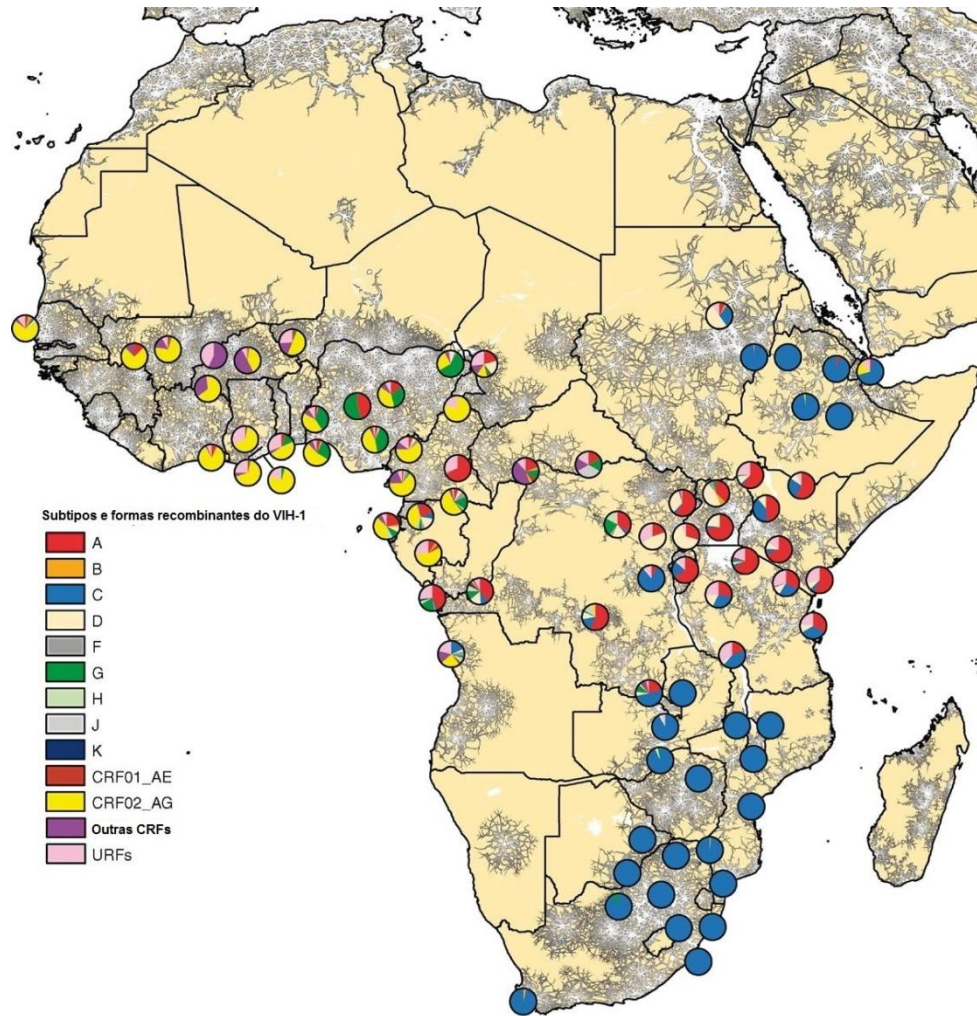
A recombinação entre dois isolados geneticamente distintos da mesma espécie de retrovírus, foi descrita pela primeira vez na década de 70 (Gao *et al.*, 2011), no entanto, hoje contamos com pelo menos 50 CRFs já caracterizadas, que são responsáveis por 20% das infeções por VIH em todo o mundo (HIV Databases, 2013; Ward *et al.*, 2013).

O VIH-1 é, assim, caracterizado por uma extensa diversidade genética, abrangendo estirpes que se encontram divididas em quatro grupos: M, N, O e P. Os grupos M, N e O, acredita-se terem surgido através de transmissões independentes do VIS<sub>cpz</sub>, enquanto o grupo P está relacionado com diferentes espécies de gorilas (Abecasis *et al.*, 2013; Sharp *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2013). O grupo M é o mais comum, sendo responsável por 95% das infeções em todo o mundo e, consequentemente, o responsável pela pandemia do VIH; o grupo O, descoberto em 1990, é muito menos prevalente que o

grupo M, representando apenas 1% das infecções pelo VIH-1, sendo restrito às regiões do Gabão e Camarões; o grupo N, identificado em 1998, é ainda menos prevalente que o grupo O, tendo sido documentados, até 2011, apenas treze casos de infecções por este grupo, todos eles em indivíduos dos Camarões. Por último, o grupo P, que foi descoberto em 2009 e isolado de um indivíduo da República dos Camarões (Sharp & Hahn, 2011).

No grupo M, podemos ainda distinguir nove diferentes subtipos - A, B, C, D, F, G, H, J e K (Abecasis *et al.*, 2013; Ciccozzi *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2013) – e sete sub-subtipos – A1, A2, A3, A4, A5, F1 e F2 (Lihana, Ssemwanga, Abimiku, & Ndemi, 2012). Estes subtipos encontram-se difundidos a nível mundial, apresentando distribuições geográficas específicas, tal como pode ser observado nas **figuras 4 e 5**.

No entanto, é na região da África subsariana que reside a maior heterogeneidade do VIH-1, com presença de todos os subtipos conhecidos, grupos e formas recombinantes. Por observação da **figura 4**, é possível diferenciar a prevalência dos diferentes subtipos, consoante a região em análise, com distinção de duas grandes regiões: a região central e ocidental e a região sul e oriental de África. Na região central e ocidental há predominio dos subtipos A, G e da forma recombinante AG (CRF02\_AG). Tal como se pode verificar na **figura 4**, há forte prevalência da forma recombinante anteriormente referida em países como o Burkina Fasso, Costa do Marfim, Gambia, Guiné-Bissau e Libéria (representado a amarelo na figura), enquanto em países como o Congo, Camarões e República Democrática do Congo há predominio do subtipo A (representado a vermelho) e em países como a Nigéria, predominio do subtipo G (representado a verde) (Lihana *et al.*, 2012). De notar ainda, a existência de outros subtipos cuja prevalência se encontra limitada aos países da África Central, como o H, J e K (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Lihana *et al.*, 2012).



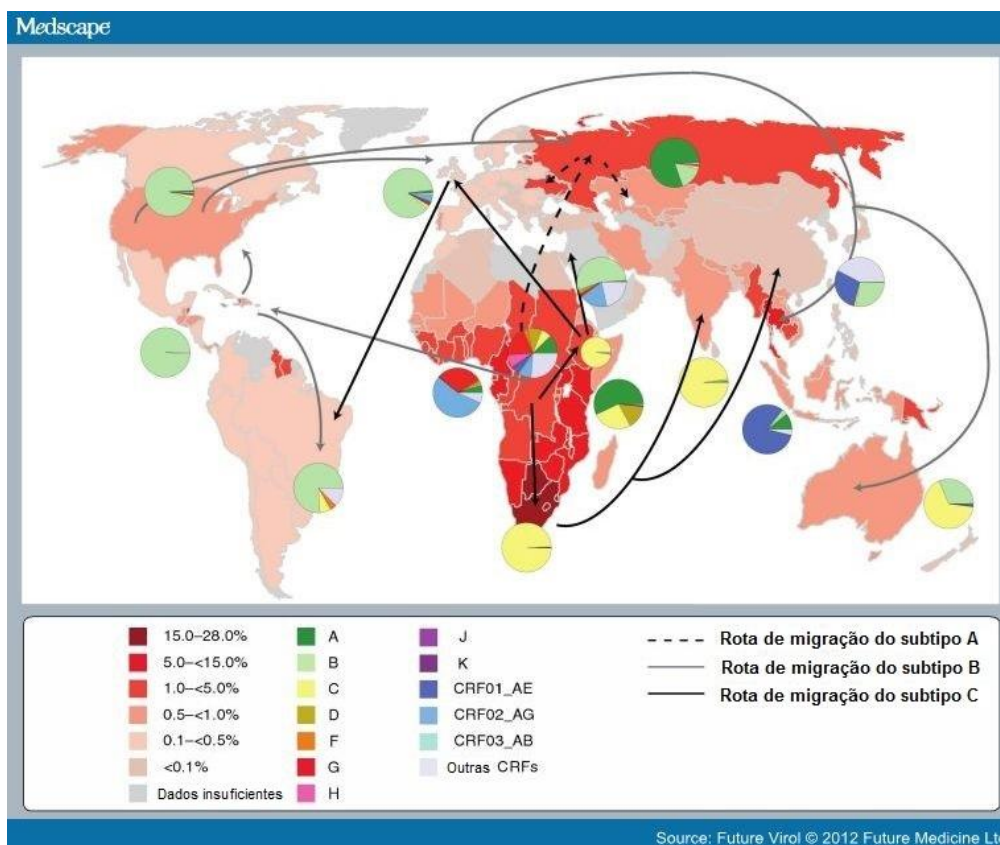
**Figura 4** – Distribuição dos diferentes subtipos de VIH-1 no continente africano em 2012.

Adaptado de (newswise, 2012)

Em contrapartida, na região sul e oriental, para além do subtipo A, estão amplamente distribuídos os subtipos C e D (representados a azul e beije, respetivamente). Por observação da figura, constata-se que países como o Zimbábue, Malawi, Moçambique, Botsuana, Zâmbia, África do sul e Etiópia têm predomínio do subtipo C, enquanto o subtipo D é parte integrante de países como o Uganda. O subtipo A predomina em países com a Tanzânia, Quênia e também no Uganda. De realçar que, em Angola, 50% dos vírus correspondem a formas recombinantes, com predomínio da CRF02\_AG. Esta forma recombinante está de igual forma amplamente distribuída pelas regiões do Gana e Camarões (Lihana *et al.*, 2012).

A nível mundial, tal como demonstrado na **figura 5**, não se observa igual heterogeneidade de subtipos à que se verifica na região da África subsariana. Em todo o continente americano, Europa Ocidental, Japão e Austrália o subtipo predominante é o

B. Contudo, na América Central, estão ainda presentes subtipos como o C, G e outras formas recombinantes, da mesma forma que, na América do Sul, há igualmente registo do subtipo C e ainda do F. O subtipo A prevalece na Rússia e em países da antiga União Soviética, enquanto o subtipo C predomina na Índia (Stanojevic *et al.*, 2012).



**Figura 5 – Distribuição mundial dos diferentes subtipos e formas recombinantes do VIH-1 em 2012.** A prevalência de VIH-1 em cada região está evidenciada pelas diferentes tonalidades de vermelho, consoante a informação fornecida pela legenda da imagem. Adaptado de (Castro-Nallar, Crandall, & Pérez-Losada, 2012)

Na Europa, a epidemiologia do VIH-1 possui características regionais distintas. À semelhança do continente norte-americano, o subtipo mais prevalente é o B, contudo, por toda a Europa, novos subtipos têm vindo a ser introduzidos e, conseqüentemente, disseminados. Em Portugal e na Bélgica, a percentagem deste subtipo ronda os 40% e 50%, respetivamente. Não obstante, noutros países europeus, diferentes subtipos têm vindo a atingir proporções significativas: o subtipo A na Grécia, que representa 21% das infeções, Áustria (14%), Dinamarca (8%) e Reino Unido (8%); o subtipo C na Suécia (30%), também na Dinamarca (8%) e Reino Unido (17%) e o subtipo G, em Portugal, representando 26% das infeções (Stanojevic *et al.*, 2012).

Em Portugal, à semelhança do anteriormente referido, os subtipos predominantes são o B e o G. A elevada prevalência destes subtipos conduziu ao aparecimento de diferentes tipos de CRFs B/G, nomeadamente, à CRF14\_BG. Esta forma recombinante foi isolada pela primeira vez, em 2002 na Galiza, Espanha, em indivíduos cuja utilização de drogas injetáveis era frequente. Contudo, nos últimos anos, poucas são as referências efetuadas a esta CRF na Europa, sugerindo que a sua prevalência reduziu significativamente (Bártolo *et al.*, 2011).

A CRFs, em diversas regiões geográficas, são a forma mais amplamente distribuída, como é o caso: da CRF01\_AE em países do sudeste Asiático, como a Tailândia, Malásia, Vietnam e Camboja; da CRF02\_AG em países da África Ocidental, tal como anteriormente referido; da CRF07\_BC na China (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Stanojevic *et al.*, 2012); da CRF12\_BF e CRF17\_BF na Argentina; da CRF29\_BF e CRF31\_BF no Brasil e da CRF03\_AB, que foi apenas encontrada em países da antiga União Soviética (Stanojevic *et al.*, 2012).

Ainda que a prevalência de outras CRFs e URFs a nível mundial não esteja totalmente estudada, alguns dados indicam o crescente e rápido aumento do número destas formas, com especial destaque para o aumento da proporção de subtipos não B em países europeus (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Lihana *et al.*, 2012; Stanojevic *et al.*, 2012).

Em suma, estudos indicam que, mundialmente, o subtipo mais prevalente é o C, responsável por 48% das infeções, (Abecasis *et al.*, 2013; Lihana *et al.*, 2012) seguido do subtipo A (12%), do B (11%), das formas recombinantes CRF02\_AG (8%) e CRF01\_AE (5%) (Abecasis *et al.*, 2013), do subtipo G (5%) e, por último, do D (2%) (Abecasis *et al.*, 2013; Lihana *et al.*, 2012).

Quanto ao VIH-2 podem-se distinguir oito grupos diferentes: A, B, C, D, E, F, G e H (Ibe *et al.*, 2010; Kannangai *et al.*, 2012; Sharp & Hahn, 2011). Contudo, apenas os grupos A e B representam a maior prevalência de infeções em seres humanos. O grupo A está presente em toda a região ocidental de África, nomeadamente na Guiné-Bissau, Cabo-Verde, Gâmbia e Senegal, assim como em países historicamente relacionados com estes, como é o caso de Portugal e França (Visseaux *et al.*, 2012). O grupo B ostenta uma distribuição mais restrita, limitando-se às regiões da Costa do Marfim

(Kannangai *et al.*, 2012; Visseaux *et al.*, 2012). Os grupos C, G e H estão relacionados com estirpes de VIS<sub>SM</sub> provenientes da Costa do Marfim; o grupo D está intimamente ligado a estirpes VIS<sub>SM</sub> oriundas da Libéria e os grupos E e F assemelham-se a estirpes de VIS<sub>SM</sub> com origem na Serra Leoa (Kannangai *et al.*, 2012; Sharp & Hahn, 2011). Em 2010, foi descrita a primeira CRF para o tipo 2 do vírus, a CRF01\_AB, resultado da recombinação de estirpes pertencentes aos grupos A e B (Ibe *et al.*, 2010).

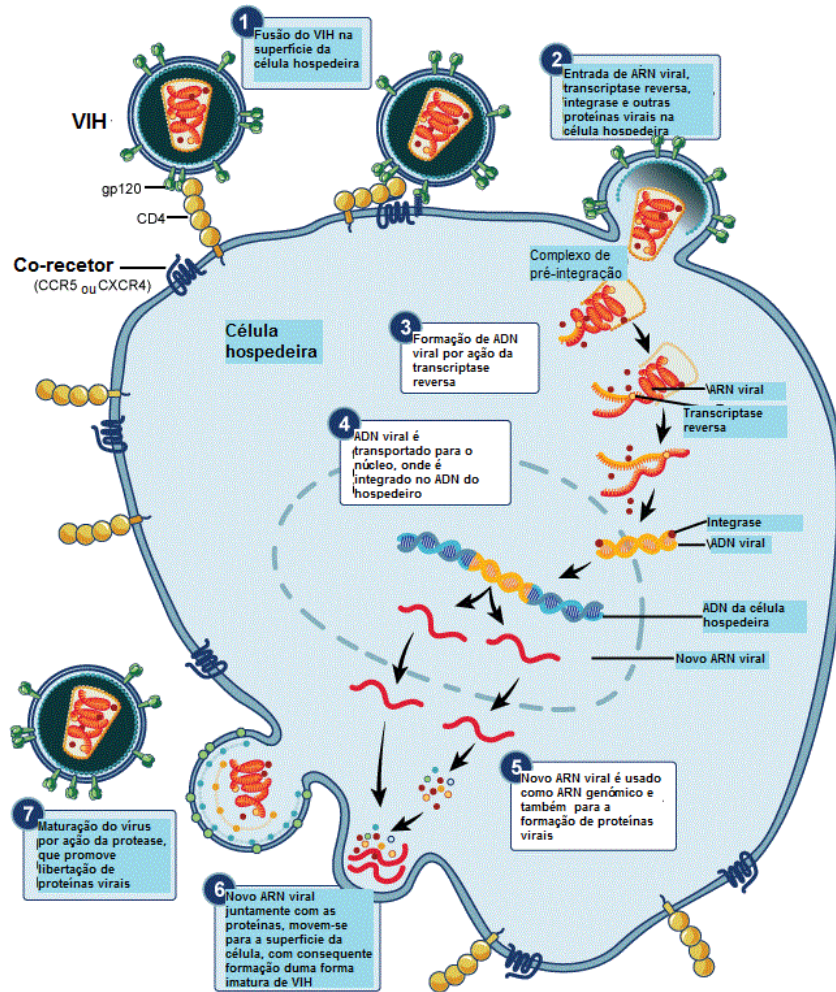
Esta recente forma recombinante foi identificada no Japão, sugerindo a crescente expansão global do VIH-2 para fora da sua zona endémica, a região da África Ocidental.

Portugal, tal como referido anteriormente, é o país europeu com a maior prevalência de infeções pelo VIH-2, nomeadamente pelo grupo A, sendo que, regiões historicamente ligadas a Portugal, como Angola, Moçambique, Índia e Brasil, têm uma maior frequência de infeção pelo mesmo tipo do vírus que outros países (Carvalho *et al.*, 2012).

#### 1.4. Partícula viral e organização genómica

O VIH-1 e o VIH-2 pertencem à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao género *Lentivirus*. As infeções causadas por vírus pertencentes este género envolvem, normalmente, o sistema nervoso central, apresentam longos períodos de latência, replicação viral intensa e são crónicas (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

Os retrovírus apresentam um genoma constituído por duas cadeias simples de ARN, de polaridade positiva. Têm a particularidade de, durante o ciclo de replicação, possuírem a capacidade de converter o seu genoma para uma cadeia dupla linear de ADN viral, com auxílio da transcriptase reversa. Esta é, posteriormente, integrada no núcleo da célula hospedeira, por ação da integrase, sendo submetida aos processos de transcrição e tradução, com a conseqüente produção de partículas virais, responsáveis pela infeção de novas células hospedeiras (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; van der Kuyl & Berkhout, 2012) (**figura 6**).



**Figura 6** - Ciclo de replicação do VIH. Adaptado de (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2012)

O genoma do VIH é constituído por dois genes estruturais (o *env* e o *gag*) e por um gene funcional (o *pol*). Estes codificam para a maior parte dos componentes estruturais e funcionais. Para além dos genes estruturais, o VIH possui também genes regulatórios e acessórios como: o *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* (para o VIH-1) ou *vpx* (para o VIH-2), tal como ilustrado na **figura 7** (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; van der Kuyl & Berkhout, 2012).

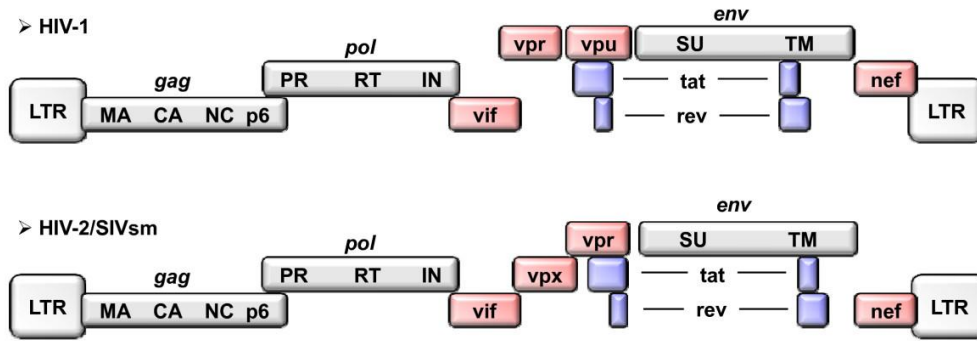


Figura 7 - Representação dos genomas do VIH-1 e VIH-2. As caixas cinzentas representam os genes estruturais; as caixas azuis, os genes regulatórios e as caixas rosa, indicam os genes acessórios. Adaptado de (Ayinde, Maudet, Transy, & Margottin-Goguet, 2010)

O *env* de VIH-1 é um trímero composto por três cópias de heterodímeros associados de forma não covalente, que engloba a glicoproteína exterior ou de superfície (SU) de 120kDA (gp120) e a glicoproteína transmembranar (TM) com 41kDA (gp41) (**figura 8**). A SU é responsável pela interação com os recetores celulares, nomeadamente com o recetor CD4, enquanto a TM é necessária para mediar a fusão entre as membranas virais e as membranas da célula alvo (Barroso *et al.*, 2011; Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Hammache, 1998; Merk & Subramaniam, 2013; Reeves & Doms, 2002; Weiss, 2013). Desta forma, os componentes estruturais mais importantes codificados pelo gene *env* são então as glicoproteínas do invólucro, que derivam da glicoproteína precursora gp160. No caso do VIH-2, a SU corresponde à gp125 (125kDA) e a TM à gp36 (36kDA), derivadas da glicoproteína precursora gp140 (Visseaux *et al.*, 2012).

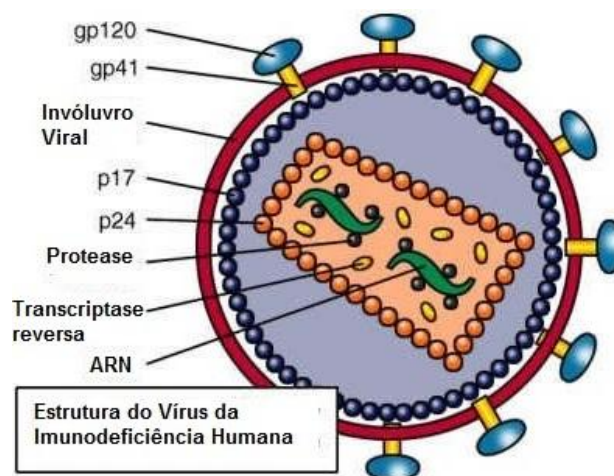
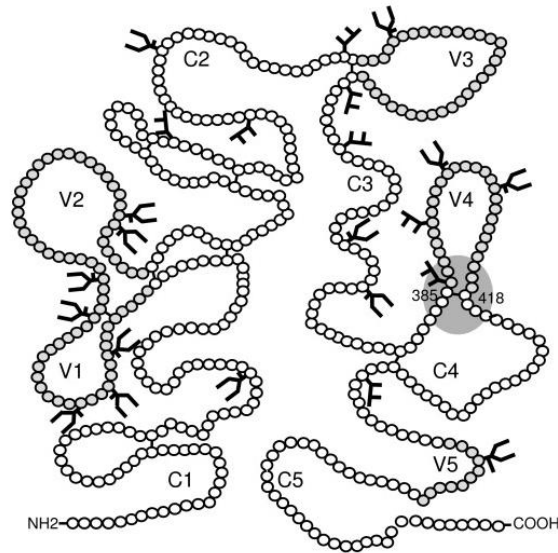


Figura 8 - Estrutura do VIH-1. Adaptado de (AVERTing HIV and AIDS, 2013)

A SU pode ainda ser dividida em cinco regiões hipervariáveis, classificadas de V1 a V5, que se encontram limitadas por cinco regiões conservadas, C1 a C5. As regiões hipervariáveis tendem a formar um anel, estabilizado por pontes dissulfureto (**figura 9**). Na sua conformação nativa, a SU, apresenta dois domínios: um interno, de natureza hidrofóbica e outro externo (Schiavone *et al.*, 2012).



