

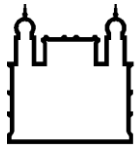
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação às características genéticas e bioquímicas do gene *env*

DALZIZA VICTALINA DE ALMEIDA

Rio de Janeiro  
Julho de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Dalziza Victalina de Almeida*

Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação às características genéticas e bioquímicas do gene *env*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

**Orientador:** Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

**RIO DE JANEIRO**

Julho 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A447 Almeida, Dalziza Victalina de

Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação às características genéticas e bioquímicas do gene *env* / Dalziza Victalina de Almeida. – Rio de Janeiro, 2016.

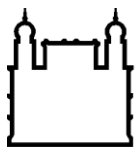
ii, 166 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 98-115

1. HIV-1. 2. Anticorpos neutralizantes. 3. Envelope. 4. Env. I. Título.

CDD 614.599392



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***DALZIZA VICTALINA DE ALMEIDA***

Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação as características genéticas e bioquímicas do gene *env*

**ORIENTADOR: Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães**

**Aprovada em: 29 / 07/ 2016**

**EXAMINADORES:**

Dr. Renato Santana de Aguiar - UFRJ/RJ (presidente)

Dra. Myrna Cristina Bonaldo - IOC/FIOCRUZ

Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ

Dr. Adriano Gomes da Silva - INI/FIOCRUZ

Dra. Luciana Jesus da Costa - UFRJ/RJ (suplente)

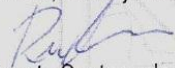
Rio de Janeiro, 29 de Julho de 2016.

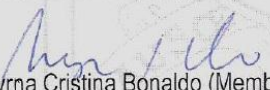


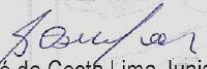
Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Dalziza Victalina de Almeida**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Monick Lindenmeyer Guimarães. Ao vigésimo nono dia do mês de julho de dois mil e dezesseis, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação às características genéticas e bioquímicas do gene env”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Renato Santana de Aguiar - UFRJ/RJ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Myrna Cristina Bonaldo - IOC/FIOCRUZ, Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Adriano Gomes da Silva - INI/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Luciana Jesus da Costa - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de julho de 2016.

  
Dr. Renato Santana de Aguiar (Presidente da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Myrna Cristina Bonaldo (Membro da Banca):

  
Dr. Josué da Costa Lima Junior (Membro da Banca):

  
Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

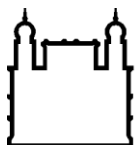
*Dedico esta tese à minha filha  
Manuela Medeiros de Almeida*

Havia um grande incêndio na floresta.  
As chamas se elevavam a uma enorme  
altura. Os animais, apavorados, fugiam  
desesperadamente da catástrofe.  
Enquanto isso, um pequenino beija-flor  
voava até o rio, pegava no bico uma gota  
de água e trazia-a até a borda da  
floresta, deixando-a cair sobre as chamas.  
Observando o vai-e-vem da ave, uma  
coruja interrogou-o: - O que você está  
fazendo, beija-flor?  
- Estou tentando apagar o incêndio -  
respondeu a avezinha. - Você deve ser  
maluco - disse a coruja. - É impossível  
apagar esse incêndio com essa gotinha de  
água! - Sei disso - o beija-flor falou. -  
Estou apenas fazendo a minha parte.  
Fábula popular

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela força e paciência adquirida nesses últimos quatro anos. Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães, pela oportunidade e confiança para a realização deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, científicos e pessoais. Agradeço enormemente todo o apoio e crescimento que me foi proporcionado! À Profa. Dra. Vera Bongertz, pelos grandes ensinamentos sobre neutralização do HIV-1, pelas oportunidades de discussões científicas. À Dra. Mariza Morgado pelo grande exemplo de mulher batalhadora sempre em prol da ciência. À Prof. Dra. Leila Mendonça Lima, pelo auxílio e por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para realização dos experimentos de clonagem. Ao DATT por auxiliarem com a manutenção dos equipamentos do laboratório de Biossegurança NB3. Ao Dr. Giovane Salvatore por disponibilizar seu tempo e ao colega Luciano Gomes por realizar a predição proteica de modelagem por homologia. Às Dra. Valdilea Veloso e Dra. Beatriz Grinsztejn, por auxiliarem na abordagem dos pacientes atendidos no hospital do INI. A minha querida mãe e aos meus irmãos, por estarem sempre presentes em minha vida independente da distância, sobretudo, por me darem força e acreditarem em mim. Ao Fred por todos esses anos de companheirismo e por cuidar tão bem de nossa filha, principalmente nos últimos momentos de foco. Aos queridos amigos do LabAids, por compartilharem seus conhecimentos, nas discussões científicas e no dia a dia da bancada: Carmem, Thaysse, Fernanda, Karine, Priscilla, Diogo, Tatiana, Suwellen & Edson, Bianca, Jose Carlos, Pilotto, Deise, Daiana, Carlos, Michelle, Pedro, Karina, Sylvia, Gonzalo, Nathalia, Vitor, Iniza, Joanna, Rafael, Giselle, Geane, Isadora, Saada, Roberta, Adriana, Carol, obrigada pela amizade e apoio! A todos os doadores de sangue, especialmente aos pacientes HIV-1+, que aceitaram participar deste estudo e que depositam em nós suas esperanças de um futuro melhor. À coordenação da Pós-graduação em Biologia Parasitária. À Fiocruz por ser este centro de referência científico e tecnológico, que tão bem nos acolhe. Por fim à Fundação Bill e Melinda Gates, ao DST/Aids e hepatites virais e a Faperj pelo apoio financeiro.





## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

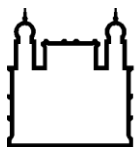
### RESUMO

Avaliação da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos virais prevalentes no Brasil em relação às características genéticas e bioquímicas do gene *env*

Dalziza Victalina de Almeida

Espera-se que uma vacina anti-HIV/aids seja capaz de induzir resposta imune específica de células T CD8<sup>+</sup> e de anticorpos neutralizantes (nAb). No entanto, a alta variabilidade genética do envelope (*env*) viral é um dos fatores que podem influenciar na eficácia de uma vacina. Assim, com a finalidade de avaliar resposta imune humoral, novos ensaios de detecção de nAb anti-HIV-1 têm sido utilizados. Portanto, o presente estudo visa avaliar a resposta neutralizante em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes perfis de progressão para aids, com diferentes subtipos do HIV-1 e mapear características do gene *env*. Para tal, realizamos um comparativo entre dois ensaios de neutralização, um usando o isolado viral HIV-1IIIB em linfócitos primários e outro utilizando oito pseudovírus (psVs) em células TZM-bl. Nestes ensaios foram testadas 10 amostras de plasma obtidas de indivíduos com perfil típico de progressão para aids e 10 de não progressores de longo tempo (LTNP). Nesta primeira análise, observamos que 44% (69/160) das titulações contra os psVs foi positiva, assim como 50% (10/20) para o HIV-1 IIIB. Também observamos que as amostras de plasmas provenientes dos indivíduos progressores apresentaram neutralização ampla e potente. Diante destes resultados observamos a importância do contínuo estímulo antigênico para a indução de nAb e que esta resposta também poderia ser influenciada por epítomos subtipo-específicos. Assim, avaliamos as características genéticas e fenotípicas do HIV-1 em *env* com relação à indução da atividade neutralizante subtipo-específica. Portanto, selecionamos 60 amostras de plasma de indivíduos cronicamente infectados com HIV-1 dos subtipos prevalentes no Brasil e realizamos o ensaio de neutralização utilizando células TZM-bl e psVs (destes mesmos subtipos). Nesta análise verificamos uma maior potência da resposta neutralizante anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelos subtipos B ou F1 em comparação com os do subtipo C ou da variante B/Bbr ( $p < 0,005$ ). Observamos que a região variável 1 (V1) do envelope viral do subtipo B/Bbr apresentou maior número de aminoácidos do que para os outros subtipos, assim como a região V4 do subtipo F1 foi menor ( $p < 0,005$ ). Observamos ainda que algumas assinaturas subtipo-específicas entre o subtipo F1 e B/Bbr, estavam localizadas nas regiões C2, V3 da gp120 e na gp41. Estes

resultados indicam que uma única substituição de aminoácido na alça V3 pode levar a uma distinta exposição conformacional ou a diferenças de carga no domínio de associação ao trímero da gp120. Desta forma, concluímos que essas alterações no envelope viral interferem na potência da atividade neutralizante anti-HIV-1, tendo uma implicação significativa para a concepção de uma vacina.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PHD THESIS IN SCIENCES (PARASITARY BIOLOGY)

#### ABSTRACT

### **Evaluation of neutralizing anti-HIV-1 response in individuals infected by viral subtypes prevalent in Brazil in relation to genetic and biochemical characteristics of the *env* gene**

**Dalziza Victalina de Almeida**

It is expected that an HIV vaccine/aids be able to induce specific response in CD8<sup>+</sup> T cells and neutralizing antibodies (nAb). However the high genetic variability of the virus envelope gene (*env*) is one of the factors that can influence the ability of a vaccine. Thus, in order to assess humoral immune response against immunogens, HIV-1 neutralizing antibody detection assays have been used. Therefore, this study aims to evaluate the humoral immune response in individuals with different AIDS progression profiles and map the *env* gene characteristics of HIV-1 subtypes prevalent in Brazil. To this end, we performed a comparison between two neutralization assays, one using the viral isolate HIV-1IIIB in primary lymphocytes and the other neutralization with TZM-bl cells tested against eight pseudovirus (psVs). In these assays were tested 10 plasma samples obtained from individuals with typical profile of progression to aids and 10 from long-term non progressors (LTNP). In the first analysis, we observed 44% of neutralizing antibody titers against psVs and 50% for HIV-1 IIIB. The plasma samples from progressors showed broad and potent neutralization. From these results, we noted the importance of continuous antigenic stimulus in inducing humoral response and their influence for viral factors. Thus, we evaluated the genetic and phenotypic characteristics HIV-1 *env* subtype-specific and associated them to the induction of neutralizing activity. For this purpose, we selected 60 plasma samples from individuals infected with HIV-1 subtypes prevalent in Brazil and perform neutralization assay with psVs (same HIV-1 subtype). We observed a greater breadth and potency of anti-Env neutralizing response in individuals infected with the F1 or B HIV-1 subtypes compared with the C subtype and variant B/Bbr. We observed that the regions V1 from B/Bbr subtype had greater number of amino acids than the other subtypes and V4 region from F1 subtype had fewer amino acids ( $p < 0.005$ ). We also observed that some subtype-specific signatures of F1 subtype and B/Bbr samples located in regions C2, V3 and gp41 may have influenced in the neutralizing response difference between them. These results indicate that a single amino acid substitution in the V3 loop may lead to a distinct conformational exposure or load,

in association domain of trimer of gp120, and interfere with the neutralizing response potency and has a significant implication for the vaccine design.

## ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Epidemiologia global do HIV-1</b>	<b>18</b>
1.1.1 Epidemiologia do HIV-1 no Brasil	20
<b>1.2 Epidemiologia Molecular do HIV</b>	<b>22</b>
1.2.1 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil	24
<b>1.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1</b>	<b>26</b>
<b>1.4 História natural da infecção pelo HIV</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Estrutura e Infecção viral</b>	<b>31</b>
<b>1.6 Sequências consenso e ensaio de neutralização</b>	<b>37</b>
<b>1.7 Anticorpos no contexto do HIV-1</b>	<b>34</b>
<b>1.8 Perspectivas para vacinas anti-HIV e imunoterapia</b>	<b>40</b>
<b>1.9 Justificativa</b>	<b>43</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>45</b>
<b>3. Documento 1</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Metodologia</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Resultados</b>	<b>56</b>
<b>4. Documento 2</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Metodologia</b>	<b>64</b>
<b>4.2 Resultados</b>	<b>68</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>87</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>96</b>
<b>7. Referências</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>116</b>
<b>8.1 Publicação</b>	<b>116</b>
<b>8.2 Figura suplementar</b>	<b>168</b>
<b>8.3 Lista de identificação das sequências de nucleotídeos submetida a banco de dados GenBank</b>	<b>168</b>
<b>8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	<b>170</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Estimativa do número de pessoas vivendo com HIV em 2014.</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2: Estimativa do número de novos casos de infecção pelo HIV-1, pessoas vivendo com HIV-1 e casos de morte relacionada com a aids, mundialmente de 2001 a 2012.</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3: Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 2005 a 2014.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes circulantes baseado em dados compilados do período de 2000-2007.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 5: Distribuição dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes circulantes, no Brasil.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 6: História natural da infecção pelo HIV-1.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7: Ilustração do trímero das glicoproteínas do envelope em interação com CD4, alterando os arranjos conformacionais de V1/V2 e V3 e desmascarando o sítio de ligação do CCR5 anteriormente oculto.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 8: Representação da estrutura secundária da glicoproteína gp120 do envelope viral.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9: Principais sítios em Env para a interação com os anticorpos neutralizantes.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 10: Esquema da tecnologia do gene repórter da luciferase em células TZM-bl, baseado em único ciclo de replicação com pseudovírus.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 11: Esquema comparativo do processo metodológico do documento 1.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12: Modelo de formato do ensaio de neutralização com PBMC.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 13: Potência da atividade neutralizante específica para o HIV-1 IIIB em plasma de indivíduos com perfil típico (TP) progressão e de não progressão para aids (LTNP).</b>	<b>59</b>
<b>Figura 14: Atividade neutralizante dos <i>pools</i> de plasmas dos subtipos B, F1 ou B/Bbr para cada pseudovirus em ensaio de TZM-bl e HIV-1 IIIB em PBMC.</b>	<b>60</b>
<b>Figura 15: Delineamento metodológico do documento 2</b>	<b>63</b>
<b>Figura 16: Árvore filogenética do gene <i>env</i> do HIV-1.</b>	<b>69</b>

<b>Figura 17</b> Distância genética entre as sequências consensos de <i>env</i> C e B de isolados do Brasil e os pseudovírus do painel internacional.	<b>71</b>
<b>Figura 18:</b> Faixa de neutralização por subtipo.	<b>75</b>
<b>Figura 19:</b> Reatividade neutralizante cruzada induzida por diferentes subtipos do HIV-1.	<b>76</b>
<b>Figura 20:</b> Dissonância entre as faixas de neutralização para os pseudovírus GWGR e pseudovírus GPGR.	<b>77</b>
<b>Figura 21:</b> Comparação do tamanho das regiões variáveis por subtipo do HIV-1 (B, B/Bbr, F1 e C).	<b>79</b>
<b>Figura 22:</b> Modelagem estrutural da superfície molecular da alça V3 da gp120, sendo em A representado o psVGWGR, com o motivo CRIHIGWGRAFYTC e em B o psVGPGR com o motivo CRIHIGPGRAFYTC.	<b>80</b>
<b>Figura 23:</b> Esquema da sequência de aminoácidos do envelope viral (gp120 e gp41) em relação as assinaturas subtipo-específicas.	<b>83</b>
<b>Figura 24:</b> Modelagem da superfície molecular da alça V3 da gp120, com motivo CRIRIGPGQAFYTC, presente no subtipo C, em A. Com motivo CRIHIGPGRAFYTC presente no subtipo B, em B.	<b>84</b>
<b>Figura 25:</b> Alinhamento dos pseudovírus (psV) em relação a linhagem de referência HXB2 e características da gp160.	<b>85</b>
<b>Figura 26:</b> Suplementar: Alinhamento de sequências de aminoácidos do envelope do HIV-1 dos subtipos B, B/Bbr, F1 e C.	<b>168</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes no momento da coleta da amostra de plasma para o estudo de anticorpos neutralizantes. _____	48
Tabela 2: Análise fenotípica dos pseudovírus e do HIV-1 IIIB. _____	56
Tabela 3: Atividade neutralizante dos plasmas provenientes de indivíduos com perfil típico de progressão (P) para a doença e perfil de não progressão (LTNP), em ensaio de TZM-bl. _____	58
Tabela 4: Distância genética inter subtipo do HIV-1 no gene <i>env</i> . _____	70
Tabela 5: Caracterização fenotípica dos pseudovírus. _____	72
Tabela 6: Média geométrica de títulos (GMT) dos anticorpos neutralizantes frente aos pseudovírus. _____	75
Tabela 7: Atividade neutralizante das amostras de plasma B, B/Bbr, C e F1 contra os psVs. _____	74
Tabela 8: Número de potenciais sítios de N-glicosilação (PNLG) do envelope viral dos subtipos F1, B, B/Bbr, C e quando agrupados por faixa de neutralização. _____	78
Tabela 9: Características do envelope por número de aminoácidos (L) e sítios de glicosilação (N) das regiões variáveis (V) da gp120, gp41 e total (gp160) dos pseudovírus. _____	80



