

A contribuição do Instituto de Higiene e Medicina Tropical para o conhecimento da infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana

The contribution of Institute of Hygiene and Tropical Medicine for the knowledge of infection by the Human Immunodeficiency Virus

Ana B. Abecasis

Unidade de Ensino e Investigação Saúde Pública Internacional e Bioestatística,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa
ana.abecasis@ihmt.unl.pt

Sónia Dias

Unidade de Ensino e Investigação Saúde Pública Internacional e Bioestatística,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa
sfdias@ihmt.unl.pt

José Maria Marcelino

Unidade de Ensino e Investigação da Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal.
jmarcelino@ihmt.unl.pt

Resumo

Ao longo dos últimos 25 anos, o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) tem contribuído de forma significativa para o conhecimento da patogénese da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH). Os estudos realizados abrangem vários aspetos da infeção como a caracterização da história evolutiva e diversidade genética do VIH em Portugal, e em alguns países de África; as alterações na dinâmica de transmissão da epidemia do VIH particularmente em populações de maior risco, a análise das mutações virais que conferem resistência aos antirretrovirais (INI e aos PI); caracterização da resposta humoral não neutralizante e neutralizante e o desenvolvimento de vacinas para a infeção VIH.

Palavras Chave:

Infeção VIH, diversidade genética e epidemiologia molecular, resistência aos antirretrovirais, infeção VIH em populações de maior risco, anticorpos neutralizantes.

Abstract

Over the past 25 years, the Institute of Hygiene and Tropical Medicine (IHMT) has contributed significantly to the knowledge of the pathogenesis of infection by the human immunodeficiency virus (HIV). The studies cover various aspects of infection such as the characterization of the evolutionary history and genetic diversity of HIV in Portugal, and in some countries of Africa; changes in HIV transmission dynamics particularly in most-at-risk populations, analysis of viral mutations that confer resistance to antiretroviral drugs (INI and IP); characterization of the neutralizing and non-neutralizing immune response and development of vaccines for HIV infection.

Key Words:

HIV infection, genetic diversity and molecular epidemiology, resistance to antiretroviral, HIV infection in most-at-risk populations, neutralizing antibodies.

O Vírus da Imunodeficiência Humana

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida pela primeira vez como uma nova doença em meados de 1981, em São Francisco nos EUA, quando se observou que um número elevado de indivíduos adultos do sexo masculino, homossexuais jovens, apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e estavam imunodeprimidos [1]. O vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (VIH-1), isolado dois anos depois, foi identificado como o agente causador da SIDA, que se tornou numa das doenças infecciosas recentes mais devastadores [2, 3]. Atualmente, já foram infetados pelo VIH-1 aproximadamente 60 milhões de indivíduos e ocorreram mais de 25 milhões de mortes [4]. Os países do continente africano em desenvolvimento são os mais afetados pela infeção VIH/SIDA, e é na África subsariana que se registam taxas de prevalência mais elevadas nos adultos jovens.

Em 1986, com a colaboração de três médicos investigadores do IHMT – José Luís Champalimaud, Jaime Nina e Kamal Mansinho – e da investigadora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa Odette Santos-Ferreira, foi descrito o isolamento de um segundo tipo de vírus que também causava a SIDA, o VIH-2, a partir de dois doentes, um dos quais oriundo da Guiné-Bissau e internado na altura no Hospital de Egas Moniz [5]. A associação do VIH-2 a esta região de África foi feita com base na descrição de vários indivíduos tratados e seguidos no Hospital de Egas Moniz em Lisboa, que indicava que nesta região um número significativo de casos de SIDA eram causados pelo VIH-2 [6]. Rapidamente se tornou evidente que a) as duas infeções correspondiam a epidemias diferentes com origens zoonóticas independentes, e que estavam associadas a grupos de risco e regiões geográficas diferentes e b) que a infeção por VIH-2 era caracterizada por uma progressão da doença bastante mais lenta do que a infeção por VIH-1. A maioria dos indivíduos infetados por VIH-2 não apresentavam carga viral detetável no plasma.

A origem do VIH

O VIH-1 foi transmitido aos humanos a partir dos chimpanzés e, evolutivamente, está relacionado de forma mais próxima com o SIVcpz (*Simmian Immunodeficiency Virus*) que infecta *Pan troglodytes troglodytes*, uma subespécie de chimpanzés que habita a África Central. De acordo com resultados de um estudo publicado na revista *Science*, que contou com a colaboração do investigador do IHMT João Diniz Sousa, a origem do vírus remonta à bacia do Congo e o crescimento inicial da epidemia parece ter ocorrido em Kinshasa [7]. O VIH-2 por outro lado, apresenta-se mais próximo do SIVsmm, que infecta sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) que habitam a África Ocidental [8].

Em ambos os casos, a transmissão para os humanos e o crescimento exponencial de ambas as epidemias parece estar associado às alterações sociais múltiplas que ocorreram no início e meados do século XX naquelas regiões e mais tarde à exportação de algumas estirpes para outros locais e continentes, em que consequentemente surgiram novas epidemias [7]. Em particular, no que diz respeito à origem do VIH-2, num estudo publicado em 2003 por vários investigadores do IHMT – Perpétua Gomes, Ana Abecasis e Ricardo Camacho - foi demonstrado que a adaptação bem-sucedida à espécie humana e o início da epidemia estarão associados à transmissão parentérica do vírus em campanhas de imunização e tratamento que ocorreram na altura da guerra da independência na Guiné-Bissau [9].

Epidemiologia molecular do VIH

As dimensões epidémicas são muito diferentes quando comparamos estes dois vírus: o VIH-2 infecta cerca de 1.2 milhões de pessoas, sobretudo na África Ocidental, na Índia e em menor extensão na Europa (Portugal e França). O VIH-1 causa uma pandemia global com aproximadamente 31 milhões de pessoas infetadas em todo o mundo. Clinicamente, o VIH-2 é menos patogénico para os humanos do que o VIH-1, e os doentes apresentam cargas virais mais baixas e uma progressão da doença mais lenta antes da evolução para SIDA.