**Figura 9** – Representação das cinco regiões variáveis (V1-V5) e das cinco regiões conservadas (C1-C5) da gp120 do VIH  
Adaptado de (Sanders *et al.*, 2008)

As regiões V1/V2 e V4/V5, altamente variáveis em termos de sequência e tamanho, são as geneticamente mais diversificadas (Harrington, Nelson, Kitrinis, & Swanstrom, 2007); a região V3, após a ligação da gp120 ao recetor CD4, promove a ligação a co-recetores, para a entrada do vírus na célula hospedeira. De notar que, alterações no domínio da V3 determinam, em parte, o tropismo viral, na medida em que o VIH pode utilizar tanto o co-recetor CCR5 como o CXCR4 (Barroso *et al.*, 2011; Riddle *et al.*, 2006). Em relação às regiões conservadas, estudos referem que a C1 e a C5 interagem diretamente com o *loop* imunodominante da gp41 (Shang & Hunter, 2010), enquanto a C2 e a C3, aquando o processo de infeção, associam-se com o objetivo de formar o local de ligação do recetor CD4. De realçar que, a ligação do recetor CD4 ao *env* do VIH-1 requer a presença de diversas regiões conservadas na gp120, incluindo a C1, C3 e C4 (Barroso *et al.*, 2011).

Enquanto o gene *env* codifica para as glicoproteínas do invólucro, o gene *gag* codifica para as proteínas da nucleocápside (p24, p7 e p6) e da matriz (p17), no caso do VIH-1

(Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Para o VIH-2 distinguem-se a p56, p26 para a nucleocápside e a p16 para a matriz (Hammache, 1998; Reeves & Doms, 2002).

O gene *pol* codifica para enzimas cruciais à replicação viral, como a transcriptase reversa, que converte o ARN viral em ADN, a integrase, responsável pela incorporação do ADN viral no ADN cromossomal do hospedeiro (pró-vírus) e a protease, cuja função se prende na clivagem de precursores proteicos *Gag* e *Pol* nos seus componentes (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

### 1.5. Diferenças biológicas entre o VIH-1 e o VIH-2

Tal como anteriormente referido, o VIH-1 e o VIH-2 são lentivírus humanos e ambos podem causar SIDA, no entanto, do ponto de vista biológico, apresentam algumas diferenças.

No decurso da infeção pelos dois tipos do vírus, diversos estudos comparativos revelaram inúmeros aspetos biológicos opostos. Assim, ao contrário da infeção por VIH-1, na infeção por VIH-2 regista-se: menor prevalência; baixa taxa de transmissibilidade (vertical e horizontal); reduzida ativação imunológica; contagem normal de linfócitos TCD4+; baixa carga viral no estado assintomático; infecciosidade atenuada; longa fase de latência e lenta progressão para a fase avançada da doença.

Estes aspetos podem estar na origem duma resposta imunológica mais efetiva contra o VIH-2. Indivíduos infetados pelo tipo 2 do vírus apresentam ainda resposta citotóxica mais potente contra as proteínas do *env* e do *gag*, promovendo a produção de anticorpos neutralizantes (autólogos e heterólogos) (Barroso *et al.*, 2011; de Silva, Cotten, & Rowland-Jones, 2008; Diwan, Saxena, & Tiwari, 2013).

A taxa de transmissão do VIH-2 é significativamente mais baixa que a do VIH-1, possivelmente devido à reduzida ou ausente virémia verificada na maioria dos indivíduos infetados (de Silva *et al.*, 2008; Diwan *et al.*, 2013).

O atenuado curso da infeção pelo tipo 2 do vírus, tem sido associado com a reduzida ativação imunológica, que, por sua vez, pode estar intimamente relacionada com a atividade imunossupressora da região C2V3C3 do *env*. Esta situação não se verifica para a mesma região do VIH-1. À semelhança do anteriormente referido, a região V3 do VIH-1 é determinante do tropismo viral e da utilização de co-recetores, retendo epítomos

antigénicos e neutralizantes, que são expostos aquando a ligação ao recetor CD4. Contudo, a região C2V3C3 do VIH-2 não é imunodominante, não sendo ainda claro se este domínio é exposto durante a infeção (Davis *et al.*, 2009; de Silva *et al.*, 2008; Diwan *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2005).

A nível estrutural e dos genes regulatórios, foi demonstrado que, o VIH-2 apresenta menor afinidade na ligação aos recetores quando comparado com o VIH-1, o que pode estar na origem da sua reduzida virulência. Assim, a SU do VIH-2 tem menor afinidade para o recetor CD4, o que lhe confere maior sensibilidade à neutralização, uma vez que tem a capacidade de infetar as células independentemente da interação com o recetor CD4 (Davis *et al.*, 2009; Diwan *et al.*, 2013).

Na infeção por VIH-1, a fuga do vírus aos anticorpos neutralizantes não só é frequente como, proporciona a evolução genética das sequências das glicoproteínas do invólucro, no sentido de, promoverem a fuga aos anticorpos. Não surpreendentemente, codões que sofrem diversificados tipos de pressão seletiva (positiva), localizam-se nas regiões hipervariáveis V1/V2 e V3, que detêm alvos de acessibilidade e neutralização. Contudo, o impacto da neutralização na infeção por VIH-2 permanece ainda desconhecido (Barroso *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2009; Diwan *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2007).

A diversidade de aminoácidos é, significativamente, maior no VIH-1 do que no VIH-2, contudo, o tipo 2 do vírus, apresenta uma taxa evolutiva muito mais rápida da região C2V3C3, que o VIH-1. Este aspeto, juntamente com a rara fuga do VIH-2 aos anticorpos neutralizantes autólogos, sugerem que, a baixa diversidade genética pode estar relacionada com a fraca pressão seletiva. Todavia, este facto não se verifica, uma vez que, tanto a C2 como a C3 do VIH-2, se encontram sob uma pressão seletiva positiva muito mais intensa que o VIH-1 (Barroso *et al.*, 2011).

Não obstante, a região V3 do VIH-2, ao contrário do que se verifica no VIH-1, apresenta uma diversidade de aminoácidos reduzida. Este aspeto pode estar relacionado com a estrutura e conformação restritas, devido ao seu papel na prevenção da ativação imunológica crónica e na ligação a co-recetores. Estudos admitem que, esta região é muito menos exposta que a C2 e a C3 e que provavelmente apresenta uma conformação retrátil, pela interações com as duas regiões anteriormente referidas. Em contrapartida, no caso do VIH-1, a V3 é altamente exposta e acessível durante o processo de infeção. A natureza oculta da V3 do VIH-2 leva-nos a ponderar que, no contexto da infeção, não

seja imunodominante. Aspeto suportado por alguns estudos, que indicam que um número significativo de indivíduos infetados não desenvolve anticorpos, nem contra a V3 ou contra a C2 e C3 (Barroso *et al.*, 2011; Plantier *et al.* 2001; Uchtenhagen *et al.*, 2011). Assim, é possível que esta região (V3) impeça o reconhecimento imunológico, com consequente preservação de inúmeras e cruciais funções, a nível da entrada no vírus nas células (Barroso *et al.*, 2011; Plantier *et al.*, 2001).

Paralelamente tem sido demonstrado que, aquando a remoção da V3 do VIH-1, há redireccionamento da resposta imunológica neutralizante para outros epítomos do env, que de outra forma, não apresentariam funções neutralizantes. Neste contexto, a natureza da V3 do VIH-2, pode favorecer uma produção mais eficiente de anticorpos neutralizantes dirigidos contra outras regiões do env, como a C2, V1/V2, V4 e C5 (Barroso *et al.*, 2011; de Silva *et al.*, 2008; Plantier *et al.*, 2001).

Diversos estudos permitem concluir que, durante a infeção por VIH-2, as regiões C2 e C3 são expostas a elevadas pressões seletivas, sugerindo que, à semelhança do VIH-1, englobem inúmeros epítomos neutralizantes. Contudo, esta pressão seletiva parece ser deletéria para o vírus, prevenindo a sua transmissão. A região V3 do VIH-2 é bastante conservada e não é exposta no contexto da infeção, enquanto a V3 do VIH-1 é altamente exposta e variável, sendo consistente com as suas propriedades imunodominantes e neutralizantes (Barroso *et al.*, 2011; de Silva *et al.*, 2008; Diwan *et al.*, 2013; Plantier *et al.*, 2001).

Em suma, diversos artigos concluem que, a estrutura terciária e quaternária do env do VIH-1 tem um importante efeito na proteção das sequências da região V3 do reconhecimento por anticorpos. A V3 do VIH-1 *in vivo* é altamente imunogénica, mas no contexto de um complexo trimérico funcional do Env, a V3 é geralmente protegida do reconhecimento por anticorpos e, portanto, não serve como um alvo eficaz de anticorpos neutralizantes. Em contraste, a região V3 do VIH-2 apresenta menor diversidade de aminoácidos e *in vivo* não é bem exposta no invólucro (Barroso *et al.*, 2011; de Silva *et al.*, 2008; Diwan *et al.*, 2013; Plantier *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2005; Uchtenhagen *et al.*, 2011).

## 1.6. Curso natural da infeção por VIH

A infeção por VIH pode ser contraída através do sémen, fluídos vaginais, por entrada do vírus no sangue circulante, diretamente através de transfusão, injeção com seringas contaminadas em consumidores de drogas endovenosas ou por transmissão de mãe para filho (antes, durante e após o parto, através da amamentação). Contudo, o VIH não se transmite pelo ar nem penetra no organismo através da pele, sendo necessário a existência de uma ferida ou de um corte para penetrar no organismo.

A transmissão por via sexual nas relações heterossexuais é mais comum do homem para a mulher, do que o contrário, uma vez que o sémen é mais virulento do que os fluidos vaginais. O contágio pode ocorrer em todos os tipos de relação, seja vaginal, anal ou oral, já que as secreções vaginais ou esperma, mesmo que não entrem no organismo, podem facilmente contactar com pequenas feridas e cortes existentes na vagina, ânus, pénis e boca (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011).

Diversos estudos admitem que a patogenicidade do VIH-2 é atenuada, quando comparada à do VIH-1, dado que, não só a carga viral no plasma em indivíduos infetados pelo VIH-2 é inferior aos infetados pelo VIH-1, como também, a progressão da doença em indivíduos infetados pelo tipo 2 do vírus é mais lenta (Blaak *et al.*, 2006; Duvall *et al.*, 2008; MacNeil *et al.*, 2007; Muenchhoff *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2007). Outros dados relacionados revelam ainda que, apesar de ambos os tipos do vírus partilharem vias de transmissão similares, o tipo 2 detém a menor taxa de transmissão, associada, provavelmente, não só aos níveis de carga viral plasmática notoriamente inferiores como também à reduzida excreção viral no trato genital (Gottlieba *et al.*, 2006).

O VIH pode encontrar-se nas lágrimas, no suor e na saliva de uma pessoa infetada, contudo, a quantidade de vírus é demasiado pequena para conseguir transmitir a infeção. Atualmente, a transmissão por transfusão de sangue ou de produtos derivados do sangue apresenta poucos riscos, uma vez que são feitos testes a todos os dadores (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Sarrami-Forooshani *et al.*, 2014).

A remoção do vírus da circulação sanguínea é efetuada, provavelmente, por ação do sistema reticuloendotelial do baço, fígado e pulmões. Neste órgãos, ocorre, em seguida,

infecção do tecido linfóide, replicação de VIH e, conseqüentemente, virémia com disseminação da infecção (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011).

O principal reservatório do VIH são as células dendríticas. Estas são derivadas de precursores da medula óssea e desempenham um papel fundamental não só na apresentação de antígenos às células T *naive* (células que ainda não foram expostas ao antígeno para que são específicas) como também na indução da resposta imunitária (Izquierdo-Useros *et al.*, 2014; St Gelais & Wu, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

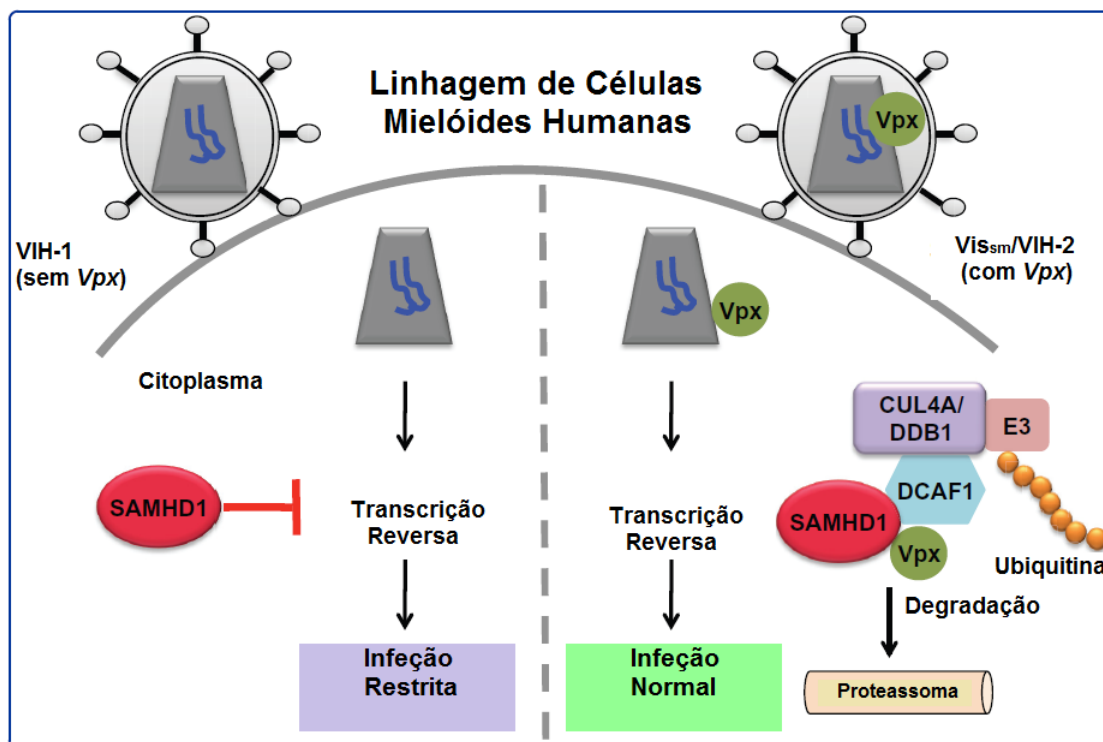
Após infecção, as células dendríticas imaturas, localizadas nas mucosas, induzem a secreção de citocinas e quimiocinas, originando uma resposta inflamatória inata. Este ambiente inflamatório induz a maturação e, conseqüentemente, a migração das células dendríticas para os tecidos linfóides, local onde decorre a apresentação dos antígenos, provenientes de agentes patogénicos, aos linfócitos T. É então possível constatar que as células dendríticas desempenham um papel fulcral na limitação de infeções por agentes patogénicos, nomeadamente vírus, uma vez que têm a capacidade de gerar uma resposta imune inata e adaptativa contra agentes patogénicos (Espada de Sousa & Victorino, 2011; Izquierdo-Useros *et al.*, 2014; St Gelais & Wu, 2011; St Gelais *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Na infecção por VIH, estas células são responsáveis pela captação dos viriões, no local da exposição, de forma a eliminá-los. Todavia, as células dendríticas mostraram-se incapazes de executar esta tarefa, por isso, transportam o vírus pelo organismo até à região paracortical dos gânglios linfáticos de drenagem, onde o vírus contacta com as células TCD4+ ativadas, através da interação destas com as células dendríticas, permitindo, assim, a replicação vírica e a posterior disseminação da infecção. Embora os mecanismos envolvidos na infecção inicial possam diferir, não existem diferenças óbvias nas manifestações da doença, entre os indivíduos infetados, através das mucosas ou através do sangue (Izquierdo-Useros *et al.*, 2014; St Gelais & Wu, 2011; St Gelais *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Contudo, a contribuição das células dendríticas pode ser confundida por facilitar a transmissão do VIH, uma vez que, para além da incapacidade de destruição do vírus, expressam, não só o recetor CD4+, como também outros co-recetores presentes na superfície das membranas, que contribuem para a infecção das mesmas pelo vírus.

As células humanas expressam inúmeras proteínas que restringem a replicação dos lentivírus humanos, nomeadamente: *Tripartite motif protein 5 alpha* (TRIM5 $\alpha$ ); as moléculas da família *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3* (APOBEC3) e *Sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1* (SAMHD1). A SAMHD1 é expressa em monócitos derivados das células dendríticas, macrófagos derivados de monócitos e em células T em repouso, onde é responsável pelo bloqueio da replicação viral por diminuição de nucleótidos disponíveis necessários à transcrição reversa.

De forma a anular estas ações antivirais, inúmeros estudos admitem que os lentivírus humanos evoluíram no sentido de incluírem, no seu genoma, proteínas acessórias responsáveis pela neutralização destas atividades. O VIH-2, o VIS e outros lentivírus relacionados, codificam a proteína acessória *Vpx*, que não só é responsável pela eficiente infeção dos macrófagos, células dendríticas e células T em repouso, como também tem a capacidade de neutralizar a SAMHD1. O vírus símio que infeta o macaco verde africano, é igualmente capaz de neutralizar a SAMHD1, no entanto, por ação de outra proteína acessória, a *Vpr*. Em contrapartida, a *Vpr* do VIH-1, já não apresenta esta capacidade sobre a SAMHD1, por consequência, mantém-se sensível à ação da SAMHD1 (**figura 10**) (Hofmann *et al.*, 2012; Izquierdo-Useros *et al.*, 2014; St Gelais & Wu, 2011; St Gelais *et al.*, 2012; White *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).



**Figura 10 – Interação da proteína acessória Vpx com a ubiquitina ligase (E3), com consequente degradação proteossomal da SAMHD1.** As linhagens de células mielóides humanas, por expressarem elevados níveis da proteína SAMHD1, não são permissíveis à infecção pelo VIH-1, uma vez que atua no início do processo de transcrição reversa. O VIH-1 não detém a proteína acessória Vpx, ao contrário do VIH-2 e do VIS, que conseguem neutralizar a SAMHD1, graças à ação desta proteína acessória. A Vpx liga-se à SAMHD1, por ação da E3, promovendo a sua interação com a subunidade DCAF1 do complexo CUL4A/DDB1. Esta interação proporciona a degradação proteossomal da SAMHD1, permitindo a ocorrência do processo de transcrição reversa e, por conseguinte, a completa replicação viral do VIH-2. Adaptado de (St Gelais & Wu, 2011)

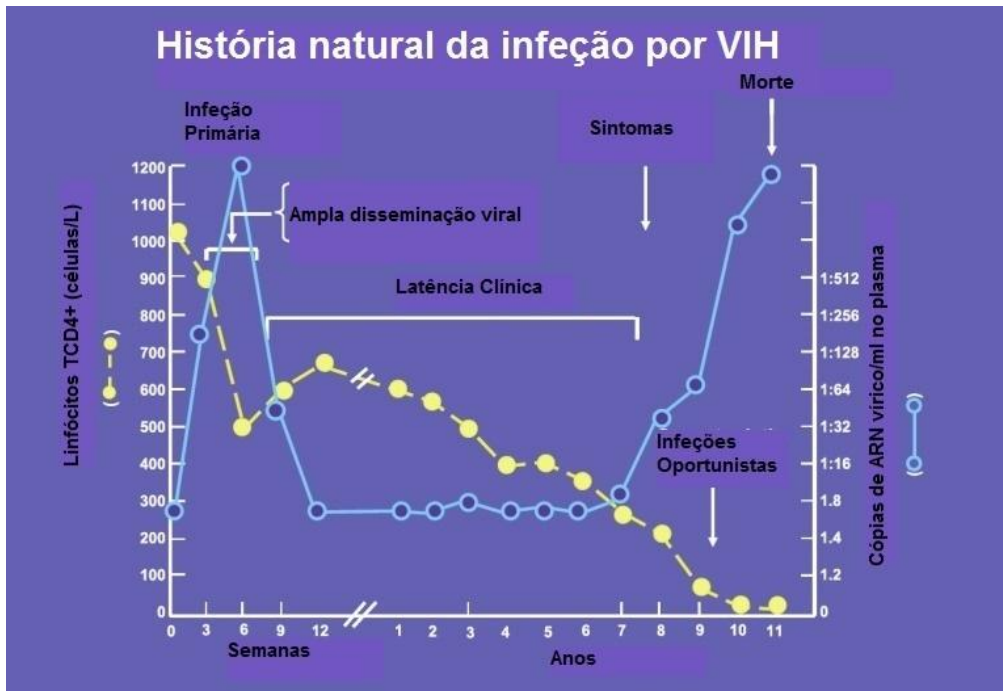
Estes dados suportam a contribuição atribuída às células dendríticas no processo de infecção por VIH, uma vez que, apesar de ser esperado que sejam infetadas pelo VIH-1, foi demonstrado em culturas celulares que a percentagem de células dendríticas infetadas quando expostas ao VIH-1 é muito inferior quando comparada com a percentagem de células CD4<sup>+</sup> e/ou macrófagos infetados, graças à ação da SAMHD1. Em contraste, o VIH-2 infeta naturalmente as células dendríticas, por neutralização da ação da mesma proteína. No entanto, a infecção eficiente das células dendríticas, não está diretamente relacionada com a progressão da doença, dado que o VIH-1 é muito mais patogénico que o VIH-2 (St Gelais & Wu, 2011; White *et al.*, 2014; Wu, 2012).

