

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR**  
**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**VACINAÇÃO NO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA –**  
**PERSPETIVAS ATUAIS**

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ana Margarida Ramos Cardoso

**Orientador: Dr. Arlindo Paulo de Sá Guimas<sup>(a)</sup>**

<sup>(a)</sup>Especialista em Medicina Interna, Centro Hospitalar do Porto

Porto, 2014

## ÍNDICE

---

I. Resumo .....	3
II. Palavras-chave .....	4
III. <i>Abstract</i> .....	5
IV. <i>Keywords</i> .....	6
1. Introdução .....	7
1.1. Estrutura do VIH e resposta imune .....	8
1.2. Vacinação .....	11
2. Anticorpos neutralizantes de largo espectro .....	12
2.1. Definição e mecanismo de ação .....	12
2.2. Paradigma da vacina baseada em atcNLE .....	16
2.3. Os desafios da indução de atcNLE .....	18
2.4. Imunização Passiva .....	21
2.5. O futuro das vacinas baseadas na indução de atcNLE .....	21
3. Linfócitos T citotóxicos .....	23
3.1. Definição e mecanismo de ação .....	23
3.2. Vacina que induz LTC .....	25
3.2.1. Tipos de vacinas .....	25
3.2.1.1. Vacinas vetoradas .....	26
3.2.1.2. Outras abordagens à criação de uma vacina .....	28
4. Ensaio clínicos .....	30
4.1. Ensaio RV144 .....	31
5. Conclusão .....	33
6. Agradecimentos .....	36
7. Referências Bibliográficas .....	37

## ***I. RESUMO***

---

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência de novos casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) é demasiado elevada, apesar dos métodos de prevenção disponíveis permitirem a redução da prevalência. As estratégias seguidas para a elaboração da vacina passam pela indução de anticorpos neutralizantes de largo espectro (atcNLE) que bloqueiam o estabelecimento da infecção inicial, ou pela indução de linfócitos T com elevada atividade antiviral para inibição e controlo da infecção.

As estratégias mais utilizadas para a criação da vacina indutora de anticorpos são: a mimetização da espícula viral para ser utilizada como imunogénio; utilização do envelope como imunogénio <sup>(1)</sup> e a entrega vetorial de genes que codificam moléculas dos anticorpos <sup>(2)</sup>. Porém, estes processos continuam a apresentar obstáculos: os anticorpos induzidos não são capazes de neutralizar parte do vírus circulante e carecem de eficácia por falta de ampliação e de potência <sup>(3)</sup>.

São desafios futuros a identificação de imunogénios capazes de induzir atividade neutralizante e a necessidade de entender como se modula o sistema imune para promover a maturação dos raros clones neutralizantes <sup>(4)</sup>.

Outra linha de investigação consiste na indução de linfócitos T que poderão atuar pelos seguintes mecanismos: intervenção dos CD8<sup>+</sup> na fase inicial da infecção abortando a fase de contágio ainda nas mucosas, assim como atenuação da replicação inicial do vírus e manutenção de níveis baixos de viremia para que a progressão da doença seja adiada ou evitada. Isto requer morte celular induzida por CD8<sup>+</sup> com coordenação pelos CD4<sup>+</sup>. O desenho de uma vacina vetorada que induza respostas celulares eficazes é o projeto com melhores perspectivas de sucesso <sup>(5)</sup>.

## ***II. PALAVRAS-CHAVE***

---

Vacina, vírus da imunodeficiência humana, anticorpos neutralizantes de largo espectro, RV144, vetores, imunogénios, linfócitos T citotóxicos.

### ***III. ABSTRACT***

---

According to the World Health Organization the incidence of new cases of infection with the human immunodeficiency virus is still very high despite the prevention methods available allow the reduction of its prevalence. The strategies followed for the preparation of the vaccine are the induction of neutralizing antibodies that block the establishment of the initial infection or the induction of T lymphocytes with high antiviral activity to inhibit and control the infection.

The most used strategies to create the antibodies inducing vaccine are mimicking the viral spike; use of the envelope as an immunogen and vector delivery of genes that encode the antibody's molecules. However, these processes continue to present obstacles: the induced antibodies are unable to neutralize part of the circulating virus and lack effectiveness due to its lack of expansion and power.

Stand out as future challenges the identification of immunogens capable of inducing neutralizing activity and the need to understand how the immune system modulates in order to promote maturation of the rare neutralizing clones system.

Another side of the research is the induction of T lymphocytes that may act through the following mechanisms: empower the CD8<sup>+</sup> lymphocytes to early stages of infection, aborting its contagion stage at the mucous membranes; mitigation of the initial virus replication and maintenance of low levels of viremia for the disease progression to be delayed or even prevented. This requires cell death induced by CD8<sup>+</sup> lymphocytes with CD4<sup>+</sup> lymphocytes coordination. The design of a vectored vaccine that induces effective cellular responses is the project with the best prospects of being successful.

In conclusion, it is essential to continue doing basic research and, simultaneously, conduct clinical trials to test different vaccine prototypes until we get clinical results with impact on the natural history of infection.

#### ***IV. KEYWORDS***

---

Vaccine, the human immunodeficiency virus, broadly neutralizing antibodies, RV144, vectors, immunogens, cytotoxic T lymphocytes.



## ***1.INTRODUÇÃO***

---

Segundo a OMS, em 2012 cerca de 35,3 milhões de pessoas no mundo viviam com VIH. Portugal é um país de média prevalência de infeção por VIH (0,7% em 2011), sendo a África subsariana a região mais afetada globalmente. Em Portugal, em 2011, as mortes devidas a VIH/SIDA foram estimadas em 2,3 por 100 000 habitantes. Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doença, em 2010 Portugal foi o terceiro país, quer em prevalência quer em número de novos diagnósticos anuais de infeção por VIH, da União Europeia. Em 2011 a taxa de diagnóstico de novos casos de infeção VIH em Portugal foi de 8,5 por 100 000 habitantes.

Atualmente a **prevenção primária** da infeção VIH inclui:

- Campanhas de educação para a saúde sobre vias de transmissão e evicção do contágio;
- Testes e aconselhamento para a infeção VIH;

- Circuncisão masculina;
- Uso de terapia antirretroviral;
- Distribuição de material estéril aos utilizadores de drogas injetáveis;
- Implementação de medidas que reduzem a transmissão vertical do vírus.

Apesar do potencial destes métodos permitir a redução da prevalência da infeção, os novos casos de infeção VIH são demasiado elevados, mantendo-se um grave problema de saúde pública a nível mundial, dados da OMS em 2013. Assim, urge a necessidade da criação de uma vacina para uma prevenção eficaz. Se for bem-sucedida poderá conduzir à erradicação desta epidemia mundial e será a melhor ferramenta a longo prazo para o combate eficaz contra o VIH.

Os objetivos da vacina deverão incluir a indução de anticorpos que impedem o estabelecimento da infeção inicial, ou segundo outra via de investigação, deverão induzir altos níveis de CD8<sup>+</sup> para controlo virológico <sup>(5)</sup>.

Os primeiros ensaios realizados com vacinas, quer baseadas na indução de anticorpos, quer assentes na produção de uma resposta protetora de CD8<sup>+</sup> não produziram os resultados desejados <sup>(6)</sup>.

O objetivo desta revisão é visitar os mecanismos imunológicos que estão na base do desenho destas vacinas, assim como apresentar e discutir os ensaios já realizados e expor as direções futuras da investigação na área. Toda a investigação realizada tem por base o VIH-1.

### ***1.1 ESTRUTURA DO VIH E RESPOSTA IMUNE***

---

O VIH é um retrovírus com envelope. Cada virião contém duas cópias de ácido ribonucleico (ARN) e numerosas cópias das enzimas essenciais que são requeridas para o estabelecimento da infeção. O genoma viral é transcrito em ácido

desoxirribonucleico (ADN) pela transcriptase reversa nas células infetadas e o ADN viral é integrado no genoma destas pela integrase.

O envelope do VIH, representado na Figura 1, na forma madura e funcional é constituído por uma membrana lipídica e por três subunidades de superfície gp120 ligadas a três subunidades transmembranares gp40. O envelope é o único antígeno acessível aos anticorpos na superfície do vírus. (47)

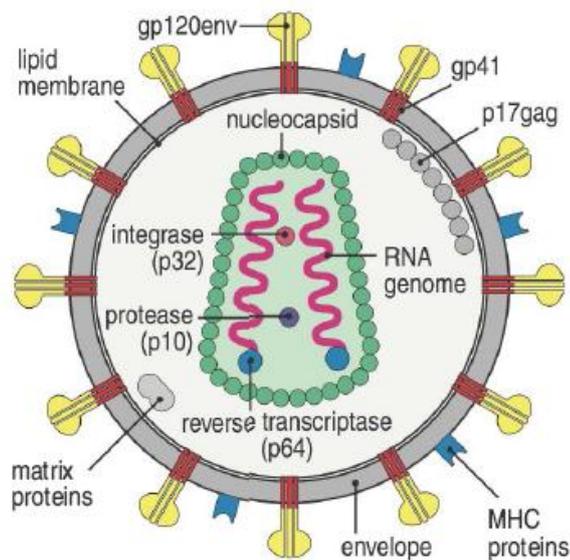


Figura 1. Representação esquemática do virião do VIH. Agradecimento a Murphy K. Janeway's immunobiology. 8ª ed. Nova Iorque: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012. p.547.