A partir da bacia do Congo, o VIH-1 disseminou-se por todo o mundo, acumulando um grau de variabilidade genética bastante elevada. Assim, formaram-se 9 subtipos de VIH-1 ditos puros (A, B, C, D, F, G, H, J e K), ou seja que resultam de histórias evolutivas independentes a partir de um ancestral comum [10]. Pensa-se que a formação de clusters independentes nos diferentes subtipos seja o resultado por um lado de efeitos fundadores, resultantes da exportação de determinados subtipos a partir da África Ocidental para outras regiões geográficas com acumulação de diversidade genética subsequente; e por outro lado do facto de não haver uma amostragem completa de todas as estirpes VIH circulantes, particularmente de todas as estirpes de VIH que circularam no início da epidemia e que portanto não estão disponíveis para análise [11].

Ainda relativamente à origem dos diferentes subtipos, pensa-se por exemplo que o VIH-1 subtipo B, que causa um maior número de infeções em países desenvolvidos, descende de uma estirpe de subtipo D que foi exportada para o Haiti nos anos 60, tendo sido depois exportada para os Estados Unidos da América (E.U.A.), onde iniciou a primeira epidemia do vírus em Homens que têm Sexo com Homens (HSH) [12]. Enquanto para o subtipo B esta história evolutiva é conhecida com maior pormenor, diferentes estudos sugerem que para os subtipos não-B a sua ‘especiação’ também ocorreu após a exportação de estirpes ancestrais desses subtipos para outros locais fora da bacia do Congo.

A infecção VIH em Portugal, na Europa e em países africanos de língua oficial portuguesa

Nos últimos 25 anos, a nossa instituição tem estado envolvida na caracterização da história evolutiva e diversidade genética da pandemia VIH. O primeiro estudo foi publicado por uma equipa que incluía Kamal Mansinho e José Luís Champalimaud em 1989, altura em que foi clonado o isolado VIH-2CAM2. Recorrendo a mapas de restrição, observou-se que este isolado diferia em 7 dos 22 locais já descritos para o isolado de referência, o VIH-2ROD [13]. A partir de 2000, foram publicados vários artigos pelos investigadores Aida Esteves, Ricardo Parreira, João Piedade, Ana Abecasis, Ricardo Camacho, Perpétua Gomes e Anne-Mieke Vandamme, em que foi estudada e descrita a diversidade genética do VIH-1 e do VIH-2 em Portugal, Guiné-Bissau, Angola e Moçambique [14-17]. O último destes estudos foi publicado em 2013, tendo sido descrita a relação entre a prevalência dos diferentes subtipos VIH-1 na Europa e os fatores demográficos das populações atingidas. Demonstrou-se a existência de um elevado grau de compartimentalização das epidemias dos diferentes subtipos, com poucos cruzamentos de infeções entre doentes de diferentes grupos de risco ou de diferentes países de origem [18].

Em 2007, demonstrámos que a epidemia VIH-1 em Portugal era caracterizada por dois subtipos altamente prevalentes: o subtipo B e o subtipo G [19]. A co-circulação destes subtipos desde muito cedo na história da epidemia VIH em Portugal, juntamente com o facto de haver uma elevada prevalência de infeções por VIH-2, confere características únicas à epidemia VIH em Portugal, sobretudo quando nos comparamos com outros países desenvolvidos, em que o subtipo B domina a epidemia e foi o único subtipo a circular durante vários anos. Este facto levou à formação desde muito cedo de formas circulantes recombinantes entre os subtipos B e G, que circulam até hoje em Portugal. Para o recombinante mais importante – CRF14_BG – a história evolutiva e a origem foram estudadas e descritas em 2011 [20-22] por uma equipa que incluía a investigadora Ana Abecasis.

Resistência aos fármacos

Depois dos primeiros anos da pandemia, em que a infecção VIH-1 com evolução para SIDA era uma doença iminente fatal, em 1986 o tratamento da infecção VIH melhorou drasticamente: resultados iniciais de ensaios clínicos demonstraram que a azidotimidina (AZT), um fármaco previamente utilizado para o tratamento do cancro, era eficaz para o tratamento da infecção VIH [23]. Os doentes tratados com este antirretroviral tinham um atraso significativo na progressão da doença. No entanto, em 1989, Larder *et al* descreveram pela

primeira vez o isolamento de estirpes de VIH, colhidas a partir de doentes tratados com AZT, com sensibilidade reduzida ao fármaco [24]. Pouco tempo depois percebeu-se o significado clínico destes achados: o desenvolvimento de resistências à terapêutica antirretroviral, levava ao escape viral à pressão seletiva dos fármacos e conseqüentemente à progressão da doença. Estas variantes do vírus, resistentes a antirretrovirais, adquirem determinadas mutações no genoma – mutações de resistência aos antirretrovirais – que permitem que o vírus continue a replicar-se, mesmo na presença do fármaco.

O rápido desenvolvimento de resistências aos antirretrovirais não é surpreendente no contexto de um organismo de evolução rápida como o VIH, em que as taxas de mutação e recombinação são extremamente elevadas e o rápido turnover celular contribuem para o elevado grau de diversidade genética [25]. Assim, a terapêutica com um ou dois fármacos não é suficientemente eficaz para controlar a replicação viral por longos períodos de tempo. Nesse contexto, pelo menos três fármacos diferentes, preferencialmente de classes distintas, são usados em combinação para manter uma elevada pressão sobre o vírus. A resultante HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) é a estratégia utilizada atualmente para melhor controlar a infecção e é extremamente eficaz. Existem cinco classes de fármacos antirretrovirais que estão disponíveis para o tratamento da infecção por VIH: os Inibidores Nucleósidos da Transcriptase Reversa (INTRs), os Inibidores Não Nucleósidos da Transcriptase Reversa (INNTRs), os Inibidores da Protease (PIs), os Inibidores da Integrase (INIs) e os Inibidores da Entrada (EIs).