### 1.6.1. Infecção primária ou síndrome de infecção aguda

O risco associado a diferentes vias de exposição difere, porém, independentemente da via de transmissão, regista-se um aparecimento uniforme, cronológico e ordenado dos marcadores virais de infecção, assim como do aparecimento de anticorpos no sangue (Cohen *et al.*, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Mogensen *et al.*, 2010).

Imediatamente após exposição e, conseqüente, transmissão, não é possível detetar o VIH no plasma, uma vez que, a sua replicação ocorre a nível da mucosa (retal ou vaginal, caso a transmissão tenha ocorrido via sexual) e submucosa, com drenagem para os tecidos linforreticulares. Esta fase é designada por período janela, e dura, geralmente, 7 a 21 dias. Estudos sugerem que, as primeiras células, presentes nas mucosas, a serem infetadas, são as células T memória que expressam os recetores CD4 e CCR5. Neste momento inicial da infecção, a ativação imunológica inata, pode contribuir com o recrutamento de granulócitos, macrófagos e linfócitos, dos quais, os últimos dois são alvos celulares do vírus (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Mogensen *et al.*, 2010).

Aproximadamente três a seis semanas após a infecção primária, ocorre a síndrome viral aguda, com manifestações semelhantes à mononucleose infecciosa, assim como linfadenopatias, exantema e sintomas associados à síndrome gripal, com presença de febre e dores de garganta. Estas manifestações caracterizam-se pela contínua replicação do vírus e conseqüente subida da virémia, acompanhada pelo decréscimo dos níveis de células TCD4+ (**figura 11**).



**Figura 11** – História Natural da infecção por VIH. Adaptado de (Pantaleo, Graziosi, & Fauci, 1993)

No final da síndrome viral aguda prevê-se, contudo, uma diminuição do quociente TCD4+/TCD8+, uma vez que, não só a recuperação de linfócitos TCD4+ é, geralmente, parcial (**figura 11**), como também, há registo da expansão da população TCD8+ para níveis iguais ou superiores aos existentes antes da infecção (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010).

Quatro meses após a infecção primária regista-se um equilíbrio entre o sistema imunitário e o vírus, por meio de respostas da imunidade celular (células TCD4+ e TCD8+) e humoral (anticorpos anti-p24), que contribuem para um decréscimo da virémia e recuperação dos linfócitos TCD4+ (**figura 11**). Embora exista uma eliminação eficaz das células infetadas, os reservatórios víricos (células T, macrófagos e viriões retidos pelas células dendríticas) com ADN provírico sem expressão de proteínas víricas, conseguem persistir no organismo e contornam o processo imunitário (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Mogensen *et al.*, 2010).

O diagnóstico da infecção durante a fase aguda é, apenas possível, com antigenemia *gag* (antígeno p24) ou quantificação do número de cópias de ARN, dado que, os anticorpos anti-VIH, só são, em regra, detetados algumas semanas após o início da sintomatologia. Contudo, o diagnóstico torna-se bastante difícil, na medida em que há registo de sintomas comuns associados a outras patologias, tais como: adenopatias, candidíase oral, cefaleias, diarreia, emagrecimento, exantema, faringite, febre, hepatomegalia,

infecções virais e bacterianas (*Staphylococcus aureus*, Sífilis) e mialgias (Arnott *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Mogensen *et al.*, 2010).

### **1.6.2. Infecção crónica: Período de latência clínica**

Logo após a infecção aguda, inicia-se um período de latência clínica (**figura 11**), período no qual, o vírus continua o seu desenvolvimento, sem, contudo, produzir sintomas no hospedeiro. Durante esta fase, por norma, os indivíduos infetados não manifestam quaisquer sintomas, contudo, a replicação viral não cessa, ainda que se verifique uma taxa substancialmente menor (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Lodi *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010).

Esta fase dura, em média, oito a dez anos, e caracteriza-se por uma infecção crónica assintomática (na fase inicial), contudo, a replicação viral persiste (**figura 11**), com consequente agravamento do sistema imunitário.

Em indivíduos sob ação terapêutica antirretroviral (TARV), esta fase pode durar décadas, uma vez que o tratamento confere controlo sobre o vírus, nomeadamente, a nível da replicação; ao invés, quando não há instituição da terapêutica, a duração desta fase é, em média, dez anos com registo mais rápido da progressão da doença.

A ausência de sintomatologia não significa a impossibilidade de transmissão do vírus, mesmo quando sob TARV, apesar de, neste caso, o risco de transmissão ser mais reduzido (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010).

Tendo em conta o supra referido, é possível constatar que a duração deste período, em indivíduos infetados, é muito heterogénea, podendo permanecer, ao fim de quinze anos, assintomáticos (contagem de linfócitos TCD4+ próximos dos níveis normais) ou rapidamente desenvolver infeções oportunistas graves acompanhadas de linfopénias TCD4+ extremas (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Mogensen *et al.*, 2010).

### **1.6.3. Doença avançada: síndrome de imunodeficiência adquirida**

A gradual destruição do sistema imunitário contribui para a progressão da doença, na medida em que o torna vulnerável ao desenvolvimento de infeções oportunistas (**figura**

11), que, em condições normais, seriam relativamente simples de combater. Estas infecções detêm esta designação, precisamente por aproveitarem o estado deficiente do sistema imunitário para proliferar. Uma vez comprometida a resposta adequada do sistema imunitário, microrganismos ubíquos de virulência limitada, como *Mycobacterium avium* ou *Pneumocystis jirovecii*, podem originar patologias que determinem a morte.

Indivíduos que tenham progredido para SIDA, dependendo da infecção oportunista desenvolvida, podem despoletar diversas patologias. É por esta razão que a SIDA é considerada um síndrome e não uma doença, onde o conjunto de todos os sinais e sintomas provêm de um único vírus, o VIH (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Mogensen *et al.*, 2010).

A fase de SIDA é caracterizada pelo decaimento da contagem de linfócitos CD4+ para valores iguais ou inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> (**figura 11**), tendo em conta que, num indivíduo saudável, a contagem destes linfócitos esteja entre os 500 e 1,600 células/mm<sup>3</sup>. Contudo, o diagnóstico desta fase pode de igual forma ser efetuado, pelo desenvolvimento de uma ou mais doenças despoletadas por infecções oportunistas, independentemente da contagem dos linfócitos (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; Lodi *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) revê, de forma periódica, diversas situações clínicas que definem esta fase avançada da doença, nomeadamente: neoplasias, relacionadas com reativação de microrganismos oportunistas; determinados linfomas (provocados pelo vírus de *Epstein-Barr*); carcinoma do colo do útero invasivo; sarcoma de Kaposi (herpesvírus 8); septicémia recorrente a *Salmonella* spp., pneumonia recorrente, entre outras.

Segundo a mesma fonte, indivíduos com diagnóstico de SIDA e que não estejam a fazer qualquer terapêutica antirretroviral, têm a capacidade de sobreviver, normalmente, três anos. Contudo, hoje em dia, com tratamento precoce adequado e eficaz, é possível não só a manutenção da carga viral, como também evitar a progressão para SIDA (CDC, 2008; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010).

#### 1.6.4. Respostas imunitárias específicas para o VIH

Durante os primeiros meses de infecção, a grande maioria dos indivíduos infetados desenvolve uma ampla e efetiva resposta imunitária contra o vírus. Contudo, com a progressão da infecção, a resposta imunológica torna-se menos eficaz, uma vez que, com a infecção das células estaminais da medula óssea, a produção e consequente reposição das células do sistema imunitário fica comprometida (Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Miedema *et al.*, 2013; Muenchhoff *et al.*, 2014; Sanjuán, Nebot, Peris, & Alcamí, 2013).

A resposta imunológica contra o VIH por ser classificada em dois tipos: celular e humoral. A primeira, geralmente, refere-se à atividade dos linfócitos CD4+ e CD8+, enquanto a segunda está intimamente relacionada com a produção e consequente atividade dos anticorpos. A resposta específica desenvolvida contra o vírus parece ser fulcral, não só, para o controlo da replicação vírica como também para a evolução da doença (Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Muenchhoff *et al.*, 2014).

Tal como anteriormente referido, diversos fatores celulares intrínsecos, têm sido identificados como determinantes na restrição da infecção viral, bloqueando a infecção por VIH ou limitando a replicação do mesmo (TRIM5- $\alpha$ ; APOBEC; SAMHD1 e *bone marrow stromal cell antigen 2* (BST-2), também conhecida por tetherin/CD317/HM1.24) (Espada de Sousa & Victorino, 2011; Katuwal *et al.*, 2014; Klatt, Chomont, Douek, & Deeks, 2013).

##### 1.6.4.1. Respostas celulares e humorais

As **respostas celulares** são, maioritariamente, mediadas por células TCD8+ citotóxicas (linfócitos T citotóxicos [CTL]), isto é, reconhecem os determinantes víricos, nas células infetadas, através da apresentação antigénica, no contexto do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) classe I, tendo ainda a capacidade de induzir a lise direta destas células. Na sequência da expansão de CTL, durante a fase primária da infecção, verificam-se alterações consideráveis a nível da sequência viral, com ocorrência de mutações em diversos locais do genoma. Estudos realizados durante a fase inicial da infecção revelaram que, a maioria destas alterações são detetadas pelas células TCD8+, através do reconhecimento dos respetivos epítomos. Contudo, aquando estas alterações, estas células perdem a capacidade de reconhecimento dos epítomos

“mutantes”, proporcionando assim a fuga do vírus às CTL. A expansão destas células não só está, temporariamente, associada à diminuição da replicação viral, como persiste até estados muito avançados, enquanto os níveis das restantes células T, envolvidas no processo imunitário, tendem a diminuir (Chou, Ramirez, Wu, & Effros, 2013; Pereyra *et al.*, 2014; Sanjuán *et al.*, 2013; Valadas, 2011).

As células TCD4<sup>+</sup> ou auxiliares (*helper*) são, de igual forma, parte integrante da resposta celular: reconhecem os epítomos, no contexto da apresentação dependente do MHC classe II, e respondem através da sua proliferação e produção de citocinas, nomeadamente das interleucinas 2 e 6, do interferão gama e do fator de necrose tumoral (TNF) (McMichael *et al.*, 2010; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013; Valadas, 2011).

Na maioria dos casos de infeção por VIH (não tratados), regista-se uma diminuição progressiva do número de células TCD4<sup>+</sup> circulantes. A quantidade destes linfócitos é utilizada como uma medida de “capacidade imunológica” global, funcionando como um indicador de risco ao desenvolvimento de infeções oportunistas (Espada de Sousa & Victorino, 2011; Klatt *et al.*, 2013; McMichael *et al.*, 2010).

No início da infeção, o número de células TCD4<sup>+</sup> memória decai seletivamente; à medida que a infeção progride, a quantidade de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, tanto os de memória como os *naive*, desaparecem de circulação. No estado avançado da doença, toda a população destas células diminui drasticamente, tanto a nível da circulação como dos tecidos linfoides. De notar ainda que anomalias funcionais destes linfócitos são, igualmente, características da progressão da infeção (Espada de Sousa & Victorino, 2011; Mogensen *et al.*, 2010; Muenchhoff *et al.*, 2014; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013).

Uma vez que, o papel fundamental das TCD4<sup>+</sup> baseia-se em facilitar a resposta imunitária, através da produção de citocinas, a perda gradual destas células constitui um dano crucial na capacidade imunológica. De notar que, durante a fase precoce da infeção, as respostas específicas TCD4<sup>+</sup> contra o VIH parecem ser prejudicadas seletivamente e de forma duradoura (Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Miedema *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010; Muenchhoff *et al.*, 2014; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013).

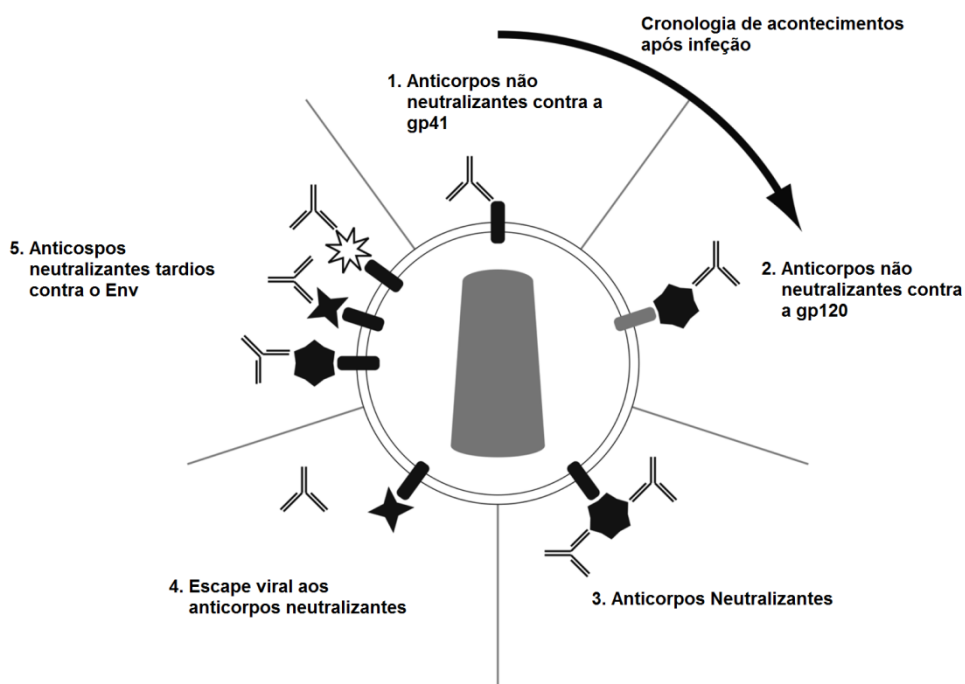
Em relação ao papel das citocinas, aquando a infeção, enquanto os níveis de interleucina-2, responsável pela divisão das células T, B e *Natural Killer*, estão diminuídos, os níveis de interleucina-6 estão consideravelmente elevados, promovendo a ativação das células B e, conseqüentemente, a libertação massiva de anticorpos. Esta ativação pode estar relacionada com a formação do linfoma das células B Não-Hodgkin, tipo de cancro frequente nas infeções por VIH. Em contrapartida, o interferão gama, responsável, não só pela inibição da replicação viral no interior das células, como também, pela estimulação das células citotóxicas, encontra-se em quantidades muito reduzidas. Por último, os níveis de TNF estão aumentados, ativando as células T e a replicação viral (Cohen *et al.*, 2011; Klatt *et al.*, 2013; McMichael *et al.*, 2010; Miedema *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010; Muenchhoff *et al.*, 2014; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013).

Contudo, a maioria dos indivíduos que produzem células TCD4<sup>+</sup> específicas, apresentam apenas interferão gama em circulação, que está associado ao controlo da carga viral. De notar que, a diminuição destes linfócitos, atenua, não só a resposta destes aos antígenos, como também, o número de algumas citocinas. Verifica-se, também, o decréscimo das células TCD4<sup>+</sup> memória e, conseqüentemente, da resposta a agentes patogénicos, predispondo ao aparecimento de infeções oportunistas (Cohen *et al.*, 2011; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Miedema *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010; Muenchhoff *et al.*, 2014).

A **imunidade humoral** é mediada pelos linfócitos B, através da produção de anticorpos específicos. Na infeção por VIH, há produção de anticorpos p-24, que parecem contribuir para o declínio da virémia, após a infeção aguda. A perda destes anticorpos está associada à progressão da infeção. Apenas um número muito reduzido de indivíduos infetados produz anticorpos contra o vírus, sendo que, a maioria dos anticorpos não previne a transmissão do vírus entre células (Alter & Moody, 2010; Espada de Sousa & Victorino, 2011).

Embora os anticorpos sejam produzidos contra a maioria das proteínas virais, aqueles que se ligam ao env do VIH e previnem a ligação do vírus às células alvo, são designados por anticorpos neutralizantes. Estes desenvolvem-se lentamente e aparecem cerca de 12 semanas (por vezes mais), após a transmissão, no entanto, os primeiros anticorpos produzidos são inofensivos para o VIH (**figura 12**). A razão pela qual isto

acontece é ainda desconhecida (Alter & Moody, 2010; McMichael *et al.*, 2010; Ringe & Bhattacharya, 2013).



**Figura 12 – Cronologia da resposta imunitária humoral contra o VIH-1.** A resposta mediada por anticorpos decorre por etapas: os primeiros anticorpos produzidos são não neutralizantes e direcionados para a gp41 (1); em seguida, surgem anticorpos não neutralizantes contra a gp120 (2); aproximadamente 12 semanas (por vezes mais), após a transmissão, surgem os primeiros anticorpos neutralizantes que exercem pressão seletiva sobre o vírus (3); a rápida mutação viral resultante da fuga à neutralização é representada pela alteração da forma da gp120 (4); alguns indivíduos infetados, têm a capacidade de produzir, nesta fase, anticorpos neutralizantes contra a maioria dos isolados de VIH-1, representados na figura por diferentes formas da gp120 (5). Adaptado de (Alter & Moody, 2010)

Os anticorpos neutralizantes reconhecem determinados epítopos conservados e funcionalmente importantes do invólucro viral (gp120 e gp41), impedindo a ligação, fusão e conseqüente entrada do vírus nas células alvo, proporcionando a diminuição da replicação viral. Assim, é então possível destacar cinco regiões suscetíveis/vulneráveis à ação dos anticorpos neutralizantes, como: epítopos nos locais de ligação da gp120 e do recetor CD4; epítopos da V1/V2 e da C3/V3 da gp120; região MPER gp41 e epítopos na interface gp120-gp41. Estes epítopos abrangem uma extensa variedade de aminoácidos altamente conservados, contudo, apesar desta diversidade intrínseca, os anticorpos neutralizantes têm uma ampla ação, na medida em que, são ativados pelo reconhecimento destas regiões conservadas (Alter & Moody, 2010; Hraber *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014).

Durante a infecção por VIH, tal como referido anteriormente, vários anticorpos neutralizantes são produzidos, podendo surgir em diferentes fases da infecção (**figura 12**). Os anticorpos produzidos são direcionados, não só para os *loops* das regiões hipervariáveis (V1, V2 e possivelmente V4), como também, para o local de ligação entre a gp120 e o co-recetor CD4. Estes últimos têm como alvo os epítomos que são formados após o rearranjo estrutural resultante desta ligação. De notar que, mais de 90% dos indivíduos infetados pelo VIH-1 produz este tipo de anticorpos, que chegam a atingir elevados níveis no plasma (Davis *et al.*, 2009; Hraber *et al.*, 2014).

Uma vez que, o local de ligação do co-recetor à gp120 é funcional e antigenicamente conservado, estes anticorpos apresentam muito mais reatividade cruzada do que aqueles que têm como alvo as regiões variáveis. Este tipo de reatividade estende-se, não só entre vírus do mesmo subtipo do VIH-1, como também entre os diferentes subtipos e até mesmo entre o VIH-1 e o VIH-2. Contudo, este tipo de anticorpos apresenta baixa potência contra o vírus, uma vez que, antes da ligação do co-recetor à gp120, estes epítomos não se encontram formados e, após a sua formação, são conformacionalmente ocultos, impedindo o acesso dos anticorpos (Davis *et al.*, 2009; Hraber *et al.*, 2014; Ozkaya Sahin *et al.*, 2012).

Por último, verifica-se ainda a existência de outro tipo de anticorpos que surgem apenas no estado mais avançado da doença, contudo, são apenas partilhados por uma pequena percentagem de indivíduos (Davis *et al.*, 2009).

No entanto, apenas 20% dos indivíduos infetados desenvolve resposta imunitária humoral, capaz de reconhecer diferentes subtipos geneticamente diversificados. Alguns estudos demonstraram pouca evidência de que os diferentes subtipos do VIH correspondiam a distintos serotipos de neutralização, sendo a única exceção o subtipo B, onde, em amostras de plasma, foi possível a sua distinção da forma recombinante AE (CRF\_01\_AE). Estudos mais recentes e com um número de amostras considerável revelaram que, não só os múltiplos subtipos do VIH induzem diferentes serotipos de neutralização, como também, dos seis subtipos do VIH, o subtipo C é o que consegue uma maior neutralização (Davis *et al.*, 2009; Hraber *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; McKinley *et al.*, 2014; Ringe & Bhattacharya, 2013).

Estudos revelam que, a sensibilidade aos anticorpos neutralizantes, está intimamente relacionada com as dimensões dos *loops* das regiões hipervariáveis do env. Assim, vírus

que contenham *loops* mais longos, como o caso da região V1/V2, são geralmente menos sensíveis aos anticorpos neutralizantes do que vírus com *loops* mais curtos. Paralelamente remetem ainda para a hipótese de que, vírus provenientes de indivíduos com anticorpos neutralizantes mais potentes detêm um env mais resistente, devido à fuga, à neutralização. Esta resistência é conferida pelos longos *loops* da V1/V2. Contudo, o mesmo já não se verifica para as regiões V4 e V5. As variações na dimensão das diferentes regiões hipervariáveis estão associadas com a forte pressão seletiva a que são submetidas (Davis *et al.*, 2009; Hraber *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2013; Ozkaya Sahin *et al.*, 2012). Por exemplo, a região V1, pode variar de tamanho entre 5 a 42 aminoácidos, refere um estudo realizado por Hraber e colaboradores. O mesmo estudo refere ainda que, apesar das regiões V1/V2, V4 e V5 conterem regiões hipervariáveis, a V3, embora apresente variabilidade, não contém regiões hipervariáveis (Hraber *et al.*, 2014).

À semelhança do VIH-1, as glicoproteínas do VIH-2 (gp125 e gp36) são os principais alvos de neutralização. Contudo, a V3 do VIH-2 é menos variável e mais acessível que a do VIH-1, o que pode contribuir para a reduzida resistência à neutralização (Diwan *et al.*, 2013; Uchtenhagen *et al.*, 2011).

Na infeção por VIH-1, a resposta neutralizante proporciona a evolução do *env*, no sentido de conferir maior resistência à neutralização. Contrariamente, durante a infeção por VIH-2 a elevada atividade neutralizante, não só é concomitante com a baixa carga viral, como com a manutenção da sensibilidade à neutralização. Este estudo admite que, não só as glicoproteínas do invólucro do VIH-1 e VIH-2 não detêm os mesmos alvos de neutralização, como que, o VIH-2 é mais acessível à mesma (Diwan *et al.*, 2013; Ozkaya Sahin *et al.*, 2012; Uchtenhagen *et al.*, 2011).

Outro aspeto que pode estar relacionado com as diferenças a nível da neutralização, segundo alguns autores, é a possibilidade do VIH-1 possuir menos espículas, e assim, os anticorpos poderão não se ligar de forma tão eficaz, resultando numa resistência aparente à neutralização. Neste contexto, seria interessante perceber se o env do VIH-2 apresenta um maior número de espículas, promovendo uma ligação mais eficaz dos anticorpos que neutralizam o vírus (Ozkaya Sahin *et al.*, 2012).