O vírus penetra nos linfócitos através de duas glicoproteínas do envelope: a gp120 e a gp41. A gp120 liga-se à molécula CD4<sup>+</sup> na superfície celular. Antes da entrada do vírus este tem de se ligar ao coreceptor que é o CCR5 ou CXCR4. Depois da ligação a este, a gp41 induz a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula permitindo a entrada do genoma e das proteínas virais na célula.

Ambas as respostas imunes inatas e adaptativas são importantes no controle da replicação viral do VIH. Na resposta imune inata as células dendríticas têm um papel preponderante na degradação dos antígenos extracelulares em lisossomas, e na apresentação dos antígenos aos CD4<sup>+</sup> através das moléculas MHC de classe II.

Os antígenos intracelulares são fragmentados por proteases e são apresentados aos CD8<sup>+</sup> pelo complexo MHC classe I.

Durante a infecção aguda, a alta taxa de replicação viral aumenta substancialmente a viremia, levando à rápida proliferação de linfócitos CD4<sup>+</sup> que são subsequentemente infetados começando os seus níveis a decrescer. O mecanismo exato que leva a este fenómeno ainda não está completamente esclarecido. As consequências são a falta de respostas proliferativas, a diminuição na produção de IL-2 e a redução na expressão do recetor de IL-2 (CD25) e da sua molécula coestimuladora CD28.

Apesar de não ser bem estabelecido qual o mecanismo, existe uma correlação entre o decréscimo da carga viral e o aumento dos CD8<sup>+</sup> - linfócitos T citotóxicos (LTC). Na infecção crónica esta resposta também está presente, embora o número destes linfócitos decaia quando a doença progride para os estados mais avançados.

Sob a pressão destes linfócitos, o VIH sofre mutações para evitar a deteção e a destruição. Estas mutações levam à perda do péptido que cria a ligação ao MHC I ou à perda de reconhecimento do complexo VIH-MHC I pelo recetor de célula T. Pensa-se ainda, que a perda de eficácia destes linfócitos seja devida a uma suprarregulação dos marcadores de apoptose que ocorre na infecção por VIH.

Só alguns indivíduos é que produzem uma resposta humoral eficiente. Na maioria dos indivíduos o VIH consegue criar múltiplos mecanismos de evasão à resposta de anticorpos. O principal é a mutação constante do vírus que faz com que a resposta anticorpo-antígeno, que é específica, deixe de ocorrer. O vírus também se protege através da produção de um escudo de glicanos, que impede a sua ligação aos anticorpos <sup>(7)</sup>.

## 1.2 VACINAÇÃO

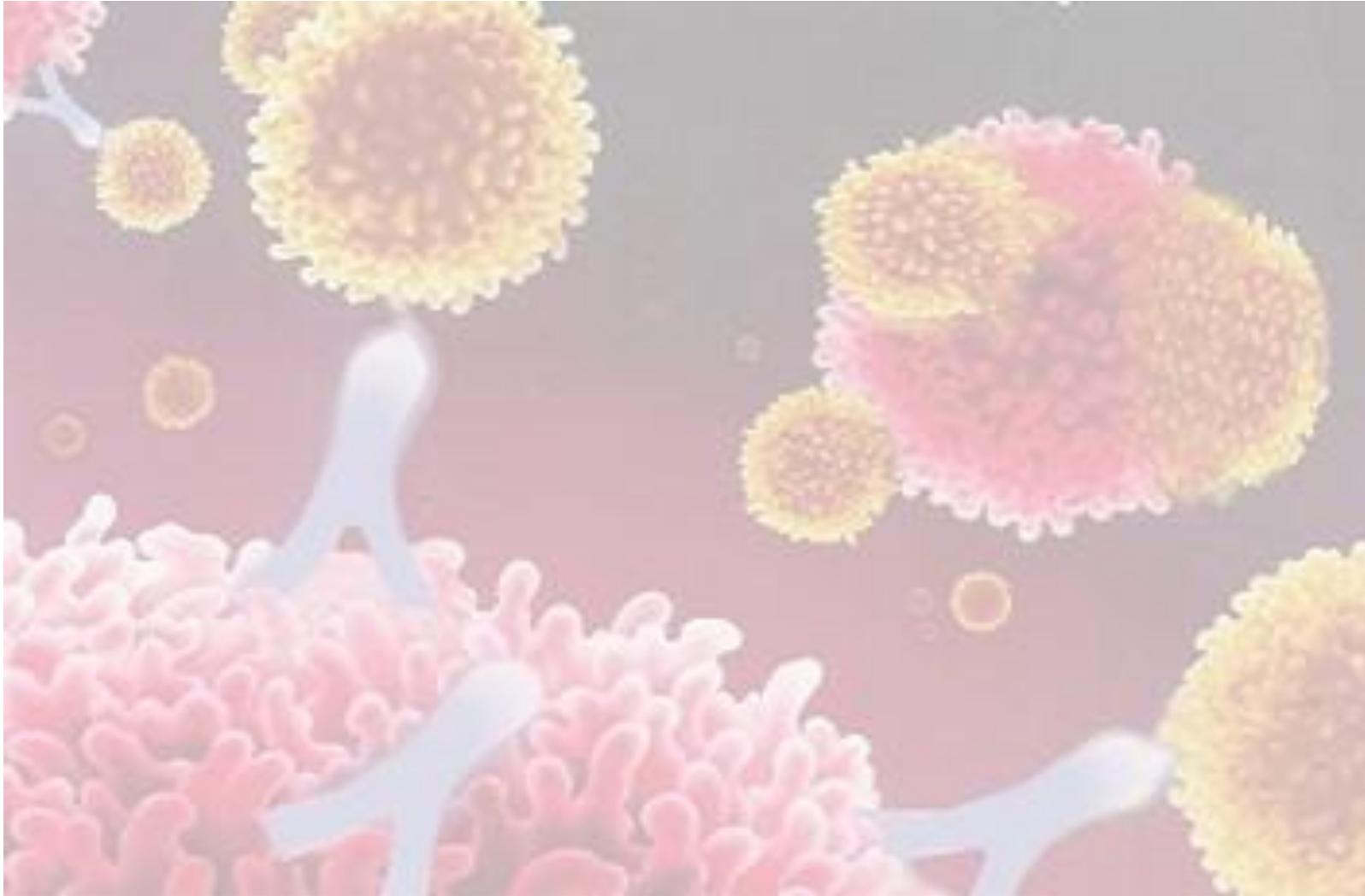
---

As vacinas são compostas por proteínas, toxinas, partes de bactérias ou vírus, ou vírus e bactérias inteiros, que quando são inoculadas no organismo, suscitam uma resposta imunológica análoga à de uma infecção por um determinado agente infeccioso.

A grande maioria das vacinas atualmente disponíveis atua através da indução de anticorpos contra os agentes infecciosos, que acabam por tornar o organismo imune.

O inoculante que a vacina contém é reconhecido como antígeno pelo sistema imunológico. Posteriormente vai ligar-se ao receptor de antígeno do linfócito B e vai proliferar e diferenciar-se em plasmócitos. Os plasmócitos produzem anticorpos que são específicos do antígeno em causa, geralmente dirigem-se contra múltiplos epítopos no antígeno, contudo só alguns deles é que conferem proteção. O linfócito B também tem a função de apresentar o antígeno aos linfócitos T <sup>(7)</sup>.

Depois da interação com o antígeno e com os linfócitos T, os linfócitos B entram no centro germinativo onde sofrem expansão clonal, mutações somáticas e seleção dos linfócitos B que expressam variantes de anticorpos de alta afinidade – maturação por afinidade <sup>(8)</sup>. Durante este processo ocorre o aumento da afinidade do linfócito B pelo antígeno através de poli-reatividade pela ligação de mais receptores de linfócitos B <sup>(9)</sup>.



## ***2.ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DE LARGO ESPETRO***

### ***2.1.DEFINIÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO***

---

Os anticorpos podem atuar de três modos: neutralização, opsonização ou por ativação do complemento. Nos vírus a neutralização é o modo mais eficaz de controlar a infecção: o anticorpo liga-se ao vírus impedindo que penetre na célula, sendo este complexo reconhecido e fagocitado pelos macrófagos <sup>(7)</sup>.

Os atcNLE definem-se por anticorpos monoclonais que neutralizam potentemente um largo espectro de cadeias de VIH circulantes <sup>(5)</sup> e têm como alvo o envelope viral <sup>(2)</sup>.

Quando comparados com outros anticorpos, estes têm características pouco usuais, incluindo estruturas físicas particulares, tais como, ansas alongadas de ligação ao antigénio e níveis elevados de mutações que afetam o local de ligação antigénio-anticorpo e os domínios estruturais <sup>(10)</sup>.

Diversas mutações somáticas são introduzidas nos genes do anticorpo durante a resposta imune ao antígeno <sup>(8)</sup>. Estas mutações que ocorrem no centro germinativo contribuem para a potente atividade dos atcNLE e para o largo espectro da sua neutralização, por melhorarem o contacto antígeno-anticorpo <sup>(11)</sup>.