A resistência aos fármacos antirretrovirais e as mutações de resistência associadas foram extensivamente caracterizadas depois da deteção dos primeiros casos. No entanto, uma vez que nos primeiros anos da pandemia apenas circulava o subtipo B nos países desenvolvidos, este tipo de estudos incidiram inicialmente apenas nestas estirpes e os algoritmos de interpretação de resistência aos antirretrovirais eram baseados apenas em estudos realizados com estirpes do subtipo B. Especificamente para Portugal, em que o subtipo G já circulava na população infetada quase desde o início da epidemia, eram necessários outros estudos para melhor compreender o desenvolvimento de resistências em estirpes de subtipos não B. Esses estudos foram desenvolvidos numa parceria do IHMT, Hospital de Egas Moniz e Katholieke Universiteit Leuven por Ana Abecasis, Anne-Mieke Vandamme e Ricardo Camacho. Apesar de estudos subsequentes terem demonstrado que a maioria das mutações de resistência são comuns aos diferentes subtipos, tornou-se claro que algumas mutações surgem apenas em determinados subtipos não B (ex. M89I/V, V106M) e que as vias evolutivas para o desenvolvimento de resistências divergem entre subtipos [26]. Essas diferenças parecem ser facilitadas por polimorfismos basais presentes nas estirpes wild-type dos diferentes subtipos.

É também importante compreender a resistência aos fármacos no contexto das estirpes de VIH-2. Nem todos os antirre-

trovirais desenvolvidos para o tratamento da infecção por VIH-1 são igualmente eficazes para as estirpes de VIH-2: o VIH-2 é naturalmente resistente a todos os INNTRs e ao IE enfuvirtide (T20) [27, 28] e também apresenta graus variáveis de resistência natural a alguns IPs. As vias evolutivas para aquisição de resistências no VIH-2 são também diferentes das do VIH-1 e os algoritmos de interpretação precisam de ser adaptados para este tipo de VIH. A nossa instituição tem estado envolvida ativamente no estudo das mutações de resistência aos antirretrovirais que conferem resistência aos INIs e aos PIs em estirpes de VIH-2, nomeadamente através do trabalho do investigador Ricardo Camacho e da aluna de doutoramento Joana Cavaco Silva, e publicou recentemente dois artigos sobre este tema [29, 30].

Alterações na dinâmica de transmissão da epidemia do VIH

Nas últimas décadas, a epidemia de VIH/SIDA tem tido efeitos profundos e duradouros sobre as sociedades em todo o mundo. No início da epidemia, a maioria dos casos VIH positivos que ocorreram nos países ocidentais resultaram das relações sexuais entre homens e do uso de drogas injetáveis [31]. Os avanços na terapia antirretroviral, a migração ativa de países onde a transmissão por contato heterossexual é frequente, e programas de prevenção extensivos com um forte impacto na mudança dos comportamentos de risco, alteraram os modos de transmissão do VIH [31]. Embora o grupo dos HSH continue a ser o grupo com maior risco de adquirir o VIH na Europa Ocidental (constituindo 40,1% de todos os novos diagnósticos de VIH em 2011), os novos diagnósticos entre heterossexuais subiram acentuadamente nos últimos anos, enquanto os utilizadores de drogas injetáveis (UDI) representam muito pouco entre os novos casos de diagnósticos de VIH na região. Foram observadas tendências semelhantes em Portugal, onde os dados de vigilância de rotina mostram que a transmissão heterossexual e homo ou bissexual contribuem para a maior parte das infeções diagnosticadas recentemente (63,1% e 24,1%, respetivamente). O grupo da investigadora e Professora do IHMT Sónia Dias tem estado amplamente envolvido num grande número de estudos sobre os fatores sócio comportamentais associados à transmissão da infeção.

Populações em maior risco

Os esforços para controlar a epidemia de uma doença infecciosa de etiologia multifatorial têm servido para destacar a complexidade dos subgrupos culturais e da diversidade de estilos de vida a considerar nas políticas e ações de saúde. Em epidemias concentradas, algumas populações têm sido reconhecidas como uma prioridade para a prevenção, uma vez que são consideradas em maior risco para contrair e trans-

mitir o VIH, e incluem homens que fazem sexo com homens (HSH), trabalhadores do sexo (TS), UDI e imigrantes.

O grupo dos HSH continua a ser desproporcionalmente afetado pela infeção por VIH [32]. O número de casos de VIH entre HSH na Europa aumentou 27% entre 2004 e 2009, mais do que os adquiridos via relações heterossexuais ou pelo uso de drogas injetáveis [33]. Em Portugal, a incidência do VIH em HSH tem-se acentuado, sendo o terceiro país europeu com o maior número de novos casos diagnosticados atribuídos ao sexo entre os homens [33]. Recentemente, o aumento da incidência de novos diagnósticos entre HSH em várias cidades da Europa, América do Norte e Austrália, tem sido associado a um aumento do sexo desprotegido e das taxas de infeções sexualmente transmissíveis (IST) [31, 34]. As razões para o aumento dos comportamentos de risco não estão totalmente claras, mas a fadiga da prevenção e falta de conscientização entre os HSH mais jovens têm sido frequentemente apresentadas como possíveis explicações [34]. Além disso, como a terapia antirretroviral se tornou muito disponível, observou-se uma forte melhoria na qualidade de vida das pessoas infetadas com o VIH [34]. Paradoxalmente, isso pode ter contribuído para mudanças no modo como muitos HSH vêem as consequências da transmissão do VIH e percecionam o risco de adquirirem o VIH, o que resulta no aumento dos comportamentos sexuais de alto risco [34]. Outro fator importante para aumentar o risco do VIH entre HSH tem sido as relações complexas entre comportamentos de risco que levam a adquirir o VIH e a adoção de medidas protetoras entre os membros do grupo, conforme descrito em diversos estudos. Num estudo transversal realizado recentemente pelo grupo da investigadora Sónia Dias, os resultados mostraram que muitos dos HSH envolveram-se em comportamentos de alto risco e adotaram práticas de redução de risco (“serosorting e seropositioning”) como estratégias de prevenção baseadas no estatuto do VIH do próprio e do parceiro (dados não publicados). Esses comportamentos não foram rigorosamente avaliados como abordagens de prevenção do VIH, e alguns podem representar riscos não intencionais para os HSH ao reduzir o uso do preservativo, especialmente entre aqueles com um teste recente negativo para VIH, infetados recentemente [35].