A diferença na sensibilidade aos anticorpos, verificada entre o VIH-1 e o VIH-2, pode, igualmente estar relacionada com a estrutura da região V3 (Barroso *et al.*, 2011; Diwan

*et al.*, 2013; Ozkaya Sahin *et al.*, 2012; Uchtenhagen *et al.*, 2011). Num estudo, onde foram analisados isolados de VIH-1 e de VIH-2, verificou-se que, o VIH-2 apresenta apenas dois locais suscetíveis à glicosilação na região V3, enquanto, o VIH-1 detém quatro a cinco locais. A remoção destes locais, no VIH-1, promove o aumento da sensibilidade aos anticorpos neutralizantes. O mesmo estudo admite a hipótese de que, a diferença na densidade do glicano, pode conferir uma maior exposição e acessibilidade da V3 do VIH-2, do que a mesma região do VIH-1, explicando também a maior sensibilidade à neutralização por parte do tipo 2 do vírus (Ozkaya Sahin *et al.*, 2012).

Este estudo conclui que, apesar de difícil é desafiante a possibilidade de se proceder à modificação do env do VIH-1, de forma a ser possível proporcionar uma potente resposta humoral, semelhante à induzida pelo VIH-2 (Ozkaya Sahin *et al.*, 2012).

Em suma, no contexto da resposta humoral durante a infeção por VIH, as glicoproteínas do invólucro são responsáveis pela destruição dos anticorpos produzidos contra o vírus. Contudo, o aumento da taxa de mutação do mesmo leva as células B a atingirem um ponto de saturação, pela produção excessiva de anticorpos específicos. Deste modo, estas células perdem a capacidade de resposta contra novos antígenos produzidos. De notar que, o número de anticorpos neutralizantes difere da infeção aguda para a crónica, assim como a sua eficácia contra vírus autólogos e heterólogos. Estes anticorpos reconhecem sequências específicas do VIH, contudo, as constantes mutações sofridas por parte do genoma do vírus (**figura 12**), incapacitam a atividade destes anticorpos (Davis *et al.*, 2009; Gach *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; McKinley *et al.*, 2014; Espada de Sousa & Victorino, 2011; McMichael *et al.*, 2010; Ozkaya Sahin *et al.*, 2012; Ringe & Bhattacharya, 2013; Uchtenhagen *et al.*, 2011).

### **1.7. Estratégias para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a SIDA**

Trinta anos após a descoberta da SIDA, a tentativa de produzir uma vacina segura e eficaz tem vindo a intensificar-se. Inúmeros candidatos promissores a vacinas chegaram a ensaios clínicos de fase II e III, mostrando-se incapazes de demonstrar eficácia contra o VIH e, apenas um ensaio de fase III demonstrou proteção parcial contra o VIH-1 (Ondondo, 2014; Smith, Tanner, & Dalglish, 2014).

De uma maneira geral, as vacinas contra as infecções virais, promovem uma resposta imunológica baseada em anticorpos neutralizantes, semelhante à verificada no decurso duma infecção natural.

Para o VIH-1, é bastante aceite que, a vacina ideal terá que produzir anticorpos neutralizantes cujas características sejam a elevada diversidade genética e mutabilidade do *env*. Uma das maiores barreiras ao desenvolvimento de vacinas para este vírus é, não só a extensa diversidade do virião (representada pela existência de diversos subtipos amplamente distribuídos geograficamente), como também a sua constante evolução. Estes aspetos representam, tanto um desafio à produção de imunogénios direcionados aos vírus circulantes, como proporcionam a fuga do VIH à resposta imunológica induzida pelas vacinas (Murphy et al., 2013; Ondondo, 2014; Sanders et al., 2013).

Estudos admitem a hipótese de que, imunogénios derivados das regiões conservadas do VIH destacam-se, como candidatos mais adequados para vacinas. Contudo, o desenvolvimento de uma vacina que tenha por base epítomos conservados, no sentido de promover uma proteção global e minimizar a fuga à neutralização é dificultado pela inacessibilidade dos domínios conservados do invólucro viral (Murphy et al., 2013; Ondondo *et al.*, 2014; Sanders et al., 2013).

Uma abordagem para a criação de uma vacina preventiva contra vírus da imunodeficiência humana tipo 1, é a produção de um imunogénio capaz de induzir, de um modo geral, títulos adequados de anticorpos neutralizantes. Estudos revelam que, a ampla produção de anticorpos neutralizantes requer a produção de um imunogénio baseado no *env*, ou seja, construído por proteínas com epítomos imunogénicos. A título de exemplo, destaca-se o trímero BG505 SOSIP.664, que foi submetido a diversos ensaios clínicos e demonstrada a sua imunogenicidade em animais. O trímero BG505 pertence à gp120 do subtipo A e SOSIP são trímeros, baseados no *env* BG505, que expressam múltiplos epítomos que promovem a produção de anticorpos amplamente neutralizantes. A sua imunização provoca uma forte e consistente resposta imunológica, pela produção de anticorpos neutralizantes contra uma estirpe de VIH-1 habitualmente resistente à neutralização, a BG505. Contudo, não só não foi conseguida a esperada produção de anticorpos amplamente neutralizantes, como também não foi possível a prevenção da infeção (Hoffenberg *et al.*, 2013; Ondondo *et al.*, 2014; Sanders & Moore, 2014; Sanders et al., 2013).

Uma diferente abordagem, baseada em diversos estudos sobre aptidão viral e o desenvolvimento de vacinas indicam que, diversos componentes virais, como as proteínas regulatórias, podem contribuir para o comprometimento do sistema imunitário em indivíduos infetados.

A proteína regulatória *Tat*, produzida na fase precoce da infeção, desempenha um papel fundamental no ciclo de vida do VIH, nomeadamente a nível da replicação, e a nível extracelular, é responsável pela expressão de genes virais, transmissão viral entre células e pela progressão da doença. De notar que, esta proteína tem a capacidade de ser libertada extracelularmente, mesmo em indivíduos a receber terapêutica antirretroviral.

Durante o curso natural da infeção, os anticorpos direcionados contra esta proteína (anticorpos anti-*Tat*), são produzidos apenas por um número reduzido de indivíduos (20%), em contraste com a abundante quantidade de anticorpos produzidos contra as outras proteínas virais. Contudo, a razão pela qual se verifica esta reduzida produção de anticorpos ainda não é clara (Bellino et al., 2014; Ensoli et al., 2010; Garulli et al., 2014; Monini et al., 2012; Nicoli et al., 2013).

Para além das funções imunorregulatórias, a *Tat* detém a capacidade de direcionar e induzir a maturação das células dendríticas, proporcionando uma resposta imune, por parte das células Th1, influenciando não só o perfil imunológico contra a infeção pelo VIH-1 como também a sua patogénese. Isto deve-se ao facto de, os anticorpos anti-*Tat* estarem diretamente relacionados não só com a fase assintomática da infeção, com também com a progressão da doença. Esta proteína é ainda responsável pela proteção do *env* dos anticorpos anti-*Tat* (Bellino et al., 2014; Ensoli et al., 2010; Garulli et al., 2014; Monini et al., 2012; Nicoli et al., 2013).

Diversos estudos revelaram que, indivíduos assintomáticos e *long-term nonprogressors* apresentavam níveis elevados de anticorpos anti-*Tat*, quando comparados com indivíduos na fase avançada da doença ou *rapid progressors*, comprovando, à semelhança do supra referido, a relação entre a presença destes anticorpos com a fase assintomática da doença (Bellino et al., 2014; Garulli et al., 2014).

Outros estudos sugerem que, a imunização conjunta *Tat/env*, com a consequente produção de anticorpos anti-*Tat* e anti-*env*, amplifica o efeito de neutralização sobre o

VIH, por bloqueio do complexo *Tat/env* e da entrada do vírus, tal como já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* (Bellino *et al.*, 2014; Monini *et al.*, 2012).

Ensaio clínico de fase 1 e 2 que, procederam à imunização da proteína *Tat* em indivíduos infectados a receber terapêutica antirretroviral, mostraram-se seguros, toleráveis e com resultados positivos, na medida em que, não só se verificou elevados níveis de anticorpos anti-*Tat* como também a ativação dos linfócitos CD4+, CD8+, manutenção dos linfócitos B e NK e ainda redução progressiva do ADN pró-viral. Foi, de igual forma, possível observar a preservação dos níveis de células TCD4+, assim como da carga viral (Bellino *et al.*, 2014; Ensoli *et al.*, 2010; Monini *et al.*, 2012).

Os dados publicados permitiram concluir que, a indução de uma resposta imunitária humoral anti-*Tat*, pode contribuir eficazmente para retardar e, possivelmente contrariar, não só a progressão da infeção como o início da terapêutica antirretroviral. Em suma, os anticorpos produzidos juntamente com a terapêutica antirretroviral detêm uma ação sinérgica, conseguindo restabelecer a homeostase do sistema imunitário (Bellino *et al.*, 2014; Ensoli *et al.*, 2010; Monini *et al.*, 2012).

A procura duma vacina eficaz para o VIH tem-se intensificado, na medida em que, diferentes estratégias se encontram em curso (para além das anteriormente referidas), tendo como alguns exemplos: estratégias baseadas na tecnologia do ADN recombinante, baseadas em vetores recombinantes (MVA/B e MVA-C [Env/Gag-Pol-Nef do VIH e proteína CN54gp140], Ad35-GRIN/ENV, ALVAC.); imunoterapia (citocinas, IL-2, IL-7 e IL-2I); vacinas de ADN (PENNVAX, DermaVir e GTU-Multi-HIVB) e técnicas baseadas em células dendríticas (células dendríticas derivadas de monócitos) (Ensoli *et al.*, 2014; Ondondo *et al.*, 2014; Sanders & Moore, 2014; Smith *et al.*, 2014; Trivedi *et al.*, 2014).



## Capítulo 2 – Objetivos

### 2. Objetivos

O presente projeto consistiu em dois objetivos principais:

- Construção dum *env* quimérico contendo a região C2, V3 e C3 do VIH-2 e as restantes do VIH-1;
- Reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144 (gp120 da CRF\_01\_AE com uma porção da gp41 dum subtipo B (LAI), onde a região C2, V3 e C3 do VIH-1 foi substituída pela homóloga do VIH-2.

Para tal, recorreu-se à amplificação e purificação da região C2V3C3 do VIH-2 e do *env* do VIH-1.

Os dois *envs* serão testados quando à sua capacidade de indução de anticorpos de ligação contra a gp120 do VIH-1 e VIH-2 e indução de anticorpos de neutralização para o VIH-1 e o VIH-2.



**Capítulo 3 – Materiais e Métodos****3. Materiais e Métodos****3.1. Recolha das amostras de VIH-1 e VIH-2**

Para o presente projeto foram utilizadas amostras que continham plasmídeos recombinantes com o gene *env* do VIH-2 ALI e o genoma completo do VIH-1 (já existentes no laboratório de Microbiologia Molecular da FFUL).

**3.2. Escolha dos *Primers* (oligonucleótidos)**

*Primers* são pequenas sequências sintéticas de ADN, oligonucleótidos de 20-30 nucleótidos, sendo complementares à sequência da cadeia de interesse. Também conhecidos como iniciadores, marcam as extremidades da sequência alvo, desempenhando assim um papel fundamental na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Hadidi, Flores, Randles, & Semancik, 2003; Iserte *et al.*, 2013). Uma vez que o objetivo desta técnica não é replicar a cadeia inteira de ADN, mas apenas a sequência alvo, são utilizados dois *primers* com sequência complementar à da extremidade 3' e 5' do ADN em dupla cadeia a amplificar (Hadidi *et al.*, 2003; Roche Portugal, 2013). Estes devem ainda possuir as seguintes características: conter um número semelhante dos quatro dNTPs (Adenina, Citosina, Guanina e Timina); apresentar uma baixa propensão para formar estruturas secundárias estáveis; uma distribuição equilibrada de resíduos de guanina (G) e citosina (C) (cerca de 50%), o que determina a sua temperatura de fusão e consequentemente a de hibridação (*annealing*) e serem específicos na sua amplificação, ou seja, devem amplificar o fragmento de ADN que se pretende e não outros fragmentos (Cheng & Y. Zhang, 2008).

Desta forma, a escolha adequada dos *primers* é fundamental para se obter os produtos desejados em grande quantidade, suprimindo a amplificação de sequências não requeridas e facilitando a consequente manipulação dos produtos amplificados (Cheng & Y. Zhang, 2008). A seleção e posterior análise dos *primers* podem ser efetuadas em programas específicos, nomeadamente o *PerlPrimer* e o *Oligotech*. Estes programas permitem a análise das características físico-químicas e estruturais dos *primers*, incluindo a temperatura de fusão ( $T_m$ ), a propensão para formação de estruturas secundárias e dimerização (Hadidi *et al.*, 2003; Iserte *et al.*, 2013).

No presente trabalho foram selecionados *primers* para a região C2V3C3 do *env* do VIH-2, e para o *env* do VIH-1, para que sejam, posteriormente, amplificadas pela técnica de PCR. Para tal, recorreu-se ao livro “*HIV Sequence Compendium 2008*” (Kuiken *et al.*, 2008a, 2008b).

Estes *primers* foram testados e analisados nos dois programas referidos anteriormente, tendo em conta as características fundamentais dos *primers*, para um bom processo de amplificação. Quando submetidas a ambos os programas, obtiveram-se dados e indicações favoráveis à escolha dos *primers* em questão (**anexo 1** para o VIH-2 e **anexo 2** para o VIH-1). Após receção dos *primers* procedeu-se à sua hidratação, obtendo uma concentração final de 10 µM (**tabela 3** para o VIH-2 e **tabela 4** para o VIH-1).

**Tabela 3** – Características dos *primers* para a região C2V3C3 do VIH-2

	C2V3C3 do VIH-2	
	HIV2C2V3C3 FW (Forward)	HIV2C2V3C3 RV (Reverse)
Sequência	5' GGT GTT ACA TGA ACC ATT GC 3'	5' ATA GAG AAA TTG TCC TCT GC 3'
T <sub>m</sub> (50 nM NaCl)	45 °C	43 °C
T <sub>m</sub> (1 M Na <sup>+</sup> )	66 °C	64 °C
T <sub>m</sub> usada no PCR	50°C	
Tamanho	20 Bases	20 Bases
Conteúdo em GC	45%	40%
Peso Molecular	6133,0	6117,0
nm/OD <sub>260</sub>	4,5	4,5
µg/OD <sub>260</sub>	27,8	27,3
Coefficiente de extinção	220,9 (OD/µmol)	224,4 (OD/µmol)
Quantidade de oligonucleótido ou <i>primer</i>	43,9 nMoles	41,5 nMoles
Concentração Final	10µM	10µM

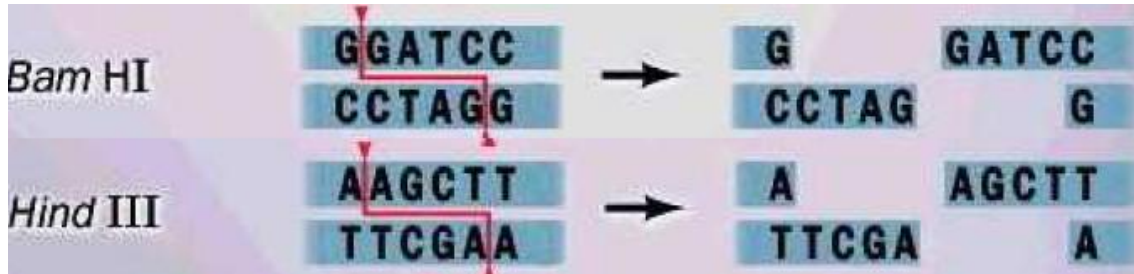
**Tabela 4** – Características dos *primers* para amplificação do ENV do VIH-1

	ENV VIH-1	
	HIV1ENV FW (Forward)	HIV1ENV RV (Reverse)
Sequência	5' ATG AGA GTG AAG GAG ATC AG 3'	5' TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT 3'
Tm (50 nM NaCl)	45 °C	47 °C
Tm (1 M Na <sup>+</sup> )	66 °C	68 °C
Tm usada no PCR	50°C	
Tamanho	20 Bases	20 Bases
Conteúdo em GC	45%	45%
Peso Molecular	6280,0	5989,0
nm/OD <sub>260</sub>	4,0	5,0
µg/OD <sub>260</sub>	24,9	30,0
Coefficiente de extinção	252,1 (OD/µmol)	199,8 (OD/µmol)
Quantidade de oligonucleótido ou <i>primer</i>	39,3 nMoles	42,6 nMoles
Concentração Final	10µM	10µM

Por motivos referidos na secção dos resultados, foi necessário proceder à escolha de outros *primers*, cujas características se encontram expostas nos **anexos 3-5**.

Para o processo de amplificação do *env* do VIH-1 foram selecionados dois novos *primers*, o **HIV1ENZFW** (5' AGC GGATCC ATGAGAGTGAAGGAGATCAG 3') e o **HIV1ENZRV** (5' GAC AAGCTT ACCACTTGCCACCCAT 3'). Sendo a Tm destes *primers* sintetizados 58°C (para o forward) e 54°C (para o reverse), optou-se por uma temperatura de annealing de 50°C (**anexo 4**). De notar que, as informações fornecidas pelas **tabelas 3, 4, 5 e 6**, foram recebidas aquando a receção dos *primers* e usadas no decorrer deste projeto, enquanto as informações presentes nos **anexos 1-4**, são-nos dadas a partir de programas de simulação de *primers* e, apenas nos foram úteis, para decisão de encomenda dos mesmos.

Tornou-se, ainda, necessário acrescentar às novas sequências encomendadas dos *primer* referentes ao VIH-1, nove nucleótidos, dos quais, seis correspondem à sequência do enzima *Bam* HI (5'...GGATCC...3'), no caso do *primer* forward, e no caso do *primer* reverse, à sequência da enzima *Hind* III (5'...AAGCTT...3') (figura 13). Este facto permite, o posterior processo de ligação, do *env* quimérico final no plasmídeo pMJ6.1.



**Figura 13** – Sequências das enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III (Biblioteca de Genes, 2006)

### 3.3. Técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A reação de PCR é uma técnica de biologia molecular desenvolvida entre 1983 e 1985 por Kary Mullis (Cheng & Y. Zhang, 2008; Deepak *et al.*, 2007). Permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de ADN, a partir de uma quantidade mínima. Este processo decorre em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo, e que se repete um número específico de vezes. Assim, um ciclo de PCR é constituído pelos seguintes passos: desnaturação, hibridação ou *annealing* e extensão (Cheng & Y. Zhang, 2008; Kubista *et al.*, 2006; Roche Portugal, 2013).

Na desnaturação, o ADN alvo contendo a sequência a amplificar é desnaturado, ou seja, dá-se a separação das duas cadeias por quebra das pontes de hidrogénio, resultado do aquecimento a 94-96°C. A temperatura de desnaturação das cadeias é determinada, em parte, pelo seu conteúdo em G e C, sendo que, quanto maior for este conteúdo, maior será a temperatura necessária para a separação das duas cadeias da molécula de ADN. Analogamente, quanto mais longa for a molécula, maior terá que ser o tempo necessário para separar as duas cadeias à temperatura escolhida. De notar que, no 1º ciclo de PCR a desnaturação ocorre durante 5 minutos, aumentado a probabilidade de desnaturação completa de moléculas longas de ADN; nos ciclos seguintes, o tempo de desnaturação

pode ser diminuído para 30 segundos a 1 minuto (Cheng & Y. Zhang, 2008; Hadidi *et al.*, 2003).

No segundo passo, hibridação ou *annealing*, dá-se a ligação dos *primers*, por complementaridade, ao ADN alvo, a uma temperatura relativamente baixa (55-60°C). No entanto, a temperatura utilizada neste passo é crítica e dependente do conteúdo G e C dos *primers*. Caso seja muito elevada ou muito superior à  $T_m$  dos *primers*, estes ligam-se mal ou não se ligam de todo, sendo a amplificação muito baixa ou inexistente. Se for muito baixa, a ligação pode ser inespecífica, amplificando fragmentos não pretendidos. A temperatura de hibridação é comumente praticada 5-10°C abaixo da  $T_m$  dos *primers* (Hadidi *et al.*, 2003).

No último passo, extensão, ocorre a polimerização e a síntese de inúmeras cópias da sequência alvo. A extensão ocorre à temperatura ótima para a síntese de ADN (72-78°C), sendo catalisada pela polimerase termoestável *Taq* ADN polimerase. No último ciclo deste passo, o tempo de extensão é três vezes superior ao dos ciclos anteriores, de forma a permitir que todas as moléculas amplificadas fiquem completas (Kubista *et al.*, 2006).

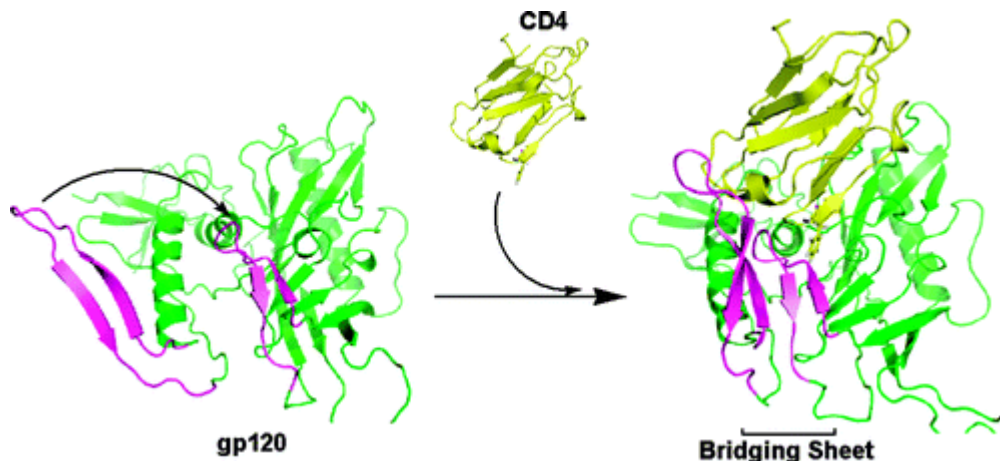
Estes três passos repetem-se um número limitado de vezes (normalmente 35 ciclos), em aparelhos designados por termocicladores. Apesar de extremamente potente, o processo de amplificação exponencial das sequências alvo de ADN não é ilimitado. A atividade da *Taq* polimerase torna-se limitante após 25-30 ciclos de amplificação (Cheng & Y. Zhang, 2008; Hadidi *et al.*, 2003).