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>Aids</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês: <i>Acquired Immuno Deficiency syndrome</i>
<b>ADCC</b>	Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, do inglês: <i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i>
<b>BCR</b>	Receptor de células B, do inglês: <i>B cell receptor</i>
<b>bNAbs</b>	Anticorpos neutralizantes potentes e com amplitude de resposta, do inglês: <i>Broadly Neutralizing Antibodies</i>
<b>CDR-H3</b>	Região determinante de complementaridade 3 da cadeia pesada, do inglês: <i>third complementarity-determining regions of the heavy chain</i>
<b>CRF</b>	Forma Recombinante Circulante, do inglês: <i>Circulante Recombinant Form</i>
<b>Env, env</b>	Envelope (proteína), <i>envelope</i> (gene)
<b>EC</b>	Controlador de Elite, do inglês: <i>Elite Controller</i>
<b>GALT</b>	Tecido linfático associado ao intestino, do inglês: <i>gut-associated lymphoid tissue</i>
<b>GMT</b>	Média geométrica de título, do inglês: <i>Geometric mean titer</i>
<b>GMS</b>	Média geométrica de sensibilidade, do inglês: <i>Geometric mean sensibility</i>
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês: <i>Human Leukocyte Antigens</i>
<b>HPTN</b>	do inglês: <i>HIV Prevention Trials Network</i>
<b>HSH</b>	Homem que faz sexo com homem
<b>HVTN</b>	do inglês: <i>HIV vaccine trial network</i>
<b>INPAACT</b>	do inglês: <i>International Maternal, Pediatric, Adolescent AIDS Clinical Trials</i>
<b>LANL</b>	do inglês: <i>Los Alamos National Laboratory</i>
<b>LTNP</b>	Não Progressor de Longo Tempo, do inglês: <i>Long Term Non Progressor</i>
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal, do inglês: <i>Monoclonal antibody</i>
<b>MPER</b>	Região externa próxima a membrana, do inglês: <i>membrane-proximal external region</i>
<b>nAb</b>	Anticorpo neutralizante, do inglês: <i>neutralizing antibody</i>
<b>NIH</b>	Instituto nacional de saúde dos Estados Unidos, do inglês <i>National Institute of Health in the USA</i>
<b>nt</b>	Nucleotídeos
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico, do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino, do inglês: <i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PNLG</b>	Potenciais sítios de glicosilação, do inglês: <i>predicted N-linked glycosylation</i>
<b>RLU</b>	Unidades Relativas de Luminescência, do inglês: <i>Relative Luminescence Units</i>
<b>sCD4</b>	CD4 solúvel, do inglês: <i>soluble cluster of differentiation 4</i>
<b>SIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Símia do inglês: <i>Simian immunodeficiency virus</i>
<b>TARV</b>	Terapia Antirretroviral
<b>TCLA</b>	Linhagens virais adaptadas à célula T, do inglês: <i>T cell lines adapted</i>
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Dose de Infectividade de 50% (diluição em que é possível detectar replicação viral em 50% das células infectadas) do inglês: <i>50% Tissue culture Infective Dose</i>
<b>UNAIDS</b>	Programa conjunto das Nações Unidas para o combate ao HIV/aids, do inglês: <i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
<b>URF</b>	Forma Recombinante Única, do inglês: <i>Unique Recombinant Form</i>
<b>VESPA</b>	<i>Viral epidemiology signature pattern analysis</i>
<b>VC</b>	Controlador Virêmico, do inglês: <i>Viremic Controller</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia global do HIV-1

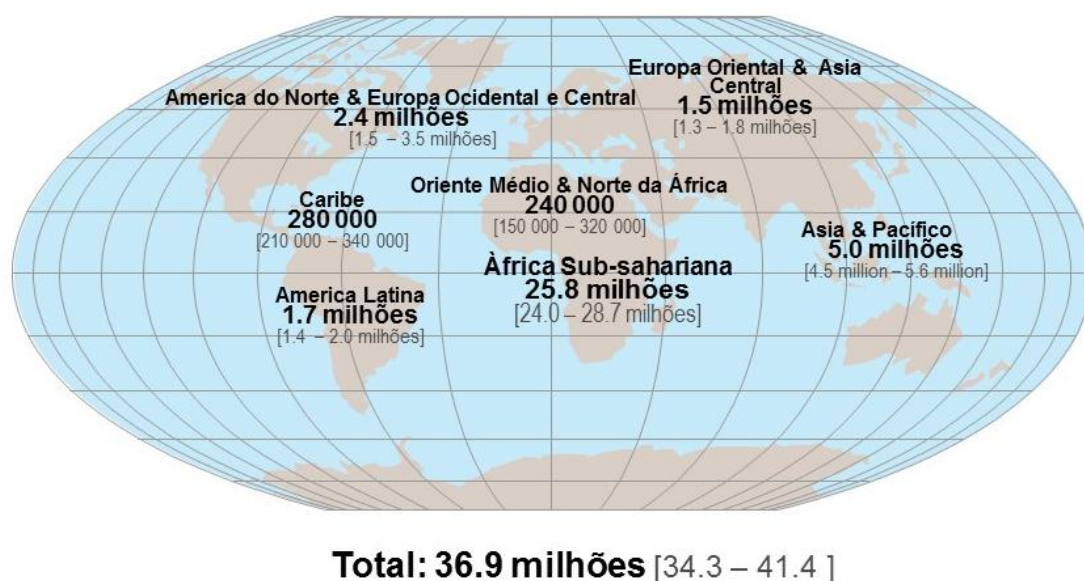
Em 2014, foi estimado que 36.9 milhões de pessoas estivessem infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), demonstrando aumento em relação aos anos anteriores, visto que em 2012 a estimativa era de 35.3 milhões (figura 1) <sup>1</sup>. Embora o número de casos da infecção continue aumentando, esse aumento não se apresenta mais em escala exponencial. Em 2014, foram registrados 2 milhões de novos casos de infecções pelo HIV, mundialmente, mostrando um declínio de 35% em relação ao ano de 2000. Ao mesmo tempo, o número de mortes relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) também apresentou um declínio, com 1,6 milhões de mortes em 2012 e 1,2 milhões de mortes em 2014, demonstrando um decréscimo de 42% em relação ao ano de 2004, ano qual obtivemos maior número de mortes (figura 2) <sup>2</sup>.

Na África sub-sahariana, região que detém o maior número de casos da doença, 25.8 milhões de casos de aids foram detectados, sendo 1.4 milhões de novos casos em 2014, com uma diminuição de 41% comparando-se ao ano de 2000. A África do Sul é o país mais afetado pela epidemia com 6.4 milhões de pessoas vivendo com HIV, sendo que em 2010 a aids esteve relacionada com cerca de 540 mortes por dia, e em 2013 representava 16% do total de novos casos mundiais. Atualmente, na África sub-sahariana, 10.7 milhões de pessoas tem acesso à terapia antirretroviral (TARV), correspondendo a 41% das pessoas infectadas pelo HIV <sup>3,4</sup>.

Na América Latina, em 2014, 1.7 milhões de pessoas estavam infectadas pelo vírus e foram relatados 87.000 novos casos na região, contudo houve um decréscimo de 17% no número de novos casos entre 2000 e 2014. Mesmo assim, foram verificadas 41.000 mortes relacionadas à aids no ano de 2014.

Por fim, verificamos com esses dados que os casos de aids, embora tenham diminuído em relação aos anos anteriores, a doença permanece como um dos mais sérios problemas de saúde no mundo <sup>1,2</sup>.

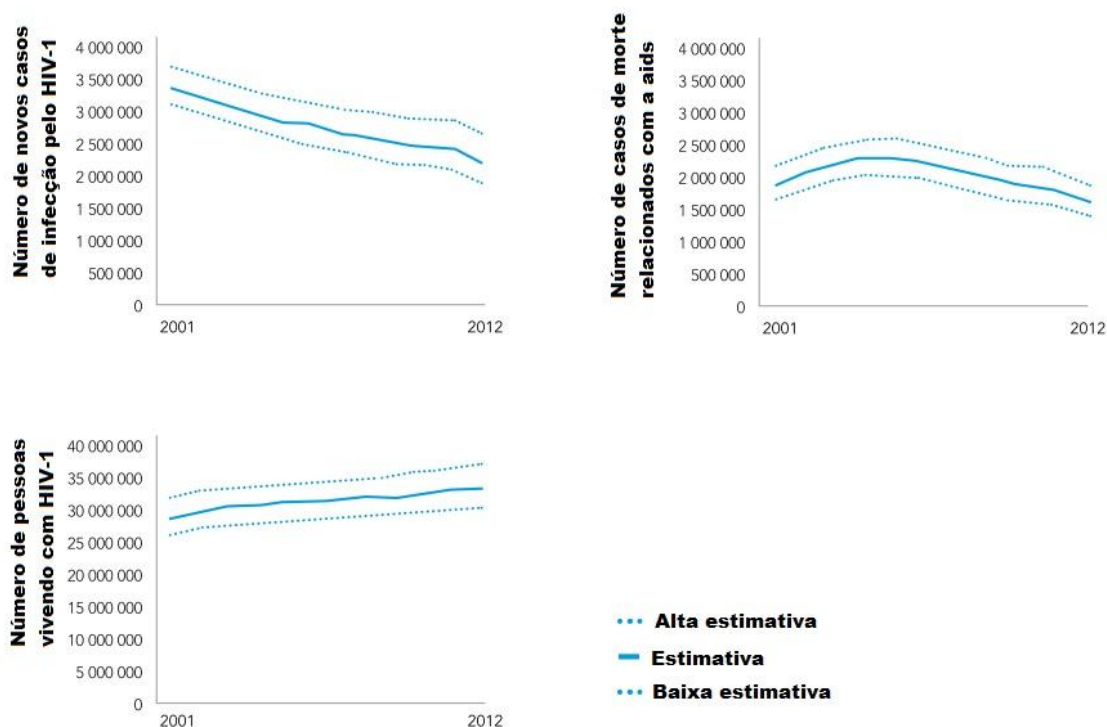
Com o avanço de novos medicamentos, novas políticas de prevenção e com maiores investimentos, o Programa Conjunto das Nações Unidas no combate a HIV/AIDS (UNAIDS) lançou a Declaração de Paris na qual traçou metas para erradicar a epidemia, a meta denominada: 90 90 90, sendo os objetivos deste programa que 90% das pessoas que vivem infectadas pelo HIV saibam seu estado sorológico, 90% recebam terapia antirretroviral, 90% das pessoas em tratamento tenham uma carga viral suprimida até 2020, diminuindo assim a transmissão. Ainda com relação a 2020 estima-se que 500.000 seja o número de novas infecções por ano e que tenhamos 0% de discriminação, visto que as pessoas afetadas pelo HIV ainda sofrem o estigma do preconceito e muitas não recebem amparo psicológico. Se estas metas forem alcançadas, o próximo programa para 2030 almejará uma cobertura maior, o chamado 95 95 95; 200.000 novos casos / ano e zero de discriminação <sup>5</sup>.



**Figura 1: Estimativa do número de pessoas vivendo com HIV em 2014.**

Fonte: Adaptado de UNAIDS 2014. Disponível em:

[http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/20150714\\_coreepidemiologyslide\\_s\\_ppt](http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/20150714_coreepidemiologyslide_s_ppt)



**Figura 2: Estimativa do número de novos casos de infecção pelo HIV-1, pessoas vivendo com HIV-1 e casos de morte relacionada com a aids, mundialmente de 2001 a 2012.** Adaptado de UNAIDS GLOBAL REPORT: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 <sup>2</sup>.

### 1.1.1 Epidemiologia do HIV-1 no Brasil

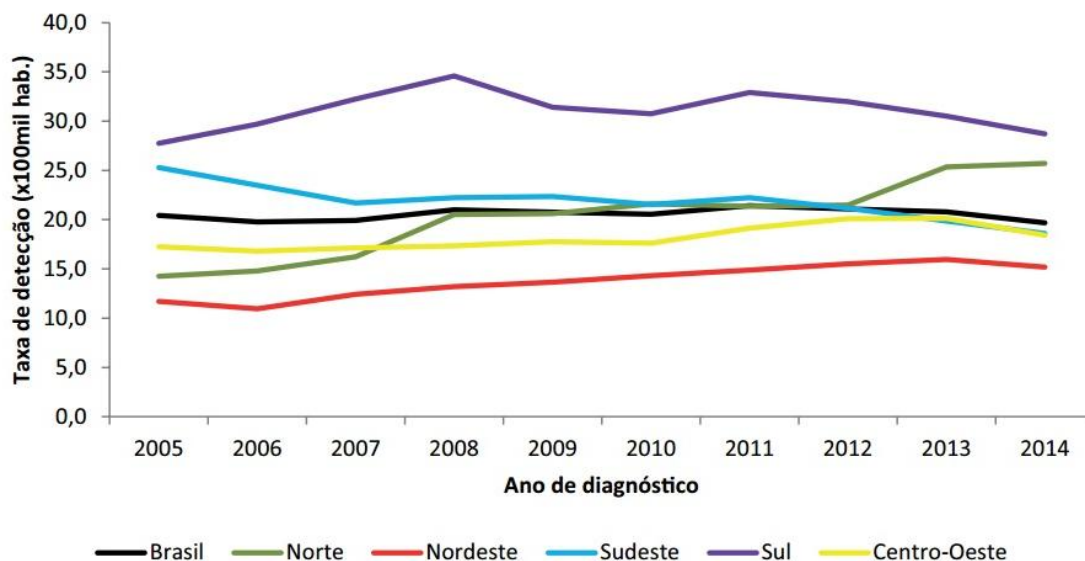
Desde o início da epidemia até junho de 2015 foram registrados 798.366 casos de aids no Brasil. No período de 2005 a 2014, o Brasil registrou uma média de 40,6 mil casos de aids por ano. Contudo, a taxa de detecção da aids no país tem apresentado estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,5 casos por ano para cada 100 mil habitantes (figura 3), o que significa aproximadamente 0,6% da população <sup>6</sup>.

Entre 2012 e 2014 os boletins epidemiológicos apresentaram similares taxas de detecção por região, contudo apontando um aumento na taxa de detecção na região Norte de 21 casos de aids/ 100.000 habitantes para 25 /100.000. A região sul continuou apresentando a maior taxa, sendo em média 31/100.000 habitantes, a região Sudeste 20/100.000, a região Centro-Oeste 19/100.000 e a região Nordeste com 15/100.000 habitantes, neste mesmo

período. Dentre os estados, as maiores taxas de detecção de casos de aids foram no Rio Grande do Sul (41), Santa Catarina (33), Amazonas (30) e Rio de Janeiro (28) /100.000 habitantes <sup>6,7</sup>. A região Sudeste foi a única que apresentou uma tendência de queda nos últimos dez anos, no qual em 2005, a taxa de detecção foi de 25,3, passando para 18,6 casos a cada 100 mil habitantes em 2014, correspondendo a uma queda de 26,5% <sup>6</sup>. No período de 2004 a 2008, a razão de sexos, expressa pela relação entre o número de casos de aids em homens e mulheres, era de 15 casos em homens para cada 10 casos em mulheres. Em 2014, essa razão passou a ser de 19 casos de aids em homens para cada 10 casos em mulheres <sup>6</sup>.

Atualmente estima-se que 781 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV-1 e destas 648 mil já diagnosticadas, das quais 405 mil pessoas estejam em terapia antirretroviral (TARV) <sup>7</sup>. Em 2012, o ponto de corte para o início do tratamento era de 500 células (linfócitos T CD4<sup>+</sup>) por mm<sup>3</sup>, em 2013, a indicação à TARV foi estabelecida para todas as pessoas infectadas pelo HIV, independentemente de seu estado imunológico, essa medida do Ministério da Saúde teve como objetivo diminuir a morbidade e a transmissão do HIV-1 <sup>8</sup>.

A Declaração de Paris lançada pela UnaidS também repercutiu no Brasil, as primeiras cidades brasileiras a assinarem a Declaração, em dezembro de 2014, foram Curitiba, Salvador e Rio de Janeiro. As demais adesões aconteceram em 2015: Tabatinga, Atalaia do Norte e Benjamin Constant (AM), além de São Paulo (SP), Manaus (AM), Porto Alegre (RS) e outros 13 municípios do Rio Grande do Sul, incluindo o próprio governo do estado e o Distrito Federal. Todos com o mesmo objetivo: alcançar as metas de tratamento 90-90-90 até 2020 e eliminar a epidemia de AIDS de seus municípios até 2030 (<http://unaidS.org.br/2016/03/brasil-discute-aportes-a-relatorio-global-do-unaidS-e-reuniao-de-alto-nivel-sobre-hiv-aids/>).



Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

**Figura 3: Taxa de detecção de aids (por 100 mil habitantes) segundo região de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 2005 a 2014.**

Fonte: Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, (2015) <sup>6</sup>.

## 1.2 Epidemiologia Molecular do HIV

Desde sua origem em Camarões na África, há mais de 100 anos atrás, o HIV-1 pandêmico tem continuamente adquirido diversificação genética e disseminado com o aumento da globalização <sup>9,10</sup>. O surgimento do HIV derivou de eventos independentes de transmissões zoonóticas do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) de primatas não humanos para humanos que deram origem aos tipos HIV-1 (grupos: M, N, O e P) e HIV-2 (grupos A a H).