Considerável atenção tem sido dada aos contextos que aumentam a exposição dos HSH ao risco do VIH. Os ambientes onde os HSH encontram outros HSH para sexo casual, geralmente anónimo, sugerem que esses locais estão associados a comportamentos de risco para o VIH [36]. No nosso estudo, os HSH que costumam visitar locais de passagem para encontrar parceiros sexuais relataram prevalências elevadas de VIH e um grande número de parceiros sexuais envolvido em sexo em grupo e com relações sexuais desprotegidas com um parceiro com estatuto desconhecido (dados não publicados). Além disso, os efeitos dos comportamentos sexuais de risco na infeção VIH podem depender fortemente das redes sexuais e suas características (tamanho, simultaneidade/con-

corrência de parceiros sexuais, proporção de membros de elevado e baixo risco), traduzindo-se em diferentes níveis de risco para o VIH [35].

Outra população chave para a prevenção do VIH são os TS pois eles e seus clientes podem ter um papel importante na transmissão [37]. Os dados recentes, mas limitados, tendem a confirmar que a prevalência do VIH entre TS é maior do que na maioria das outras populações [31, 37]. Os TS experienciam elevada exposição sexual ao risco através de um grande número e concorrência de parceiros sexuais. Em termos biológicos, a alta prevalência de IST em TS e a relação sinérgica entre o VIH e outras IST agrava os riscos [37]. A maioria dos TS em todo o mundo são mulheres. No entanto, existem populações substanciais de TS masculinos e transexuais em muitos países [31, 37]. A dinâmica da transmissão do VIH entre estes TS pode ser ainda mais complexa com os riscos biológicos aumentados devido ao sexo anal, elevada prevalência do VIH em alguns subgrupos, e à grande proporção de TS homens e transexuais que relatam práticas bissexuais [37]. Um estudo comportamental realizado em Portugal por investigadores do IHMT mostrou uma prevalência de VIH de 17,6% entre os TS transexuais, muito superior à de outros subgrupos [38], e consistente com outros estudos internacionais [37]. Além disso, como foi demonstrado neste estudo, a transmissão do VIH entre TS também pode ser agravada pela interseção do uso de drogas injetáveis e trabalho sexual, através do aumento da exposição parentérica devido à partilha de equipamentos de injeção, sexo com parceiros positivos para o VIH, reduzido uso de preservativos e risco aumentado de outras IST [31, 37, 39]. Os resultados também documentam as influências limitantes de fatores estruturais, incluindo a pobreza, a degradação das condições do trabalho sexual, a desigualdade de género, assim como os efeitos nocivos da violência física e sexual, estigma, discriminação e exclusão social [31, 37]. Esses fatores aumentam diretamente o risco de infeção por VIH entre trabalhadores do sexo, restringindo o acesso à saúde preventiva e serviços de tratamento do VIH/outras IST [31, 37].

Os migrantes de países com epidemias generalizadas de VIH, particularmente da África subsaariana, têm sido reconhecidos por representar uma parcela desproporcional e crescente de infeções por VIH na Europa Ocidental. Nos países com informação disponível, dois terços de todas as infeções por VIH adquiridas heterossexualmente e diagnosticadas durante 1997-2002 foram em pessoas provenientes de países com epidemias generalizadas de VIH [31]. Além disso, a migração coloca frequentemente essas mesmas pessoas em vulnerabilidade acrescida ao VIH e suas complicações [31]. As potenciais explicações incluem os longos períodos longe de controlo social da família e dos parceiros, a experiência de exclusão social e a falta de proteção legal [31]. Além disso, a subutilização dos serviços de saúde para a prevenção do VIH, testes e tratamento, associada a barreiras culturais, linguísticas, socioeconómicas e legais, foi identificada como um fator que contribui para a vulnerabilidade dos imigrantes [31,

40]. Um estudo sobre infeção VIH e imigrantes em Portugal mostrou que grupos de imigrantes específicos, como os imigrantes homens, provenientes da Europa do Leste e em situação irregular reportaram taxas mais baixas de testes de VIH, sugerindo constrangimentos culturais, legais e linguísticos no acesso aos serviços de saúde da infeção por VIH [40]. O estudo também indica que esta população apresenta tendencialmente altas taxas de infeção VIH não diagnosticada e utiliza os serviços de saúde em fases posteriores da doença [31, 40]. Um estudo bio comportamental com TS imigrantes em Portugal revelou que muitos imigrantes infetados pelo VIH não têm conhecimento do seu estado serológico (dados não publicados).

Desafios emergentes para a vigilância, investigação e tradução do conhecimento

Mais do que nunca, na era da terapia antirretroviral altamente eficaz, o diagnóstico precoce e o tratamento dos indivíduos infetados é essencial para a prevenção, tratamento e controlo do VIH. Uma grande percentagem das pessoas infetadas por VIH continua a ignorar a sua infeção - dos 35 milhões de pessoas infetadas por VIH no mundo, 19 milhões não sabem que são seropositivos para o VIH (3). Essas pessoas não vão poder beneficiar de um tratamento eficaz e vão continuar, sem saber, a transmitir o VIH. Além disso, as pessoas infetadas recentemente têm cargas virais elevadas, o que aumenta o risco de transmissão [31]. Medir com precisão a prevalência do VIH e comportamentos ao longo do tempo, nomeadamente nas populações em maior risco é essencial para o planeamento e a implementação de programas de prevenção adequados e custo-efectivos [31]. Infelizmente, a nossa compreensão da carga e epidemiologia do VIH em populações em maior risco é escassa, em grande parte porque essas populações estão pouco representadas nos sistemas nacionais de vigilância do VIH, estando “escondidas” e sendo estigmatizadas em muitos lugares. Neste sentido, a existência de populações de difícil acesso apresenta um desafio para a vigilância do VIH, que ultimamente tem levado a uma grande expansão de inquéritos de vigilância bio comportamentais para determinar a prevalência de VIH e comportamentos de risco associados nas populações mais vulneráveis [41]. No entanto, definir e aceder aos subgrupos em maior risco é um grande desafio. Dadas as recentes tendências do VIH, e considerando os diversos perfis sócio comportamentais e níveis de risco e exposição ao VIH entre essas populações, surgem questões relevantes: são os subgrupos que foram estudados até agora os mais imperativos? Estamos a usar os métodos mais eficazes para obter amostras suficientes e diversas das populações que mais interessam? Estas preocupações têm destacado a necessidade de estratégias de amostragem alternativas para subgrupos populacionais que não são eficientemente “capturados” através das estratégias de recolha de dados convencionais [41].