A maioria dos atcNLE atua nos estágios iniciais do ciclo de replicação viral, bloqueando a interação do vírus com os recetores da superfície da célula, prevenindo subsequentes mudanças de conformação das proteínas virais necessárias para a entrada nas células e transição das vesículas endocíticas para o citoplasma <sup>(7)</sup>. Existem alguns anticorpos protetores que podem atuar mais tarde no ciclo da replicação, por exemplo, os anticorpos dependentes da citotoxicidade e os anticorpos dependentes da inibição do vírus mediada por células, em adição ou na ausência de propriedades neutralizantes <sup>(12)</sup>.

É importante lembrar que a infeção natural induz maioritariamente anticorpos não-neutralizantes ou anticorpos específicos de uma cadeia nos primeiros meses <sup>(13,14,15)</sup>. A resposta de anticorpos neutralizantes é muito mais débil que a resposta de anticorpos não neutralizantes <sup>(16)</sup>. No VIH os atcNLE demoram meses a anos a desenvolver-se <sup>(17)</sup>, 10 a 30% dos indivíduos, só depois de 2 até 4 anos de infeção é que desenvolvem atcNLE <sup>(5)</sup>. Isto poderá ser uma consequência da infeção que causa dano da função imune, incluindo a destruição dos CD4<sup>+</sup> e a destruição da arquitetura dos nódulos linfáticos. A resposta tardia também pode estar relacionada com a natureza intrínseca dos antígenos contidos nas proteínas do envelope <sup>(3)</sup>. Esta pode igualmente advir da necessidade de ocorrência de raros eventos aleatórios, ou da alteração complexa do gene dos anticorpos durante o desenvolvimento da infeção <sup>(18)</sup>.

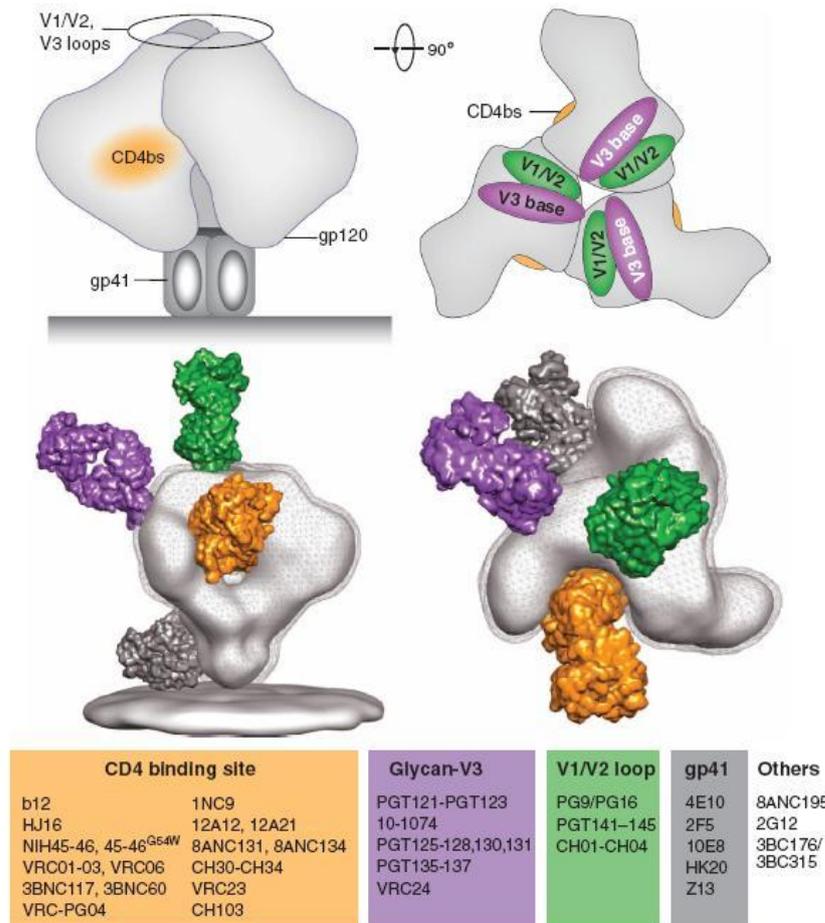
A evolução do vírus e da resposta humoral é que leva à produção de anticorpos eficientes <sup>(1)</sup>. A persistência da infeção viral está dependente de vários mecanismos de evasão nomeadamente: rápida mutação de aminoácidos de múltiplas regiões do envelope; existência de um escudo de glicanos que é reconhecido pelo

sistema imune como próprio minimizando a exposição do vírus; presença de contingências conformacionais à ligação dos anticorpos, que protegem o local de ligação do CD4<sup>+</sup>; flexibilidade inerente das estruturas terciárias e quaternárias do envelope – dissimulação conformacional; presença de envelopes imaturos, mal dobrados ou deteriorados que apresentam epítomos imunodominantes não neutralizadores <sup>(5)</sup>; baixa densidade de espículas do envelope na superfície viral <sup>(19)</sup>.

Os atcNLE podem dividir-se em **quatro classes** com base na localização da espícula viral que têm como alvo. As localizações destas regiões alvo encontram-se representadas na Figura 2 sendo estas:

- 1) Região externa da membrana proximal (REMP) na gp41, à qual se liga o anticorpo 10E8.
- 2) O local de ligação do CD4<sup>+</sup> na gp120 à qual se liga o anticorpo VRC01 <sup>(2)</sup>;
- 3) O domínio V1/V2 que é alvo dos anticorpos PG9, PG16, CH01 a CH04 e PGT141 a 145 <sup>(20)</sup>;
- 4) O domínio V3 de glicanos que é alvo do PGT121 e dos PGT128-like. Ambos bloqueiam a infecção por interferirem com a ligação do CD4<sup>+</sup> <sup>(21)</sup>.

Até 2009 os anticorpos *in vitro* mais potentes eram os que se ligavam ao local de ligação do CD4<sup>+</sup>, os b12 <sup>(22)</sup>.



**Figura 2. Locais alvo dos anticorpos na espícula viral do VIH** – Cada um dos monômeros do trîmero é composto por uma proteína gp120 e por uma gp41. Cada cor corresponde a um dos locais de ligação mais frequentes dos anticorpos. O local de ligação do CD4<sup>+</sup> em cor-de-laranja, o epítipo associado a glicanos na base do domínio V3 representado a roxo, os domínios V1/V2 a verde e a região externa da membrana proximal na gp41 a cinzento. Exemplos de anticorpos de primeira e de segunda geração são apresentados nas caixas. Agradecimento a Klein F et al. Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. Science 2013; 341:1199.

Em 2009, a evolução técnico-científica permitiu a descoberta dos atcNLE de segunda geração. Estes anticorpos surgiram através do uso de clonagem individual de linfócitos B, juntamente com um método de seleção baseado na ligação de antígenos. Revelou-se que existem várias linhagens de antígenos que têm como alvo múltiplos epítomos na proteína gp120 <sup>(10)</sup>. Simultaneamente a adaptação da clonagem individual de linfócitos B para um rastreio de alto rendimento levou ao isolamento de dois anticorpos PG9 e PG16 <sup>(23)</sup>. Estes anticorpos neutralizaram 70 a 80% das estirpes de VIH testadas ligando-se preferencialmente ao trîmero do envelope por via dos domínios V1/V2 da subunidade gp120 <sup>(23,24)</sup>. Outras melhorias nos métodos de

isolamento levaram à identificação do PGT121-145 com um espectro de ação sobre 16 a 80% das estirpes, mas com uma potência notável. Este atcNLE interage com o escudo glicano do VIH <sup>(25)</sup>.

## **2.2.PARADIGMA DA VACINA BASEADA EM ATCNLE**

Existem várias estratégias para criar uma vacina que induza a produção de anticorpos neutralizantes contra o VIH nomeadamente a **mimetização da espícula viral**, que é o alvo dos atcNLE. O objetivo é recriar o epítipo num formato minimalista para induzir a ligação a este dos recetores de linfócitos B, levando à formação de anticorpos. A dificuldade está em que muitos dos epítipos onde se ligam os anticorpos neutralizantes são conformacionais e descontínuos. Para esta estratégia ser eficaz, tem de existir uma ligação estrutural perfeita entre o epítipo, da forma mimética do antigénio, e o anticorpo <sup>(2)</sup>.

Tentativas falhadas no passado, para a produção de uma vacina, focavam-se no uso da **gp120 como imunogénio**. A imunização gerada era potente mas era específica para uma determinada cadeia <sup>(1)</sup>. A imunização, tendo como alvo as proteínas do envelope, têm-se focado primariamente na gp120, contudo muitos anticorpos imunodominantes mas não neutralizantes interagem com a gp41 <sup>(26)</sup>. Recentemente os **imunogénios gp41** têm sido investigados com algum sucesso. A neutralização mais abrangente induzida até agora, para a gp41, envolveu a imunização de porcos da guiné com rinovírus humano, que apresentavam versões modificadas do epítipo 2F5. O soro pós-imune de um animal neutralizou nove estirpes de VIH com potência ligeira a moderada <sup>(27)</sup>.