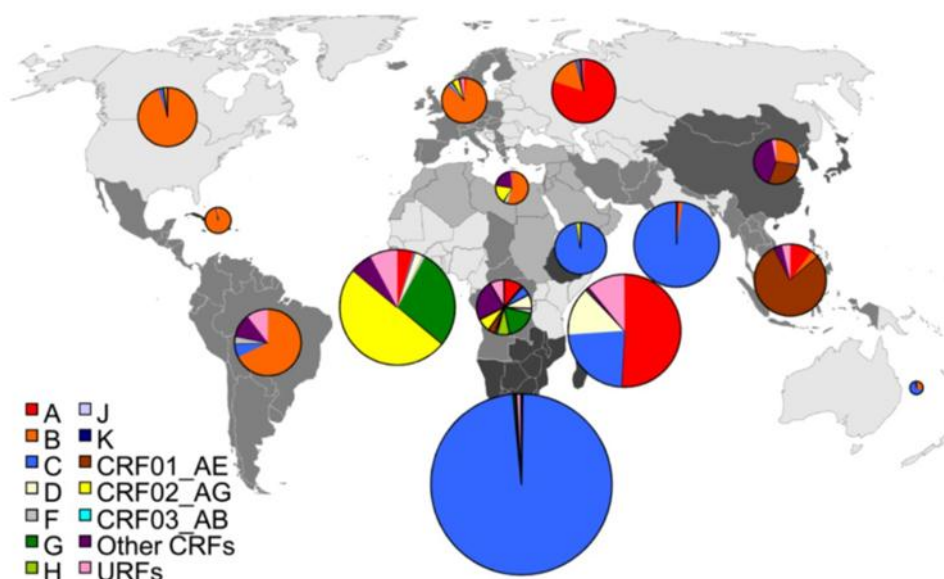
Mundialmente, a maioria das infecções são causadas pelo HIV-1 do grupo M que é subdividido em nove subtipos A-D, F-H, J e K, sub-subtipos (A1 - A4 e F1, F2) e em diferentes formas recombinantes circulantes (CRF) ou únicas (URF) <sup>11</sup>, atualmente, já foram identificados mais de 70 CRFs <sup>12</sup>.

Em relação à distribuição global desses subtipos encontramos o subtipo C representando metade das infecções, seguido pelo subtipo A (12%), subtipo B (11%), CRF02\_AG (8%), CRF01\_AE (5%), subtipo G (5%) e subtipo D (2%). Os outros subtipos como F, H, J, K e todos outros CRFs representam cerca de 5% das infecções no mundo <sup>13</sup>. Na figura 4, podemos observar que o subtipo C

é dominante na África do Sul, na Índia e na Etiópia. O Subtipo A é encontrado principalmente na África Oriental, na Europa Oriental e Ásia Central.

A epidemia do subtipo B é mais amplamente distribuída mundialmente e de acordo com a figura 4 pode ser detectada em mais de 7 regiões. O CRF02\_AG é o quarto mais prevalente e está concentrado na África Ocidental, com números menores na África Central, no Oriente Médio e Norte da África. O CRF01\_AE apresenta a quinta maior prevalência e é encontrado no sul e sudeste da Ásia, extremo Oriente e um pequeno número na África Central <sup>11</sup>. O subtipo F1 tem uma distribuição com baixa frequência, cerca de 0,6%, sendo detectado na Romênia, principalmente entre usuários de drogas injetáveis <sup>14</sup>. Além do Brasil, este subtipo também é encontrado na Grécia e região da Galícia (noroeste da Espanha), onde é disseminado principalmente por transmissão entre homens que fazem sexo com homens (HSH)<sup>15</sup>, sendo que este vírus disseminado na Galícia foi relacionado filogeneticamente com o do Brasil.

Vários fatores evidenciam que a distribuição mundial dos subtipos do HIV-1 é complexa e heterogênea, como o aumento da mobilidade da população devido à globalização e imigração, juntamente com diferenças de "fitness" e as taxas de transmissão dos subtipos. Existem relatos que alguns subtipos do HIV-1 possuem vantagens na transmissão <sup>16,17</sup>, outros estudos têm associado infecções pelo HIV-1 subtipo B com uma maior transmissão entre HSH <sup>18</sup>, na África do Sul e na Índia as epidemias heterossexuais são quase que exclusivamente causada pelo HIV-1 subtipo C <sup>19</sup>.



**Figura 4: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes circulantes baseado em dados compilados do período de 2000-2007.**

Fonte: Hemelaar, *et al.*, 2011<sup>11</sup>.

### 1.2.1 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil

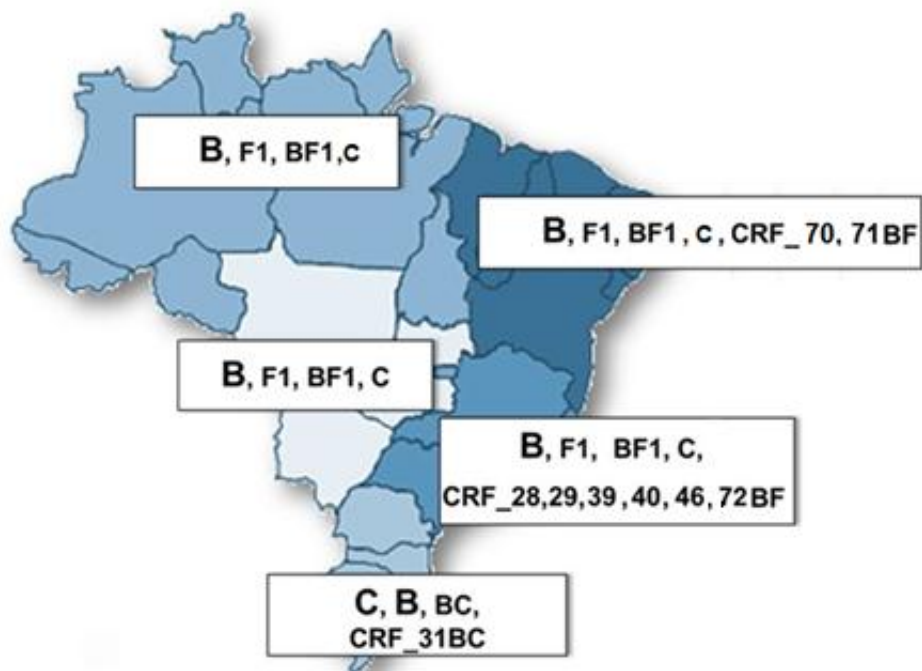
A epidemia do HIV-1 no Brasil tem como prevalente o subtipo B, seguido de frequências mais baixas para o subtipo C e sub-subtipo F1 (denominado neste estudo apenas como subtipo F1). Além destes subtipos puros, ainda podem ser detectadas formas recombinantes envolvendo estes subtipos<sup>20-24</sup> (figura 5). A exceção é a região Sul onde há maior circulação do subtipo C, sendo este prevalente em Santa Catarina, já no Rio Grande do Sul ele cocircula em proporção similar ao subtipo B, sendo presente em menor circulação que o subtipo B apenas no Paraná<sup>25</sup>. O subtipo C teve sua introdução no Brasil estimada entre as décadas de 1960 e 1970 no estado do Paraná (PR)<sup>26,27</sup>, no mesmo período também foi observada a introdução do HIV-1 subtipo B que provavelmente partiu dos Estados Unidos<sup>28</sup> e por fim o subtipo F1 que teve sua introdução mais tardia, entre as décadas de 70 e 80, oriundo da África Central<sup>28</sup>.

Na Região Sudeste, o subtipo B é prevalente (63-84%), seguido pelo subtipo F1 (9-17%), recombinantes BF (5-11%). O subtipo C representa uma menor porcentagem (~3%), nesta região<sup>23,29-31</sup>. Adicionalmente, também foram descritos um maior número de recombinantes, sendo os CRFs: CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF\_39BF, CRF\_40, CRF\_46 e CRF\_72BF<sup>32-36</sup>. Na região



Nordeste, o subtipo B também é o mais prevalente (77-91%), seguido por recombinantes BF1 (3-21%) e pelo subtipo F1 (0,5-5%)<sup>37-39</sup>. Na região Centro-Oeste o subtipo B possui uma frequência de 70 a 90%, os recombinantes BF apresentam frequência de 10% e o subtipo F1 e C representam menos de 2% dos casos de infecção pelo HIV-1<sup>40,41</sup>. Na região Norte, o subtipo B também é o mais prevalente (88%), seguido pelo subtipo F1 (8-9%) e recombinantes BF (3%)<sup>42</sup>, com poucos casos de infecção pelo subtipo C, similar a região Centro Oeste.

Na figura 5, fica evidente a presença dos subtipos B, C e F1, porém, no Brasil, também foi descrita uma variante do subtipo B, denominada B/Bbr, essa possui o motivo GWGR no topo da alça V3 do envelope viral, que a difere do subtipo B pandêmico (GPGR), o qual possui uma prolina (P) ao invés do triptofano (W). Essa variante foi detectada por apresentar distinta imunogenicidade<sup>43</sup> e no mesmo ano, Morgado *et. al.*, (1994) descreveram essa alteração no envelope viral<sup>21</sup>. Em 2010, a variante B/Bbr encontrava-se presente em 30% dos isolados virais do subtipo B, no Rio de Janeiro<sup>23</sup>, em 2013 essa variante foi detectada em torno de 20 a 28% na região Sul do país<sup>44</sup> e também foram detectados casos esporádicos em outros países, como Cuba<sup>45</sup>. Devido a existência de poucos dados na literatura sobre a epidemiologia molecular desta variante realizamos uma busca pelo motivo GWGR no gene *env*, utilizando as sequências de HIV-1 depositadas na base de dados de Los Alamos. Nesta busca foram detectadas 61 sequências (1 sequência/paciente), destas 48 (79%) eram provenientes do Brasil, as restantes estavam distribuídas entre Estados Unidos, Espanha, Japão, Argentina, África do Sul e China. O que reforça a importância de estudos desta variante do HIV-1, no Brasil.



**Figura 5: Distribuição dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes circulantes, no Brasil** <sup>32,34,36,46</sup>.

### 1.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1

Em 1983, foi publicado um estudo descrevendo a hiperativação e a disfunção de células B e T em indivíduos com uma síndrome caracterizada pelo desenvolvimento de infecções raras ou neoplasias em jovens previamente saudáveis e em usuários de drogas intravenosas <sup>47</sup>. No mesmo ano, a ligação etiológica entre um retrovírus e a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) foi estabelecida <sup>48</sup>.

A observação da disfunção das células do sistema imune durante a doença define a imunopatogênese induzida pelo HIV-1 e considera-se como uma das principais características a depleção de células T CD4<sup>+</sup>. Essa depleção foi descrita como um processo gradual que gera o desenvolvimento da aids nos indivíduos infectados pelo HIV-1, geralmente 10 anos após a infecção. Essa infecção é gerada por vias de transmissão, sendo as principais : relação sexual desprotegida, contaminação por sangue ou hemoderivados e a transmissão de mãe para filho durante o parto <sup>49</sup>.

As proteínas do envelope (Env) no HIV desempenham um papel importante no processo de entrada do vírus na célula hospedeira, principalmente as células T *helper*, macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans e células microgliais. A gp120 interage com o receptor celular CD4 e com os receptores de quimiocina, sendo na maior parte das vezes o CXCR4 e/ou CCR5<sup>50</sup>. As linhagens do HIV-1 podem ser divididas em dois grupos de acordo com a preferência de utilização dos correceptores para a entrada do vírus na célula hospedeira. O HIV-1 CCR5-trópico interage com o receptor CD4 e CCR5, infectando células T CD4 CCR5<sup>+</sup> e macrófagos. Da mesma forma, o vírus CXCR4-trópico interage com o receptor CD4 e CXCR4, infectando as células T CD4 CXCR4<sup>+</sup><sup>50</sup>. Além disso, existem as linhagens duo-trópico que são capazes de utilizar tanto CCR5 quanto CXCR4 para a entrada do vírus na célula<sup>51</sup>. O HIV-1 R5-trópico predomina durante as fases iniciais da infecção e os vírus X4-trópicos surgem em estágios mais avançados e geralmente estão associadas ao declínio das células T CD4<sup>+</sup>, acarretando a progressão para aids<sup>51</sup>.

Recentemente, Li-Chung *et. al.*, (2016) demonstraram que interação do CCR5, com uma população de vírus mais diversificada (incluindo vírus duo-trópicos), acelera a depleção de células T CD4<sup>+</sup> induzida por Env<sup>52</sup>. Esse efeito de depleção foi observado em células *bystander* (células próximas) que expressam CCR5 na superfície, desta forma aumentando a depleção por apoptose induzida por Env<sup>53,54</sup> e favorecendo a mudança do tropismo viral.

Além da depleção de células T, estudos demonstraram que indivíduos infectados pelo HIV-1 possuem uma maior proliferação de células T do que em indivíduos não infectados<sup>55</sup>. Esse fato ocorre provavelmente, a fim de manter a homeostase entre morte e divisão celular o que conseqüentemente leva a uma exaustão do sistema imune<sup>56</sup>.

Atualmente, o conceito de patogênese da aids é caracterizado por uma ativação imune crônica, inflamação e aumento do estresse oxidativo celular<sup>57-61</sup>. Cada célula possui funções específicas na resposta imune ao HIV e, na maioria das vezes, suas funções tornam-se alteradas como influência direta e/ou indireta do vírus. Em relação aos linfócitos B também estão sendo evidenciadas certas alterações.

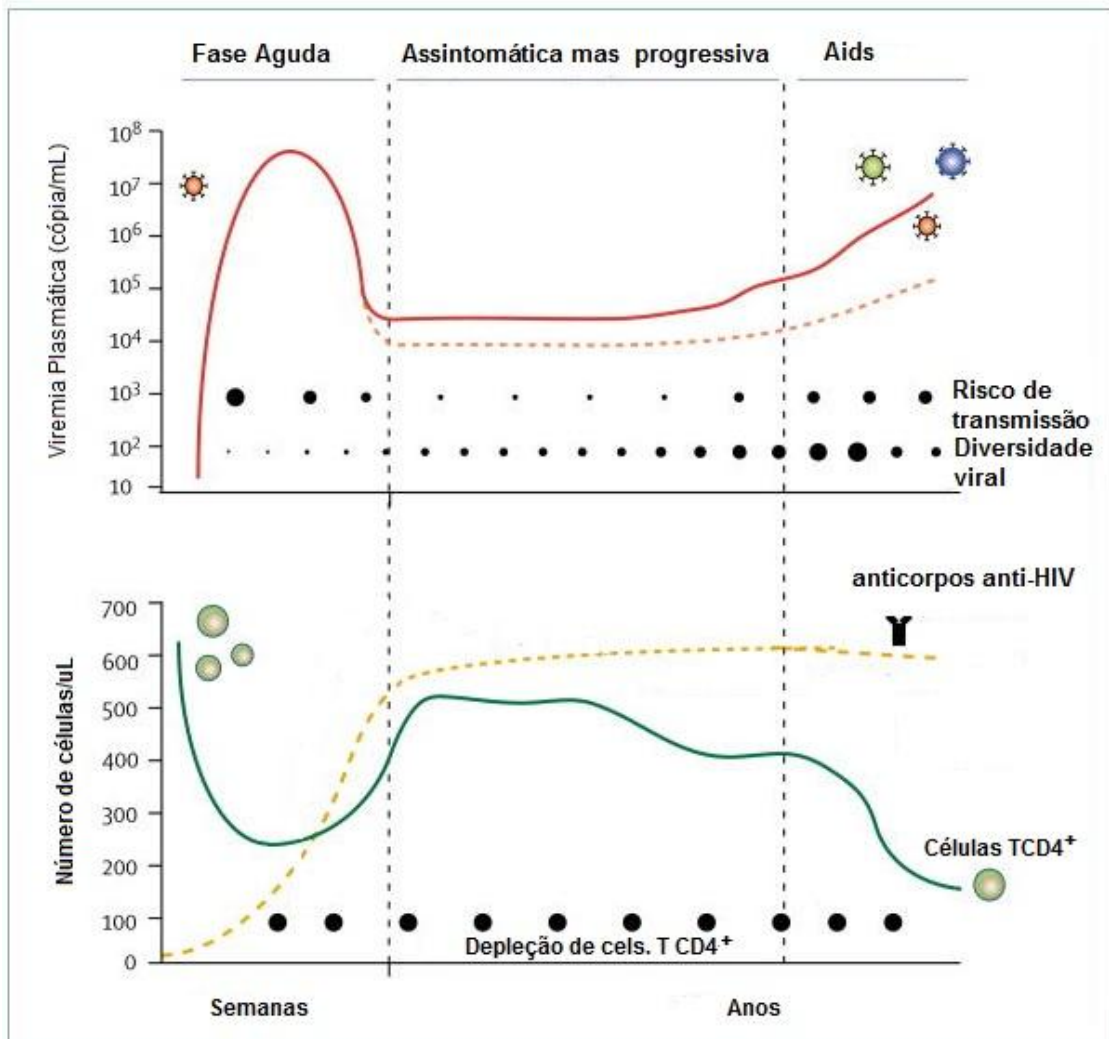
Visto que a principal função dos linfócitos B é a produção de anticorpos, qualquer disfunção com estas células afeta diretamente a resposta protetora contra vários patógenos. Os linfócitos B originam-se na medula óssea e desenvolvem-se por processos de maturação através de rearranjos randômicos dos segmentos gênicos (VDJ), culminando com a expressão do receptor de células B (BCR) IgM na superfície celular<sup>62</sup>. As células B imaturas seguem para o baço onde diferenciam-se em células imaturas de transição e são guiadas pela expressão de fatores de transcrição para se tornarem células B maduras (da zona marginal ou foliculares). As células B foliculares recirculam povoando outros tecidos linfoides secundários: linfonodos, tonsilas e as placas de Peyer no tecido linfático associado ao intestino (GALT) <sup>63</sup>. Em indivíduos saudáveis, a maioria das células B no sangue periférico, ou são células B em repouso ou células B de memória que expressam ou não isotipos de anticorpos (IgG, IgE, IgA, ou IgM e IgD). Em indivíduos infectados pelo HIV-1, além da aumentada presença de imunoglobulinas no sangue, várias subpopulações adicionais de células B são encontradas, estas incluem células imatura de transição, células B de memória em exaustão, células B maduras e plasmoblastos, evidenciando uma disfunção imune <sup>64,65</sup>. Existem relatos de que a expansão de células imaturas de transição estaria associada a linfopenia de células T <sup>66</sup> e que as células B de memória estariam reduzidas durante a infecção pelo HIV-1 <sup>67</sup>, assim como as células B maduras e plasmoblastos estariam associados a alta virêmia <sup>68</sup>.