Nas últimas décadas, têm sido realizados grandes esforços na tentativa de se desenvolver estratégias alternativas para recrutar populações de difícil acesso para efeitos de investigação, uma vez que não existe nenhuma base de amostragem para esses grupos e é inviável usar métodos de amostragem tradicionais probabilísticos. Alguns dos métodos mais inovadores têm sido utilizados na investigação internacional para a recolha de dados sobre as tendências de prevalência da infeção VIH e fatores de risco comportamentais das populações de difícil acesso [42]. O SIALON II é um projeto europeu em curso, que envolve 16 países europeus, incluindo Portugal destinado a fornecer evidência científica para uma vigilância epidemiológica eficaz utilizando metodologias de amostragem inovadoras como a amostragem por tempo-local e a amostragem dirigida pelo entrevistado [41]. O IHMT, como instituição do país coordenador da avaliação do projeto, tem contribuído para avaliar a eficácia dessas abordagens e melhorar a capacidade das instituições de saúde pública e das organizações não-governamentais na utilização de novas amostragens e novos métodos de testes para a recolha de dados bio comportamentais entre populações de difícil acesso, como HSH. Como parceiro coordenador da avaliação, também estamos a colaborar no desenvolvimento de orientações internacionais sobre a implementação de estratégias e políticas eficazes de saúde pública em áreas de forte necessidade na Europa.

Um outro desafio relevante na condução de investigação em VIH tem sido a obtenção de informação quando as comunidades não estão geralmente dispostas a participar nos esforços de investigação, quer porque muitas vezes têm um sentimento de desconfiança e desinteresse em relação à investigação ou estão relutantes em revelar os seus comportamentos e situação de infeção a outras pessoas [41]. A longa história de investigações a partir das quais não havia qualquer benefício direto (por vezes até danos reais) nem retorno dos resultados às comunidades contribuiu para essa desconfiança [43]. Isto coloca um problema de investigação, não de métodos mas de abordagem. O reconhecimento de que as iniciativas de investigação não estavam a ter efeito nos ganhos em saúde e bem-estar das comunidades levou a que progressivamente se viesse a considerá-las como parceiros ativos na identificação de problemas-chave e na utilização dos resultados da investigação, vindo a ter um importante papel na realização de investigação participativa baseada na comunidade com populações difíceis de alcançar/de difícil acesso [44]. Este foi o caso do PREVIH, um projeto Português desenvolvido no IHMT de 4 anos de investigação-intervenção sobre VIH em TS e um dos primeiros projetos nacionais desenvolvidos com uma natureza intersectorial e participativa, envolvendo todos os atores interessados em e afetados pela problemática do VIH (instituições de investigação/ensino, serviços de saúde, ONGs, organizações de base comunitária (OBCs) e sociedade civil). Claras vantagens foram encontradas na utilização da abordagem de investigação participativa, uma vez que contribuiu para ultrapassar diversos desafios no decorrer do proje-

to, principalmente os relacionados com assegurar um compromisso pleno dos parceiros comunitários sobre a relevância do projeto, construir e manter confiança e respeito mútuo, determinar a melhor forma de alcançar subgrupos de TS de difícil acesso garantindo simultaneamente o rigor científico, e abordar as questões éticas. Outros resultados importantes foram a obtenção de uma maior relevância das questões de investigação para a comunidade, um desenho de estudo, metodologia, métodos e medidas mais apropriados para a população e contexto dos TS, melhores taxas de recrutamento e retenção de participantes, interpretação dos resultados mais enriquecida através da integração de múltiplas perspetivas, e o desenvolvimento do *empowerment* da comunidade e da capacidade para a prevenção do VIH.

Esta experiência, como muitas outras iniciativas internacionais de investigação participativa, reforçam o potencial da abordagem participativa em investigação para obter evidência sobre o peso do VIH, os fatores de risco sociodemográficos, comportamentais e estruturais associados e as necessidades de prevenção nas populações vulneráveis, particularmente nas que se encontram em maior risco. Tem sido também reconhecido o seu potencial para a tradução do conhecimento – uma prática inovadora multifacetada que permite intercâmbios multidirecionais e a co-construção de conhecimento entre os académicos, os representantes comunitários, os profissionais e os decisores políticos, e a sua tradução em políticas e ações de saúde efetivas baseadas na evidência [44-46].

A necessidade de encontrar continuamente estratégias mais eficazes e eficientes para ultrapassar os desafios atuais é primordial. Abordagens de investigação adequadas são a essência de qualquer sistema de vigilância de alta qualidade, especialmente quando se pretende compreender as dinâmicas de transmissão em populações que têm um potencial papel na transmissão do VIH e que são difíceis de alcançar. Nos últimos anos temos vindo a assistir a uma mudança de paradigma na investigação em VIH, no sentido da construção de alianças inovadoras para a promoção da saúde sexual, re inventivas e adaptadas às necessidades dos atores envolvidos, que promovam a sua capacidade para conceber investigações e intervenções mais relevantes, coerentes, responsivas e sustentáveis ao longo do tempo.

Infeção por VIH-2: uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina para o VIH

Os grandes desafios que se colocam ao desenvolvimento de uma vacina eficaz e protetora contra a infeção por VIH-1 têm por base a diversidade genética do VIH-1, a incerteza sobre o que deve constituir a imunidade protetora, e a dificuldade em desenvolver antígenos que induzam respostas neutralizantes de elevada potência e com amplitudes mais abrangentes. Os anticorpos com atividade

neutralizante levam aproximadamente por 2 anos para serem produzidos pelo sistema imunitário após a infecção por VIH, contudo apenas uma pequena percentagem de indivíduos desenvolvem anticorpos com capacidade para neutralizarem o VIH-1 [47]. Os anticorpos neutralizantes, que neutralizam diversos subtipos de VIH-1, são produzidos por cerca de 20% dos indivíduos infetados [48]. Estes anticorpos são caracterizados por uma elevada frequência de mutações somáticas nas regiões que determinam a complementaridade [49]. Os anticorpos neutralizantes contudo, não evitam o escape do vírus na maioria dos indivíduos [50]. A produção de anticorpos monoclonais humanos neutralizantes utilizando novas abordagens, como é o caso de células B de memória específicas para antígenos do VIH-1, esta é uma das principais estratégias na pesquisa de vacinas para o VIH-1 [51-53].