Neste trabalho prático, procedeu-se, em primeiro lugar, à amplificação da região C2V3C3 do *env* do VIH-2 e, posteriormente, do *env* quimérico do VIH-1. Para a construção de um *env* quimérico, juntamente com o *primer* forward escolhido para amplificação do *env* do VIH-1 (HIV1ENVFW) utilizou-se a região C2V3C3 do VIH-2 como *primer* reverse. O produto amplificado designa-se por *megaprimer*. Uma terceira amplificação é então necessária para amplificar o restante *env* do VIH-1. Para tal, utilizou-se este *megaprimer* como *primer* forward e um *primer* reverse (HIV1ENVRV), para amplificação do *env* quimérico do VIH-1.

O gene *env*, não só apresenta o maior nível de diversidade dentro do genoma, como medeia a entrada do vírus na célula hospedeira, através da ligação a recetores celulares

específicos (CD4, CCR5 e/ou CXCR4), sofrendo ainda diversas alterações conformacionais resultantes destes processos (Barroso *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2013; Merk & Subramaniam, 2013; Riddle *et al.*, 2006; R. W. Sanders *et al.*, 2008; Weiss, 2013). Engloba, tal como anteriormente foi referido, diversas regiões, nomeadamente a região C2V3C3. Tal como explicado anteriormente, a V3 do VIH-1 é altamente imunogénica, porém, no contexto de um complexo trimérico, esta região é geralmente protegida do reconhecimento por anticorpos. Contrariamente, a V3 do VIH-2, não é bem exposta *in vivo* no invólucro, implicando que, não só esta região possa não ser imunodominante no decurso da infeção como, que esta proteção possa estar a impedir o reconhecimento por parte dos anticorpos. Assim, coloca-se a hipótese que, um env quimérico contendo as regiões C2, V3 e C3 do VIH-2 e as restantes do VIH-1, possam induzir o desenvolvimento de uma resposta amplamente neutralizantes contra os dois tipos do vírus.

Este domínio, a V3, aquando a ligação da gp120 ao recetor CD4, sofre diversas alterações conformacionais, com a conseqüente formação de *loops*. Estudos revelam a possibilidade destes *loops* exercerem um papel de proteção da ligação entre o domínio interno e externo da glicoproteína do invólucro, estando associados, não só à fuga desta região à neutralização, como também ao aumento da imunogenicidade destes domínios (Harrington *et al.*, 2007; Riddle *et al.*, 2006; Sagar, Wu, Lee, & Overbaugh, 2006). A nível da SU, são igualmente observadas distintas alterações que conduzem não só à formação da *Bridging Sheet* (**figura 14**) como ao aumentando da exposição das regiões V1, V2, V3 e C4. Isto resulta na aproximação entre o invólucro viral e a membrana celular, com a subseqüente interação da região V3 com o co-recetor (Guttman, Kahn, Garcia, Hu, & Lee, 2012; Schiavone *et al.*, 2012).



**Figura 14** - Ligação do recetor CD4 à gp120, com consequente alteração conformacional e formação da *Bridging Sheet* (Da, Quan, & Wu, 2009)

Para a amplificação da C2V3C3, usou-se uma mistura comercial - beads (Ilustra PureTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads – GE Healthcare), que já contém MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio), os dNTPs (Nucleótidos) e a *Taq*-polimerase. Ao tubo que já contém a bead, adicionou-se 2,0 µL do ADN em estudo, 2,5µl de cada primer, e água desionizada estéril até um volume reacional final de 50µL. Foi efetuado um controlo negativo em que o ADN é substituído por água destilada estéril.

A reação de PCR foi efetuada no termociclador (BIO-RAD) e após otimização das condições, o ciclo reacional de PCR utilizado foi, uma pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento do primer a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos.

Para a reação de PCR onde foram amplificados produtos mais longos (*megaprimer*), usou-se o kit Expand Long Template PCR System (Roche), que já contém MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio) e uma mistura enzimática que contém a *Taq*-polimerase e a *Tgo* ADN polimerase, uma polimerase com a capacidade de *proofreading activity* (mecanismo de correção). Esta mistura enzimática proporciona um maior rendimento do produto de PCR amplificado. Este kit está otimizado no sentido de amplificar eficientemente longos produtos de ADN genómico (aproximadamente produtos até 20kb).

A reação de PCR foi efetuada num termociclador (BIO-RAD), e após otimização das condições, o ciclo reacional de PCR utilizado foi, uma pré-desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos, extensão a 68°C durante 2 minutos, seguidos de 15 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos e extensão a 68°C durante 2 minutos, com incrementos de 20 segundos a cada ciclo. Por fim, uma extensão final a 68°C durante 7 minutos, conforme as instruções do fabricante.

Houve ainda a necessidade, como será referido na secção **4.2**, de aplicar um outro ciclo reacional para amplificação do *megaprimer*: pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 15 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento do primer a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos.

### 3.4. Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida é um método frequentemente utilizado para identificar ou separar fragmentos de ADN. Através da comparação entre, a distância percorrida pelos fragmentos e a distância percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular), é possível estimar o peso molecular de cada fragmento da amostra a analisar. Os géis de agarose têm um poder de resolução menor que os de poliacrilamida, no entanto, têm um maior poder de separação (Cheng & Y. Zhang, 2008; Lee, 2009).

A agarose é um polímero linear composto por resíduos alternados de D e de L-galactose, unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,3) e  $\beta$  (1,4). Funciona como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas, que vão portanto migrar mais do que as de maiores dimensões (Cheng & Y. Zhang, 2008).

Depois de preparado o gel de agarose, este é imerso numa tina de eletroforese com uma solução tampão que estabelece a condução elétrica com a fonte de alimentação. Uma vez aplicadas as amostras de ADN e o padrão de pesos moleculares nos poços, inicia-se a eletroforese. A aplicação do campo elétrico é efetuada através de 2 eléctrodos. Quando sujeitos a um campo elétrico, os ácidos nucleicos (que apresentam carga negativa) migram em direção ao pólo positivo (Cheng & Y. Zhang, 2008; Lee, 2009). A localização do ADN no gel pode ser determinada diretamente por coloração com baixas concentrações de corantes fluorescentes, que se intercalam entre as bases de ADN, como é o caso do brometo de etídio, podendo as bandas de ADN ser observadas por exposição do gel à luz ultravioleta (Cheng & Y. Zhang, 2008). Contudo, dada a toxicidade do brometo de etídeo, hoje em dia, utilizam-se outros corantes que não detêm estas características, nomeadamente o GelRed e o GreenSafe.

Os corantes utilizados na eletroforese também desempenham um papel fundamental, na medida em que, nos permitem a visualização dos fragmentos de ADN quando submetidos à luz ultravioleta. Temos como exemplo o GreenSafe Premium (nzytech), usado neste trabalho prático e adicionado ao gel antes da sua solidificação.

O tampão usado na eletroforese é de grande importância na medida em que, a mobilidade do ADN é influenciada pela força iônica e composição deste tampão. Na ausência de íões, a condutividade elétrica é mínima e o ADN migra muito lentamente ou não migra. Por oposição, em tampões com elevada força iônica a condutância é muito elevada. Tendo como alguns exemplos de tampões usados na eletroforese, o TAE e o TBE (Cheng & Y. Zhang, 2008; Lee, 2009).

Outro aspeto de extrema importância reside na concentração do gel, sendo que, quanto menor for a concentração do gel maior será a porosidade e portanto maior o fragmento de ADN que é separado. Contudo, quanto menor a concentração do gel, mais frágil ele se torna (Cheng & Y. Zhang, 2008; Lee, 2009).

Um corante que também foi parte integrante deste trabalho é o Azul de Bromofenol (Azul III). Também designado por “corante de eletroforese”, este não cora nem se liga ao ADN, mas permite a localização visual dos fragmentos durante o processo eletroforético.

No presente trabalho, foram executadas diversas eletroforeses, a diferentes concentrações de gel de agarose: 1% e 1,2%. Como referido anteriormente, o tamanho do fragmento amplificado e a concentração do gel de agarose estão intimamente relacionados, na medida em que, neste caso, foi necessário uma concentração do gel igual a 1,2% para que fosse possível uma boa separação e conseqüente definição da banda do fragmento correspondente à C2V3C3 do VIH-2, que apresenta um tamanho de 593pb. Em relação ao padrão de pesos moleculares, foi utilizado o **100bp DNA Ladder** (BioLabs), uma vez que apresenta doze bandas de tamanhos compreendidos entre 100 e 1517pb (**anexo 6, figura 36**). Dado que o fragmento em análise apresenta um tamanho igual a 593pb, torna-se possível a confirmação da sua correta amplificação, por comparação da banda obtida com o padrão de pesos moleculares utilizado (sensivelmente ao nível da sétima banda). Foi, de igual forma, utilizado um segundo padrão de pesos moleculares, o **λ DNA-HindIII Digest**, uma vez que apresenta oito

bandas de tamanhos compreendidos entre 125 e 23 130pb (**anexo 6, figura 37**). Uma vez que, o *megaprimer* amplificado, o produto amplificado pelo *megaprimer* e o *env* quimérico obtido, apresentam um tamanho de 1190, 1425 e 2635pb, respetivamente, torna-se possível a confirmação da sua correta amplificação, por comparação da banda obtida com o padrão de pesos moleculares utilizado.

Após obtenção e conseqüente confirmação da correta amplificação das bandas em análise, procedeu-se à purificação dos produtos de PCR correspondentes (**anexo 7**).

### **3.5. Reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144**

O ensaio clínico de fase três RV144, conduzido na costa leste da Tailândia, consistiu, num regime de imunização conjunta dum vírus recombinante, ALVAC-HIV<sup>®</sup> (vCP1521), com a AIDSVAXB/E. A ALVAC-HIV<sup>®</sup>, expressa a gp120 da forma recombinante AE (CRF 01\_AE), com uma porção da gp41 dum subtipo B (LAI) e a AIDSVAXB/E expressa os genomas do subtipo B e da forma recombinante AE. Este regime conseguiu atingir uma eficácia de 31,2%, no que respeita à proteção da aquisição da infeção por VIH-1 (Rerks-ngarm *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2012). A avaliação deste regime, na primeira e segunda fase do ensaio clínico, permitiu verificar a indução, tanto de resposta imunitária celular, como humoral. Estudos de imunogenicidade demonstraram que, esta imunização promoveu, não só a produção de anticorpos neutralizantes contra estirpes do VIH-1, como também contra antígenos específicos, resultantes de respostas linfo-proliferativas. Contudo, apesar da ampla resposta humoral obtida, a duração desta aparente proteção veio a confirmar-se ser limitada. De notar ainda que, este tipo de imunização quando aplicada num indivíduo norte-americano, que teve relações sexuais com outro homem, não diminuiu a possibilidade de aquisição do VIH-1. Todavia, e apesar do supra referido, este estudo forneceu a prova de que é possível produzir uma vacina que induza uma resposta imunitária protetora, bloqueando a infeção (Karasavvas *et al.*, 2012; Kijak *et al.*, 2013; McMichael & Haynes, 2012; Pitisuttithum *et al.*, 2011; Rerks-ngarm *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2012).

Tendo todos estes aspetos em conta, desenvolveu-se uma sequência semelhante ao regime ALVAC-HIV<sup>®</sup>, ou seja, utilizou-se a gp120 da forma recombinante AE e adicionámos a mesma porção da gp41 dum subtipo B (LAI). Contudo, substituiu-se a

C2V3C3 da gp120, pela C2V3C3 do VIH-2 ALI. Assim, através da manipulação da sequência no programa *MEGA6* (**figura 31**), obteve-se um *env* quimérico do VIH-1 com a região C2V3C3 do VIH-2. Esta substituição baseia-se no facto de, como anteriormente referido, a região V3 do VIH-1, apesar de altamente imunogénica, no contexto de complexo trimérico funcional do ENV é geralmente protegida do reconhecimento por anticorpos e, portanto, não serve como alvo eficaz de anticorpos neutralizantes. Em contraste, a região V3 do VIH-2 apresenta menor diversidade de aminoácidos e *in vivo* não é bem exposta no invólucro. A natureza oculta da V3 no invólucro do VIH-2 implica que esta região pode não ser imunodominante no decurso da infeção e que, esta proteção possa impedir que seja reconhecida pelos anticorpos. No entanto, a C3 do VIH-2 é acessível aos anticorpos, na medida em que, o elevado grau de pressão seletiva detetada na C3 sugere que, esta região possa igualmente ser um importante domínio de neutralização.

Em suma, após síntese e clonagem no plasmídeo pcDNA3.1, o objetivo será sub-clonar este *env* em pMJ6.1, introduzi-lo em vírus da vaccinia e verificar se há expressão da proteína construída. Posteriormente, este *env* quimérico será imunizado em ratinhos, com o intuito de perceber se o sistema imunológico é capaz de induzir anticorpos contra ambos os vírus VIH-1 e VIH-2.



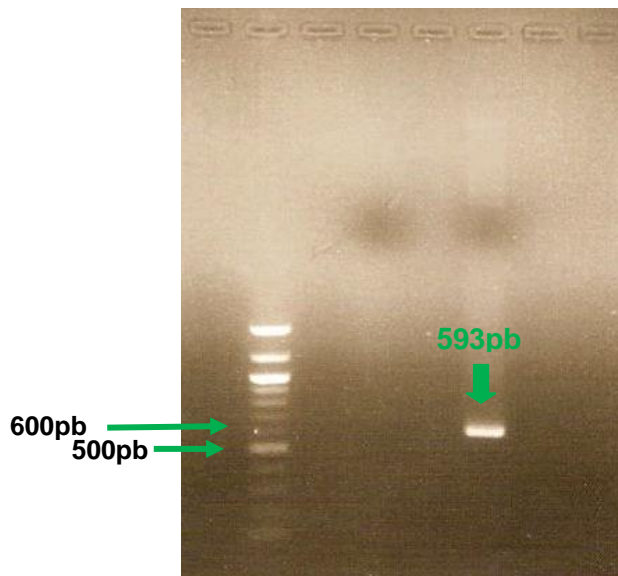
## Capítulo 4 – Resultados e Discussão

### 4. Resultados e Discussão

#### 4.1. Amplificação da região C2V3C3 do ENV de VIH-2

Foi efetuado um PCR para amplificação da região C2V3C3 do *env* VIH-2, utilizando *primers* específicos para esta região (**tabela 3**). A amplificação desta região foi possível utilizando uma temperatura de hibridação igual a 50°C.

Foi efetuada uma eletroforese, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1,2%, pois o produto de amplificação terá cerca de 593 nucleótidos. Após visualização do gel à luz ultravioleta foi possível identificar uma banda bastante nítida com aproximadamente 593pb, por comparação ao padrão de pesos moleculares utilizados tal como é possível visualizar na **figura 15**.



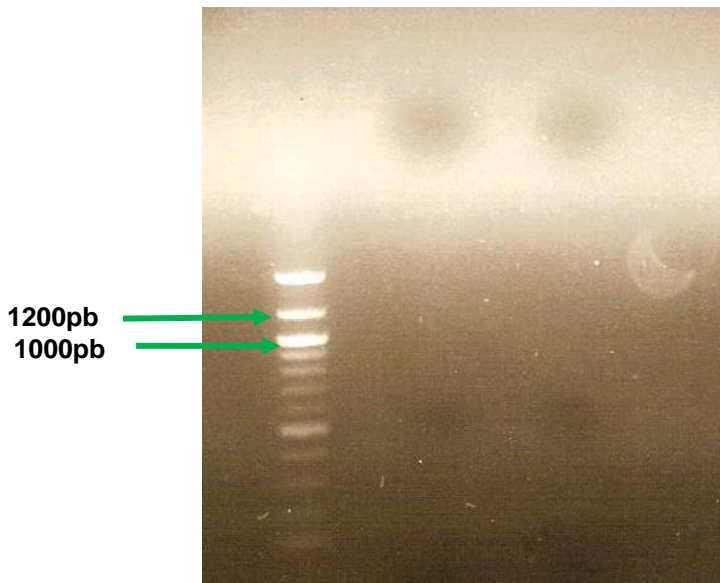
**Figura 15 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR da região C2V3C3 do VIH-2.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: C2V3C3 do VIH-2.

Após purificação do produto de PCR referente à C2V3C3, esta região foi utilizada como *primer* reverse, na amplificação do *env* do VIH-1.

#### 4.2. Amplificação do ENV do VIH-1

Foi efetuado um PCR para amplificação do ENV do VIH-1, utilizando *primers* específicos para esta região (**tabela 4**). Na amplificação desta região, utilizou-se inicialmente, uma temperatura de hibridação igual a 50°C, 2,5µl de cada *primer* (HIV-1ENVFW e C2V3C3 anteriormente amplificada) e 1µl de ADN. O ciclo reacional utilizado foi o seguinte: uma pré-desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos, extensão a 68°C durante 2 minutos, seguidos de 15 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos e extensão a 68°C durante 2 minutos, com incrementos de 20 segundos a cada ciclo. Por fim, uma extensão final a 68°C durante 7 minutos.

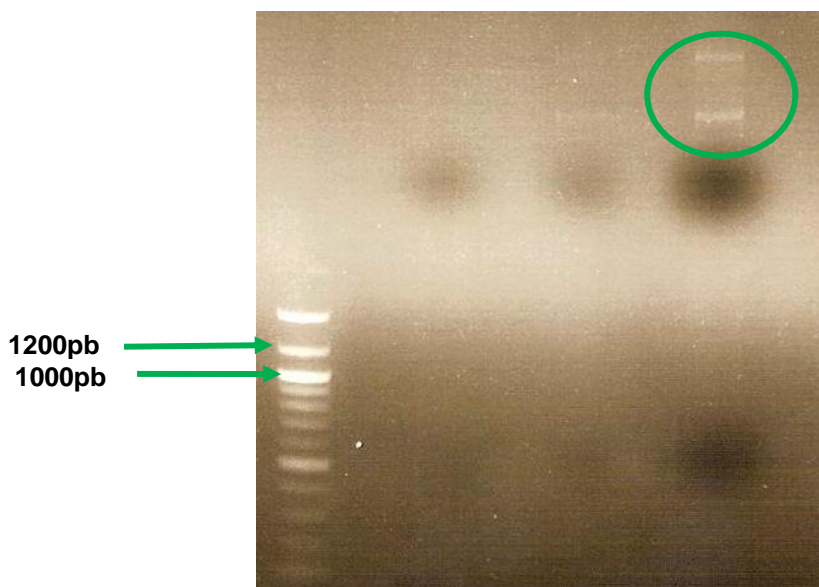
Foi efetuada uma eletroforese, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1,2%, pois o produto de amplificação terá cerca de 1190 nucleótidos. Após visualização do gel à luz ultravioleta, a banda resultante deveria estar entre a segunda e a terceira banda do marcador, contudo não foi possível identificar nenhuma banda, tal como é possível visualizar na **figura 16**.



**Figura 16 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR megaprimer.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: megaprimer.

Outra eletroforese foi realizada, com um maior volume de amostra (20µl), e após visualização à luz ultravioleta, apesar de não se visualizar nenhuma banda com

aproximadamente 1190pb, é possível distinguir duas bandas (circundadas a verde) com tamanhos muito superiores. Estas bandas correspondem a duas das três formas do plasmídeo SG3.1, que pode ser linear, circular e super enrolada, contudo, nem sempre é possível a visualização das três formas, tal como verificado na **figura 17**.

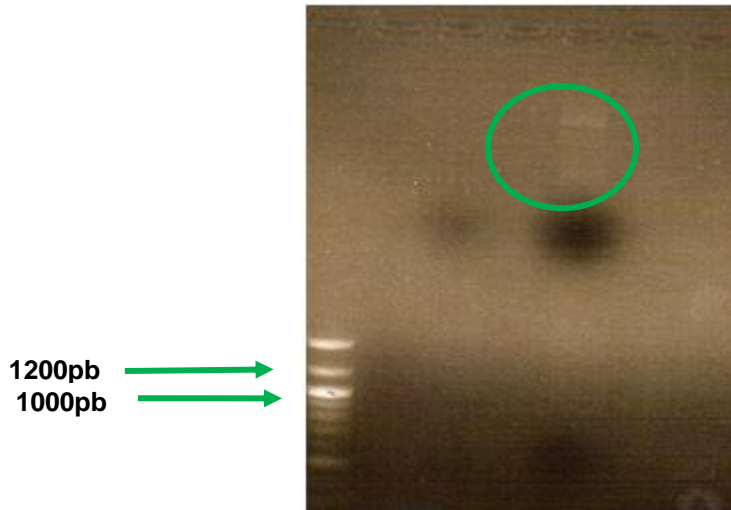


**Figura 17 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR megaprimer.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: megaprimer.

#### **Resolução de problemas:**

Uma vez que não foi obtida nenhuma banda, optou-se por efetuar um novo PCR, aumentando o volume de ADN a amplificar (4µl) e diminuindo a temperatura de hibridação para 45°C. O ciclo reacional manteve-se, assim como os volumes de todos os outros produtos essenciais à amplificação.

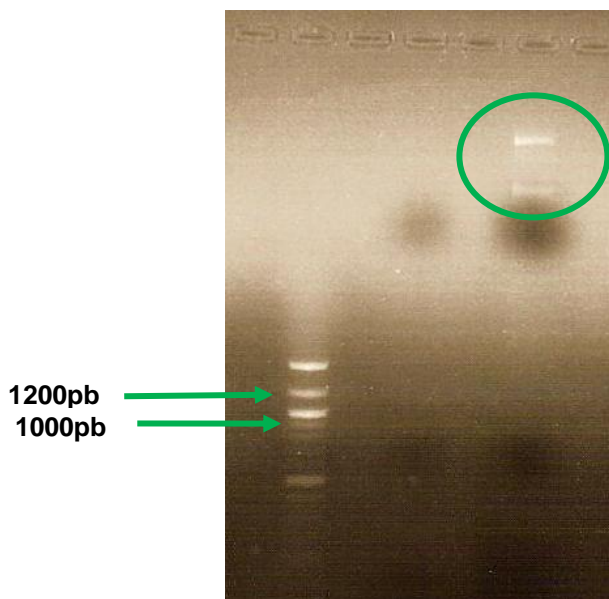
Foi efetuada uma eletroforese, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1,2%. Após visualização do gel à luz ultravioleta, não foi possível identificar nenhuma banda. Novamente, apenas são visíveis as bandas referentes ao plasmídeo, tal como é possível visualizar na **figura 18**.



**Figura 18 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR megaprimer.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: megaprimer.

Na tentativa de colmatar esta situação, realizou-se um novo PCR, aumentado a temperatura de pré-desnaturação para 95°C, manteve-se a temperatura de hibridação (45°C) e o volume de ADN (4µl), tendo apenas sido aumentado o volume de *primers*, para 3µl.