Com estas observações podemos concluir que a patogênese da aids não está completamente elucidada e que envolve uma interação mais complexa entre o sistema imune do hospedeiro e os efeitos diretos e indiretos da replicação viral.

#### **1.4 História natural da infecção pelo HIV**

Logo após a infecção pelo HIV, ainda no período denominado de fase aguda, o indivíduo apresenta sintomas inespecíficos similares aos da gripe, nessa fase observa-se uma elevada virêmia plasmática e queda acentuada de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no sangue periférico. Nesta fase também existe um maior risco de transmissão do vírus e o surgimento de uma resposta específica que é

seguida da queda da virêmia plasmática. Durante a fase crônica, apesar da frequente ausência de sintomas, a replicação do HIV-1 é dinâmica ao longo da doença. A meia-vida do vírus é tão curta que metade de toda a população do vírus no plasma é substituída em menos de 30 minutos e o número total de partículas virais produzidas numa pessoa infectada cronicamente pode chegar a mais de  $9.3 \log^{10}$  por dia <sup>69</sup>. A fase crônica inicia com a queda virêmica associada a um aumento parcial no número de células T CD4<sup>+</sup>, essa fase é também denominada de fase de latência clínica e é bastante variável entre os indivíduos. A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV (aproximadamente 70%), pode ser denominada de progressores típicos, nestes o tempo mediano do aparecimento dos sintomas clínicos é entre 8 e 10 anos após a infecção o que culmina com o aparecimento de doenças oportunistas, caracterizando a fase de aids (figura 6) e apenas cerca de 10% dos indivíduos, conhecidos como progressores rápidos, desenvolvem a aids no prazo de até 4 anos <sup>70</sup>.



**Figura 6: História natural da infecção pelo HIV-1.**  
Adaptado de Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. (2006) <sup>71</sup>.

Com a ampliação tecnológica, testes mais sensíveis de detecção e quantificação da carga viral surgiram, assim foi possível observar que uma parcela dos pacientes era capaz de manter a carga viral em níveis baixos ou indetectáveis sem uso de TARV. Esses indivíduos que possuem uma resistência natural ao desenvolvimento da doença são conhecidos como não progressores de longo tempo (LTNP), correspondendo de 5 a 7% dos indivíduos infectados pelo HIV-1. Os indivíduos LTNP foram identificados por não progredirem para aids mesmo após 10 anos de infecção, mantendo a contagem de células T CD4<sup>+</sup> acima de 500 células /  $\mu\text{L}$  <sup>72,73</sup>. Alguns indivíduos ainda podem ser classificados em controladores de acordo com os níveis de carga viral. Os controladores virêmicos (VC) são capazes de manter a carga viral abaixo de 2000 cópias de

RNA / mL, e os controladores de elite (EC) são capazes de manter a carga viral indetectável, representando menos de 1% dos indivíduos infectados pelo HIV-1<sup>74,75</sup>. Os mecanismos de controle dos EC permanecem obscuros, atualmente acredita-se que a resposta do hospedeiro, incluindo a resposta imune específica de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup><sup>76</sup>, bem como os alelos de HLA de classe I<sup>77</sup>, sejam o principal mecanismos de controle, ao invés de uma infecção defectiva, como era especulado inicialmente. Alguns estudos em relação à capacidade replicativa dos vírus isolados de controladores, mostraram que a replicação, em cultura de células, neste grupo era similar ao grupo de progressão típica<sup>78,79</sup>. Atualmente, os principais aspectos estudados em relação aos controladores são: a regulação de quimiocinas e citocinas dentro da imunidade inata; no aspecto genético são os haplótipos HLA (como HLA-B\*5701) e mutações nos genes CCR5 e CCR2; na imunidade adquirida: a atividade citotóxica de células T, função celular de células T *helper* e anticorpos neutralizantes (nAb)<sup>80-84</sup>.

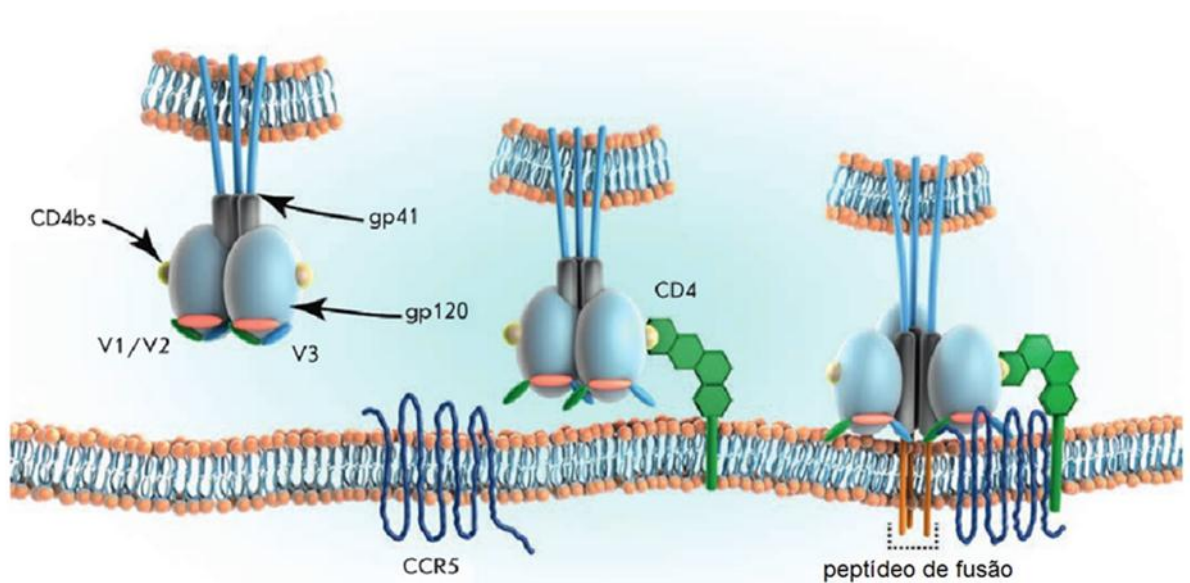
## 1.5 Estrutura e Infecção viral

O HIV-1 é membro da família *Retroviridae* do gênero Lentivirus, seu material genético é composto por RNA e pela transcriptase reversa. Cada partícula viral possui duas cópias de RNA, uma delas é retrotranscrita em cDNA, pela ação da enzima transcriptase reversa, e então integrado ao genoma, pela ação da integrase e por fim, denominado de provírus. O provírus serve como molde para a produção da sua progênie viral utilizando a maquinaria de transcrição do hospedeiro, ou pode entrar em latência, principalmente quando infecta células T em repouso<sup>85</sup>.

Para entrada do vírus na célula há o reconhecimento das espículas na superfície do envelope viral (Env), iniciando o processo de infecção. Cada espícula de Env é composta por um trímero de glicoproteínas idênticas, onde cada proteína possui duas subunidades (gp120 e gp41) que são clivadas pela furina no complexo de Golgi e associadas (não-covalentemente) após a tradução<sup>86</sup>.

A gp120 é dividida estruturalmente em dois domínios, um domínio interno e um domínio externo que são interligados por moléculas em conformação beta

pregueada. A gp120 é responsável pelo reconhecimento de sítios no receptor CD4bs (CD4 *binding site*) e correceptores (CCR5 ou CXCR4) e a gp41 medeia a fusão entre o vírus e a célula hospedeira <sup>87,88</sup>. Devido ao processo de fusão, a gp41 possui subunidades mais conservadas e complexas estruturalmente, pois possui partes móveis que se submetem a rearranjos conformacionais durante o processo de fusão (figura 7). A região externa da gp41 e próxima a membrana (MPER) conecta o ectodomínio com o domínio transmembranar seguido da cauda citoplasmática <sup>89</sup>.

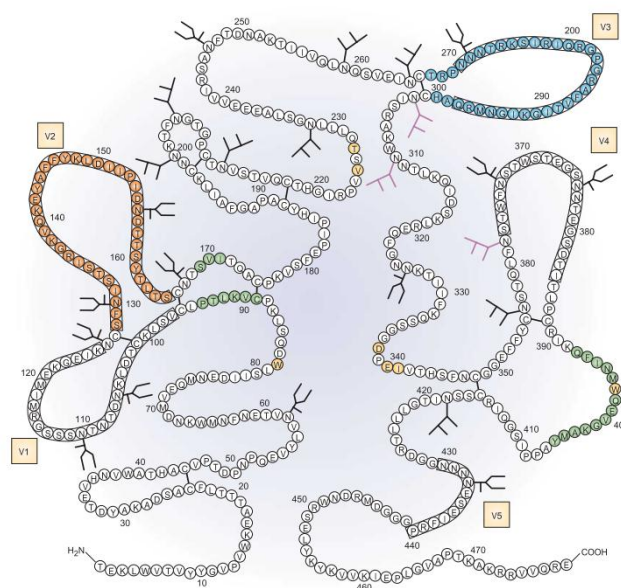


**Figura 7: Ilustração do trímero das glicoproteínas do envelope em interação com CD4, alterando os rearranjos conformacionais de V1/V2 e V3 e desmascarando o sítio de ligação do CCR5 anteriormente oculto.**

Observa-se também a conexão do peptídeo de fusão da gp41 na membrana plasmática após interação com CCR5, que acarretará a fusão membranar e consequentemente a entrada do vírus na célula. Adaptado de Shcherbakov *et. al.*, (2015) <sup>90</sup>.



A capacidade do HIV-1 em acumular mutações aumenta a variabilidade viral, contudo os domínios de ligação com CD4 e CCR5/CXCR4 são conservados. A gp120 possui cinco regiões conservadas (C1-C5) que são intercaladas com 5 regiões variáveis (V1-V5) <sup>91</sup> (figura 8). As regiões variáveis são expostas na forma de alças (*loops*) que são ancoradas em suas bases por pontes de sulfetos envolvendo duas cisteínas. A terceira alça variável (V3) da gp120 possui 35 aminoácidos (aa) e interage com os correceptores CCR5 ou CXCR4 e é um importante alvo de anticorpos neutralizantes (nAb) <sup>91</sup>.



**Figura 8: Representação da estrutura secundária da glicoproteína gp120 do envelope viral.**

As caixas da cor laranja indicam a posição das regiões variáveis (V1-V5) com relação a sequência de referência HXB2. Os sítios de glicosilação estão indicados com braços em formato similar as letras “U ou F”. Os principais epítopos que induzem anticorpos neutralizantes estão demarcados por cores. Fonte: Zolla-Pazner, 2004 <sup>91</sup>

Em geral as alças das regiões variáveis cobrem as regiões constantes o que facilita a oclusão de regiões que poderiam ser acessadas pelos nAb. Outros fatores associados à dinâmica do escape viral são as inserções, deleções ou substituições de aminoácidos nas regiões variáveis, o que acarreta alterações estruturais devido a modificações no comprimento das alças da gp120 e nas posições e quantidades de sítios de glicosilação (PNLG) <sup>92</sup>.

Aproximadamente 25 sítios de glicosilação são encontrados na superfície da gp120, enquanto que a gp41 é menor e menos glicosilada, possuindo em média quatro potenciais sítios de glicosilação nas asparaginas <sup>93</sup>. A quantidade

e as posições dos glicanos evoluem de forma a criar um escudo que muda continuamente sobre a superfície do envelope de forma a proteger determinadas regiões da neutralização por anticorpos desempenhando um importante papel na resistência aos nAb<sup>94-96</sup>. Contudo, estes carboidratos também acabam promovendo um novo código de diversidade e são reconhecidos por receptores celulares como o BCR e anticorpos neutralizantes glicano-específico como o 2G12 ou anticorpos dependentes de sítios de glicosilação como os descritos na região V3 (N332) e V1/V2 (N160)<sup>97</sup>.

## 1.6 Anticorpos no contexto do HIV-1

Os anticorpos têm como principais atividades, a capacidade de ligação às proteínas do envelope viral e desse modo bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras, ou induzir a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC). Este último é mediado através das regiões Fc das imunoglobulinas G1 (IgG1) ou IgG3 reconhecidas pelos receptores Fc das células do sistema imune inato, levando à fagocitose de células infectadas por opsonização, e a ativação da via clássica do complemento<sup>98,99</sup>.

Neste trabalho o enfoque principal será dado em relação a resposta humoral frente às proteínas do envelope. Desta forma a resposta de anticorpos pode ser dividida em três grupos. No primeiro a resposta de anticorpos que não neutralizam o vírus, mesmo tendo uma sequência de proteína Env idêntica à do antígeno imunizante, onde tais anticorpos ligam-se aos epítomos de Env mas não são capazes de impedir a infecção, ou em glicoproteínas Env defeituosas, contudo, estas sequências competem na indução dos anticorpos neutralizantes gerando respostas ineficientes<sup>100</sup>.

O segundo grupo engloba os anticorpos neutralizantes capazes de neutralizar especificamente a própria linhagem viral (resposta autóloga), essa resposta surge relativamente cedo na infecção, tende a ser imunodominante<sup>101,102</sup>.

O terceiro grupo é representado pelos anticorpos neutralizantes heterólogos, a indução desse tipo de resposta geralmente apresenta alta potência e amplitude, sendo detectados após 2 anos de infecção. A indução

desse tipo de anticorpo é o objetivo para uma vacina anti-HIV-1 com capacidade de proteger contra a diversidade global do HIV-1 <sup>103-105</sup>.

Em relação a estes anticorpos neutralizantes potentes com amplitude de resposta, recentemente novos anticorpos monoclonais foram descritos e foram estabelecidos cinco principais sítios de vulnerabilidade no envelope viral, sendo estes (figura 9):

1) região CD4bs (CD4 *binding site*): nesta região os principais anticorpos monoclonais (mAb) que inibem a infecção viral são o b12, VRC01, NIH45-46, 3BNC117 e também o inibidor recombinante CD4 solúvel (sCD4) <sup>107-110</sup>. Eles interagem bloqueando a ligação da gp120 com o receptor CD4 na célula hospedeira. Recentemente, foi possível a identificação de novos anticorpos que possuem características como o elevado nível de mutações somáticas nas regiões variáveis da cadeia pesada, sendo que nesta categoria encontram-se os nAb VRC01 e 3BNC117 <sup>111,112</sup>. Também é de particular interesse o anticorpo NIH45-46, pois este possui potência e amplitude excepcional, dados cristalográficos da estrutura do NIH45-46 ligado à gp120 revelaram que uma substituição de glicina para o triptofano na posição 54 do anticorpo é suficiente para aumentar a interação, permitindo que este anticorpo passasse a exibir uma potência 10 vezes maior do que a do VCR01, demonstrando que a posição e tipo de aminoácidos interfere na afinidade do anticorpo <sup>108</sup>.