Os estudos sobre o desenvolvimento de vacinas para a infecção por VIH-1 no IHMT, através do grupo do investigador José Marcelino, tem sido centrada na avaliação do papel dos anticorpos na infecção por VIH-2 [54-58]. Para avaliar estes objetivos foi estudado o VIH-2, o segundo retrovírus que causa também a SIDA no homem como acontece com o VIH-1. A infecção pelo VIH-2 tem sido descrita como um bom exemplo de como o sistema imunitário é capaz de desenvolver ferramentas eficientes para controlar a replicação de VIH-1 e evitar a progressão da doença. Os estudos para avaliar este tipo de resposta foram realizados em murganhos e utilizaram uma coorte de indivíduos infetados por VIH-2.

A imunogenicidade e a resposta neutralizante induzida por proteínas recombinantes derivadas do invólucro de um isolado primário de referência, VIH-2ALI, foram avaliadas num modelo animal, murganhos Balb/C, em que os animais foram imunizados com várias combinações do vírus *vaccinia* expressando proteínas do VIH-2ALI e depois com proteínas recombinantes da região do invólucro do VIH-2ALI [59].

Os resultados demonstraram que podem ser induzidos anticorpos neutralizantes muito reativos utilizando uma estratégia de imunização, utilizando numa primeira fase o vírus *vaccinia* e depois uma proteína recombinante da região C2V3C3 da gp125. O estudo permitiu sugerir também uma possível relação entre o escape do vírus à neutralização e o tropismo celular [57, 59].

A natureza e a dinâmica da resposta de anticorpos neutralizantes obtida e o escape viral foram caracterizadas num grupo de indivíduos crónicos infetados por VIH-2 [57]. A maioria dos doentes infetados com isolados R5 de tropismo desenvolveram anticorpos neutralizantes específicos para a região C2V3C3, contudo potência e amplitude diminuíam com a progressão da doença. A resistência aos anticorpos neutralizantes ocorreu na fase mais avançada da doença e estava geralmente associada aos vírus com tropismo viral X4 e com grandes alterações na sequência de amino ácidos da região V3 assim como na sua conformação. Estes estudos suportam um novo modelo para a patogénese do VIH-2 em que os anticorpos neutralizantes desempenham um papel central e têm fortes implicações para o desenho de uma vacina para o VIH-1 [57].

Estes estudos demonstram pela primeira vez que a maioria dos indivíduos infetados por VIH-2 desenvolvem anticorpos que os protegem da progressão da infecção por VIH-2. A progressão da infecção para a fase de SIDA ocorreu apenas nos pacientes em que se observou uma redução da presença de anticorpos neutralizantes contra o VIH-2. Nestes pacientes o vírus era resistente à atividade dos anticorpos neutralizantes, e adquirindo a capacidade de infetar novas células. Observou-se que havia uma região do envelope do vírus que foi o alvo da resposta de anticorpos neutralizantes e que também foi alterada em contacto com estes anticorpos. Os resultados dos estudos realizados poderão contribuir para o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra a infecção por VIH-2 e no desenho de novas estratégias para uma vacina para o VIH-1.