As investigações para gerar imunização com o envelope mais específica incluem diversas abordagens: mutação dos epítipos imunodominantes; dissimulação dos epítipos imunodominantes por ligação cruzada e alteração seletiva de uma porção das moléculas dos carboidratos <sup>(28)</sup>. São exemplos destas abordagens as

alterações no domínio variável do envelope <sup>(29)</sup>, a deleção do V2 do envelope <sup>(30)</sup> e outras mais drásticas como a mutação do local de ligação do CD4<sup>+</sup> ou a disrupção da ponte proteica que está entre os domínios da proteína gp120 <sup>(31)</sup>.

Uma outra hipótese para gerar atcNLE é criar **imunogénios do envelope** que se liguem ao recetor de linfócitos B nas células *naive* e aos linfócitos B intermediários nos **estágios iniciais, médios e finais da resposta humoral** <sup>(2)</sup>.

É de relevo referir, outra tentativa falhada de induzir atcNLE através da utilização de **trímeros solúveis**. Porém, estes trímeros assumem conformações diferentes dos locais de ligação, não induzindo assim a resposta humoral pretendida. Além disso, antigénios ligados à membrana são muito mais potentes a estimular os linfócitos B do que os antigénios solúveis. Adicionalmente, a preparação de formas solúveis da estrutura do envelope exacerba a instabilidade e o erro de dobra do trímero. Tem-se investido em conseguir homogeneidade e estabilidade do trímero do envelope através da adição de ligações de dissulfeto interprotómeros, que provou ser efetiva.

Uma outra opção é a **utilização de um imunogénio com um epítopo específico conservado, que induz a resposta com o mesmo epítopo, mas num imunogénio diferente** para adquirir reconhecimento de alta afinidade numa espícula viral natural. Há que considerar que ao isolar um epítopo do seu antigénio poderá não ser desencadeada o mesmo tipo de resposta imunogénica.

Uma outra possibilidade é a **entrega vetorial de genes** que codificam moléculas dos anticorpos, o que sustenta a produção de anticorpos a longo prazo <sup>(18)</sup>. Um dos vetores mais utilizados é o adenovírus <sup>(32)</sup>. Contudo, a resposta de anticorpos neutralizantes induzida ainda não é suficientemente potente nem de largo espetro.

### **2.3. OS DESAFIOS DA INDUÇÃO DE ATCNLE**

---

Embora já tenham sido realizados diversos estudos e estejam a decorrer outros, a indução de atcNLE através de uma vacina, continua a apresentar-se como um enorme desafio. Numa primeira instância, porque os anticorpos induzidos pela vacina não são capazes de neutralizar parte do vírus circulante <sup>(3)</sup> e carecem de eficácia por falta de ampliação e de potência.

Existem explicações propostas para esta **falta de potência**. Em quase todos os estudos com anticorpos neutralizantes, a reversão dos genes variáveis dos anticorpos para as sequências germinais, resulta em marcada diminuição da afinidade para o VIH <sup>(33,34)</sup>. As pobres afinidades destes anticorpos precursores ao envelope do VIH sugerem que a ativação inicial dos linfócitos B precursores e o desenvolvimento inicial das respostas de linfócitos B possa ser limitado <sup>(28,35)</sup>.

Um dos mais importantes desafios no desenvolvimento guiado por antigénios de linfócitos B que produzem atcNLE é como e **quando vacinar e qual a combinação ideal de antigénios** <sup>(18)</sup>. Importante referir um estudo que foi fundamental para a compreensão dos padrões naturais que levam à produção de anticorpos. Este mostrou o percurso da infeção e a evolução do vírus e dos anticorpos, particularmente do anticorpo CH103. Concluíram que uma célula B progenitora, que expresse este anticorpo da linha germinativa, pode ser apenas estimulada em resposta a uma apresentação às proteínas do envelope do vírus fundador. Embora todos os membros da linhagem do anticorpo reconheçam e neutralizem o vírus fundador, a afinidade e a capacidade de neutralização diminui gradualmente com a acumulação de mutações somáticas. Demonstraram ainda que o VIH escapa à pressão dos anticorpos por mutação de resíduos aminoácidos no local de ligação do CD4<sup>+</sup>. Posteriormente estes vírus resistentes incitam mais mutações somáticas e maturação por afinidade das variantes do anticorpo, resultando em neutralização mais eficaz e numa resposta mais ampla <sup>(36)</sup>.

Falta também definir os **melhores vetores e os melhores genes**, bem como saber mais sobre a resposta imune que pode ser gerada pelo hospedeiro. Consegue-se assim garantir as medidas de segurança necessárias. Deverá ser conhecido um modo de eliminar o anticorpo codificado para o caso de ocorrer algum efeito adverso não esperado <sup>(18)</sup>.

A **diversidade genética dos subtipos de VIH**, das formas circulantes recombinantes e das estirpes é maior do que na maioria dos vírus, isto reflete-se na diversidade antigénica do envelope <sup>(37,38)</sup>. O VIH gera  $10^{10}$  viriões por dia, tem uma taxa de mutação de  $3 \times 10^{-5}$  por base nucleotídica por ciclo de replicação, isto leva à geração de imensas variantes de VIH no mesmo doente num dia. A variedade também aumenta com a natureza propensa a erros da replicação retroviral, visto que, a transcriptase reversa não tem os mecanismo de revisão de erros associados as ADN polimerases. Os genomas dos retrovírus são copiados com baixa fidelidade e a transcrição do ADN para ARN pela ARN polimerase também não é fiável <sup>(7)</sup>.

Um problema adicional destas vacinas é a falta de respostas de anticorpos com **memória durável** <sup>(39)</sup>.

Um outro desafio é **induzir elevadas concentrações de anticorpos neutralizantes ao nível da mucosa** o que é ainda mais difícil que a indução a nível sistémico. Isto é importante devido ao modo de transmissão do vírus <sup>(40)</sup>.

Uma aprendizagem importante que se pode fazer com os estudos realizados até à data é que os **modelos animais usados podem ser inadequados** (ratos e coelhos não conseguem recriar as mesmas características estruturais que levam à neutralização de largo espetro) <sup>(5)</sup>.

Por fim, o principal obstáculo colocado a estes estudos é técnico-científico, maioritariamente devido à falta de técnicas de clonização de anticorpos humanos.

Além disso, para o desenho ideal de anticorpos, será necessário conhecer a estrutura da espícula viral através de uma resolução de nível atómico, tecnologia que ainda não está disponível <sup>(22)</sup>.

Das muitas questões em torno desta problemática há duas importantes de realçar:

- Se apenas uma pequena percentagem de indivíduos infetados com VIH criam uma resposta com atcNLE, será que o mesmo pode acontecer com a vacinação? <sup>(5)</sup>

- A quantidade de anticorpos necessária para uma resposta eficaz poderá ser induzida pela vacinação? <sup>(22)</sup>

Relativamente à criação de um antígeno baseado no envelope, os desafios específicos que se colocam são:

- O epítipo que imita o REMP adota uma conformação inapropriada em solução e falha na apresentação da superfície correta para o reconhecimento de linfócitos B.
- Os anticorpos 4E10 e 2F5 são autorreativos, por este motivo estão sujeitos a mecanismo de tolerância pelos linfócitos B.
- O local de ligação do CD4<sup>+</sup> é um alvo dos atcNLE, contudo a maioria dos indivíduos não os produz pelas seguintes razões: a natureza intrínseca imunorecessiva dos segmentos conservados do local de ligação do CD4<sup>+</sup>, a dificuldade no acesso à região de dois domínios do recetor de linfócitos B e a restrição no ângulo de aproximação entre o epítipo e o recetor de linfócitos B.
- Os anticorpos PG9 e PGT128 que se ligam a epítopos no domínio V1/V2 e na base do domínio V3 requerem uma longa ansa CDR3 para acederem ao epítipo.
- São requeridas características antigénicas únicas para o reconhecimento do recetor de linfócitos B, as imitações dos epítopos ainda não conseguem ter estas características <sup>(5)</sup>.

## **2.4. IMUNIZAÇÃO PASSIVA**

---

Uma outra estratégia preventiva da infecção é a utilização de anticorpos neutralizantes, através da transferência passiva de imunoglobulinas – profilaxia direta com anticorpos. (7) É digno de nota que a proteção mediada por atcNLE via transferência passiva em primatas não-humanos, não atua unicamente pelos mecanismos de neutralização <sup>(41,42,43)</sup>.

Os anticorpos usados na imunização passiva são os de 2ª geração que são altamente potentes (o anticorpo VRC01, anticorpo 10E8 e anticorpos que têm como alvo o domínio V3) <sup>(18)</sup>. Os anticorpos neutralizantes, envelope-específicos, mostraram que fornecem proteção contra a aquisição de VIH e contra o vírus da imunodeficiência símia (VIS) através da sua transferência passiva em primatas não-humanos <sup>(19)</sup>. Contudo não existem ainda provas de que o anticorpo monoclonal contra o VIH possa prevenir a infecção em seres humanos <sup>(18)</sup>.