2) o sítio de glicosilação N160: para esta região os principais anticorpos monoclonais descritos compreendem o PG9, PG16 e CH01 a 04 <sup>113-115</sup>, a glicosilação da asparagina na posição 156 e 160 pode afetar a interação dos anticorpos PG9 e PG16 com a gp120, eles envolvem tanto sítios de N-glicosilação como aminoácidos da gp120 (V2 e V3) <sup>116</sup>. Os anticorpos CH01 a 04 possuem um longo domínio na região determinante de complementaridade 3 da cadeia pesada (CDR-H3) o que permite a penetração e a interação entre os glicanos com uma maior afinidade pela gp120 <sup>115</sup>.

3) região externa próxima a membrana (MPER): situa-se na gp41, contra a qual já foram descritos os mAb 2F5, 4E10 e 10E8 <sup>117-119</sup>, estes possuem conformação linear. O 2F5 interage com a sequência conservada ELDKWA, o anticorpo 4E10 reconhece um epítipo NWF(D/N)IT localizado próximo ao epítipo do 2F5. Estudos de transferência passiva mostraram que esses

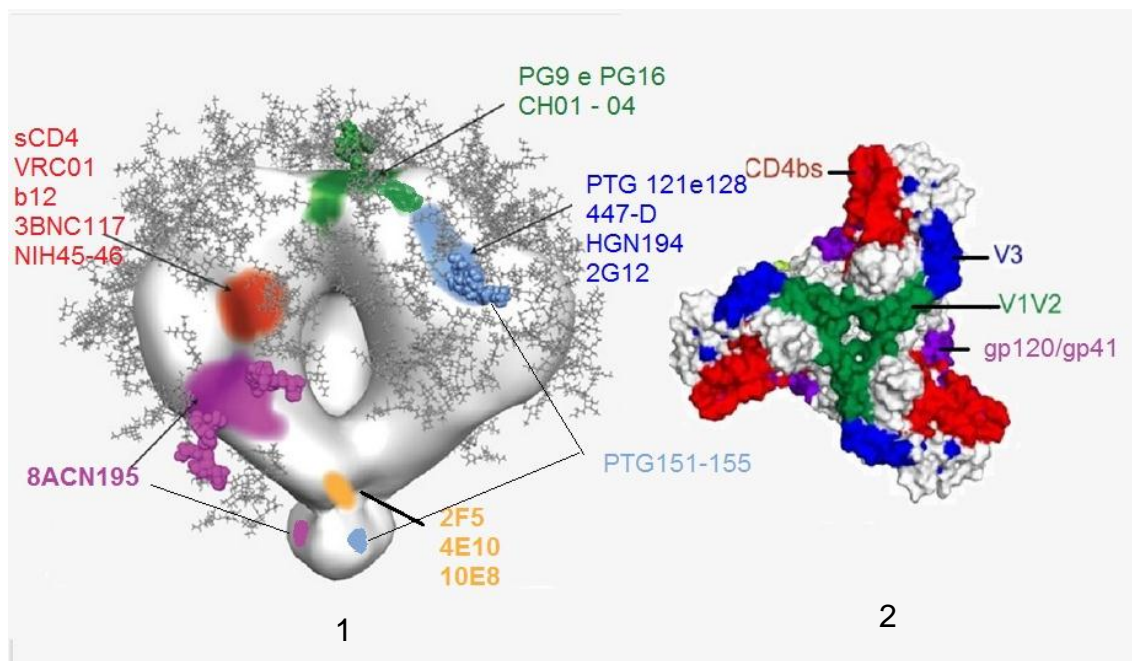
anticorpos podem promover proteção em macacos desafiados com o HIV-1<sup>120,121</sup>. O anticorpo 10E8 diferentemente dos outros anticorpos não possui reatividade contra fosfolipídios. Huang *et. al.*, (2012)<sup>122</sup> relataram que este anticorpo foi capaz de neutralizar 98% dos vírus testados demonstrando ser um importante alvo MPER não-auto reativo<sup>122</sup>.

4) interface gp120 e gp41 (PTG151-155 e 8ANC195). Falkowska *et. al.*, (2015)<sup>123</sup> identificaram que o anticorpo PTG151 reconhecia um epítipo glicano-dependente na gp41. Através de mutagênese foi verificado que a troca da asparagina 611 por uma alanina revertia o efeito neutralizante do anticorpo e outras trocas na gp120 (N230, N241, N276, N448) também comprovaram uma correlação com a diminuição da efetividade do anticorpo<sup>124</sup>, evidenciando que essa classe de anticorpos conectava a interface gp120 / gp41. Essa interação do anticorpo com as duas subunidades do envelope também foi verificada recentemente para o anticorpo 8ANC195<sup>125</sup>.

5) alça V3, nessa categoria encontram-se os anticorpos: 2G12, HGN194, PTG 121 e 128, 447-52D<sup>126-130</sup>. O anticorpo HGN194 foi isolado de células B de memória de um indivíduo LTNP infectado pelo HIV-1 CRF\_AG e reconhece a alça V3 em sua conformação<sup>128</sup>. O anticorpo 2G12, requer apenas o reconhecimento de glicanos, próximo a alça V3, nas posições N295, N332, N339, N392, assim foi classificado como anti-V3 glicano-específico<sup>97</sup>. O anticorpo 447-52D reconhece o motivo GPGR no *loop* da alça V3<sup>131</sup>.

A alça V3 foi originalmente descrita como sendo o principal domínio de neutralização do HIV1<sup>132</sup>, adicionalmente, dados posteriores mostraram que a potência de neutralização dos anticorpos anti-V3 também dependiam do vírus testados, ou seja, de seus domínios nesta região<sup>133</sup>. Sabe-se que para a sua sobrevivência o HIV-1 mantém a alça V3 oclusa, assim protegida dos anticorpos anti-V3, esta conformação torna-se acessível apenas quando ocorre a ligação de CD4 a gp120. Assim, gp120, como a maioria das proteínas, é conformacionalmente dinâmica, da mesma forma, a região V3 da gp120 oscila entre oclusão e acessibilidade<sup>134</sup>, como demonstrado anteriormente na figura 7. Dados recentes indicam que o V3 participa do domínio de associação ao trímero (*trimer-associating domain*), uma vez que o V3 encontra-se em um arcabouço delimitado pelo *loop* V1V2 e pela estrutura V1V2 no núcleo gp120 participando

deste protômero e do protômero vizinho <sup>135,136</sup>. Desta forma mudanças únicas de aminoácidos na gp120 podem tornar o vírus sensível à neutralização. Assim, recentemente Zolla *et al.*, 2015 sugeriram algumas interações moleculares que expõe o *loop* V3 a partir do seu arcabouço, mostrando que essas alterações estruturais do vírus poderiam torná-los sensíveis aos anticorpos anti-V3 <sup>136</sup>.



**Figura 9: Principais sítios em Env para a interação com os anticorpos neutralizantes.**

Podemos observar nesta imagem da estrutura da gp 120 na vista lateral (1) e na vista superior (2). Na vista lateral encontra-se indicado a localização de ligação dos principais anticorpos neutralizantes. Na vista superior observa-se a região CD4 *binding site* em vermelho, a região V3 em azul, a região V1/V2 em verde, a interface gp120/gp41 em roxo e a região de interação da gp41 em amarelo.

### 1.7 Sequências consenso e ensaio de neutralização

Diante da grande variabilidade genética do HIV-1, diferentes estratégias têm sido avaliadas com objetivo de diminuir este impacto na efetividade de uma vacina. Entre essas estratégias, encontram-se o uso de vacinas de DNA recombinante com sequências consensos <sup>137</sup>, mosaicos <sup>138,139</sup> e sequências conservadas do HIV-1 <sup>140</sup>. As sequências consensos são sequências desenhadas com base na frequência de aminoácidos em cada posição de um alinhamento dentre um grupo de sequências, com o intuito de reduzir a distância genética entre o imunógeno e os vírus circulantes. Foi observado em alguns

estudos <sup>141,142</sup> que as sequências consenso apresentavam aproximadamente metade da distância genética quando comparada com as sequências contemporâneas, diante desse conceito supõem-se que o consenso poderia estimular uma resposta imune com reatividade cruzada maior do que imunógenos provenientes de um único isolado viral.

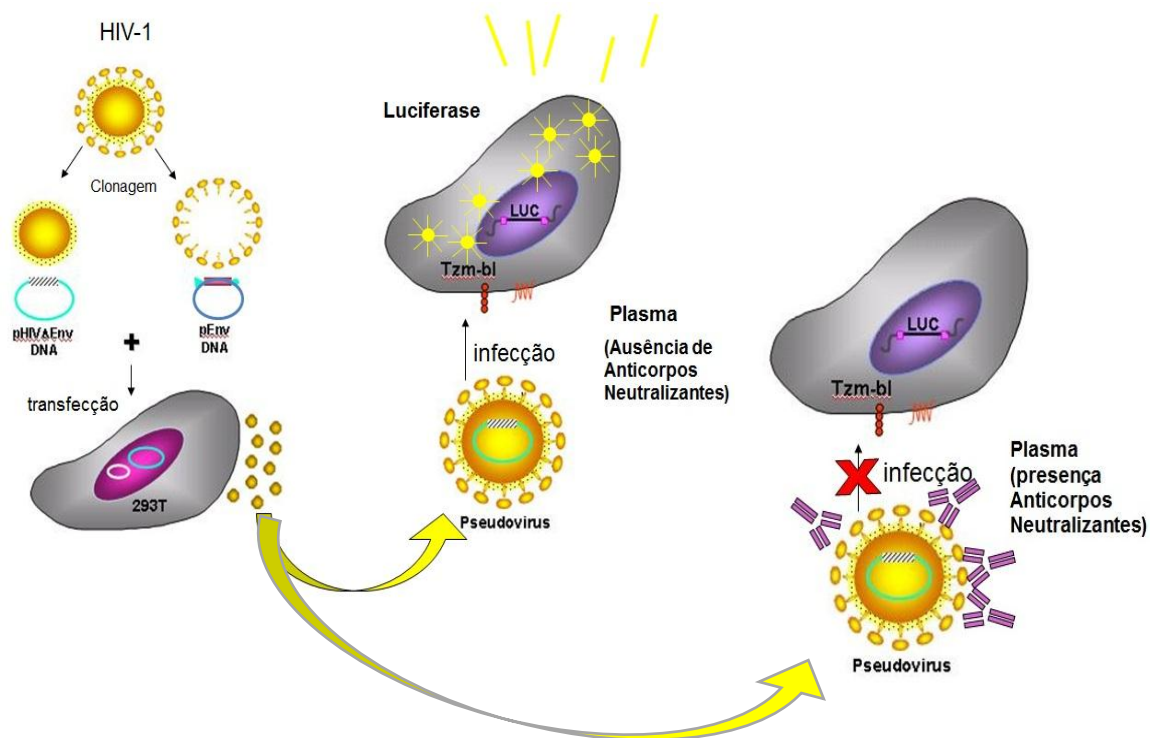
Hulot *et. al.*, (2015) <sup>143</sup> compararam a imunogenicidade de formulações vacinais em macacos rhesus, sendo uma formulação possuindo uma sequência do gene *env* isolada de infecção recente do HIV-1 subtipo B, um consenso de *env* do grupo M (Con-S), e um mosaico de *env*. Ambos os imunógenos, consenso e mosaico induziram significativamente mais IFN- $\gamma$ . A imunização com estas sequências, particularmente Con-S, induziu anticorpos neutralizantes mais potentes que a imunização com o vírus de infecção recente. Tanto a análise da resposta neutralizante e dados de resposta celular demonstraram a efetividade dos imunógenos consensus, reforçando o conceito do uso de imunógenos projetados para estratégias globais de desenvolvimento de vacina contra o HIV-1.

No contexto do desenho de reagentes (pseudovírus) para avaliação da indução de anticorpos por antígenos vacinais, espera-se que os reagentes baseados em sequências consensus sejam mais eficazes em detectar se a resposta imune é ampla <sup>144</sup>. Desta forma, a avaliação consiste em observar se o indivíduo adquiriu anticorpos contra o subtipo prevalente na região de residência e não apenas contra algumas linhagens vacinais ou isolados primários.

As técnicas para a avaliação dos ensaios vacinais até pouco tempo atrás possuíam pouca reprodutibilidade. Dentre os ensaios de avaliação da resposta imune mediada por anticorpos, o ensaio de neutralização que utiliza células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi amplamente utilizado, sua principal característica era fornecer condições “naturais” de infecção. Contudo, estes tinham como limitações a sua baixa reprodutibilidade, uma vez que cada ensaio utilizava PBMC de doadores distintos, o que impactava na presença diferenciada também dos receptores destas células (de acordo com o doador) além disso, isolados virais utilizados neste teste, em geral, são linhagens adaptadas à células T (TCLA) como HIV-1IIIB e HIV-1MN <sup>145</sup>. Em contrapartida, a técnica de neutralização que utiliza células TZM-bl é amplamente utilizada

atualmente, apresenta grande aplicabilidade por permitir a padronização e minimizar as variáveis apresentadas com ensaios em PBMC, possibilitando assim, a análise de parâmetros estabelecidos e a reprodutibilidade. O ensaio mede a inibição de um único ciclo da infecção viral em células TZM-bl. Estas células, anteriormente designada JC53-BL (clone 13) é uma linhagem celular HeLa que expressa os receptores CD4, CXCR4 e CCR5. A linhagem celular TZM-BL foi gerada a partir das células JC53 através da introdução de cópias dos genes da luciferase (*Luc*) e da  $\beta$ -galactosidase clonados em fase de leitura com a sequência do *Long Terminal Repeats* (LTR) viral. Assim quando a célula é infectada pelo vírus, a proteína Tat oriunda da infecção é produzida, se liga ao *LTR upstream* ao *Luc* e ativa a expressão da luciferase. Desta forma a inibição da infecção por anticorpos pode ser medida pela diminuição da luciferase em relação ao controle viral <sup>146</sup>. Neste ensaio, utiliza-se um pseudovírus do HIV-1 (capsídeo infeccioso do vírus capaz de englobar o genoma do HIV-1, no caso, defectivo em *env* e envolto pela membrana plasmática com as glicoproteínas do envelope, produzidos *in vitro*) para quantificar um único ciclo de infecção (figura 10).

Os ensaios de neutralização que utilizam células PBMC e os que utilizam TZM-bl, frequentemente divergem em seus resultados, alguns estudos observaram que a técnica com TZM-bl apresentava-se mais sensível <sup>147-149</sup>. Portanto, foi sugerido pelo comitê de padronização da neutralização (NeutNet) <sup>148</sup> em 2012, que as técnicas com PBMC e com TZM-bl deveriam ser realizadas em conjunto uma vez que os verdadeiros parâmetros de proteção imune ainda não tinham sido completamente estabelecidos.



**Figura 10: Esquema da tecnologia do gene repórter da luciferase em células TZM-bl, baseado em único ciclo de replicação com pseudovírus.**

Um plasmídeo contendo o genoma do HIV-1 defeituoso em *env* é clonado juntamente com outro plasmídeo contendo a sequência do envelope determinada. Os plasmídeos são transfectados em uma célula empacotadora para a produção dos pseudovírus. No ensaio de neutralização calcula-se a diferença de luminescência entre a célula infectada sem anticorpos e a célula na presença de anticorpos.

### 1.8 Perspectivas para vacinas anti-HIV e imunoterapia

Experiências de transferência passiva de anticorpos em macacos e camundongos <sup>120,121</sup> sugerem que uma vacina que induz bNAbs (anticorpos neutralizantes potentes e com amplitude de resposta) seria protetora contra o HIV-1, contudo, estes anticorpos potentes ainda não foram alcançados por imunização ativa em seres humanos. A caracterização da resposta de anticorpos anti-HIV-1 está começando a revelar algumas das razões do por que isso tem sido tão difícil e está fornecendo algumas pistas iniciais para abordagens racionais deste problema.

As estratégias de vacinas que foram até o momento testadas não incluem a descoberta dos anticorpos neutralizantes descritos a partir de 2010, cuja principal característica é a extensa mutação somática que ocorre como resultado



de ciclos de seleção no centro germinativo <sup>150</sup>. Liao *et. al.*, (2013)<sup>151</sup> observaram em um estudo longitudinal a relação das mutações no envelope em co-evolução com a diversidade dos anticorpos, e concluíram que os anticorpos evoluem naturalmente como resultado de exposição a uma série de variantes virais. Outros estudos adicionalmente indicam que determinadas características no envelope viral poderiam induzir uma resposta imune mais potente, de forma que as espículas do envelope seriam capazes de ativar determinadas células B expressando anticorpos com a cadeia pesada mais longa <sup>110</sup>. Essa ideia é suportada pelo fato observado em outro estudo onde diferentes imunógenos de Env foram administrados em macacos e alguns induziram potentes anticorpos e outros não. Realmente é possível que a indução de alguns anticorpos dependa de um único epítipo de Env associado com um individual repertório de células B <sup>152</sup>.