Bibliografia

1. (CDC), C f D C (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30, 305-308.
2. Barre-Sinoussi, F, Chermann, JC, Rey, F, Nugeyre, MT, Chamaret, S, Gruest, J, Dautet, C, Axler-Blin, C, Vezinet-Brun, F, Rouzioux, C, Rozenbaum, W, and Montagnier, L (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
3. Gallo, RC, Salahuddin, SZ, Popovic, M, Shearer, GM, Kaplan, M, Haynes, BF, Palker, TJ, Redfield, R, Oleske, J, Safai, B, and et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503.
4. Merson, MH, O'Malley, J, Serwadda, D, and Apisuk, C (2008). The history and challenge of HIV prevention. *Lancet* 372, 475-488.
5. Clavel, F, Guetard, D, Brun-Vezinet, F, Chamaret, S, Rey, MA, Santos-Ferreira, MO, Laurent, AG, Dauguet, C, Katlama, C, Rouzioux, C, and et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
6. Clavel, F, Mansinho, K, Chamaret, S, Guetard, D, Favier, V, Nina, J, Santos-Ferreira, MO, Champalimaud, JL, and Montagnier, L (1987). Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *The New England journal of medicine* 316, 1180-1185.
7. Faria, NR, Rambaut, A, Suchard, MA, Baele, G, Bedford, T, Ward, MJ, Tatem, AJ, Sousa, JD, Arinaminpathy, N, Pepin, J, Posada, D, Peeters, M, Pybus, OG, and Lemey, P (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56-61.
8. Santiago, M L, Range, F, Keele, B F, Li, Y, Bailes, E, Bibollet-Ruche, F, Frueteau, C, Noe, R, Peeters, M, Brookfield, JF, Shaw, GM, Sharp, PM, and Hahn, BH (2005). Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology* 79, 12515-12527.
9. Gomes, P, Abecasis, A, Almeida, M, Camacho, R, and Mansinho, K (2003). Transmission of HIV-2. *The Lancet. Infectious diseases* 3, 683-684.
10. Robertson, DL, Anderson, JP, Bradac, JA, Carr, JK, Foley, B, Funkhouser, RK, Gao, F, Hahn, BH, Kalish, ML, Kuiken, C, Learn, GH, Leitner, T, McCutchan, F, Osmanov, S, Peeters, M, Pieniazek, D, Salminen, M, Sharp, PM, Wolinsky, S, and Korber, B (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288, 55-56.
11. Rambaut, A, Posada, D, Crandall, KA, and Holmes, EC (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews. Genetics* 5, 52-61.
12. Gilbert, MT, Rambaut, A, Wlasiuk, G, Spira, TJ, Pitchenik, AE, and Worobey, M (2007). The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18566-18570.
13. Tristem, M, Mansinho, K, Champalimaud, JL, Ayres, L, and Karpas, A (1989). Six new isolates of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) and the molecular characterization of one (HIV-2CAM2). *The Journal of general virology* 70 (Pt 2), 479-484.
14. Piedade, J, Venenno, T, Prieto, E, Albuquerque, R, Esteves, A, Parreira, R, and Canas-Ferreira, WF (2000). Longstanding presence of HIV-2 infection in Guinea-Bissau (West Africa). *Acta tropica* 76, 119-124.
15. Parreira, R, Piedade, J, Domingues, A, Lobao, D, Santos, M, Venenno, T, Baptista, JL, Mussa, SA, Barreto, AT, Baptista, AJ, and Esteves, A. (2006). Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 from Beira, Mozambique. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 2442-2451.
16. Esteves, A, Parreira, R, Venenno, T, Franco, M, Piedade, J, Germano De Sousa, J, and Canas-Ferreira, W. F. (2002). Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS research and human retroviruses* 18, 313-325.
17. Abecasis, A, Paraskevicius, D, Epalanga, M, Fonseca, M, Burity, F, Bartolomeu, J, Carvalho, AP, Gomes, P, Vandamme, AM, and Camacho, R (2005). HIV-1 genetic variants circulation in the North of Angola. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 5, 231-237.
18. Abecasis, AB, Wensing, AM, Paraskevicius, D, Vercauteren, J, Theys, K, Van de Vijver, DA, Albert, J, Asjo, B, Balotta, C, Beshkov, D, Camacho, RJ, Clotet, B, De Gascon, C, Griskevicius, A, Grossman, Z, Hamouda, O, Horban, A, Kolupajeva, T, Korn, K, Kostrikis, LG, Kucherer, C, Litsola, K, Linka, M, Nielsen, C, Otelea, D, Paredes, R, Poljak, M, Puchhammer-Stockl, E, Schmit, JC, Sonnerborg, A, Stanekova, D, Stanojevic, M, Struck, D, Boucher, CA, and Vandamme, AM (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 10, 7.
19. Palma, AC, Araújo, F, Duque, V, Borges, F, Paixão, MT, Camacho, R, and Network, PS (2007). Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect Genet Evol* 7, 391-398.
20. Bártoło, I, Abecasis, AB, Borrego, P, Barros, H, McCutchan, F, Gomes, P, Camacho, R, and Taveira, N (2011). Origin and epidemiological history of HIV-1 CRF14_BG. *PLoS One* 6, e24130.
21. Esteves, A, Parreira, R, Piedade, J, Venenno, T, Franco, M, Germano de Sousa, J, Patricio, L, Brum, P, Costa, A, and Canas-Ferreira, WF (2003). Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. *AIDS research and human retroviruses* 19, 511-517.
22. Freitas, FB, Esteves, A, Piedade, J, and Parreira, R (2013). Novel multiregion hybridization assay for the identification of the most prevalent genetic forms of the human immunodeficiency virus type 1 circulating in Portugal. *AIDS research and human retroviruses* 29, 318-328.
23. Chaisson, RE, Allain, JP, Leuther, M, and Volberding, PA (1986). Significant changes in HIV antigen level in the serum of patients treated with azidothymidine. *The New England journal of medicine* 315, 1610-1611.
24. Larder, BA, Darby, G, and Richman, DD (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243, 1731-1734.
25. Abecasis, AB, Vandamme, AM, and Lemey, P (2009). Quantifying differences in the tempo of human immunodeficiency virus type 1 subtype evolution. *Journal of virology* 83, 12917-12924.
26. Abecasis, AB, Deforche, K, Snoeck, J, Bachelier, LT, McKenna, P, Carvalho, AP, Gomes, P, Camacho, RJ, and Vandamme, AM (2005). Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *Aids* 19, 1799-1806.
27. Camacho, RJ (2012). Special aspects of the treatment of HIV-2-infected patients. *Intervirology* 55, 179-183.
28. Witvrouw, M, Pannecouque, C, Switzer, WM, Folks, TM, De Clercq, E, and Heneine, W (2004). Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antiviral therapy* 9, 57-65.
29. Cavaco-Silva, J, Abecasis, A, Miranda, AC, Poças, J, Narciso, J, Águas, MJ, Maltz, F, Almeida, I, Germano, I, Diniz, A, Gonçalves, M e F, Gomes, P, Cunha, C, Camacho, RJ, and Group, P. H.-R. S. (2014). HIV-2 integrase polymorphisms and longitudinal genotypic analysis of HIV-2 infected patients failing a raltegravir-containing regimen. *PLoS One* 9, e92747.
30. Cavaco-Silva, J, Aleixo, MJ, Van Laethem, K, Faria, D, Valadas, E, Gonçalves, M e F, Gomes, P, Vandamme, AM, Cunha, C, Camacho, RJ, and Group, P. H.-R. S. (2013). Mutations selected in HIV-2-infected patients failing a regimen including atazanavir. *J Antimicrob Chemother* 68, 190-192.
31. Hamers, FF, and Downs, AM (2004). The changing face of the HIV epidemic in western Europe: what are the implications for public health policies? *Lancet* 364, 83-94.
32. Baral, S, Sifakis, F, Cleghorn, F, and Beyrer, C (2007). Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low- and middle-income countries 2000-2006: a systematic review. *PLoS medicine* 4, e339.
33. van de Laar, MJ (2009). HIV/AIDS and other STI in men who have sex with men--a continuous challenge for public health. *Euro surveillance*, vol. 14.
34. Boily, MC, Godin, G, Hogben, M, Sherr, L, and Bastos, FI (2005). The impact of the transmission dynamics of the HIV/AIDS epidemic on sexual behaviour: a new hypothesis to explain recent increases in risk taking-behaviour among men who have sex with men. *Medical hypotheses* 65, 215-226.
35. Beyrer, C, Baral, SD, van Griensven, F, Goodreau, SM, Chariyalertsak, S, Wirtz, AL, and Brookmeyer, R (2012). Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet* 380, 367-377.
36. Grov, C, Hirshfield, S, Remien, RH, Humberstone, M, and Chaisson, MA (2013). Exploring the venue's role in risky sexual behavior among gay and bisexual men: an event-level analysis from a national online survey in the U.S. *Archives of sexual behavior* 42, 291-302.
37. Baral, S, Beyrer, C, Muessig, K, Poteat, T, Wirtz, AL, Decker, MR, Sherman, SG, and Kerrigan, D (2012). Burden of HIV among female sex workers in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* 12, 538-549.
38. Dias, S, Gama, A, Fuertes, R, Mendao, L, and Barros, H (2014). Risk-taking behaviours and HIV infection among sex workers in Portugal: results from a cross-sectional survey. *Sexually transmitted infections*.
39. Dias, S (2015). The role of men who pay for sex in STI transmission: current knowledge and future directions. The contribution of the third UK National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *Sexually transmitted infections* 91, 78-79.
40. Dias, S, Gama, A, Severo, M, and Barros, H (2011). Factors associated with HIV testing among immigrants in Portugal. *International journal of public health* 56, 559-566.
41. Magnani, R, Sabin, K, Sidel, T, and Heckathorn, D (2005). Review of sampling hard-to-reach and hidden populations for HIV surveillance. *Aids* 19 Suppl 2, S67-72.
42. Muhib, FB, Lin, LS, Stueve, A, Miller, RL, Ford, WL, Johnson, WD, Smith, PJ, and Team, C. I. T. f. Y. S. (2001). A venue-based method for sampling hard-to-reach populations. *Public Health Rep* 116 Suppl 1, 216-222.
43. Israel, BA, Schulz, AJ, Parker, EA, and Becker, AB (1998). Review of community-based research: assessing partnership approaches to improve public health. *Annual review of public health* 19, 173-202.
44. Dias, S, and Gama, A (2014). [Community-based participatory research in public health: potentials and challenges]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* 35, 150-154.