## **2.5. O FUTURO DAS VACINAS BASEADAS NA INDUÇÃO DE ATCNLE**

---

O estado da arte atual baseia-se nos progressos científicos que têm sido alcançados e que permitem desenvolver a investigação. Posto isto, é relevante referir:

- Progressos na clonização de genes das imunoglobulinas que possibilitam selecionar os linfócitos B permitindo o isolamento dos atcNLE <sup>(23)</sup>.
- Avanços na sequenciação de genes dos anticorpos, que permitem conhecer o padrão de desenvolvimento do anticorpo, desde o anticorpo progenitor não mutado até a um anticorpo neutralizante de alta afinidade <sup>(44)</sup>.
- Conhecimento da ontogenia dos linfócitos B, desde a ativação da linha germinal, passando pela maturação intermédia até à expansão dos linfócitos B que produzem anticorpos neutralizantes <sup>(18)</sup>.

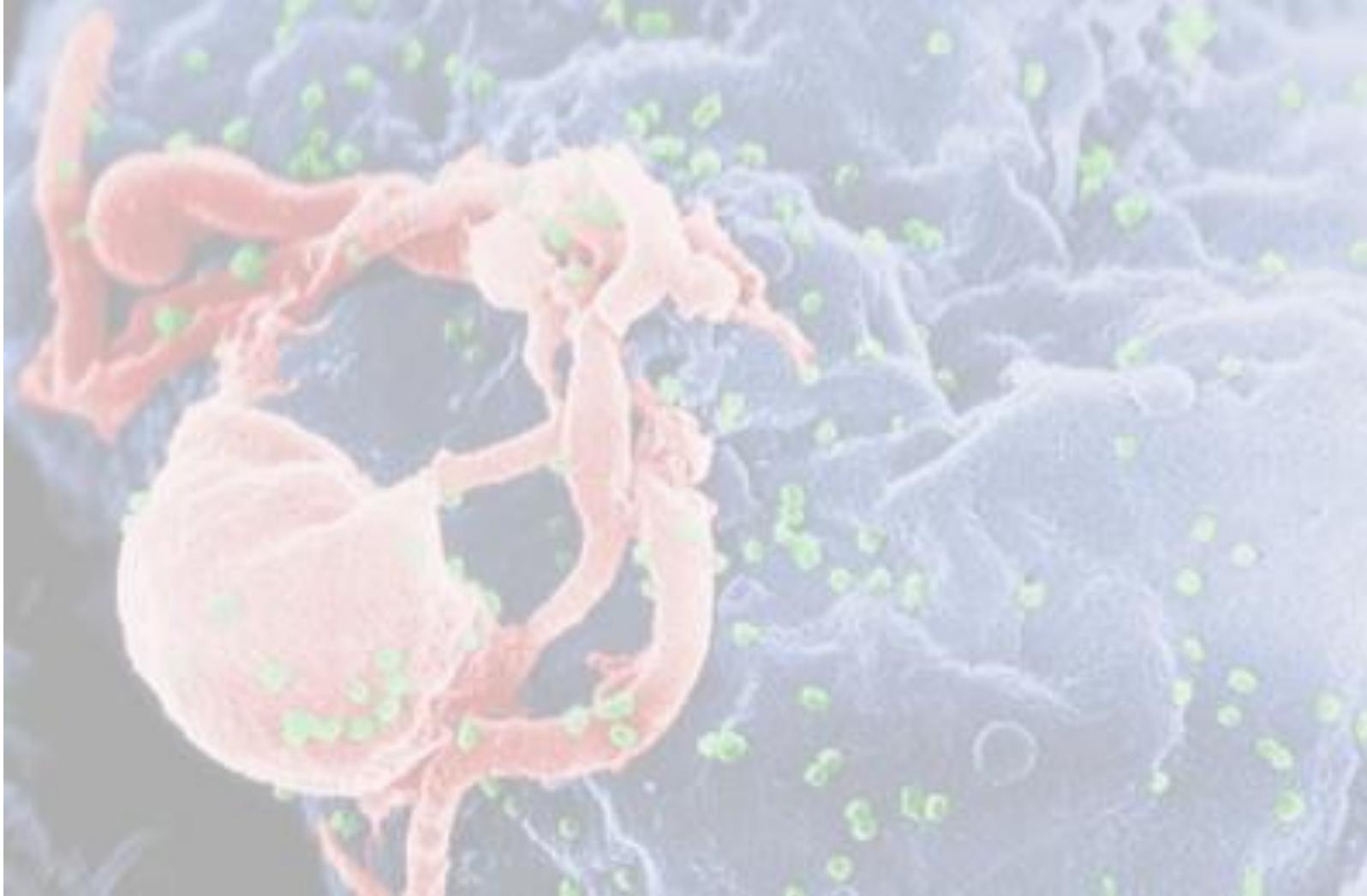
São várias as novas linhas de investigação que irão possibilitar a progressão do conhecimento nesta área:

- A imunização com objetivo de desenvolver **pré-atcNLE** (formas iniciais dos anticorpos neutralizantes) deverá ser mais fácil, pois existe menos mutação somática e menos maturação por afinidade envolvida. Poderá ser mais fácil seguir o seu desenvolvimento. Os pré-atcNLE terão de ser capazes de evoluírem para atcNLE quando ocorrer a exposição ao VIH facilitando o controlo da fase aguda da infeção. Além disso devem proporcionar algum grau de proteção direta contra o VIH através de níveis modestos de neutralização.

- A geração de atcNLE **aumentando o repertório de linfócitos B maduros experimentalmente, relaxando os *checkpoint* de tolerância dos linfócitos B** por um curto período de tempo durante a imunização. O tratamento com BLyS/BAFF (estimulador de linfócitos B /fator de ativação dos linfócitos B) provoca esta tolerância, levando ao desenvolvimento de um largo repertório de linfócitos B, que conduz a uma resposta de anticorpos neutralizantes maior <sup>(45)</sup>.

- Trabalhos recentes mostram a potência **da combinação de anticorpos de largo espectro**. Estes atcNLE não são autorreativos, e visto que têm diferentes padrões de neutralização, a sua combinação pode proporcionar ganho em espectro e em potência <sup>(46,47)</sup>. Se usados na imunização passiva ou numa vacina que consiga induzir esta variedade de anticorpos, que tem como alvo múltiplos epítomos, pode resultar numa atividade sérica com neutralização multiespecífica. Este mecanismo ocorre em alguns pacientes neutralizantes inatos <sup>(10)</sup>. Combinações de atcNLE de segunda geração, direcionados contra epítomos diferentes, neutralizam 100% do vírus circulante *in vitro* e potencialmente suprimem a viremia em modelos humanizados de ratos *in vivo* <sup>(5)</sup>.

- Por fim a **modificação da glicosilação dos imunogénios do envelope** que permite que o vírus se evada da neutralização está a ser pesquisada <sup>(4)</sup>.



### **3. LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS**

#### **3.1. DEFINIÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

---

Na infecção natural, a resposta por LTC é desencadeada pelo reconhecimento de células hospedeiras já infetadas pelo vírus.

Quando um linfócito T tem o seu primeiro encontro com um antígeno ele prolifera e diferencia-se num tipo funcional de linfócito efetor, nomeadamente os CD8<sup>+</sup> e os CD4<sup>+</sup>. Os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) têm a função de destruir diretamente as células infetadas pelo vírus. Os linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) fornecem sinais que influenciam o comportamento e a atividade de outras células. Estes enviam sinais para os linfócitos B influenciando a produção de anticorpos, assim como para os macrófagos influenciando a sua capacidade fagocítica.

Ao contrário dos linfócitos B, os linfócitos T não reconhecem um antígeno *naive* diretamente. Os linfócitos T reconhecem epítopos que estão incorporados em

antigénios. Assim, estes antigénios são primeiro fragmentados, e os peptídeos resultantes e respetivos epítomos ligam-se ao complexo major de histocompatibilidade, e o recetor do linfócito T vai ligar-se a este complexo. <sup>(7)</sup>

Os LTC reconhecem os antigénios virais no contexto de antigénios hospedeiros HLA. Os alelos HLA de classe I são um determinante major do *set point* da carga viral, e esta associação parece operar através do reconhecimento de CD8<sup>+</sup> HLA I restritos de epítomos virais suscetíveis em CD4<sup>+</sup> infetados. Os CD8<sup>+</sup> guiam a seleção de variantes de escape em todas as fases da doença e uma seleção precoce de vírus mutantes tem sido observada em indivíduos com alelos HLA de classe I favoráveis, tais como, o HLA B57 e B27 <sup>(5, 48)</sup>.

Na infeção por VIH, os CD8<sup>+</sup> têm uma correlação inversa com a carga viral, como se observa na Figura 3, e precedem a emergência de anticorpos neutralizantes em algumas semanas <sup>(7)</sup>. A depleção experimental de CD8<sup>+</sup> leva à perda de controlo da replicação do SIV em macacos infetados <sup>(49)</sup>.