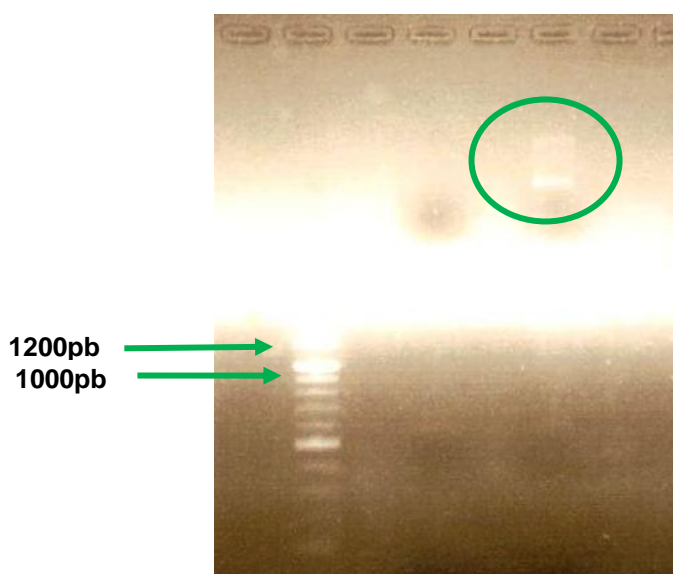
O produto amplificado foi analisado, em gel a 1,2%, onde, após visualização à luz ultravioleta, foi possível concluir o resultado igual ao anterior. Apenas as bandas referentes ao plasmídeo foram obtidas (**figura 19**).



**Figura 19 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR *megaprimer*.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: *megaprimer*.

De forma a esclarecer se, o problema residiria no ciclo reacional aplicado, este foi alterado para o seguinte: pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 15 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento do primer a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos. Na reação, foram utilizados 5µl de cada *primer* e 4µl ADN. A decisão de alteração do ciclo reacional baseou-se em experiências realizadas por outros investigadores (comunicação pessoal, Prof. Doutor Nuno Taveira).

Contudo, após análise do produto obtido em gel a 1,2%, as únicas bandas obtidas foram as referentes ao plasmídeo, como se pode concluir por observação da **figura 20**.



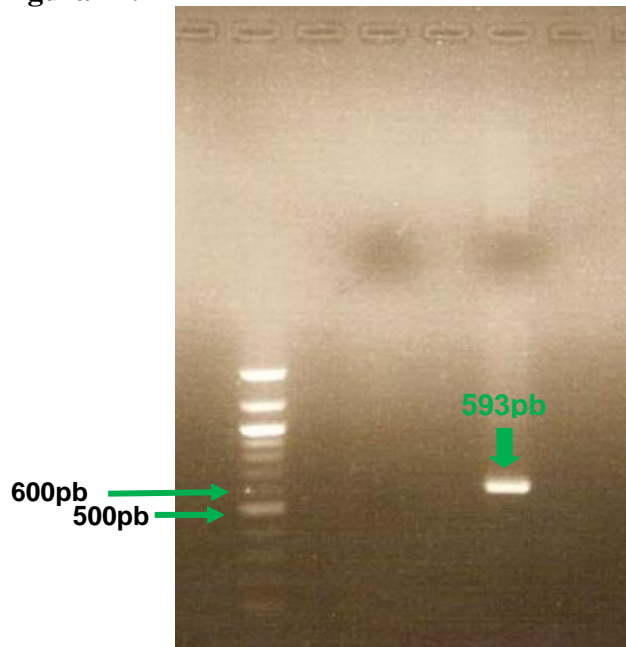
**Figura 20 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR *megaprimer*.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: *megaprimer*.

Tendo em conta o supra referido, decidiu-se alterar os *primers* inicialmente escolhidos, uma vez que estes podiam não estar a funcionar devidamente, promovendo assim, a sua não ligação ao ADN a amplificar. Isto pode estar na origem do facto do *primer* forward, inicialmente escolhido, começar antes da região C2V3C3 do VIH-2 e, assim, não estar a

ocorrer a ligação à mesma região do VIH-1, impossibilitando a amplificação do *megaprimer*. Desta forma, o novo *primer* forward corresponde aos primeiros 20 nucleótidos da região C2V3C3 do VIH-2.

Assim, a região C2V3C3 do VIH-2 foi novamente amplificada, nas mesmas condições referidas na **secção 4.1**, agora com outro *primer* forward escolhido (**tabela 5**).

Foi efetuada uma eletroforese, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1,2%, pois o produto de amplificação terá cerca de 593 nucleótidos. Após visualização do gel à luz ultravioleta foi possível identificar uma banda bastante nítida com aproximadamente 593pb, por comparação ao padrão de pesos moleculares utilizados tal como é possível visualizar na **figura 21**.



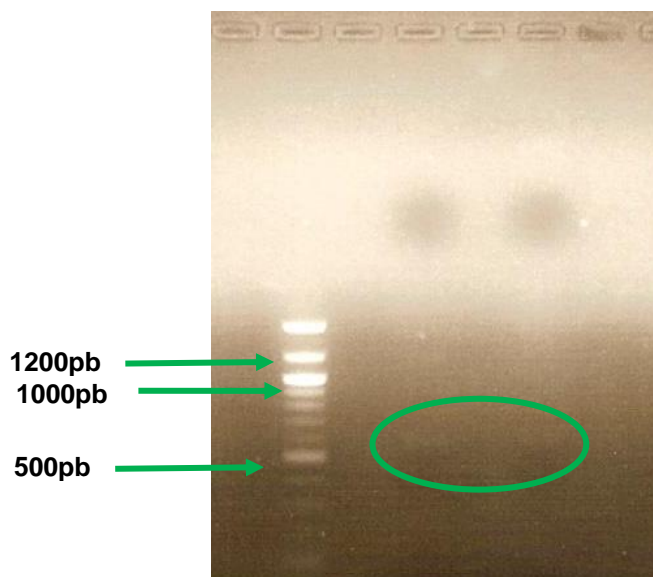
**Figura 21 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR da região C2V3C3 do VIH-2.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: C2V3C3 do VIH-2.

Após purificação do produto de PCR referente à C2V3C3, esta região foi utilizada como *primer* reverse, na amplificação do *env* do VIH-1.

Foi efetuado um PCR para amplificação do ENV do VIH-1, utilizando novos *primers* para esta região (**tabela 6**). Na amplificação desta região, utilizou-se o seguinte ciclo: pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 15 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1

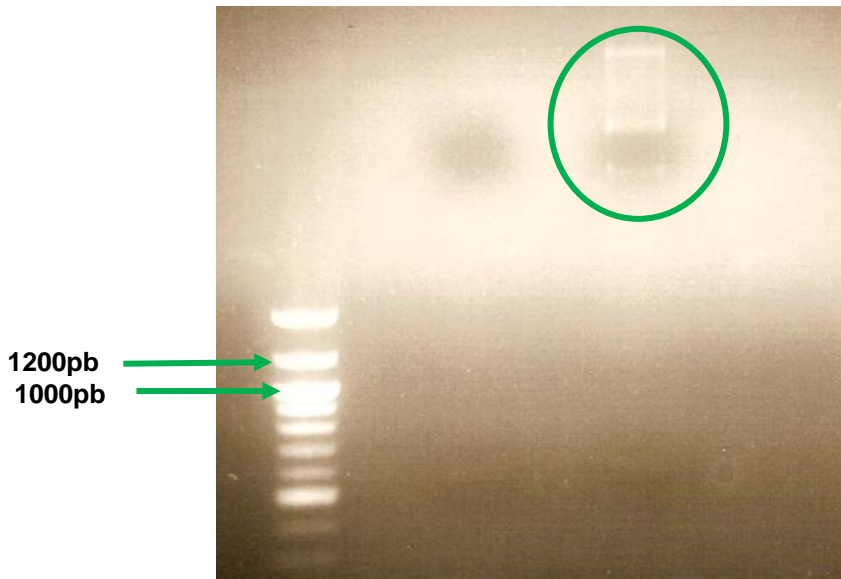
minuto, emparelhamento do primer a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos. A temperatura de hibridação utilizada foi de 50°C, 3µl do *primer* HIV1ENZVFW, 5µl da região C2V3C3 amplificada e 4µl de ADN.

Nova eletroforese foi realizada, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1,2%, pois o produto de amplificação terá cerca de 1190 nucleótidos. Após visualização do gel à luz ultravioleta, não foi possível identificar nenhuma banda. Contudo, é possível distinguir duas bandas, muito pouco nítidas, com sensivelmente 593pb (**ver figura 22**), que correspondem ao *primer* reverse (C2V3C3 VIH-2).



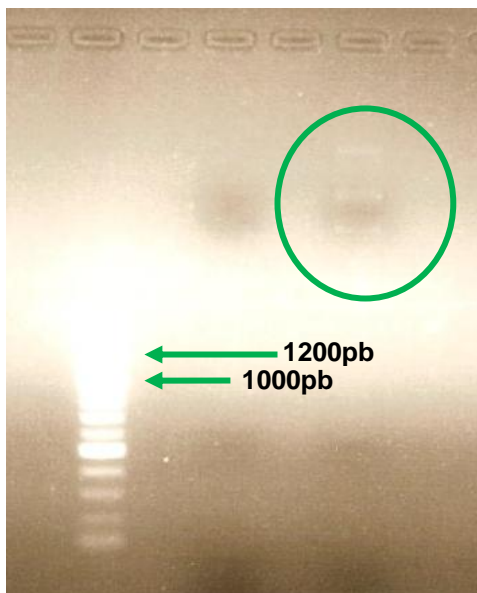
**Figura 22 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR megaprimer.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: megaprimer.

Uma vez que não foi obtida nenhuma banda, optou-se por efetuar um novo PCR, aumentando o volume de ADN a amplificar (5µl), assim como o do *primer* HIV1ENZVFW. O ciclo reacional manteve-se, assim como a temperatura de hibridação e os volumes de todos os outros produtos essenciais à amplificação. Após visualização do gel à luz ultravioleta, não foi possível identificar a banda pretendida, apenas as referentes ao plasmídeo, tal como é possível visualizar na **figura 23**.

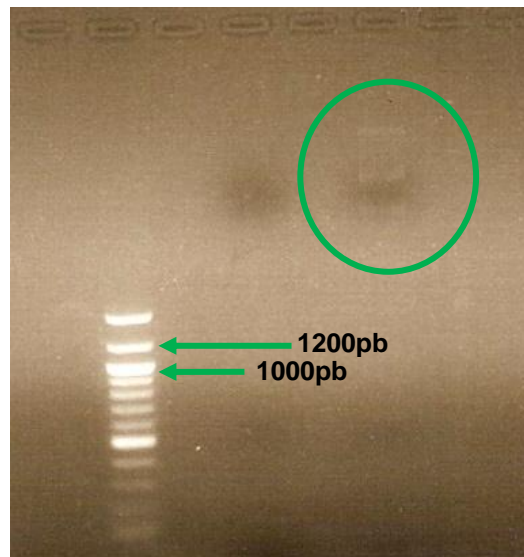


**Figura 23 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR *megaprimer*.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: *megaprimer*.

Uma vez que, se continuou sem obter a banda pretendida, procedeu-se à diminuição da temperatura de hibridação primeiro para 45°C e depois, para 42°C, contudo sem resultados (ver figuras 24 e 25, respetivamente).

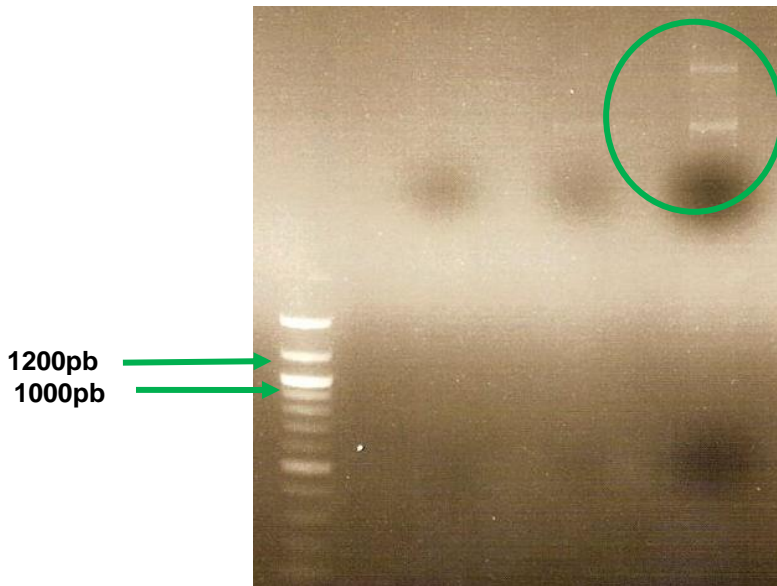


**Figura 24 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR *megaprimer* a 45°C.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: *megaprimer*.



**Figura 25 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR *megaprimer* a 42°C.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: *megaprimer*.



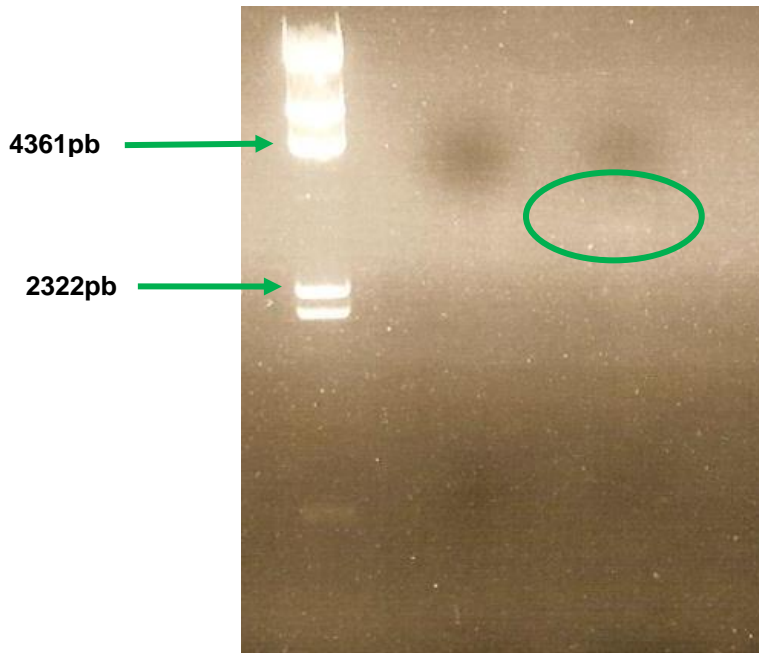


**Figura 27 - Gel de agarose a 1,2% do produto de PCR megaprimer.** 2º poço: marcador - 100bp DNA Ladder; 4º poço: branco; 6º poço: megaprimer.

De forma a ultrapassar este problema e, uma vez que se partia do genoma completo do VIH-1 e não apenas do ENV, decidiu-se, em primeiro lugar, proceder à amplificação do ENV, de forma a ser, posteriormente, utilizado na amplificação principal.

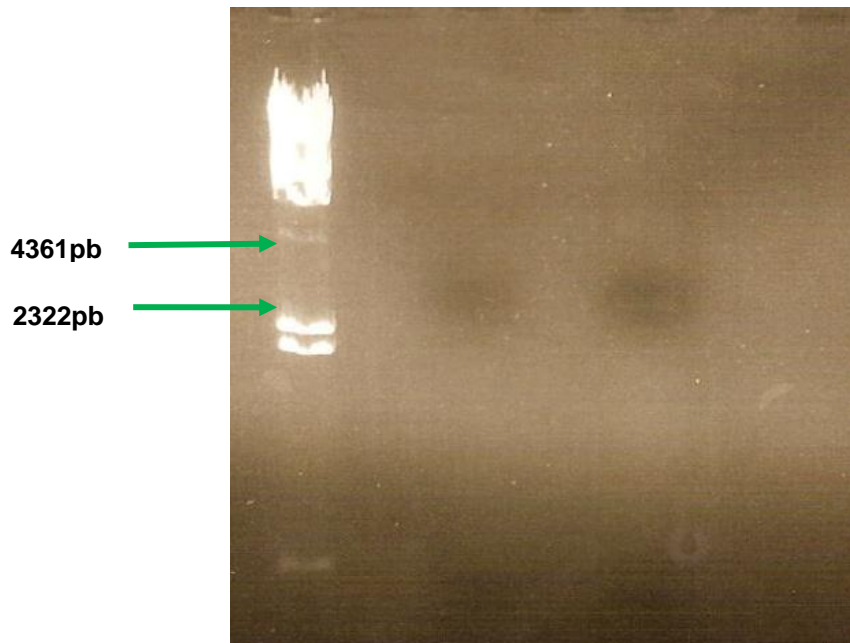
Desta forma, utilizou-se o ciclo reacional para produtos longos, uma vez que o ENV do VIH-1 apresenta aproximadamente 2600pb. Utilizaram-se 2,5µl dos *primers* HIV1ENZFW e HIV1ENZRV, 2µl de ADN e uma temperatura de hibridação igual a 50°C.

Foi realizada uma eletroforese, com uma corrente aplicada de 80V, num gel a 1%, pois o produto de amplificação terá cerca de 2600 nucleótidos. Após visualização do gel à luz ultravioleta foi possível identificar uma banda muito pouco nítida com aproximadamente 2600pb, por comparação ao padrão de pesos moleculares utilizados tal como é possível visualizar na **figura 28**.



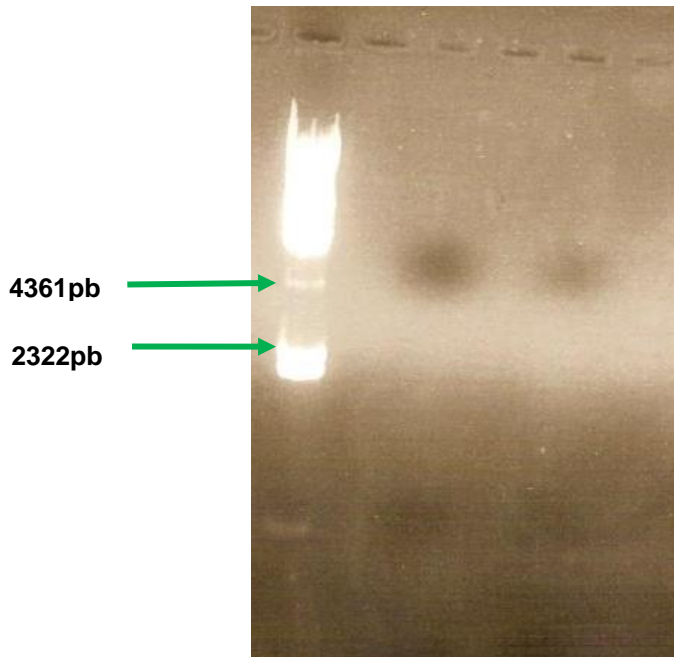
**Figura 28** - Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1. 2º poço: marcador -  $\lambda$  DNA-HindIII; 4º poço: branco; 6º poço: env do VIH-1.

De forma a resolver este problema, os volumes dos *primers* foram aumentados para 3,5 $\mu$ l, utilizou-se 3 $\mu$ l de ADN e diminuiu-se a temperatura de hibridação para 49°C. Contudo, após a visualização do gel, nenhuma banda foi obtida (**figura 29**).



**Figura 29** - Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1 a 49°C. 2º poço: marcador -  $\lambda$  DNA-HindIII; 4º poço: branco; 6º poço: env do VIH-1.

Este procedimento foi repetido, diminuindo apenas a temperatura de hibridação para 47°C. À semelhança do verificado anteriormente, nenhuma banda foi obtida (**figura 30**).



**Figura 30-** Gel de agarose a 1% da amplificação do env do VIH-1 a 47°C. 2º poço: marcador -  $\lambda$  DNA-*HindIII*; 4º poço: branco; 6º poço: env do VIH-1.

A origem da ausência de resultados pode residir em inúmeros fatores, nomeadamente, no facto dos *primers* não serem os mais adequados à amplificação do ENV do VIH-1 e, por isso, não se conseguir a sua amplificação. De igual forma, é importante referir que as condições reacionais aplicadas poderão não ser as mais adequadas, sendo necessário testar outros ciclos reacionais, volumes e temperaturas de hibridação. Outro aspeto relevante será efetuar um controlo positivo, no qual será testado a amplificação do ENV do VIH-2, utilizando a região C2V3C3 amplificada e um *primer* forward homologa ao início do ENV do VIH-2. O objetivo será testar este controlo em todas as etapas deste projeto.

#### 4.3. Reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144

Para a reconstrução da sequência utilizada no ensaio clínico RV144, foi necessário aceder à base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Em seguida, através do programa *MEGA6*, foi possível, não só a manipulação da sequência,

onde se procedeu à substituição da região C2V3C3 do VIH-1 pela mesma região do VIH-2 ALI, como à confirmação de que a proteína final seria funcional (**figura 31**). Após a finalização deste processo, a sequência foi enviada para uma empresa, que irá sintetizar o péptido e cloná-lo no plasmídeo pcDNA3.1.



**Figura 31** – Reconstrução da sequência no programa *MEGA6*

Após a síntese e clonagem no plasmídeo pcDNA3.1, o objetivo será sub-clonar o péptido obtido em pMJ6.1, introduzi-lo em vírus da vaccinia, e verificar se há expressão da proteína construída. Com a imunização, em ratinhos, deste *env* quimérico, pretende-se investigar se o sistema imunológico é capaz de induzir anticorpos contra ambos os vírus VIH-1 e VIH-2.

Tendo em conta os resultados obtidos, é possível concluir que, a correta amplificação da região C2V3C3 do VIH-2 ALI é conseguida através de um ciclo reacional de PCR de: uma pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento do primer a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos. Tendo em conta que, para a correta identificação do tamanho do fragmento, é necessário obter uma boa definição e intensidade da banda correspondente à amostra, foi efetuado um gel a 1,2% e uma voltagem aplicada de 80V. Assim, conseguiu-se a correta separação e identificação do fragmento alvo de 593pb. Adicionalmente, foi necessário adequar concentração do marcador utilizado, *100bp DNA Ladder*, sendo diluído numa proporção de 1:5. Desta forma, tornou-se possível verificar e, consequentemente confirmar, que houve amplificação da região alvo em estudo e que o fragmento obtido apresenta um tamanho de 593pb, por comparação ao padrão de pesos moleculares

utilizado (**figura 15**). Este facto, ainda confirma a correta escolha dos primers HIV2C2V3C3 FW e HIV2C2V3C3 RV que, caso não fossem específicos para região alvo, iriam amplificar um fragmento de tamanho não correspondente aos 593pb.