Justamente, em uma abordagem vacinal ativa, espera-se que um imunógeno seja capaz de ativar as células B e que estas expressem bNAbs <sup>150</sup>. Em 2013, Jardine *et al.* (2013) <sup>153</sup> relataram o uso de métodos computacionais para selecionar características genéticas de Env e desenvolveram o antígeno eOD-GT6 denominado “engineered outer domain (eOD)” com capacidade de se ligar ao precursor da linhagem germinativa do anticorpo VRC01. Mais recentemente, uma versão otimizada deste antígeno, o eOD-GT8 foi usado em dois estudos independentes para imunizar camundongos geneticamente modificados (*knock-in*) expressando a cadeia pesada do anticorpo humano VH1-2\*02 <sup>154,155</sup>. Ambos estudos demonstraram que o antígeno foi capaz de expandir células B expressando a cadeia pesada humana e a cadeia leve de camundongo com a região CDR-H3 mais longa, similar ao que ocorre naturalmente aos nAbs da família VCR01. Embora os anticorpos produzidos tenham sido similares ao VCR01 eles não foram capazes de neutralizar a infecção pelo HIV-1.

A engenharia de anticorpos também revelou que a maioria dos seres humanos que desenvolvem amplitude e potência sorológica podem fazê-lo através da produção de anticorpos para mais de um sítio de vulnerabilidade. Apesar dos recentes avanços, uma vacina eficaz baseada em anticorpos para o HIV-1 ainda não foi alcançada, pois ainda não há nenhuma demonstração pré-clínica de como induzir anticorpos anti-HIV-1 amplos e potentes, contudo

ensaios clínicos com imunoterápicos já começaram a ser testados em humanos. Em um estudo publicado na revista *Nature*, Caskey *et. al.*, (2015) relataram ter conseguido diminuir a carga do vírus no sangue de pessoas infectadas com uma única infusão do anticorpo 3BNC117, com alvo na região CD4bs da gp120, reduzindo a virêmia após 28 dias<sup>156</sup>.

Atualmente, o Estados Unidos, Espanha e a África do Sul participam do estudo multicêntrico INPAACT (Protocolo 1112), que visa determinar a segurança e farmacocinética do anticorpo monoclonal VRC01, quando administrado em bebês expostos<sup>157</sup>. O Brasil também tem participado de estudo de prevenção mediada por anticorpos com o VRC01 (HVTN 704/HPTN 085), assim como o Peru e Estados Unidos, nesta avaliação os participantes são homens e transgêneros, que fazem sexo com homens, com sorologia negativa para o HIV-1<sup>158</sup>. Esses estudos são os primeiros a avaliarem se os anticorpos neutralizantes são efetivos em reduzir a aquisição da infecção pelo HIV-1, entre uma população de risco.

Quanto ao uso de anticorpos em indivíduos infectados pelo HIV-1, West *et. al.*, (2014)<sup>159</sup> relatam que devido a TARV ser menos dispendiosa e mais fácil de administrar, do que a terapia de anticorpos, a imunoterapia, provavelmente viria como complemento. Contudo, inicialmente vários aspectos estão sendo avaliados como: se o uso dos anticorpos é seguro, se podem impactar na virêmia global e se o uso dos anticorpos deverá ser utilizado individual ou em combinações com a TARV.

No entanto, a proteção mediada por anticorpos mostra-se promissora no controle do HIV-1, as informações sobre imunologia e estrutura do envelope viral estão sendo usadas para projetar novos antígenos vacinais, incluindo a classe emergente do recombinante SOSIP (gp140 solúvel estabilizada por pontes de dissulfeto) cristalizado em conformação semelhante a nativa e capaz de induzir nAbs contra HIV-1 em coelhos e camundongos<sup>160</sup>. Alternativamente, tais informações poderão ser possivelmente usadas para produzir um coquetel de nAbs incluindo estes em estudo, objetivando a imunização passiva e adicionalmente ser administrado por imunização ativa com auxílio das sequências recombinantes antigênicas.

## 1.9 Justificativa

Recentemente, a triagem vacinal RV144, a qual induziu moderados títulos de anticorpos neutralizantes foi capaz de inibir apenas os pseudovírus mais sensíveis (fenótipo *tier 1*), com isso não ficou definido a real participação dos anticorpos neutralizantes na proteção, mas foram identificados nAb contra a região V1V2 do envelope <sup>161</sup> e uma maior ativação da resposta celular por ADCC <sup>162</sup>. Desde então, estes achados têm estimulado um crescente interesse em estudos da atividade neutralizante mediada por anticorpos em indivíduos na fase crônica da infecção.

Porém, tanto para estudos, como para avaliar a efetividade de uma vacina anti-HIV/AIDS, os testes devem estar em uso rotineiro antes de sua aplicação, incluindo testes de avaliação do sistema de imunidade celular e humoral, que inclui a determinação da capacidade dos anticorpos em neutralizar o HIV-1. Tais testes precisam estar padronizados, para permitir comparações a nível global, sendo que uma vacina eficaz deverá ser avaliada principalmente contra as linhagens de HIV-1 prevalentes na região geográfica da triagem vacinal.

Como citado na introdução existem duas técnicas principais para análise de anticorpos neutralizantes, cada uma apresentando vantagens e desvantagens em relação a outra. A técnica que utiliza células TZM-bl foi implementada no nosso laboratório e neste trabalho é comparada com a técnica que utiliza PBMC, onde adicionalmente avaliamos a resposta neutralizante em indivíduos infectados pelo HIV-1 com perfil típico de progressão e em indivíduos que não progrediram para a aids.

Em uma análise mais aprofundada é importante considerar como a diversidade do envelope, não somente a nível de aminoácidos, mas também como o tamanho das regiões variáveis da gp120 e a quantidade e localização dos sítios de glicosilação impacta na capacidade de induzir uma resposta protetora. Já foram descritos alguns estudos comparando a resposta neutralizante em distintos subtipos e abordando estas características do envelope viral <sup>163-168</sup>. No entanto, ainda não possuímos estudos relacionado as características de Env do subtipo F1 e da variante B/Bbr frequentes no Brasil com a resposta neutralizante. Portanto, o escopo do segundo documento desta

tese baseia-se na avaliação da amplitude e magnitude da resposta neutralizante induzida pelos diferentes subtipos do HIV-1 no Brasil e a identificação de características no gene *env* que possam estar correlacionadas com esta resposta humoral.

Além da introdução de uma metodologia reprodutível para a análise de nAb a incorporação de reagentes que avaliem se a resposta produzida por anticorpos indica proteção contra os vírus circulantes é de vital importância. Diante deste contexto se faz necessária a produção de reagentes (pseudovírus) a partir de sequências consensos de *env* do subtipo F1 e da variante B/Bbr que possam, futuramente, ser incorporadas na análise da resposta induzida por vacina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta imune humoral em indivíduos infectados pelos principais subtipos do HIV-1 presentes no Brasil, visando mapear alterações no envelope viral relacionadas a imunogenicidade.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar a resposta imune humoral anti-HIV-1 em indivíduos com perfil de progressão típica para aids ou não progressores de longo tempo e ainda realizar uma análise comparativa dos ensaios de neutralização (Documento 1).
- ✓ Caracterizar o fenótipo de neutralização dos pseudovírus HIV-1 consenso dos subtipos F1 e B/Bbr, desenvolvidos neste estudo e os do painel de neutralização subtipos B e C (Documento 2).
- ✓ Avaliar a resposta imune humoral dos indivíduos infectados pelo HIV-1 (dos subtipos F1, B, B/Bbr e C) utilizando os pseudovírus caracterizados (Documento 2).
- ✓ Avaliar a possível correlação entre os títulos de neutralização obtidos na avaliação da resposta imune humoral com as características do envelope viral (Documento 2).

### 3. DOCUMENTO 1

Comunicação publicada no periódico: **AIDS Research and Human Retroviruses**. 2013, Mar; 29(3):488-92. doi: 10.1089/AID.2012.0052  
**Short Communication: Neutralizing Antibodies in HIV-1-Infected Brazilian Individuals.**

RESUMO:

#### **Anticorpos neutralizantes em indivíduos brasileiros infectados pelo HIV-1**

Os testes para a detecção da resposta imune humoral contra o HIV-1 têm sido padronizados e estabelecidos, demandando esforços regionais. Para esse propósito, o ensaio de detecção de anticorpos neutralizantes anti-HIV-1 em células TZM-bl foi introduzido no Brasil. Vinte amostras de plasma obtidas a partir de indivíduos infectados foram analisadas: 10 obtidas de indivíduos com perfil de progressão para aids e 10 não progressores de longo tempo. Estas amostras foram testadas contra oito pseudovírus *env*-tipados (psVs) no ensaio com células TZM-bl e contra o isolado viral HTLV/IIIB (HIV-1IIIB) em linfócitos primários. Quarenta e quatro por cento das amostras apresentaram títulos contra os psVs e 50% para o HIV-1 IIIB. As amostras de plasmas provenientes dos progressores apresentaram ampla e alta potência de neutralização. A introdução desses reagentes de referência permitirão a participação do Brasil em futuras análises comparativas para validação de anticorpos anti-HIV-1.

### Delineamento Metodológico – (Documento 1)

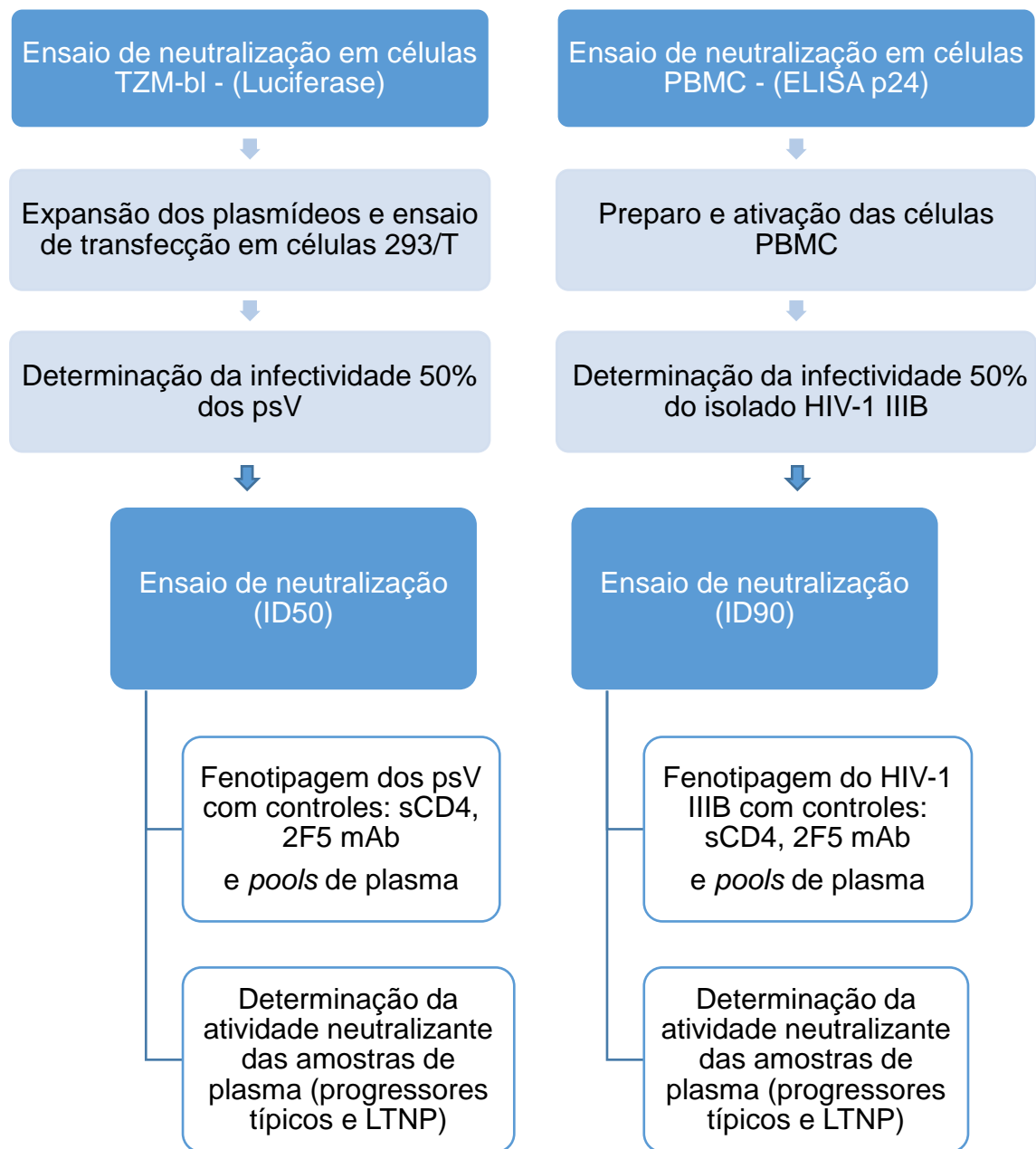


Figura 11: Esquema comparativo do processo metodológico do documento 1.

### 3.1 Metodologia

**Casuística:** Foram selecionadas 20 amostras de plasma provenientes de indivíduos infectados pelo HIV-1 caracterizados em estudos prévios do laboratório de aids e que se encontravam armazenadas a temperatura de -80°C. Dezoito amostras de plasma foram coletadas no centro de coleta do hospital Evandro Chagas, da Fiocruz e duas no laboratório de saúde pública de Porto Alegre, entre 2006 e 2009. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (#240/04). As características demográficas e clínicas dos indivíduos participantes do estudo encontram-se na tabela 1.

**Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes no momento da coleta da amostra de plasma para o estudo de anticorpos neutralizantes.**

Amostra	Gênero	Categoria de Exposição	Terapia antirretroviral	CD4 <sup>+</sup> T (contagem de células)	RNA (cópias/mL)	Subtipo do HIV
P1	M	MSM	AZT+EFV+3TC	704	2.200	B/Bbr
P2	M	Het	AZT+EFV+3TC	379	<80	F
P3	M	Het	–	317	16.000	B/Bbr
P4	M	NA	–	856	430.000	B
P5	F	Het	–	484	10.310	C
P6	M	Het	–	317	8.352	C
P7	F	Het	–	639	9.000	B
P8	F	Het	–	467	7.000	B/Bbr
P9	F	Het	AZT+EFV+3TC	273	540	F
P10	F	Het	–	948	670	C
LTNP-NC 1	M	MSM	–	712	2.000	C
LTNP-NC 6	M	MSM	–	582	5.889	B
LTNP-EC 2	M	IDU	–	1,206	<80	C
LTNP-EC 4	F	Het	–	1,817	<50	F
LTNP-EC 8	F	Het	–	1,089	<50	B
LTNP-EC 7	F	Het	–	1,13	<50	B
LTNP-EC 9	F	NA	–	1,509	<50	B
LTNP-EC 10	F	Het	–	1,416	<50	B
LTNP-VC 3	M	Het	–	920	<50	B
LTNP-VC 5	M	MSM	–	1,225	115	B

P, progressor; LTNP, não progressor a longo termo; NC, não controlador virêmico; CE, controlador de elite; VC, controlador virêmico; F, sexo feminino; M, sexo masculino; MSM, homens que fazem sexo com homens; Het, heterossexual; IDU, o usuário de



drogas intravenosas; NA, não disponível; AZT, zidovudine; EFV, efavirenz; 3TC, lamivudina; -, indivíduos sem antirretroviral.

Com base nos prontuários médicos, os indivíduos infectados, participantes do estudo foram classificados de acordo com o perfil de progressão da doença. Para os progressores típicos (TP) consideramos como critérios definidores de aids a contagem das células T CD4<sup>+</sup> < 300 células / mL ou início da terapia antirretroviral (TARV) ou primeira infecção sintomática, para os indivíduos LTNP a estratificação foi de acordo com a indicada por Casado *et. al.*, (2010)<sup>169</sup>:

- Não progressor de longo tempo - controladores de elite (LTNP-CE): com contagem de células T CD4<sup>+</sup> estáveis > 500 células / mL, com contagem de carga viral abaixo de 50 cópias de RNA / mL e com episódios isolados de virêmia até 1.000 cópias / mL;
- Não progressor de longo tempo - controladores virêmicos (LTNP-VC) com episódios isolados de virêmia até 2.000 cópias / mL;
- Não progressor de longo tempo, não controladores virêmicos (LTNP-NC) com virêmia acima de 2.000 cópias / mL em mais de 50% das contagens.

#### **Células utilizadas nos ensaios de neutralização em PBMC:**

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de bolsas de concentrado leucocitário (*buffy coats*) que foram gentilmente doadas pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho / UFRJ, Rio de Janeiro. As células foram separadas por gradiente de ficoll, criopreservadas e utilizadas após o resultado negativo de sorologia para HIV-I/II, Hepatites B e C, Doença de Chagas, Sífilis, HTLV I/II, Malária e Citomegalovírus, realizado na UFRJ, uma vez que essas bolsas proveram de doadores de sangue.