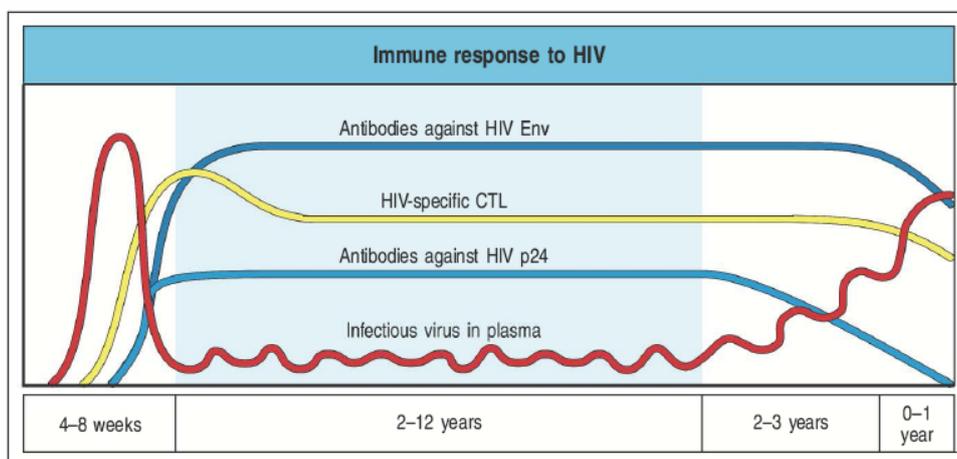


Figura 3. Correlação entre os níveis de CD8<sup>+</sup> e a viremia. Numa fase aguda da infeção ambos aumentam. Com a entrada no estado de latência a viremia diminui muito, contudo os CD8<sup>+</sup> mantêm-se num nível constante e relativamente alto. Agradecimento a Murphy K. Janeway's immunobiology. 8ª ed. Nova Iorque: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2012. p.555.

O controlo da replicação viral a longo prazo não é explicado pela magnitude ou espectro da resposta de LTC na maioria dos indivíduos, mas parece estar

correlacionado com a funcionalidade dos LTC que têm como alvo epítomos de baixa entropia <sup>(50)</sup>.

### **3.2. VACINA QUE INDUZ LTC**

---

Uma vacina que induz LTC poderá proteger contra o VIH dos seguintes modos:

- Capacitando os linfócitos T de modo a se dirigirem rapidamente para as mucosas, abortando a infeção durante a janela crítica entre a transmissão do vírus e a disseminação no tecido linfóide local. Contudo, a proteção a longo prazo, só pode ser conseguida mantendo um alto nível de células efetoras funcionais no trato genital <sup>(5)</sup>;

- Atenuando a replicação inicial do vírus e manutenção da viremia, para que a progressão da doença possa ser adiada ou evitada e a replicação seja reduzida. Isto requer morte celular por LTC efetiva, com uma resposta coordenada de CD4<sup>+</sup> auxiliares.

#### **3.2.1. TIPOS DE VACINAS**

---

As **vacinas de vírus mortos** e as **vacinas de subunidades** são fracos estimuladores dos LTC e atuam principalmente via mecanismos baseados em anticorpos. Por outro lado, as **vacinas vivas atenuadas** e as **vacinas com vetores** são estimuladores potentes dos anticorpos e dos LTC <sup>(51)</sup>.

O desenvolvimento de uma vacina de vírus vivo atenuado é acompanhado do inerente risco das cadeias da vacina adquirirem virulência completa. A entrega de antígenos VIH por ADN nú e vetores de vírus atenuados, com vantagens adicionais de estabilidade, ultrapassa este risco.

Como as **vacinas de ADN** são pobremente imunogénicas quando usadas isoladamente e as **vacinas com vetores virais** são ineficazes se usadas repetidamente, as duas abordagens têm sido **testadas em combinação**.

Atualmente a estratégia mais estudada para induzir LTC é o uso de vacinas vetoradas com ADN. O adenovírus é um dos principais testados como vetor, por ser fácil de manipular, de fabricar e por ser altamente imunogénico <sup>(5)</sup>.

### **3.2.1.1. VACINAS VETORADAS**

---

Duas vacinas usando como vetor o adenovírus humano tipo 5 foram desenvolvidas por 2 entidades. Uma delas avançou para ensaios de fase I tendo induzido uma resposta celular CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> forte e durável VIH específica <sup>(52,53)</sup>. Com a outra vacina elaborada foram conduzidos ensaio de fase I e II. Esta vacina também induziu respostas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> VIH específicas na maioria dos vacinados <sup>(54,55,56)</sup>. Uma limitação das duas abordagens foi **a imunogenicidade do componente adenovírus ser negativamente afetado por anticorpos anti-adenovírus específicos pré-existent**s. É relevante referir que a seroprevalência de adenovírus tipo 5 é de 60% na Europa e na América do Norte, e de 90% na África sub-sariana <sup>(57)</sup>.

Para determinar se os CD8<sup>+</sup>, induzidos pela vacina com vetor adenovírus, conseguem prevenir a infeção ou controlar a viremia inicial após infeção foram realizados os seguintes ensaios: o ensaio STEP (EUA e Caraíbas) e o Phambili (África do Sul).

O ensaio STEP foi prematuramente terminado em 2007, a vacina falhou na prevenção da infeção e no impacto na viremia inicial <sup>(5)</sup>. Uma das justificações encontradas passa pelas vacinas conterem um vetor de adenovírus tipo 5 atenuado e terem falta de um componente do envelope para centrar a resposta imune.

Além disso, a segurança da vacina com vetor adenovírus foi posta em causa, porque se verificou uma tendência, não significativa, de aumento de risco da infeção

por VIH nos vacinados que tinham anticorpos contra o adenovírus tipo 5 específicos pré-existentes. Tendência esta que era mais evidente em homens não circuncidados e com imunidade prévia ao adenovírus 5 <sup>(58)</sup>.

Por estas questões de segurança, outros ensaios com vacinas vetoradas por adenovírus foram posteriormente suspensos, incluindo o Phambili.

O ensaio STEP expôs novamente **limitações dos modelos animais** e das medições da imunidade VIH-específica que suportavam a estratégia dessa vacina <sup>(5)</sup>.

Com já referido, a **extensão da resposta nos vacinados foi extremamente limitada**, com a resposta de CD8<sup>+</sup> a ter como alvo, em média, um epítopo por proteína, com um viés direcionado contra os epítopos menos conservados <sup>(59,60)</sup>. Os resultados destes ensaios sugerem que respostas CD8<sup>+</sup> mais potentes e amplas são necessárias para conter a replicação viral inicial <sup>(5)</sup>.

Uma lição importante é que as vacinas vetoradas por adenovírus tipo 5 criam um **padrão de imunodominância claro**. Elas dirigem-se para os *hotspots* de epítopos, que são um pequeno subconjunto de regiões antigénicas do VIH altamente imunogénicas <sup>(61)</sup>.

Tendo em conta as limitações do adenovírus 5 como vetor, outros estão a ser investigados, como os serotipos humanos raros, 26 e 35 e adenovírus não humanos. As vacinas com o serotipo 26 e com o 35 não são neutralizadas pelos anticorpos anti-adenovírus 5, e foram testadas em estudos pré-clínicos. Contudo são menos potentes que a vacina com adenovírus tipo 5 <sup>(5)</sup>. As vacinas vetoradas com adenovírus 35 foram recentemente testadas num ensaio de fase I, que confirmou a sua segurança, assim como a sua modesta imunogenicidade <sup>(62)</sup>. Os adenovírus de chimpanzés têm vindo a ser desenvolvidos como vetores e provaram ser seguros e altamente imunogénicos em ensaios clínicos de fase I <sup>(63)</sup>.

Uma das desvantagens das vacinas vetoradas é a curta duração da expressão dos genes transferidos, o que leva a uma diminuta resposta imune. Por este motivo, têm-se investigado **vetores replicativos** contendo vírus associados ao adenovírus:

vírus da encefalite equina venezuelana, vírus da estomatite vesicular e citomegalovírus <sup>(5)</sup>. Uma vacina para o macaco Rhesus de VIS **vetorado por citomegalovírus**, induziu potentes e duráveis respostas CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> que conferiram proteção a longo prazo contra a infeção viral e contra a depleção de CD4<sup>+</sup> em mais de metade dos animais vacinados <sup>(64)</sup>. A proteção foi associada à proteção celular e não à indução de anticorpos. Esta é a evidência mais forte que os linfócitos T induzidos por vacinas podem oferecer um controlo durável do VIH. Contudo é difícil avançar para os ensaios clínicos visto que o citomegalovírus pode causar doença a longo prazo nos indivíduos inoculados.

Os vetores replicativos imitam melhor a infeção natural por induzirem potentes respostas imunes inatas, que realçam as respostas humorais e celulares sistémicas e mucosas.

Devido ao fato das células dendríticas capturarem o VIH nas mucosas e ativarem os linfócitos T *naive* a saírem dos nódulos linfáticos, a capacidade dos vetores virais em atingir subconjuntos específicos de células dendríticas e o tipo de sinal que estes induzem, pode ser a chave para incitar respostas imunes adaptativas efetivas <sup>(5)</sup>.

### **3.2.1.2. OUTRAS ABORDAGENS À CRIAÇÃO DE UMA VACINA**

Duas novas abordagens usam **regiões isoladas conservadas e mosaicos**. Os genes resultantes de engenharia genética, baseados em múltiplas regiões altamente conservadas têm sido expressos em vários vetores e estão agora a passar por testes em primatas não humanos. O objetivo desta primeira abordagem é focar a resposta imune em respostas CD8<sup>+</sup>, em que o escape mutacional é restrito <sup>(65)</sup>.