Contudo, o mesmo não se verificou para a amplificação do *megaprimer*. Inicialmente foi aplicado um ciclo reacional de, uma pré-desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos, extensão a 68°C durante 2 minutos, seguidos de 15 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 30 segundos e extensão a 68°C durante 2 minutos, com incrementos de 20 segundos a cada ciclo. Por fim, uma extensão final a 68°C durante 7 minutos. Foram utilizados 2,5µl de cada *primer* (HIV-1ENVFW e C2V3C3 anteriormente amplificada) e 1µl de ADN. Seria suposto obter-se um fragmento com tamanho aproximadamente igual a 1190pb, que corresponde à região inicial do *env* do VIH-1 até ao fim da C2V3C3. Todavia, a amplificação desta região não foi possível, como pode ser observado pela **figura 16**. Na tentativa de colmatar esta situação, tentou-se otimizar as condições de amplificação, tendo-se: aumentado o volume de ADN a amplificar (*env* VIH-1) (**figura 17**); diminuído a temperatura de hibridação para 45°C (**figura 18**); aumentar o volume de *primers* (**figura 19**) e alterar o ciclo reacional de PCR (**figura 20**) para, pré-desnaturação a 95°C durante 5 minutos, 15 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento do *primer* a 50°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto, e por fim, uma extensão final a 72°C durante 15 minutos. Uma vez que, nenhuma destas tentativas supra referidas teve sucesso, decidiu-se encomendar-se novos *primers*, tanto para a região C2V3C3 do VIH-2 ALI como para o *env* do VIH-1.

Todo o processo foi repetido com os novos *primers*, tendo-se, em primeiro lugar amplificado a região C2V3C3 do VIH-2 ALI, novamente com sucesso e nas mesmas condições da primeira amplificação. Em relação à amplificação do *megaprimer*, o mesmo já não aconteceu. Efetuou-se o ciclo reacional mais curto, com uma temperatura de hibridação de 50°C, 3µl do *primer* HIV1ENZVFW, 5µl da região C2V3C3 amplificada e 4µl de ADN. Nenhuma banda foi obtida, embora tivesse sido possível distinguir duas bandas, muito pouco nítidas, com sensivelmente 593pb (**figura 22**), que correspondem ao *primer* reverse (C2V3C3 VIH-2).

Desta forma, novas reações de PCR foram realizadas, na tentativa de se conseguir o resultado pretendido. Assim: aumentou-se o volume de ADN do *primer* HIV1ENZVFW, mantendo-se temperatura de hibridação e os volumes de todos os outros produtos essenciais à amplificação (**figura 23**); diminuiu-se da temperatura de hibridação primeiro para 45°C e depois, para 42°C (**figuras 24 e 25, respetivamente**); alterou-se o ciclo reacional para o mais longo e aumentou-se o volume dos *primers* e de DN para 10µl. Mais uma vez, nenhum resultado favorável foi obtido (**figuras 26 e 27**).

Ponderou-se que, o problema poderia residir no facto de se estar a partir de uma amostra que continha o genoma completo do VIH-1 e, sendo um fragmento consideravelmente grande, poderia interferir negativamente nas reações de amplificação. Tendo isto em conta, procedeu-se à amplificação do *env* do VIH-1 com os *primers* HIV1ENZFW e HIV1ENZRV (2,5µl de cada), 2µl de ADN e uma temperatura de hibridação igual a 50°C. O fragmento obtido apresentará aproximadamente 2600pb, que será confirmado através dum gel a 1%, uma corrente aplicada de 80V e do marcador de pesos moleculares  $\lambda$  **DNA-HindIII Digest**. No entanto, por observação da **figura 28**, é possível concluir que nenhuma banda foi obtida. Nova tentativa foi realizada, agora com 3,5µl de cada *primer*, 3µl de ADN e diminuição da temperatura de hibridação para 49°C e, posteriormente, para 47°C. Por observação das **figuras 29 e 30**, respetivamente, conclui-se que nenhuma banda foi obtida.

Tendo em conta o anteriormente referido, é possível constatar que, um dos principais obstáculos à realização deste projeto residiu em encontrar as condições mais adequadas à amplificação do *megaprimer*, sendo que, diversas são as razões que podem estar na origem na ausência de resultados. Contudo, isto não implica a impossibilidade de concretização dos objetivos propostos, na medida em que, inúmeras estratégias estão já em curso, de forma a alcançar os objetivos propostos, nomeadamente: uma otimização das condições reacionais; escolha de *primers* mais adequados; aquisição de um plasmídeo que contenha uma sequência conhecida do *env* de VIH-1, através da base de dados NIH, com o intuito de se proceder à amplificação do *megaprimer* e a produção de uma proteína funcional, semelhante à utilizada no ensaio clínico RV144, que será estada quanto à sua capacidade de indução de anticorpos neutralizantes contra o VIH-1 2 VIH-2.

Em relação à manipulação da sequência usada no ensaio clínico RV144, foi possível através do programa *MEGA6* (**figura 31**), o qual permitiu, ainda, a confirmação de que a sequência final seria funcional. É, igualmente, importante referir que, após síntese do péptido construído, este será sub-clonado em pMJ6.1, introduzido em vírus vaccinia, e analisado quanto à sua capacidade de indução, não só de anticorpos contra a gp120 dos dois tipos do vírus, como também quanto à indução de anticorpos neutralizantes.

## Capítulo 5 - Conclusões

### 5. Conclusões

Neste projeto, verificou-se a correta amplificação da região C2V3C3 do *env* do VIH-2 do ALI. Foi possível observar a presença de um fragmento de 593pb, confirmando o sucesso do processo de amplificação e da escolha apropriada dos *primers* utilizados.

Todavia, apesar da impossibilidade de amplificação do *megaprimer*, que impediu o cumprimento dos objetivos, é de considerar, a desafiante e inovadora estratégia de construção de um *env* quimérico contendo as regiões C2, V3 e C3 do VIH-2 e as restantes do VIH-1, com o propósito de induzir o desenvolvimento de uma resposta amplamente neutralizante contra o VIH-1 e VIH-2. Adicionalmente será igualmente relevante, analisar a resposta em anticorpos contra a gp120 do VIH-1 e VIH-2 nomeadamente em anticorpos neutralizantes para o VIH-1 e VIH-2, aquando da imunização do péptido reconstruído, cuja sequência será semelhante à utilizada no ensaio clínico RV144.

## 6. Bibliografia

Abecasis, A. B., Wensing, A. M., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K., Van de Vijver, D. A., Vandamme, A. (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, 10, 7.

Alter, G., & Moody, M. A. (2010). The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *The Journal of infectious diseases*. doi:10.1086/655654

Arnott, A., Jardine, D., Wilson, K., Gorry, P. R., Merlin, K., Grey, P., McPhee, D. a. (2010). High viral fitness during acute HIV-1 infection. *PloS one*, 5. doi:10.1371/journal.pone.0012631

AVERTing HIV and AIDS. (2013). HIV Structure and Life Cycle. Retrieved May 29, 1BC, from <http://www.avert.org/hiv.htm>

Ayinde, D., Maudet, C., Transy, C., & Margottin-Goguet, F. (2010). Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: is Vpx overshadowing Vpr? *Retrovirology*, 7, 35.

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*, 6, 14548.

Bártolo, I., Abecasis, A. B., Borrego, P., Barroso, H., McCutchan, F., Gomes, P., Taveira, N. (2011). Origin and epidemiological history of HIV-1 CRF14\_BG. *PloS one*, 6, e24130.

Bellino, S., Tripiciano, A., Picconi, O., Francavilla, V., Longo, O., Sgadari, C., Ensoli, B. (2014). The presence of anti-Tat antibodies in HIV-infected individuals is associated with containment of CD4+ T-cell decay and viral load, and with delay of disease progression: results of a 3-year cohort study. *Retrovirology*, 11, 49.

- Biblioteca de Genes. (2006). *Digestão com enzimas de restrição*. Retrieved January 31, 1BC, from <http://users.med.up.pt/med05009/bcm/aplicacoes.htm>
- Blaak, H., van der Ende, M. E., Boers, P. H. M., Schuitemaker, H., & Osterhaus, A. D. M. E. (2006). In vitro replication capacity of HIV-2 variants from long-term aviremic individuals. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2006.05.029
- Carvalho, A. C., Valadas, E., França, L., Carvalho, C., Aleixo, M. J., Mendez, J., ... Barros, H. (2012). Population mobility and the changing epidemics of HIV-2 in Portugal. *HIV medicine*, 13, 219–25.
- Castro-Nallar, E., Crandall, K. A., & Pérez-Losada, M. (2012). Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of HIV Transmission. *Future Virology*, 7, 239–252.
- CDC. (2008). AIDS - Defining Conditions. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.
- Cheng, L., & Y. Zhang, D. (2008). Molecular genetic pathology. In *DNA Separation Methods* (pp. 76–100).
- Chou, J. P., Ramirez, C. M., Wu, J. E., & Effros, R. B. (2013). Accelerated aging in HIV/AIDS: novel biomarkers of senescent human CD8+ T cells. *PloS one*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0064702
- Ciccozzi, M., Santoro, M. M., Giovanetti, M., Andrissi, L., Bertoli, A., & Ciotti, M. (2012). HIV-1 non-B subtypes in Italy: a growing trend. *The new microbiologica*, 35, 377–86.
- Cohen, M. S., M.D., G. M. S., M.D., P. D., McMichael, A. J., MB., B. C., & Haynes, B. F. (2011). Acute HIV-1 Infection. *National Institutes of Health*, 364, 1943–1954.
- Da, L.-T., Quan, J.-M., & Wu, Y.-D. (2009). Understanding of the Bridging Sheet Formation of HIV-1 Glycoprotein gp120. *J. Phys. Chem. B*, 113, 14536–14543.
- Davis, K. L., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Decker, J. M., Kutsch, O., Morris, L., Shaw, G. M. (2009). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2): HIV-1 envelope chimeras

detect high titers of broadly reactive HIV-1 V3-specific antibodies in human plasma. *Journal of virology*, 83, 1240–59.

De Silva, T. I., Cotten, M., & Rowland-Jones, S. L. (2008). HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in microbiology*, 16, 588–95.

Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Agrawal, G. (2007). Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics*, 8, 234–51.

Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, & em colaboração com Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA. (2013). *Infecção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de dezembro de 2012*. (I. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Ed.).

Diwan, B., Saxena, R., & Tiwari, A. (2013). HIV-2 and its role in conglutinated approach towards Acquired Immunodeficiency Syndrome ( AIDS ) Vaccine Development. *SpringerPlus*, 2, 1–8.

Duvall, M. G., Precopio, M. L., Ambrozak, D. A., Jaye, A., Andrew, J., Whittle, H. C., ... Koup, A. (2008). Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *National Institutes of Health*.

Ensoli, B., Bellino, S., Tripiciano, A., Longo, O., Francavilla, V., Marcotullio, S., Garaci, E. (2010). Therapeutic immunization with HIV-1 Tat reduces immune activation and loss of regulatory T-cells and improves immune function in subjects on HAART. *PloS one*. doi:10.1371/journal.pone.0013540

Ensoli, B., Cafaro, A., Monini, P., Marcotullio, S., & Ensoli, F. (2014). Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Frontiers in immunology*, 5, 417.

Espada de Sousa, A., & Victorino, R. (2011). Imunopatogénese e Resposta Imunitária. In *Manual sobre sida* (4<sup>a</sup> ed., pp. 55–76). Lisboa, Portugal: Permanyer Portugal.

- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection : a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*, 46, 5–14.
- Gach, J. S., Achenbach, C. J., Chromikova, V., Berzins, B., Lambert, N., Landucci, G., Murphy, R. L. (2014). HIV-1 specific antibody titers and neutralization among chronically infected patients on long-term suppressive antiretroviral therapy (ART): a cross-sectional study. *PloS one*, 9. doi:10.1371/journal.pone.0085371
- Gallo, R. C., & Montagnier, L. (2003). The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England journal of medicine*, 349, 2283–5.
- Gao, Y., Abreha, M., Nelson, K. N., Baird, H., Dudley, D. M., Abraha, A., & Arts, E. J. (2011). Enrichment of intersubtype HIV-1 recombinants in a dual infection system using HIV-1 strain-specific siRNAs. *Retrovirology*, 8, 5.
- Garulli, B., Di Mario, G., Stillitano, M. G., Compagnoni, D., Titti, F., Cafaro, A., Castrucci, M. R. (2014). Induction of antibodies and T cell responses by a recombinant influenza virus carrying an HIV-1 Tat $\Delta$ 51-59 protein in mice. *BioMed research international*, 2014, 904038.
- Gottlieb, G. S., Hawes, S. E., Agnew, H. D., Stern, J. E., Critchlow, C. W., Kiviat, N. B., & Sow, P. S. (2006). Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. *National Institutes of Health*. doi:10.1097/01.aids.0000218554.59531.80.Lower
- Guan, Y., Pazgier, M., Sajadi, M. M., Kamin-Lewis, R., Al-Darmarki, S., Flinko, R., Lewis, G. K. (2013). Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1 envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E69–78.
- Guttman, M., Kahn, M., Garcia, N. K., Hu, S., & Lee, K. K. (2012). Solution structure, conformational dynamics, and CD4-induced activation in full-length, glycosylated, monomeric HIV gp120. *Journal of virology*, 86, 8750–64.

Hadidi, A., Flores, R., Randles, J., & Semancik, J. (2003). Viroids: Properties, Detection, Diseases and their Control. In *Polymerase Chain Reaction* (pp. 115–122). Csiro.

Hammache, D. (1998). Specific Interaction of HIV-1 and HIV-2 Surface Envelope Glycoproteins with Monolayers of Galactosylceramide and Ganglioside GM3. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 7967–7971.

Harrington, P. R., Nelson, J. E., Kitrinou, K. M., & Swanstrom, R. (2007). Independent evolution of human immunodeficiency virus type 1 env V1/V2 and V4/V5 hypervariable regions during chronic infection. *Journal of virology*, 81, 5413–7.

HIV Databases. (2013). M Group Recombinants and Circulating Recombinant Forms. Retrieved March 17, from <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html>

Hoffenberg, S., Powell, R., Carpov, A., Wagner, D., Wilson, A., Kosakovsky Pond, S., Caulfield, M. J. (2013). Identification of an HIV-1 clade A envelope that exhibits broad antigenicity and neutralization sensitivity and elicits antibodies targeting three distinct epitopes. *Journal of virology*, 87, 5372–83.

Hofmann, H., Logue, E. C., Bloch, N., Daddacha, W., Polsky, S. B., Schultz, M. L., Landau, N. R. (2012). The Vpx lentiviral accessory protein targets SAMHD1 for degradation in the nucleus. *Journal of virology*, 86, 12552–60.

Horn, T., & Hahn, B. H. (2005). Tracing the Origin of the AIDS Pandemic, *10*, 4–8.

Hraber, P., Korber, B. T., Lapedes, A. S., Bailer, R. T., Seaman, M. S., Gao, H., Montefiori, D. C. (2014). Impact of Clade, Geography and Age of the Epidemic on Hiv-1 Neutralization By Antibodies. *Journal of virology*, 1–59.

Hu, W. S., & Temin, H. M. (1990). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1556–1560.

Huang, J., Kang, B. H., Pancera, M., Lee, J. H., Tong, T., Feng, Y., Connors, M. (2014). Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41–gp120 interface. *Nature*, 1–17.

Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Sugiura, W. (2010). HIV-2 CRF01\_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 54, 241–7.

Iserte, J. A., Stephan, B. I., Goñi, S. E., Borio, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2013). Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnology research international*, 2013, 383646.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., McLaren, P. J., Telenti, A., Kräusslich, H.-G., & Martinez-Picado, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS pathogens*, 10, e1004146.

Kannangai, R., David, S., & Sridharan, G. (2012). Human immunodeficiency virus type-2-A milder, kinder virus: An update. *Indian J Med Microbiol*, 30, 6–15.

Karasavvas, N., Billings, E., Rao, M., Williams, C., Zolla-Pazner, S., Bailer, R. T., de Souza, M. S. (2012). The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine trial (RV144) regimen induces antibodies that target conserved regions within the V2 loop of gp120. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28, 1444–57.

Katuwal, M., Wang, Y., Schmitt, K., Guo, K., Halemano, K., Santiago, M. L., & Stephens, E. B. (2014). Cellular HIV-1 inhibition by truncated old world primate APOBEC3A proteins lacking a complete deaminase domain. *Virology*, 532–544.

Kijak, G. H., Tovanabutra, S., Rerks-Ngarm, S., Nitayaphan, S., Eamsila, C., Kunasol, P., ... Kim, J. H. (2013). Molecular evolution of the HIV-1 Thai epidemic between the time of RV144 immunogen selection to the execution of the vaccine efficacy trial. *Journal of virology*, 87, 7265–81.

- Klatt, N. R., Chomont, N., Douek, D. C., & Deeks, S. G. (2013). Immune activation and HIV persistence: Implications for curative approaches to HIV infection. *National Institutes of Health*, 254. doi:10.1111/imr.12065.Immune
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27, 95–125.
- Kuiken, C., Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Korber, B. (2008a). HIV-2/SIV Complete Genomes. In *HIV Sequence Compendium* (pp. 151–157).
- Kuiken, C., Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Korber, B. (2008b). HIV-1/SIVcpz Complete Genomes. In *HIV Sequence Compendium* (pp. 9–220).
- Lai, R. P. J., Hock, M., Radzimanowski, J., Tonks, P., Lutje Hulsik, D., Effantin, G., Weissenhorn, W. (2014). A fusion intermediate gp41 immunogen elicits neutralizing antibodies to HIV-1. *The Journal of biological chemistry*. doi:10.1074/jbc.M114.569566
- Lee, M. (2009). Basic Skills in Interpreting Laboratory Data. In *Introduction to common Laboratory Assays and Technology* (pp. 17–39).
- Lever, A. M. L., & Berkhout, B. (2008). 2008 Nobel prize in medicine for discoverers of HIV. *Retrovirology*, 5, 91.
- Lihana, R. W., Ssemwanga, D., Abimiku, A., & Ndembu, N. (2012). Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. *AIDS reviews*, 14, 83–100.
- Lippincott Williams & Wilkins. (2009). Françoise Barré-Sinoussi and Luc Montagnier share the 2008 Nobel Prize for Physiology and Medicine for their discovery of the human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS*, 23:1, 9370.
- Liu, S., Mittler, J. E., Nickle, D. C., Mulvania, T. M., Shriner, D., Rodrigo, A. G., Mullins, J. I. (2002). Selection for human immunodeficiency virus type 1 recombinants in a patient with rapid progression to AIDS. *Journal of Virology*, 76, 10674 –10684.

Lodi, S., Fisher, M., Phillips, A., De Luca, A., Ghosn, J., Malyuta, R., Porter, K. (2013). Symptomatic illness and low CD4 cell count at HIV seroconversion as markers of severe primary HIV infection. *PloS one*, 8, e78642.

MacNeil, A., Sarr, A. D., Sankalé, J.-L., Meloni, S. T., Mboup, S., & Kanki, P. (2007). Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *Journal of virology*, 81, 5325–30.

Martins, H. C., Kislaya, I., & Nunes, B. (2013). Evolução temporal da idade à data de diagnóstico de infeção VIH/SIDA em Portugal: 1938-2012. *Observações \_Boletim Epidemiológico - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, 2–5.

McKinley, S., Chen, A., Shi, F., Wang, S., Mucha, P. J., Forest, M. G., & Lai, S. K. (2014). Modeling neutralization kinetics of HIV by broadly neutralizing monoclonal antibodies in genital secretions coating the cervicovaginal mucosa. *PloS one*, 9. doi:10.1371/journal.pone.0100598

McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *National Institutes of Health*, 10, 11–23.

McMichael, A. J., & Haynes, B. F. (2012). Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: new priorities and directions. *National Institutes of Health*, 13, 423–427.

Merk, A., & Subramaniam, S. (2013). HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Current opinion in structural biology*, 1–9.

Miedema, F., Hazenberg, M. D., Tesselaar, K., van Baarle, D., de Boer, R. J., & Borghans, J. M. (2013). Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00298

Miyamoto, T., Nakayama, E. E., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Shioda, T. (2012). The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2

circulating recombinant form 01\_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ . *PloS one*, 7, e47757.

Mogensen, T. H., Melchjorsen, J., Larsen, C. S., & Paludan, S. R. (2010). Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*, 7, 54.

Monini, P., Cafaro, A., Srivastava, I. K., Moretti, S., Sharma, V., Andreini, C., Ensoli, B. (2012). HIV-1 tat promotes integrin-mediated HIV transmission to dendritic cells by binding Env spikes and competes neutralization by anti-HIV antibodies. *PloS one*. doi:10.1371/journal.pone.0048781

Muenchhoff, M., Prendergast, A. J., & Goulder, P. J. R. (2014). Immunity to HIV in Early Life. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–13.

Murphy, M. K., Yue, L., Pan, R., Boliar, S., Sethi, A., Tian, J., Derdeyn, C. (2013). Viral escape from neutralizing antibodies in early subtype A HIV-1 infection drives an increase in autologous neutralization breadth. *PLoS pathogens*, 9, e1003173.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2012). HIV Replication Cycle. Retrieved May 29, from <http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/Pages/hivReplicationCycle.aspx>

newswise. (2012). “Transport Infrastructure” Determines Spread of HIV Subtypes in Africa. Retrieved May 25, 1BC, from <http://www.newswise.com/articles/transport-infrastructure-determines-spread-of-hiv-subtypes-in-africa>

Nicoli, F., Finessi, V., Sicurella, M., Rizzotto, L., Gallerani, E., Destro, F., Gavioli, R. (2013). The HIV-1 Tat protein induces the activation of CD8<sup>+</sup> T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses. *PloS one*. doi:10.1371/journal.pone.0077746

Ondondo, B. O. (2014). The influence of delivery vectors on HIV vaccine efficacy. *Frontiers in microbiology*, 5, 439.