45. Clavier, C, Senechal, Y, Vibert, S, and Potvin, L (2012). A theory-based model of translation practices in public health participatory research. *Sociology of health & illness* 34, 791-805.
46. Ramsden, VR, McKay, S, and Crowe, J (2010). The pursuit of excellence: engaging the community in participatory health research. *Global health promotion* 17, 32-42.
47. Richman, DD, Wrin, T, Little, SJ, and Petropoulos, CJ (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4144-4149.
48. Walker, LM, Huber, M, Doores, KJ, Falkowska, E, Pejchal, R, Julien, JP, Wang, SK, Ramos, A, Chan-Hui, PY, Moyle, M, Mitcham, JL, Hammond, PW, Olsen, OA, Phung, P, Fling, S, Wong, CH, Phogat, S, Wrin, T, Simek, MD, Koff, WC, Wilson, IA, Burton, DR, Poignard, P, and Investigators, PGP (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477, 466-470.
49. Klein, F, Mouquet, H, Dosenovic, P, Scheid, JF, Scharf, L, and Nussenzweig, MC (2013). Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science* 341, 1199-1204.
50. Liao, HX, Lynch, R, Zhou, T, Gao, F, Alam, SM, Boyd, SD, Fire, AZ, Roskin, KM, Schramm, CA, Zhang, Z, Zhu, J, Shapiro, L, Mullikin, JC, Gnanakaran, S, Hraber, P, Wiehe, K, Kelsoe, G, Yang, G, Xia, SM, Montefiori, DC, Parks, R, Lloyd, KE, Scearce, RM, Soderberg, KA, Cohen, M, Kamanga, G, Louder, M K, Tran, L M, Chen, Y, Cai, F, Chen, S, Moquin, S, Du, X, Joyce, MG, Srivatsan, S, Zhang, B, Zheng, A, Shaw, GM, Hahn, BH, Kepler, TB, Korber, BT, Kwong, PD, Mascola, JR, Haynes, BF, and Program, NCS (2013). Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* 496, 469-476.
51. Jardine, J, Julien, JP, Menis, S, Ota, T, Kalyuzhnyi, O, McGuire, A, Sok, D, Huang, PS, MacPherson, S, Jones, M, Nieusma, T, Mathison, J, Baker, D, Ward, AB, Burton, DR, Stamatatos, L, Nemazee, D, Wilson, IA, and Schief, WR (2013). Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science* 340, 711-716.
52. Mouquet, H (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends in immunology* 35, 549-561.
53. Mouquet, H, Klein, F, Scheid, JF, Warncke, M, Pietzsch, J, Oliveira, TY, Velinzon, K, Seaman, MS, and Nussenzweig, MC (2011). Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PloS one* 6, e24078.
54. Marcelino, JM, Nilsson, C, Barroso, H, Gomes, P, Borrego, P, Maltez, F, Rosado, L, Doroana, M, Antunes, F, and Taveira, N (2008). Envelope-specific antibody response in HIV-2 infection: C2V3C3-specific IgG response is associated with disease progression. *Aids* 22, 2257-2265.
55. Rocha, C, Calado, R, Borrego, P, Marcelino, JM, Bartolo, I, Rosado, L, Cavaco-Silva, P, Gomes, P, Familia, C, Quintas, A, Skar, H, Leitner, T, Barroso, H, and Taveira, N (2013). Evolution of the human immunodeficiency virus type 2 envelope in the first years of infection is associated with the dynamics of the neutralizing antibody response. *Retrovirology* 10, 110.
56. Borrego, P, Marcelino, JM, Rocha, C, Doroana, M, Antunes, F, Maltez, F, Gomes, P, Novo, C, Barroso, H, and Taveira, N (2008). The role of the humoral immune response in the molecular evolution of the envelope C2, V3 and C3 regions in chronically HIV-2 infected patients. *Retrovirology* 5, 78.
57. Marcelino, JM, Borrego, P, Nilsson, C, Familia, C, Barroso, H, Maltez, F, Doroana, M, Antunes, F, Quintas, A, and Taveira, N (2012). Resistance to antibody neutralization in HIV-2 infection occurs in late stage disease and is associated with X4 tropism. *Aids* 26, 2275-2284.
58. Barroso, H, Borrego, P, Bartolo, I, Marcelino, JM, Familia, C, Quintas, A, and 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, e14548.
59. Marcelino, JM, Borrego, P, Rocha, C, Barroso, H, Quintas, A, Novo, C, and Taveira, N (2010). Potent and broadly reactive HIV-2 neutralizing antibodies elicited by a vaccinia virus vector prime-C2V3C3 polypeptide boost immunization strategy. *Journal of virology* 84, 12429-12436.