A segunda abordagem implica criação de proteínas em mosaico através de recombinação em silício de sequências naturais. Um imunogénio com mosaico de VIH, quando introduzido em macacos através do vetor adenovírus 26, mostrou induzir uma

melhor e mais ampla resposta reativa de linfócitos T do que as vacinas que só incorporam VIH originado do mesmo ancestral <sup>(66)</sup>.

Estas estratégias ainda precisam de ser melhoradas depois de se determinar as suas vantagens e desvantagens em ensaios clínicos.



#### ***4. ENSAIOS CLÍNICOS***

---

Ao longo dos últimos anos, diversos ensaios clínicos foram sendo realizados. Alguns deles revelaram resultados não expectáveis e permitiram desenvolver a investigação. Todos eles obtiveram resultados clínicos escassos, exceto o RV144 que mostrou uma eficácia modesta na prevenção da infecção. A primeira concepção a ser avaliada foi a AIDSVAX em 2003, composta por proteínas gp120 do envelope. Esta foi testada em dois ensaios de fase III nos EUA e na Tailândia, tendo sido reportada como não eficaz. Num outro ensaio foi avaliada uma vacina com vetor de adenovírus tipo 5 que expressava as proteínas internas Gap, Pol e Nef. Esta vacina também não se mostrou eficaz num ensaio de fase IIb no Norte e Sul da América em 2007 e na África do Sul. A terceira vacina testada deu origem ao ensaio RV144 <sup>(6)</sup>.

A primeira e única vacina preventiva do VIH baseada em **vírus morto geneticamente modificado**, está a passar por ensaios de fase I. Foram anunciados

resultados interinos positivos. Denomina-se de **SAV001-H**. É constituída por vírus morto, concretamente, a estirpe de VIH geneticamente modificada para não ser patogénica. As análises interinas revelaram que a vacina é segura e bem tolerada por humanos e leva a aumentos significativos dos níveis de anticorpos. Esta vacina foi testada em infetados, mas o seu interesse amplifica-se quando se considera o seu potencial profilático <sup>(67)</sup>.

#### **4.1. ENSAIO RV144**

---

O ensaio de fase III da vacina VIH Tailandesa (RV144) testa a combinação de duas vacinas: “ALVAC-HIV” (*prime*) - constituído de *Canarypox* - e “AIDSVAX B/E” (*boost*) - proteínas gp120 do envelope. Este ensaio clínico envolveu mais de 16000 voluntários adultos na Tailândia, publicado em 2009, revelou que a combinação de ALVAC e de AIDSVAX era segura e diminuiu a taxa de infeção em 31,2% quando comparado com o placebo. Os resultados sugeriram que a proteção foi máxima 6-12 meses após vacinação <sup>(68)</sup>.

Depois do RV144 foi realizado um estudo de dois anos para explorar a correlação imunológica do risco. Em 2012 duas correlações foram reportadas, primeiro que os anticorpos contra o V1/V2 do envelope correlacionam-se inversamente com o risco de infeção, levantando a hipótese de que estes estejam envolvidos na prevenção da infeção <sup>(69)</sup>. Um segundo achado deste estudo indicou que ter níveis sanguíneos elevados de IgA se correlaciona com menor proteção contra o VIH quando comparado com níveis baixos de IgA.

Acredita-se que estes anticorpos IgA contra diferentes regiões do envelope do VIH podem ter interferido com as respostas protetoras induzidas pela vacina <sup>(70)</sup>.

A vacina testada no RV144 não produziu atcNLE contra as estirpes selvagens do VIH e não produziu resposta CD8<sup>+</sup> detetável, o que direcionou a atenção dos

cientistas para outros mecanismos como: citotoxicidade celular anticorpo-dependente, inibição viral dependente de mediação celular e inibição nas barreiras mucosas <sup>(71)</sup>.

Para compreender os resultados do ensaio RV144, estão a decorrer estudos de imunoprevenção com a vacina em primatas não humanos. Além disso, futuros ensaios clínicos estão planeados na África meridional com modelos de vacinas similares ao RV144 mas com sequências do subtipo de VIH C. Visto que a eficiência da vacina no RV144 foi de curto prazo e de fraca potência <sup>(72)</sup>, surge a questão: será que a eficácia observada no RV144 poderá ser sustentada e aumentada por um *boost*? <sup>(73)</sup> Na tentativa de responder a esta questão, um ensaio em voluntários de alto risco na Tailândia está planeado, em 2014, com um *prime* de *Canarypox* e um *boost* proteico. Um ensaio similar com pox/proteína em heterossexuais de elevado risco deve ser realizado em 2014 na África do Sul <sup>(71)</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

---

Após 30 anos desde a descoberta do VIH como causa da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, ainda não existe nenhuma vacina preventiva eficaz, segura e custo-efetiva para combater esta infeção.

As medidas preventivas instituídas atualmente dependem da ação individual e do contexto social em que os indivíduos estão inseridos, além disso, mesmo que a prevenção do VIH seja ótima e atinja uma taxa de infeção perto de zero, as recidivas não deixam de ser um problema.

Sendo assim, parece que o melhor modo de controlar e erradicar a pandemia rapidamente, e de uma forma sustentada, será através de uma vacina <sup>(74)</sup>.

Uma vacina será a tática mais custo-efetiva de prevenir o VIH especialmente em populações de recursos limitados <sup>(75)</sup>.

A evidência indica que os títulos de anticorpos se correlacionam com proteção contra a infeção, mas a resposta imune mediada por LTC é requerida para a proteção contra a doença <sup>(51, 76)</sup>. Isto sugere que a **dupla abordagem deva ser garantida**.

Aspetos das vacinas que induzem LTC, como os vetores replicantes e persistentes, devem ser aplicados à expressão de antigénios baseados no envelope. O objetivo é permitir uma exposição antigénica de longo termo, no contexto de estimulação imune apropriada de atcNLE. Reciprocamente, as abordagens para produzir atcNLE devem ser imunologicamente compatíveis com a geração paralela de uma resposta de LTC.

Existem alguns conceitos promissores nos ensaios relativos à indução de atcNLE, que devem continuar a ser investigados, incluindo: imitação da evolução do envelope do vírus por imunização sequencial; imunização com objetivo de desenvolver pré-aticNLE; aumento do repertório de linfócitos B maduros relaxando os *checkpoint* de tolerância dos linfócitos B; combinação de anticorpos de largo espectro; modificação da

glicosilação dos imunogénios do envelope; criação de trímeros dos envelopes estabilizados que mimetizam a espícula viral nativa <sup>(6)</sup>.

Na indução de uma resposta celular, as vias de investigação que devem ser seguidas são: o estudo dos vetores replicativos, utilização de genes baseados em múltiplas regiões altamente conservadas expressos por vetores e a criação de proteínas imunogénicas com mosaicos.

Uma lição que se retira dos últimos anos de investigação é que é fundamental ter um objetivo temporal realista para a criação da vacina e energizar o campo de estudo fermentado com o senso necessário e propósito de urgência.

Contudo, há uma questão que ainda é levantada pela comunidade científica: Será que temos informação científica suficiente sobre o VIH para priorizar o desenvolvimento do produto em vez da investigação básica?

A abordagem a esta questão passará por gerir simultaneamente vigorosas estratégias de ensaios clínicos e simultaneamente programas de investigação em modelos básicos e animais. Isto vai requerer pequenos estudos entre populações de alto risco desenhados para fiavelmente determinar a eficácia do produto <sup>(71)</sup>.

A grande discussão da criação desta vacina para o VIH terá de culminar num balanço entre o suporte político, o apoio governal e de Organizações Não Governamentais, a eficácia dos métodos preventivos já existentes, as vantagens e desvantagens da terapia antirretroviral atualmente implementada, o benefício dos ensaios de eficácia versus as suas controvérsias, o progresso da ciência que se vai capacitando com novas armas de estudo, e a prioridade dada pela sociedade ao desenvolvimento de uma vacina.

A criação de uma vacina será sem dúvida uma descoberta revolucionária. Nos últimos anos os ensaios realizados não têm tido os resultados expectáveis e ainda não foi possível criar uma vacina eficaz suficientemente potente e custo-efetiva. Porém, é importante referir que os avanços técnico-científicos que têm sido feitos em prol do desenvolvimento desta área, assim como as descobertas sobre os mecanismos de

vacinação, estrutura do VIH e todos os outros mecanismos imunológicos envolvidos neste processo são conhecimentos importantes que poderão permitir avanços em outros estudos imunológicos ou mesmo em outras áreas da medicina.