- Ozkaya Sahin, G., Holmgren, B., da Silva, Z., Nielsen, J., Nowroozalizadeh, S., Esbjörnsson, J., Fenyö, E. M. (2012). Potent intratype neutralizing activity distinguishes human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) from HIV-1. *Journal of virology*, 86, 961–71.
- Paiardini, M., & Müller-Trutwin, M. (2013). HIV-associated chronic immune activation, 254. doi:10.1111/imr.12079.HIV-associated
- Pantaleo, G., Graziosi, C., & Fauci, A. S. (1993). The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *The New England Journal of Medicine*, 328, 327–335.
- Paraskevis, D., Lemey, P., Salemi, M., Suchard, M., Van De Peer, Y., & Vandamme, A.-M. (2003). Analysis of the evolutionary relationships of HIV-1 and SIVcpz sequences using bayesian inference: implications for the origin of HIV-1. *Molecular biology and evolution*, 20, 1986–96.
- Pereyra, F., Heckerman, D., Carlson, J. M., Kadie, C., Soghoian, D. Z., Karel, D., Walker, B. D. (2014). HIV control is mediated in part by CD8+ T-cell targeting of specific epitopes. *Journal of virology*. doi:10.1128/JVI.01004-14
- Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Bussaratid, V., Dhitavat, J., Maekanantawat, W., Pungpak, S., Kim, J. H. (2011). Safety and reactogenicity of canarypox ALVAC-HIV (vCP1521) and HIV-1 gp120 AIDSVAX B/E vaccination in an efficacy trial in Thailand. *PloS one*, 6. doi:10.1371/journal.pone.0027837
- Plantier, J. C., Damond, F., Brun-vézinet, F., Simon, F., & Barin, F. (2001). V3 Serological Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Is Not Relevant V3 Serological Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection Is Not Relevant. *Journal of Clinical Microbiology*, 39. doi:10.1128/JCM.39.10.3803
- Reeves, J. D., & Doms, R. W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology*, 83, 1253–65.

Rerks-ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Kim, J. H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *The New England journal of Medicine*, 361, 2209–2220.

Riddle, T. M., Shire, N. J., Sherman, M. S., Franco, K. F., Sheppard, H. W., & Nelson, J. E. (2006). Sequential turnover of human immunodeficiency virus type 1 env throughout the course of infection. *Journal of virology*, 80, 10591–9.

Ringe, R., & Bhattacharya, J. (2013). Preventive and therapeutic applications of neutralizing antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *Therapeutic advances in vaccines*, 1, 67–80.

Roche Portugal. (2013). Introdução à PCR. Retrieved September 30, 2012, from <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr/>

Rodriguez, S. K., Sarr, A. D., MacNeil, A., Thakore-Meloni, S., Gueye-Ndiaye, A., Traoré, I., Kanki, P. J. (2007). Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *Journal of virology*, 81, 5331–8.

Sagar, M., Wu, X., Lee, S., & Overbaugh, J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *Journal of virology*, 80, 9586–98.

Sanders, R. W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeeen, A., de Val, N., Moore, J. P. (2013). A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS pathogens*, 9, e1003618.

Sanders, R. W., & Moore, J. P. (2014). HIV: A stamp on the envelope. *Nature*, 1–2.

Sanders, R. W., van Anken, E., Nabatov, A. A., Liscaljet, I. M., Bontjer, I., Eggink, D., Paxton, W. A. (2008). The carbohydrate at asparagine 386 on HIV-1 gp120 is not essential for protein folding and function but is involved in immune evasion. *Retrovirology*, *5*, 10.

Sanjuán, R., Nebot, M. R., Peris, J. B., & Alcamí, J. (2013). Immune activation promotes evolutionary conservation of T-cell epitopes in HIV-1. *PLoS biology*, *11*. doi:10.1371/journal.pbio.1001523

Sarrami-Forooshani, R., Mesman, A. W., van Teijlingen, N. H., Sprokholt, J. K., van der Vlist, M., Ribeiro, C. M., & Geijtenbeek, T. B. (2014). Human immature Langerhans cells restrict CXCR4-using HIV-1 transmission. *Retrovirology*, *11*, 52.

Schiavone, M., Fiume, G., Caivano, A., de Laurentiis, A., Falcone, C., Masci, F. F., ... Scala, G. (2012). Design and Characterization of a Peptide Mimotope of the HIV-1 gp120 Bridging Sheet. *International journal of molecular sciences*, *13*, 5674–99.

Shang, L., & Hunter, E. (2010). Residues in the membrane-spanning domain core modulate conformation and fusogenicity of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology*, *404*, 158–167.

Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., & Hahn, B. H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *356*, 867–76.

Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *365*, 2487–94.

Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *1*.

Shi, Y., Brandin, E., Vincic, E., Jansson, M., Blaxhult, A., Gyllensten, K., ... Albert, J. (2005). Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage,

autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *The Journal of general virology*, 86, 3385–96.

Smith, P. L., Tanner, H., & Dalgleish, A. (2014). Developments in HIV-1 immunotherapy and therapeutic vaccination. *F1000prime reports*, 6, 43.

Souza, M. S., Ratto-Kim, S., Chuenarom, W., Schuetz, A., Chantakulkij, S., Nuntapinit, B., Kim, J. H. (2012). The Thai Phase III Trial (RV144) Vaccine Regimen Induces T Cell Responses that Preferentially Target Epitopes within the V2 Region of HIV-1 Envelope. *National Institutes of Health*, 188, 5166–5176.

St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S. M., Coleman, C. M., Hoy, H., Hollenbaugh, J. a, ... Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4+ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. *Retrovirology*, 9, 105.

St Gelais, C., & Wu, L. (2011). SAMHD1: a new insight into HIV-1 restriction in myeloid cells. *Retrovirology*, 8, 55.

Stanojevic, M., Alexiev, I., Beshkov, D., Gökengin, D., Mezei, M., Minarovits, J., ... Paraskevis, D. (2012). HIV-1 molecular epidemiology in the Balkans: a melting pot for high genetic diversity. *AIDS reviews*, 14, 28–36.

Trivedi, S., Jackson, R. J., & Ranasinghe, C. (2014). Different HIV pox viral vector-based vaccines and adjuvants can induce unique antigen presenting cells that modulate CD8 T cell avidity. *Virology*, 468-470C, 479–489.

Uchtenhagen, H., Friemann, R., Raszewski, G., Spetz, A.-L., Nilsson, L., & Achour, A. (2011). Crystal structure of the HIV-2 neutralizing Fab fragment 7C8 with high specificity to the V3 region of gp125. *PloS one*, 6. doi:10.1371/journal.pone.0018767

UNAIDS. (2013). Epidemiological Status. Retrieved February 12, from <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>

United Nations & AIDS. (2013). *The Gap Report*.

Valadas, E. (2011). Espectro Clínico da infecção por VIH. In *Manual sobre sida* (pp. 131–138). Lisboa, Portugal: Permanyer Portugal.

Van der Kuyl, A. C., & Berkhout, B. (2012). The biased nucleotide composition of the HIV genome: a constant factor in a highly variable virus. *Retrovirology*, 9, 92.

Visseaux, B., Hurtado-Nedelec, M., Charpentier, C., Collin, G., Storto, A., Matheron, S., Descamps, D. (2012). Molecular determinants of HIV-2 R5-X4 tropism in the V3 loop: development of a new genotypic tool. *The Journal of infectious diseases*, 205, 111–20.

Ward, M. J., Lycett, S. J., Kalish, M. L., Rambaut, A., & Leigh Brown, A. J. (2013). Estimating the Rate of Intersubtype Recombination in Early HIV-1 Group M Strains. *Journal of virology*, 87, 1967–73.

Weiss, R. A. (2013). Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. *BMC biology*, 11, 57.

White, T. E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J. C., Knowlton, C., Kim, B., Sawyer, S. L., & Diaz-Griffero, F. (2014). Effects of human SAMHD1 polymorphisms on HIV-1 susceptibility. *Virology*, 460-461, 34–44.

WHO. (2014). Data and statistics. *Number of people receiving ART and percentage of all people living with HIV receiving ART in low- and middle-income countries overall and by WHO region, 2013*.

WHO (World Health Organization). (2014). HIV/AIDS and other STIs: Data on the size of the HIV/AIDS epidemic. Retrieved February 15, from <http://apps.who.int/gho/data/node.main.618?lang=en>

World Health Organization. (2014). *Core epidemiological slides - HIV/AIDS estimates*.

World Health Organization: WHO. (2014). Global UPDATE on the Health Sector Response to HIV, 2014.

Wu, L. (2012). SAMHD1: a new contributor to HIV-1 restriction in resting CD4+ T-cells. *Retrovirology*, 9, 88.

Yang, O. O., Daar, E. S., Jamieson, B. D., Balamurugan, A., Smith, D. M., Pitt, J. A., Brown, A. J. L. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade B Superinfection : Evidence for Differential Immune Containment of Distinct Clade B Strains. *Journal of Virology*, 79, 860–868.

Zhang, R., Bloch, N., Nguyen, L. a, Kim, B., & Landau, N. R. (2014). SAMHD1 restricts HIV-1 replication and regulates interferon production in mouse myeloid cells. *PloS one*, 9, e89558.

Zheng, N. N., McElrath, M. J., Sow, P.-S., Hawes, S. E., Diallo-Agne, H., Stern, J. E., Kiviat, N. B. (2007). Role of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell immunity in control of dual HIV-1 and HIV-2 infection. *Journal of virology*. doi:10.1128/JVI.00117-07

## ANEXOS

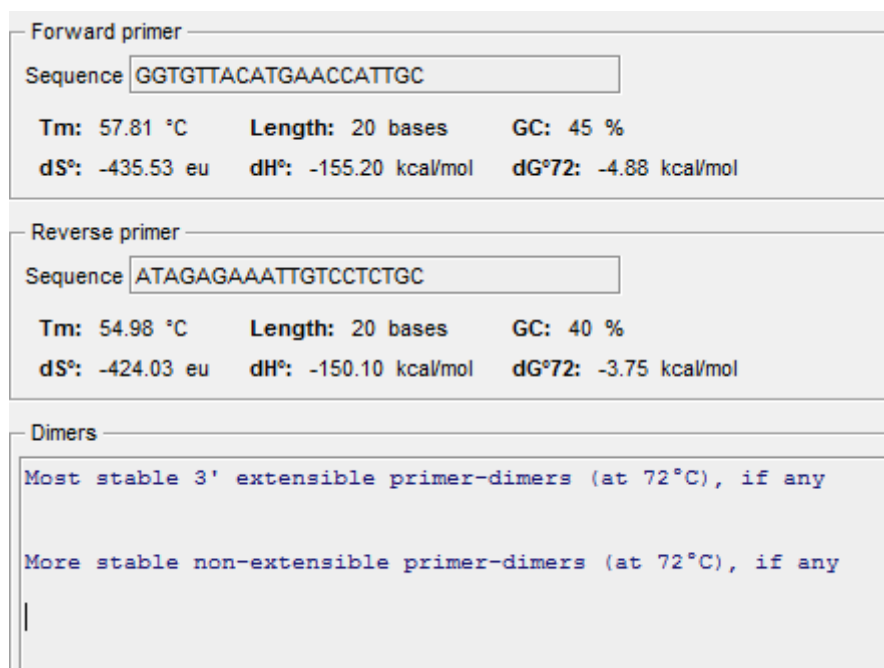
### Anexo 1: Características dos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI após análise no programa PerlPrimer

Forward: **HIV2C2V3C3 FW**

5' GGTGTTACATGAACCATTGC 3'

Reverse: **HIV2C2V3C3 RV**

5' ATAGAGAAATTGTCCTCTGC 3'



**Figura 32** – Informações obtidas a partir do programa *PerlPrimer* relativas aos *primers* HIV2C2V3C3 FW e HIV2C2V3C3 RV, respetivamente.

**Anexo 2: Características dos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após análise no programa PerlPrimer**

Forward: **HIV1ENV FW**

5' ATGAGAGTGAAGGAGATCAG 3'

Reverse: **HIV1ENV RV**

5' TTTGACCACTTGCCACCCAT 3'

Forward primer			
Sequence	ATGAGAGTGAAGGAGATCAG		
Tm:	56.21 °C	Length:	20 bases
dS°:	-422.03 eu	dH°:	-150.00 kcal/mol
		dG°72:	-4.34 kcal/mol
GC: 45 %			

Reverse primer			
Sequence	TTTGACCACTTGCCACCCAT		
Tm:	62.81 °C	Length:	20 bases
dS°:	-418.43 eu	dH°:	-151.80 kcal/mol
		dG°72:	-7.38 kcal/mol
GC: 50 %			

Dimers
Most stable 3' extensible primer-dimers (at 72°C), if any
More stable non-extensible primer-dimers (at 72°C), if any

**Figura 33** – Informações obtidas a partir do programa *PerlPrimer* relativas aos *primers* HIV1ENV FW e HIV1ENV RV, respetivamente.

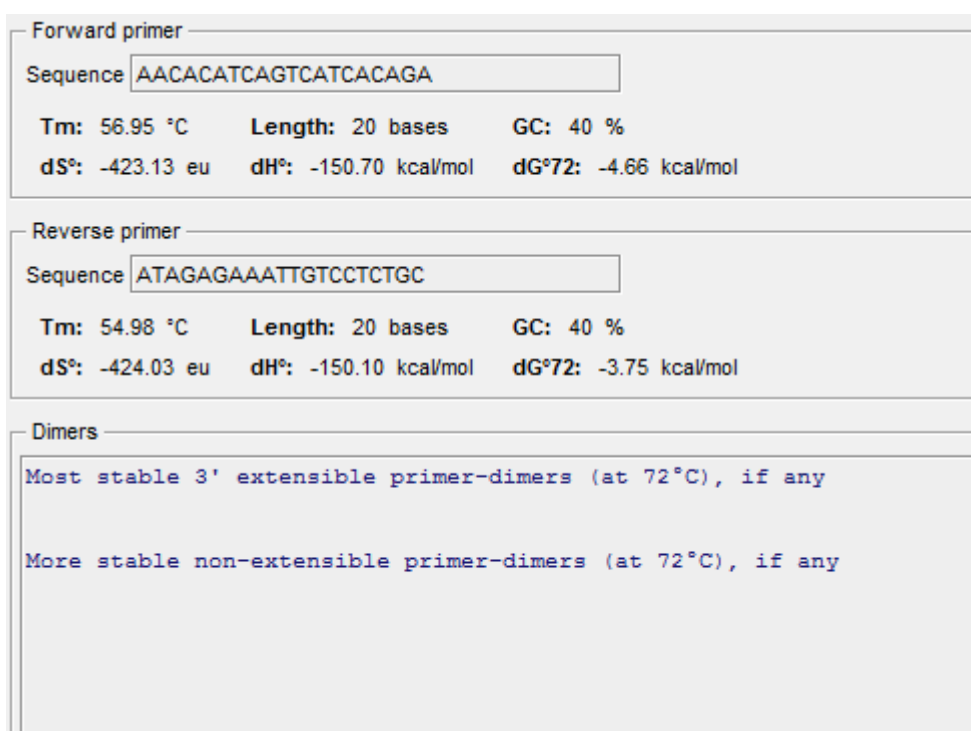
**Anexo 3: Características dos novos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI após análise no programa PerlPrimer**

Forward: **HIV2C2V3C3 FW**

5' AACACATCAGTCATCACAGA 3'

Reverse: **HIV2C2V3C3 RV**

5' ATAGAGAAATTGTCCTCTGC 3'

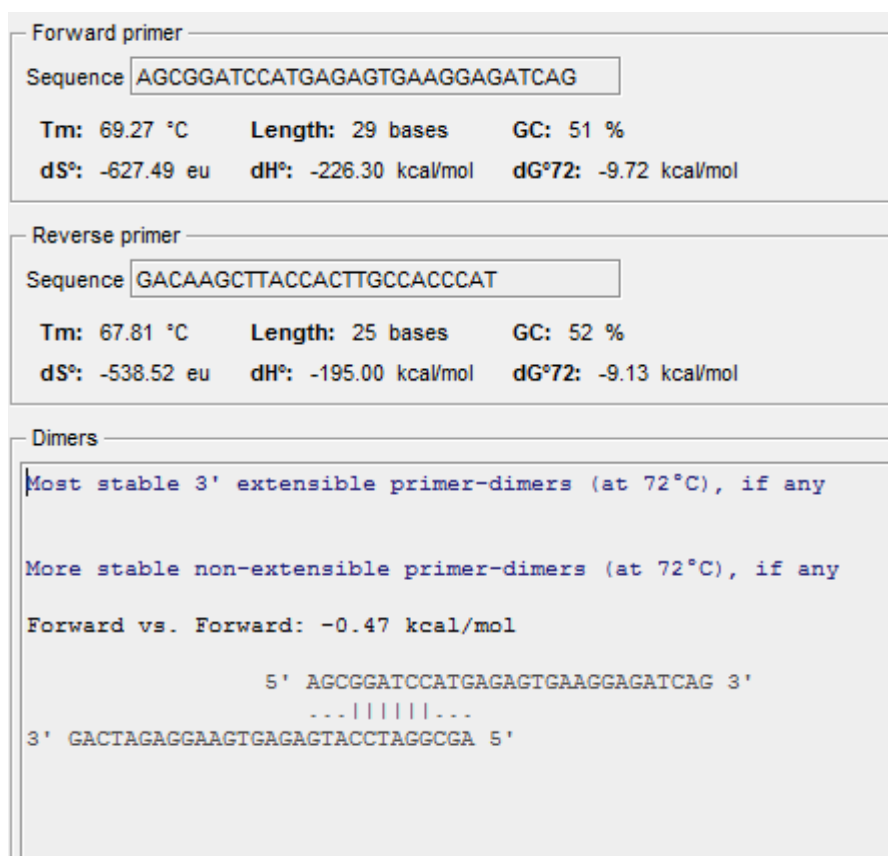


**Figura 34** – Informações obtidas a partir do programa *PerlPrimer* relativas aos novos *primers* HIV2C2V3C3 FW e HIV2C2V3C3V RV, respetivamente.

#### Anexo 4: Características dos novos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após análise no programa PerlPrimer

Forward: **HIV1ENZ FW**  
5' AGC GGATCC ATGAGAGTGAAGGAGATCAG 3'

Reverse: **HIV1ENZ RV**  
5' GAC AAGCTT ACCACTTGCCACCCAT 3'



**Figura 35** – Informações obtidas a partir do programa *PerlPrimer* relativas aos novos *primers* HIV1ENZ FW e HIV1ENZ RV, respetivamente.

**Anexo 5: Características dos novos *primers* da região C2V3C3 do VIH-2 ALI e dos novos *primers* utilizados na amplificação do *env* do VIH-1 após receção**

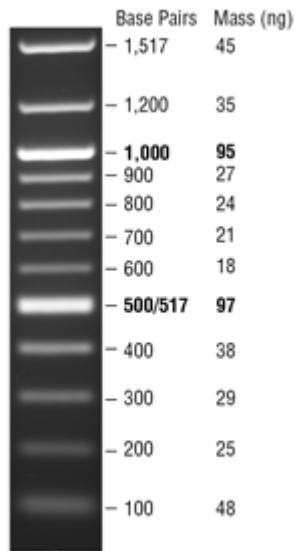
**Tabela 5** – Características dos novos *primers* para a região C2V3C3 do VIH-2

	<b>C2V3C3 do VIH-2</b>	
	<b>HIV2C2V3C3 FW (Forward)</b>	<b>HIV2C2V3C3 RV (Reverse)</b>
<b>Sequência</b>	5' AAC ACA TCA GTC ATC ACA GA 3'	5' ATA GAG AAA TTG TCC TCT GC 3'
<b>T<sub>m</sub> (50 nM NaCl)</b>	<b>43 °C</b>	<b>43 °C</b>
<b>T<sub>m</sub> (1 M Na<sup>+</sup>)</b>	<b>64 °C</b>	<b>64 °C</b>
<b>T<sub>m</sub> usada no PCR</b>	<b>50°C</b>	
<b>Tamanho</b>	20 Bases	20 Bases
<b>Conteúdo em GC</b>	<b>40%</b>	<b>40%</b>
<b>Peso Molecular</b>	6064,0	6117,0
<b>nm/OD<sub>260</sub></b>	4,3	4,5
<b>µg/OD<sub>260</sub></b>	26	27,3
<b>Coefficiente de extinção</b>	233,6 (OD/µmol)	224,4 (OD/µmol)
<b>Quantidade de oligonucleótido ou <i>primer</i></b>	45,8 nMoles	41,5 nMoles
<b>Concentração Final</b>	<b>10µM</b>	<b>10µM</b>

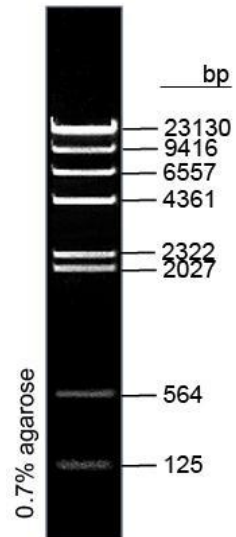
**Tabela 6** – Características dos novos *primers* para amplificação do *env* do VIH-1

	ENV VIH-1	
	HIV1ENZ FW (Forward)	HIV1ENZ RV (Reverse)
Sequência	5' AGC GCA TCC ATG AGA GTG AAG GAG ATC AG 3'	5' GAC AAG CTT ACC ACT TGC CAC CCA T 3'
T <sub>m</sub> (50 nM NaCl)	58 °C	54 °C
T <sub>m</sub> (1 M Na <sup>+</sup> )	79 °C	76 °C
T <sub>m</sub> usada no PCR	50°C	
Tamanho	29 Bases	25 Bases
Conteúdo em GC	52%	52%
Peso Molecular	9065,8	7532,0
nm/OD <sub>260</sub>	2,9	5.03,8
µg/OD <sub>260</sub>	26,0	28,6
Coefficiente de extinção	349,6 (OD/µmol)	263,0 (OD/µmol)
Quantidade de oligonucleótido ou <i>primer</i>	45,6 nMoles	23,7 nMoles
Concentração Final	10µM	10µM

## Anexo 6: Marcadores de pesos moleculares



**Figura 36** – Marcador  
*100 bp DNA Ladder*



**Figura 37** – Marcador *Lambda*  
*DNA/HindIII*

## **Anexo 7: Protocolo de purificação de produtos de PCR**

1. Perfazer cada amostra com **TE buffer** até atingir um volume final de 50µl;
2. Aos 50µl de amostra adicionar 100µl de **buffer NT**;
3. Colocar a coluna **NucleoSpin Extract II** num tubo coletor de 2ml e adicionar o volume total de amostra (150µl);
4. Centrifugar durante 1min a 11000 rpm. Descartar cuidadosamente o líquido presente no tubo coletor e recoloca-lo na coluna;
5. Adicionar 600µl de **buffer NT3** e centrifugar, durante 1min, a 11000 rpm. Descartar cuidadosamente o líquido presente no tubo coletor e recoloca-lo na coluna;
6. Centrifugar a 11000 rpm durante 2min para remoção total do **buffer NT3**. Ter em atenção que o líquido resultante não pode entrar em contato com a coluna. Aquecer a coluna NucleoSpin Extract II juntamente com o tubo coletor durante 2-5min á temperatura de 70°C;
7. Descartar cuidadosamente o tubo coletor, colocando a coluna num novo tubo eppendorf de 1,5ml. Adicionar entre 15-50µl de **elution buffer NE** e incubar durante 1 min à temperatura ambiente;
8. Centrifugar durante 1min a 11000 rpm. Descartar a coluna **NucleoSpin Extract II**.