Para a separação de PBMC por gradiente de ficoll, citado acima, homogeneizou-se o sangue e diluiu-se em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 na proporção de 1:2, uma vez que este sangue não continha o plasma. As amostras de sangue diluídas foram aplicadas cuidadosamente sobre a solução de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 30 minutos a 20°C, para separação da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e

lavadas duas vezes pela adição de 50 mL de PBS seguida de centrifugação a 400 x g por 10 min a 20°C. Por fim, ressuspendeu-se o precipitado celular em 5 mL de meio RPMI-1640 incompleto e procedeu-se à contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de Tripán (0,4%) (Sigma-Aldrich, EUA) para análise da viabilidade celular.

**Ensaio de detecção de p24 (ELISA):** O ensaio de detecção de p24 foi realizado utilizando o teste RETRO-TEK HIV-1 p24 *Antigen* ELISA (Zeptomérix, EUA), segundo o fabricante. O teste de detecção do antígeno p24 foi realizado para determinar a dose de infectividade do isolado viral HIV-1 IIIB (TCID 50%) e também para determinação do título de neutralização. O teste é composto de poços que são revestidos com um anticorpo monoclonal específico para o gene *gag* p24 do HIV-1. O antígeno viral contido na amostra é capturado e ocorre uma reação com o anticorpo anti-HIV-1 conjugado à biotina, após subsequente incubação com estreptoavidina-peroxidase. A leitura da absorbância foi proporcional a quantidade de antígeno p24 presente na amostra e lida em espectrofotômetro a 405 nm. Após a leitura calculou-se o valor de 1 pg de p24 com base na curva padrão de p24 e associou-se esse valor ao controle viral. A redução da síntese de p24 foi calculada em relação a presença do anticorpo neutralizante que inibiu a replicação viral em 90% (ID90), com base na média do controle viral (100% de replicação), detectando assim a recíproca da diluição por curvas de regressão linear (Microcal Origin Software Inc, EUA).

**Controles:** Foram utilizados como controles positivos combinações de amostras (*pools*) de plasmas de indivíduos infectados pelo mesmo subtipo do HIV-1, randomicamente selecionadas (dos subtipos B, B/Bbr e F1). Também foram utilizados o anticorpo monoclonal 2F5 e o inibidor CD4 solúvel (sCD4), estes foram testados com duas concentrações iniciais (20 µg/mL e 15 µg/mL), respectivamente e com 5 diluições fator 2. Como controle negativo foi utilizado plasmas normal humano. Esses controles foram testados segundo o protocolo de neutralização do HIV-1IIIB e pseudovírus como descrito a seguir.

**Ensaio de neutralização do isolado HIV-1 IIB:** As células normais humanas mononucleares de sangue periférico foram cultivadas em 30 mL de meio RPMI 1640 (com 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de gentamicina e 2 Mm de L-glutamina) e ativadas com fitohemaglutinina P (2.5 µg/mL) em frascos T75 e após 48hs as células foram passadas para tubo Falcon, centrifugadas 1000 x g por 10 min e contadas (uma suspensão de  $5 \times 10^6$  células/mL é necessária por placa de 96 poços (estéril e em formato de U)). Após, o meio foi trocado por RPMI + IL-2 (10 U/mL) e incubado a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de meio RPMI + IL-2 foram adicionados às colunas 1-12 e, adicionalmente, 40 µL para a linha H das colunas 3-12 e 50 µL da coluna 1 (que ficou apenas com meio de cultura). Este formato permitiu a titulação de 5 amostras de plasma, testados em 8 diluições em duplicata e mais uma amostra de controle negativo (controle de vírus) segundo a figura 12. Após a adição do meio de cultura foi realizada a diluição dos plasmas, colocando 11 µL de plasma nos poços 2 e 3, e a mesma sequência para os demais plasmas, após a homogeneização do plasma e meio realizou-se a diluição em série transferindo 50 µL para o próximo poço da mesma coluna (ou seja, 50 µL para 100 µL) para um total de 8 diluições do plasma. Descartou-se 50 µL do último conjunto de poços. O próximo passo foi adicionar 50 µL do vírus a todos os poços utilizados e incubou-se a 37 °C por uma hora, neste passo adicionou-se a diluição apropriada de vírus, geralmente de 10 a 50 doses infectantes, calculado segundo método de Reed e Muench (1938) <sup>170</sup>. Em seguida adicionou-se 50 µL de PBMC (250.000 células) e a placa foi incubada por *overnight* em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. E em seguida, retirou-se aproximadamente 190 µL do sobrenadante da cultura, com cuidado para não ressuspender as células, isso foi realizado inclinando a placa e aspirando com a pipeta lentamente. Após, os 190 µL foram substituídos por meio fresco RPMI+ IL-2. No sétimo dia o sobrenadante foi colhido para quantificação de p24, para isso transferiu-se 200 µL do sobrenadante a uma placa de 96 poços com fundo plano que foi vedada e congelada a -20°C ou realizou-se a contagem de p24.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC	CV	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8	Dil 8
B		CV	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7	Dil 7
C		CV	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6	Dil 6
D		CV	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5	Dil 5
E		CV	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4	Dil 4
F		CV	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3	Dil 3
G		CV	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2	Dil 2
H	NEG	CV	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1	Dil 1
			Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Plasma 4	Plasma 5					

**Figura 12: Modelo de formato do ensaio de neutralização com PBMC.**

Os poços da coluna 1 correspondem ao controle negativo (NEG- 1H), Branco (BC-1A) e as demais cavidades vazias (1B-G) para posterior utilização destas posições na placa de quantificação de p24 (curva padrão: 0 – 125 pg de p24/mL). O CV (controle viral) é referente aos poços de vírus sem plasma.

**Células utilizadas nos ensaios de neutralização em TZM-bl:** ATCC 293T/17, TZM-bl.

Os dois tipos celulares são de células aderentes a superfície e foram mantidos em cultura com meio DMEM (Eagle modificado por Dulbecco) completo (10% soro fetal bovino, 50 µg de gentamicina por mL de meio e 25 mM de tampão HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] (Sigma-Aldrich, EUA)) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células 293T/17 foram adquiridas da coleção americana ATCC (*American Type Culture Collection*) e as células TZM-bl obtidas por solicitação ao Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), a autorização de importação de produtos geneticamente modificados foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (Nº-1.191/2007). As culturas de células foram testadas para determinar provável contaminação por Mycoplasma utilizando o kit Mycoalert<sup>®</sup> Detection (Lonza, Suíça) seguindo as instruções do fabricante.

**Obtenção dos pseudovírus:** Os pseudovírus foram montados a partir dos plasmídeos contendo o gene *env* do HIV-1 dos subtipos B (SF162.Ls, WITO4160.33, PVO.4, PRhpa4259, Rejo4541.67, QH0692.42, Trjo4551.67) e C (ZM53m PL12) com associação ao plasmídeo pSG3Δ*env* (o qual possui o

genoma do HIV defeitivo para *env*). Os plasmídeos foram doados pelo Programa NIH AIDS (11227 - Painel de Referência do HIV-1 subtipo B e 11326 - Painel de Referência do HIV-1 subtipo C).

**Expansão dos plasmídeos:** Os plasmídeos foram inseridos em *E. coli* Top10 ou DH5 $\alpha$  pela técnica de transferência direta de eletroporação, utilizou-se 1  $\mu$ L de 0,5  $\mu$ g do plasmídeo e 50  $\mu$ L de *E. coli* eletrocompetente em cuvette de 0,1cm e uma incubação em gelo por 10 minutos, a eletroporação atingiu um pulso elétrico de 100 ohms. Em seguida, adicionou-se 250  $\mu$ l de meio líquido LB (Luria-Bertani) em temperatura ambiente e incubou-se a 37 °C por uma hora, para expressão do gene de resistência a ampicilina presente no vetor plasmidial. Após, as aliquotas de 10 a 50  $\mu$ l da bactéria transformada foram inoculados em placas de Petri com o meio Agar-LB e ampicilina (50  $\mu$ g/mL). As colônias selecionadas foram multiplicadas em 50 mL meio líquido LB-amp em agitador orbital (200 rpm) a 36°C por 18hs. Os plasmídeos foram extraídos e purificados utilizando Wizard Plus SV Minipreps DNA (Promega, EUA), e quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop (Wilmington, EUA). Também realizou-se uma corrida de eletroforese em gel de agarose (0,8%) para visualizar a integridade dos plasmídeos, corados com brometo de etídeo.

**Transfecção:** Os pseudovírus foram produzidos por transfecção em células 293/T17 (ATCC, EUA), simultaneamente com o plasmídeo *env* (4ng) e pSG3 $\Delta env$  (8ng). O cultivo celular de 293T/17 foi preparado na véspera, para a obtenção de monocamadas de 50-80% de confluência, em meio de cultura DMEM completo. Os plasmídeos foram homogeneizados com 100  $\mu$ L de DMEM e com 48  $\mu$ L do agente transfectante FuGENE 6 (Promega, EUA) mais 652  $\mu$ L de DMEM e incubados por 30 minutos para permitir a formação do complexo. Após, este complexo foi adicionado ao frasco de células 293T/17 e incubado por 8 horas à 37°C. Posteriormente, à coleta do sobrenadante um novo meio de cultura foi adicionado e mantido por 2 dias à 37°C. Por fim, o sobrenadante contendo o pseudovírus, foi filtrado em filtro 0.45  $\mu$ m, aliqotado e congelado a -80°C.

**Teste da infectividade dos pseudovírus (TCID<sub>50</sub>) em TZM-bl:** Para o ensaio de inibição da replicação por anticorpos em células TZM-bl foi necessário determinar a dose de infectividade de cada psV. Portanto, após a infecção a expressão da luciferase foi quantificada através de adição do substrato desta enzima e a luminescência emitida foi captada e transformada em unidades relativas de luminescência no Luminômetro Victor 3 (PerkinElmer-EUA). O protocolo também encontra-se disponível no site: <http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm>. Em uma placa de 96 poços com fundo plano adicionou-se 100 µL de meio DMEM completo em todos os poços. Na coluna 1, linhas A-D adicionou-se 25 µL de um pseudovírus e nas linhas E-H 25 µL de um segundo pseudovírus, após misturar transferiu-se 25 µL para os próximos poços, a fim de fazer diluições em série fator 5 em um total de 11 diluições. Descartou-se os 25 µL da última diluição. Os poços da coluna 12 foram o controle negativo (celular). A placa foi incubada à temperatura ambiente, enquanto as células eram preparadas. Para isso, as células TZM-bl foram tratadas com tripsina (0.25%) - EDTA (1mM) (Sigma-Aldrich, EUA) (tratamento para a interrupção da monocamada celular) e contadas, também verificou-se a viabilidade celular por microscopia óptica utilizando 0,4% de azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, adicionou-se 100 µL de células TZM-BL (10.000 células / 100 µL contendo 20 µg de DEAE-dextran /mL) a todos os poços, procedeu a incubação a 37°C por dois dias. Após esse período realizou-se a análise da infectividade (TCID<sub>50</sub>) pela leitura da luminescência e o cálculo de TCID foi realizado utilizando o macro "TCID", disponível no banco de dados de Los Alamos.

**Leitura da Luminescência:** Para a leitura da luminescência utilizou-se placas de 96 poços na cor preta para evitar possíveis leituras falso-positivas. Da placa de cultura em avaliação retirou-se 100 µL de meio de todos os poços, observou-se ao microscópio óptico a presença ou não de indícios de citotoxicidade e posteriormente, adicionou-se 100 µL do reagente Bright Glo (Roche, EUA) ou Britelite Plus Reporter Gene Assay System (PerkinElmer, EUA). Após 2 minutos transferiu-se o conteúdo do lisado (150 µL) para a placa preta e imediatamente fez-se a leitura em luminômetro Vitor3 (PerkinElmer- EUA).

**Ensaio de neutralização em células TZM-bl:** Os psVs foram incubados com 5 diluições de cada plasma, em duplicata, por 1 hora. Em seguida, adicionou-se as células TZM-bl, seguindo de incubação por 48 horas. A inibição da infecção foi dada pela diferença entre o controle positivo (100% de infecção - somente vírus e células) e a concentração de células não infectadas, determinando a diluição do plasma onde ocorre 50% da inibição viral. Portanto, os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos pela recíproca da diluição do plasma necessária para reduzir em 50% a infecção que foi apresentada em unidades relativas de luminescência (RLU). O protocolo geral encontra-se disponível no site: <http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm>.

Utilizando uma placa de cultura de 96 poços com o formato de fundo plano, adicionou-se 150 µL de meio DMEM completo em todas as cavidades da coluna 1 (controle celular). Após, colocou-se 100 µL de meio em todos os poços das colunas 2-12 (na coluna 2 adicionou-se apenas o psV). Em seguida 40 µL de meio em todos os poços das colunas 3-12 da linha H (amostras de plasma). As amostras de plasma foram inativadas a 56° C por 60 minutos. Adicionou-se 11 µL de amostra de plasma em duplicata para a linha H, nas colunas 3-12 na seguinte ordem: amostra 1 - poços H3-H4, amostra 2 - poços H5-H6, amostra 3 - poços H7-H8, amostra 4 - poços H9-H10 e a amostra 5 - poços H11-H12. Misturou-se as mostras na fila H e transferiu-se 50 µL para a fileira G. Repetiu-se a transferência e diluição de amostras até a linha D e descartou-se 50 µL destes poços. Os pseudovírus com aproximadamente 150.000 RLU ou 200 TCID<sub>50</sub> foram descongelados e 50 µL foram adicionados a todos os poços de 2 a 12 até a linha A e a placa foi incubada por 45 minutos. Durante esse período as células TZM-bl que estavam em cultura foram tratadas com tripsina (0.25%) - EDTA (1 mM) (Sigma-Aldrich, EUA) por dois minutos e contadas, preparou-se uma suspensão com 100,000 células / mL. Em seguida, adicionou-se 100 µL de células TZM-bl (10.000 células) contendo 20 µg de DEAE-dextran / mL) em todos os poços até a linha A, seguida de incubação úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por dois dias. Após realizou-se a leitura em luminômetro Vitor3 (PerkinElmer- EUA).

**Estatística:** O teste Mann–Whitney foi utilizado para determinar se os títulos de neutralização dos combinados de plasma, entre os testes de TZM-bl e PBMC, apresentavam diferença estatística, com valor de  $p < 0,05$ . Os cálculos foram realizados pelo programa estatístico GraphPad Prism (version 5.01).

### 3.2 Resultados

Um total de 8 pseudovírus (7- *tier 2* e 1- *tier 1*)<sup>171</sup> foram fenotipados com a utilização do mAb 2F5 (anti-gp41) e do sCD4 (anti-gp120). A tabela 2 mostra as concentrações de anticorpos que foram necessárias para inibir 50% dos pseudovírus. Os resultados demonstraram que o psV SF162LS teve uma maior susceptibilidade à neutralização, seguido pelo HIV-1 IIIB e psV QH0692.

Os psVs PVO.4, pTRJO 4551.67 e ZM53M.PB12 (único do subtipo C) foram os menos susceptível à inibição pelo 2F5. No estudo realizado por Li *et. al*, (2006) o sCD4 foi capaz de inibir os psVs e HIV-1 IIIB na seguinte sequência de sensibilidade, SF162LS > HIV-1 IIIB> QH0692 > pREJO > pRhpa4259 > pWITO460 > PVO.4 >TRJO4551. Para o mAb 2F5 a sequência de sensibilidade foi: SF162LS > HIV-1 IIIB> pREJO > pWITO460 > QH0692 > pRhpa4259 > PVO.4 >TRJO4551. Desta forma os dados da análise fenotípica apresentaram-se de acordo com a literatura o que confirmou a reprodutibilidade dos testes em TZM-bl<sup>146</sup>.

**Tabela 2: Análise fenotípica dos pseudovírus e do HIV-1 IIIB**

Inibidores (µg/ml)	env-pseudoviruses/TZM-bl (50% neut)								IIIB/PBMC (90% neut)
	SF162. Ls	WITO 4160	PVO. 4	PRhpa 42597	ZM53m PL12	Rejo 4541.67	QH0692 .42	Trjo45 51.67	X4 HIV-1 IIIB
sCD4	0.07	>15	9.44	3.9	>10	1.29	0.53	2.6	<0.4
mAb 2F5	<0.17	2	>20	22	>20	1.45	2.42	>20	>10

No ensaio da titulação dos anticorpos neutralizantes monoclonais, apresentamos a concentração inibitória capaz de reduzir 50% a infecção no ensaio que utiliza células TZM-bl e 90% para o ensaio em PBMC, como comumente apresentado devido ao fato do HIV-1 IIIB ser mais susceptível a neutralização.



Após o teste fenotípico dos psVs, foi verificada a atividade neutralizante nos plasmas dos 20 indivíduos estudados. O valor da recíproca da diluição das amostras de plasma foi agrupado por média geométrica de título (GMT) e evidenciamos a sensibilidade dos pseudovírus através da média geométrica de sensibilidade (GMS). Nesta análise o psV SF162 (subtipo B) foi o mais sensível aos anticorpos neutralizantes, de acordo com sua classificação de fenótipo *tier* 1. Sendo capaz de detectar anticorpos neutralizantes provenientes dos dois grupos de amostras testadas, progressores típicos (P) e LTNP.