## **6. AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus pais e avós por tornarem o meu percurso académico possível,

Aos meus irmãos por se preocuparem, por incentivarem e sobretudo pelo sentido de amizade e  
interajuda,

Aos meus amigos e amigas por acreditarem, apoiarem e auxiliarem,

Ao Dr. Arlindo Guimas, um especial agradecimento, pela colaboração, perseverança e disponibilidade, e  
fundamentalmente pela capacidade de “criar” tempo para me orientar nesta tarefa tornando-a exequível,  
de uma forma serena e alegre.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (1) Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nature Med* 2009; 15:866-870.
- (2) Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. *Immunity* 2012; 37:412-425.
- (3) Mascola JR, Montefiori DC. The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010; 28:413-444.
- (4) McCoy LE, Weiss RA. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *J Exp Med* 2013; 210:209-223.
- (5) Schiffner T, Sattentau QJ, Dorrell L. Development of prophylactic vaccines against HIV-1. *Retrovirology* 2013; 10:72.
- (6) Barouch DH. The Quest for an HIV-1 Vaccine — Moving Forward- Perspective. *N Engl J Med* 2013; 28:369.
- (7) Murphy K. Janeway's immunobiology. 8ª ed. Nova Iorque: *Garland Science, Taylor & Francis Group*; 2012.
- (8) Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centres. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:429-457.
- (9) Mouquet H et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. *Nature* 2010; 467:591–595.
- (10) Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV infected individuals. *Nature* 2009; 458:636-640.
- (11) Klein F et al. Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell* 2013; 153(1):126-138.
- (12) Forthal DN, Moog C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4:388–393.
- (13) Wei X et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422: 307–312.
- (14) Richman DD, Wrinn T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4144–4149.
- (15) Tomaras GD et al. Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. *J Virol* 2011; 85:11502–11519.

- (16) McCoy LE, Weiss RA. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *J Exp Med* 2013; 210(2):209-223.
- (17) Gray ES et al. The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *J Virol* 2011; 85:4828–4840.
- (18) Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(9):693-701.
- (19) Stephenson KE, Barouch DH. A global approach to HIV-1 vaccine development. *Immunol Rev* 2013; 254(1):295-304.
- (20) Bonsignori M et al. Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. *J Virol* 2012; 86(8):4688-4692.
- (21) Julien JP et al. Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog* 2013; 9(5):e1003342.
- (22) Klein F et al. Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. *Science* 2013; 341:1199.
- (23) Walker LM et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 2009; 326:285–289.
- (24) McLellan JS et al. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 2011; 480:336–343.
- (25) Walker LM et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 2011; 477:466–470.
- (26) Wilson C et al. The site of an immune-selected point mutation in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 does not constitute the neutralization epitope. *J Virol* 1990; 64:3240–3248.
- (27) Arnold GF et al. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) elicited from human rhinoviruses that display the HIV-1 gp41 ELDKWA epitope. *J Virol* 2009; 83:5087–5100.

- (28) Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, Kepler TB. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nature Biotech* 2012; 30:423–433.
- (29) Lian YI et al. Evaluation of envelope vaccines derived from the South African subtype C human immunodeficiency virus type 1 TV1 strain. *J Virol* 2005; 79:13338–13349.
- (30) Ferrantelli F et al. A combination HIV vaccine based on Tat and Env proteins was immunogenic and protected macaques from mucosal SHIV challenge in a pilot study. *Vaccine* 2011; 29:2918–2932.
- (31) Douagi I et al. Influence of novel CD4 binding-defective HIV-1 envelope glycoprotein immunogens on neutralizing antibody and T-cell responses in nonhuman primates. *J Virol* 2010; 84:1683–1695.
- (32) Balazs AB et al. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 2011; 481:81–84.
- (33) Xiao X et al. Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390:404–409.
- (34) Hoot S et al. Recombinant HIV envelope proteins fail to engage germline versions of anti-CD4bs bNAbs. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003106.
- (35) Moir S, Malaspina A, Fauci AS. Prospects for an HIV vaccine: leading B cells down the right path. *Nature Struct Mol Biol* 2011; 18:1317–1321.
- (36) Liao HX et al. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* 2013; 496(7446):469-476.
- (37) Burton, DR, Poignard P, Stanfield RL, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. *Science* 2012; 337:183–186.
- (38) Ndung'u T, RA Weiss. On HIV diversity. *AIDS* 2012; 26:1255–1260.
- (39) Montefiori DC et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis* 2012; 206:431–441.
- (40) Wright PF et al. Comparison of systemic and mucosal delivery of 2 canarypox

virus vaccines expressing either HIV-1 genes or the gene for rabies virus G protein. *J Infect Dis* 2004; 189:1221–1231.

(41) Hessel AJ et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000433.

(42) Watkins JD et al. An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PLoS ONE* 2011; 6:e18207.

(43) Moldt B et al. A nonfucosylated variant of the anti-HIV-1 monoclonal antibody b12 has enhanced FcγRIIIa-mediated antiviral activity in vitro but does not improve protection against mucosal SHIV challenge in macaques. *J Virol* 2012; 86:6189–6196.

(44) Wu X. et al. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 2011; 333:1593–1602.

(45) Streeck H, D'Souza MP, Littman DR, Crotty S. Harnessing CD4+ T cell responses in HIV vaccine development. *Nat Med* 2013; 19(2):143-149.

(46) Doria-Rose NA et al. HIV-1 neutralization coverage is improved by combining monoclonal antibodies that target independent epitopes. *J Virol* 2012; 86(6):3393–3397.

(47) Klein F et al: HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* 2012; 492(7427):118–122.

(48) Goonetilleke N et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2009; 206(6):1253–1272.

(49) Schmitz JE et al. Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8+ Lymphocytes. *Science* 1999; 283(5403):857–860.

(50) McDermott AB, Koup RA. CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease. *AIDS* 2012; 26(10):1281–1292.

(51) Plotkin SA. Complex Correlates of Protection After Vaccination. *Clin Infect Dis* 2013; 56(10):1447-1455.

(52) Goonetilleke N et al. Induction of multifunctional HIV-1-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified

vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 gag coupled to CD8+ T cell epitopes. *J Virol* 2006; 80(10):4717–4728.

(53) Harari A et al: An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *Journal Exp Med* 2008; 205(1):63–77.

(54) Churchyard GJ et al. A phase IIA randomized clinical trial of a multiclade HIV-1 DNA prime followed by a multiclade rAd5 HIV-1 vaccine boost in healthy adults (HVTN204). *PLoS One* 2011; 6(8):e21225.

(55) Jaoko W et al. Safety and immunogenicity study of Multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS One* 2010; 5(9):e12873.

(56) Kibuuka H et al. A phase 1/2 study of a multiclade HIV-1 DNA plasmid prime and recombinant adenovirus serotype 5 boost vaccine in HIV-Uninfected East Africans (RV 172). *J Infect Dis* 2010; 201(4):600–607.

(57) Priddy FH et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* 2008; 46(11):1769–1781.

(58) Buchbinder SP et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomized, placebo-controlled test-of-concept trial. *Lancet* 2008; 372:1881–1893.

(59) McElrath MJ et al: HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 2008; 372(9653):1894–1905.

(60) Li F et al: Mapping HIV-1 vaccine induced T-cell responses: bias towards less-conserved regions and potential impact on vaccine efficacy in the Step study. *PLoS One* 2011; 6(6):e20479.

(61) Hertz T et al. HIV-1 vaccine-induced T-cell responses cluster in epitope hotspots that differ from those induced in natural infection with HIV-1. *PLoS Pathog* 2013; 9(6):e1003404.

- (62) Keefer MC et al. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of a multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected adults. *PLoS One* 2012; 7(8):e41936.
- (63) Colloca S et al. Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Sci Transl Med* 2012; 4(115):115ra2.
- (64) Hansen SG T, et al: Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 2011; 473(7348):523–527.
- (65) Letourneau S et al. Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One* 2007; 2(10):e984.
- (66) Barouch DH et al. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat Med* 2010; 16(3):319–323.
- (67) Positive Phase 1 interim results for killed whole-virus HIV vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; 9(1):7
- (68) Vaccari M, Poonam P, Franchini G. Phase III HIV vaccine trial in Thailand: a step toward a protective vaccine for HIV. *Expert Rev Vaccines* 2010 Sep; 9(9):997-1005.
- (69) Liao HX et al, Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity* 2013; 38:176–186.
- (70) Rerks-Ngarm et al, Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009; 361:1–12.
- (71) Merlin Robb, HIV vaccine development: a new beginning, *Expert Rev Vaccines* 2011; 10(7):925–927.
- (72) Haynes BF, McElrath MJ. Progress in HIV-1 vaccine development. *Curr Opin HIV AIDS* 2013; 8(4):326-332.
- (73) Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. HIV Vaccines - Lessons learned and the way forward. *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(5): 428–434.
- (74) Fauci AS, Marston HD. Ending AIDS--is an HIV vaccine necessary? *N Engl J Med* 2014; 370(6):495-498.

(75) Esparza J. A tale of two vaccines: lessons from polio that could inform the development of an HIV vaccine. *AIDS* 2013; 27(1):1-5.

(76) Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(7):1055-1065.

Imagens de fundo disponíveis *online* em:

-<http://www.alagoasnet.com.br/v3/cientistas-espanhois-criam-vacina-que-controla-hiv-temporariamente/>

-<http://www.brasilecola.com/biologia/antigeno-anticorpo-vacinacao.htm>

-<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2011/04/hiv-na-mira-de-vacina-brasileira>

-<http://thesuccessfulceo.com/category/work-at-home/clinical-trials-work-at-home/>