Do total de 160 pontos amostrais (8 psVs × 20 amostras), 8 (5%) pontos apresentavam títulos maiores que 1: 1000 frente a alguns dos psVs e foram designados como alta potência neutralizante, indicado pela cor vermelha na tabela 3. Os valores das recíprocas de títulos que apresentaram valores entre 500 e 1000 foram designados como neutralização potente e foram 8,7% do total, de 100 a 499 foram classificados como neutralização moderada, sendo 11% das amostras e valores entre 100 e 19 foram classificados como neutralizadores fracos, com um percentual de 31 das amostras. As amostras de plasmas que não neutralizaram os psVs perfizeram um total de 90 (56,25%), sendo destas 63 (70%) provenientes de LTNPs e 27 (30%) de progressores típicos.

Dos 80 pontos (10 plasmas provenientes dos LTNP × 8 psV), 17 (21,2%) pontos tinham títulos neutralizantes entre fraco (1:27) e altamente potente (1:6250). O psV SF162.Ls foi sensível a nove amostras de plasmas e o psV WITO4160.33 foi sensível a três amostras (LTNP-EC 2 e LTNP-NC:1 e 6). A amostra LTNP-NC 1, foi a que apresentou uma maior amplitude de resposta, sendo capaz de inibir 5 psVs e a amostra LTNP - EC 10 não apresentou anticorpos neutralizantes. Vale salientar que embora a resposta neutralizante dos LTNPs tenha sido 70% negativa este grupo apresentou três amostras com títulos de neutralização altamente potentes de 1:6250 contra o psV SF162.Ls. Interessantemente a única amostra de plasma LTNP do subtipo C (LTNP NC-1) não apresentou anticorpos com capacidade de inibir o psV C (ZM53MPB), mesmo sendo a amostra deste grupo com maior capacidade de neutralização. Em contrapartida, a amostra LTNP VC-3 do subtipo B apresentou anticorpos contra o psV C. Entre o grupo de indivíduos progressores a reatividade cruzada entre os subtipos também demonstrou incongruência para a amostra P10

(subtipo C) a qual não apresentou anticorpos contra o psV C indicando a necessidade de um estudo mais aprofundado para o esclarecimento destas questões.

Para o grupo de progressores típicos, 51 dos 80 pontos amostrais (63%) apresentaram títulos neutralizantes de fraco a altamente potentes (1:20 a 1:4374). Duas amostras foram potentes e com ampla capacidade de neutralização (100%), neutralizando os pseudovírus do subtipo B e C. A amostra P1 proveniente de um indivíduo infectado pelo HIV-1 do subtipo B/Bbr foi a que apresentou maior capacidade de neutralização cruzada, quando comparado com os outros plasmas, com GMT de 1150 e com o título de neutralização acima de 1:1000 contra os psVs WITO4160.33 e PRhpa4259. O plasma do indivíduo P2 (subtipo F1), embora não tenha atingido títulos elevados foi capaz de neutralizar todos os psVs com títulos variando de 1:71 a 1:1000.

**Tabela 3: Atividade neutralizante dos plasmas provenientes de indivíduos com perfil típico de progressão (P) para a doença e perfil de não progressão- LTNP), em ensaio de TZM-bl.**

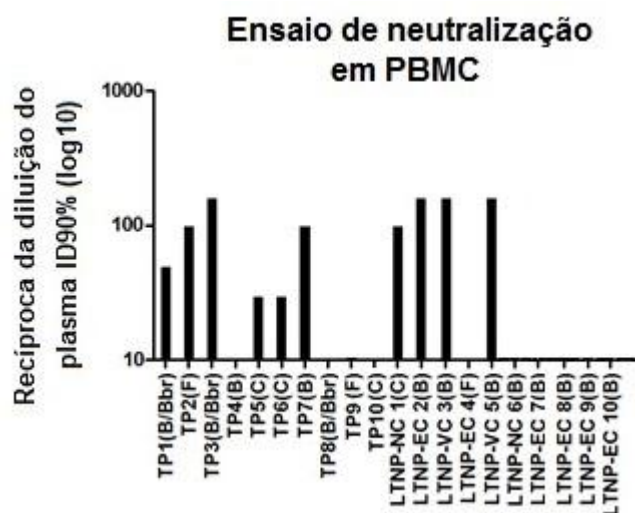
Plasma	psV									GMT
	SF162.Ls (B)	WITO4160.33 (B)	PVO.4 (B)	PRhpa42597 (B)	ZM53MPB 12 (C)	Rejo4541.67 (B)	QH0692.42 (B)	Trjo4551.67 (B)		
P1(B/Bbr)	637	4374	1000	4374	252	1000	1000	1000	1000	1150.57
P2(F1)	170	1000	328	71	141	202	182	120	120	199.03
P3(B/Bbr)	4374	559	78	77	74	162	10	10	10	107.33
P4(B)	249	10	70	4374	50	4374	10	10	10	106.60
P5(C)	313	1000	81	40	90	10	28	10	10	63.23
P6(C)	260	1000	85	10	66	10	20	10	10	48.21
P7(B)	666	22	77	25	150	10	50	10	10	46.31
P8(B/Bbr)	10	1000	69	76	50	10	10	10	10	35.67
P9(F1)	363	1000	10	33	10	10	10	10	10	32.34
LTNP-NC 1(C)	311	30	53	73	10	10	27	10	10	31.52
LTNP-EC 2(B)	6250	171	10	10	10	10	10	10	10	31.89
P10(C)	642	1000	10	10	10	10	10	10	10	29.92
LTNP-VC 3(B)	445	10	62	10	50	10	10	10	10	24.69
LTNP-EC 4(F1)	6250	10	10	10	10	10	10	10	10	22.36
LTNP-VC 5(B)	6250	10	10	10	10	10	10	10	10	22.36
LTNP-NC 6(B)	389	61	10	10	10	10	10	10	10	19.81
LTNP-EC 7(B)	812	10	10	10	10	10	10	10	10	17.33
LTNP-EC 8(B)	47	10	10	10	10	10	10	10	10	12.13
LTNP-EC 9(B)	44	10	10	10	10	10	10	10	10	12.03
LTNP-EC 10(B)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10.00
GMS	367.30	92.22	29.49	29.33	26.10	21.15	17.12	13.80		

Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos pela recíproca da diluição dos plasmas e estão sombreados por cores que representam sua potência. Vermelho: potência altamente neutralizante, marrom: neutralizantes potentes, laranja: neutralizantes moderados, laranja claro: neutralizantes fracos e bege: não neutralizantes. Os plasmas com títulos inferiores a 20 foram apresentados com o valor de 10 para os cálculos de média geométrica (GMT). GMS: Média Geométrica de Sensibilidade, P, progressor; LTNP, não progressor de longo termo; NC, não controlador virêmico; EC, controlador de elite; VC, controlador virêmico; psV, pseudovírus.

O ensaio de neutralização do HIV-1 IIIB (ID<sub>90</sub>) com PBMC foi realizado com as mesmas amostras do ensaio em células TZM-bl. Das 20 amostras testadas, 10 eram LTNP e destas 40% (4/10) apresentaram atividade neutralizante. Em relação as 10 amostras provenientes de indivíduos com perfil de progressão típico, 60% (6/10) foram capazes de inibir o HIV-1 IIIB, ambos grupos com títulos variando de 1:30 a 1:160 (figura 13).

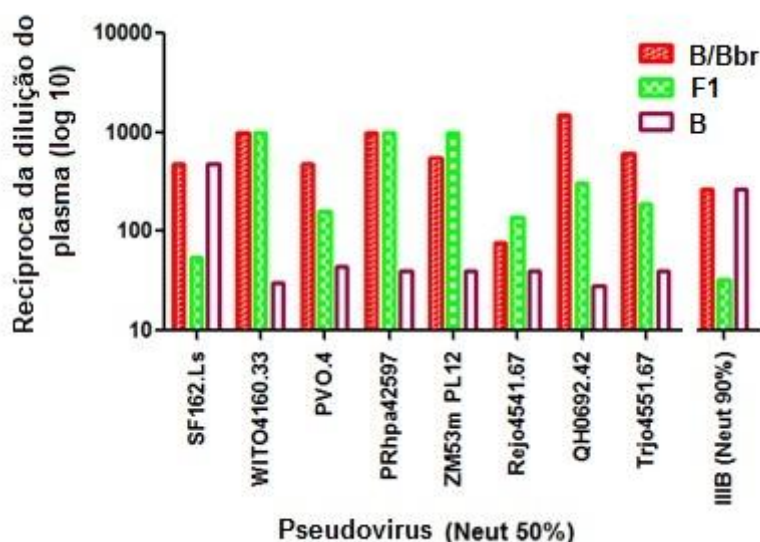
Portanto, 44% (70/160) da matriz de plasmas (20 plasmas x 8 psV) tiveram capacidade de neutralizar os psVs e considerando a média geométrica de títulos com apenas valores acima de 20, verificamos que 75% das amostras neutralizaram os psVs, no ensaio de TZM-bl. Em relação ao ensaio em PBMC, 50% (10/20 títulos) das amostras de plasmas neutralizaram o HIV-1 IIIB.

O ensaio de neutralização com células TZM-bl apresentou uma sensibilidade de 95% e concordou com o ensaio de PBMC em 60%, quando consideramos os valores de GMT positivos acima de 20, e calculamos em tabela de contingência, estando de acordo com os dados relatados por Polonis *et al.* (2008)<sup>149</sup>.



**Figura 13: Potência da atividade neutralizante específica para o HIV-1 IIIB em plasma de indivíduos com perfil típico (TP) progressão e de não progressão para aids (LTNP).**

Avaliamos os combinados de plasmas (*pool/s*) de diferentes indivíduos infectados pelo HIV-1 do subtipo B, B/Bbr e F1, com as duas técnicas (figura 14). Observamos que os subtipos B e F1 não apresentavam diferenças na resposta neutralizante, no ensaio de neutralização em TZM-bl ( $p = 0,2114$ ). No mesmo ensaio verificamos que os *pool/s* B e B/Bbr apresentaram respostas diferentes ( $p=0,0017$ ) assim como B e F1 ( $p=0,0337$ ). No ensaio de PBMC verificamos uma similaridade entre B e B/Bbr. Portanto, na análise de potência relacionada ao subtipo, no ensaio de TZM-bl, verificamos a seguinte ordem de potência B/Bbr=F1>B. Por fim, o *pool* de amostras de plasmas do subtipo B/Bbr apresentou maior resposta neutralizante para ambas técnicas, enquanto o resultado de neutralização com combinado B divergiu entre as técnicas.



**Figura 14: Atividade neutralizante dos *pool/s* de plasmas dos subtipos B, F1 ou B/Bbr para cada pseudovírus em ensaio de TZM-bl e HIV-1 IIIB em PBMC.**

A técnica de neutralização em TZM-bl é uma ferramenta importante para a avaliação de anticorpos neutralizantes, sendo altamente reprodutível com um risco biológico inferior devido à utilização dos psVs. Em contraponto, os psVs apresentam uma grande susceptibilidade à neutralização, com a recíproca de diluição do plasma muito mais elevada do que quando testados no ensaio de PBMC, e isso pode levar a uma superestimação da resposta protetora.

Em nosso estudo pode ter ocorrido uma subestimação pelo fato de algumas amostras serem de indivíduos progressores em terapia, visto que a presença destes antirretrovirais no plasma pode interferir na capacidade de síntese do DNA viral nas células infectadas. Essa subestimação poderia ser verificada com a inclusão de um controle negativo (pseudovírus adicional) que apresentasse o envelope que não de HIV, como por exemplo o psV VSV-G/HIV, o qual é um pseudovírus com uma sequência do envelope do vírus da estomatite vesicular, de fato não incluímos o mesmo nesta análise, contudo esperamos incluir este ou similar nos próximos estudos.

Segundo Van Gils *et.al.*<sup>172</sup>, existe uma associação positiva entre a produção de anticorpos neutralizantes e o número de cópias de RNA/mL e com base nos resultados dos títulos de neutralização das amostras dos pacientes, evidenciamos uma maior resposta neutralizante para os indivíduos que possuíam estímulo antigênico frequente, os progressores típicos. No entanto também evidenciamos que algumas amostras LTNP, com virêmia indetectável, apresentaram anticorpos, todavia com menor capacidade em neutralizar os pseudovírus. Desta forma indagamos se alguns epítomos presentes nas amostras teriam uma menor/menor potência em induzir uma resposta neutralizante. Já que é de conhecimento que algumas modificações no envelope como inserções deleções e adições de carboidratos podem levar a uma oclusão dos epítomos antigênicos gerando resistência a neutralização <sup>173</sup>.

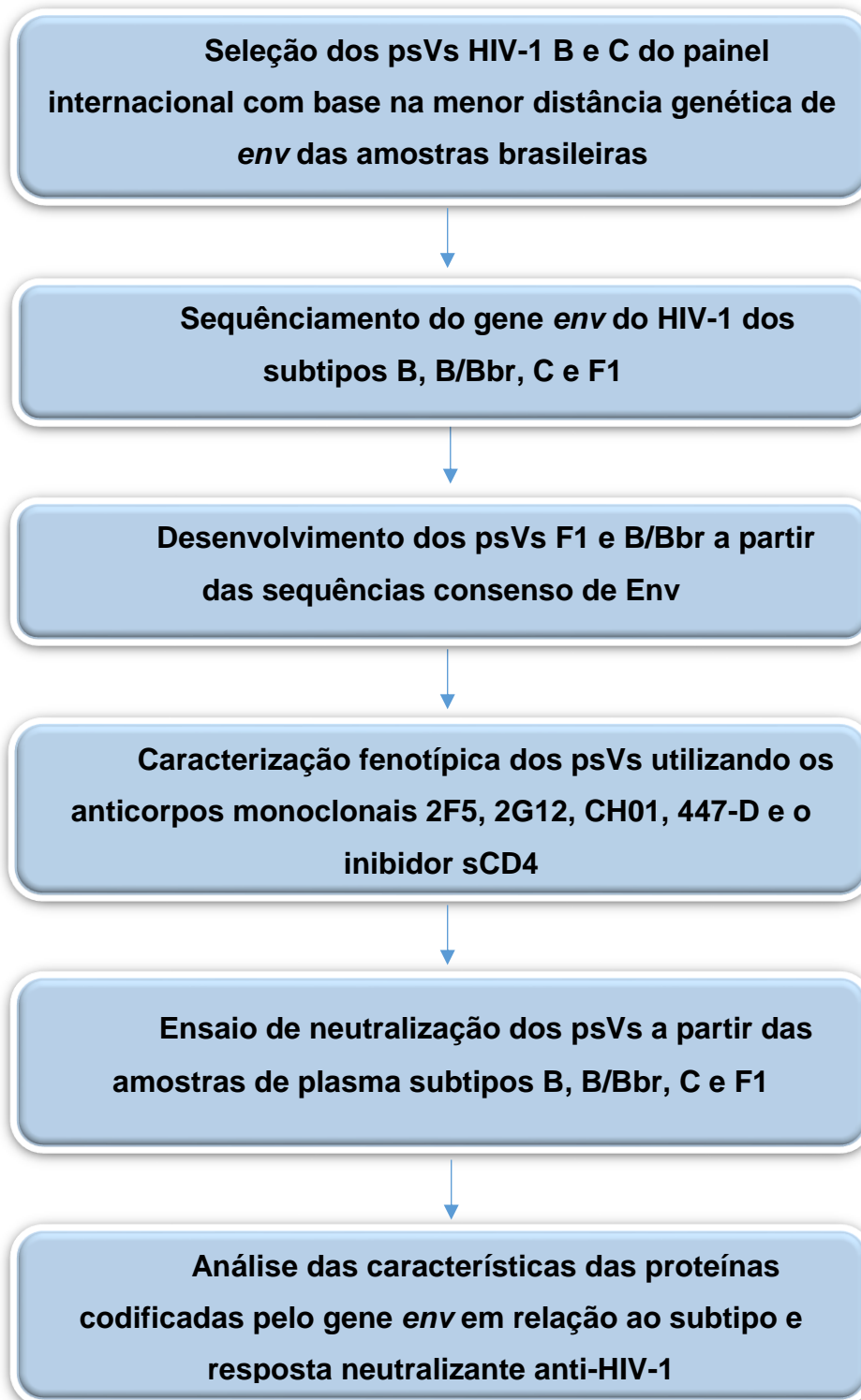
## 4. DOCUMENTO 2

Resumo apresentado no formato de pôster no Keystone Symposia conference 8X HIV vaccine, Olympic Valley, CA, em 20/03/2016. **The impact of proline to tryptophan substitution on v3 loop and cross-neutralizing antibody in hiv-1 individuals infected.**

### **O impacto da substituição da prolina para o triptofano na alça V3 e resposta cruzada neutralizante mediada por anticorpos em indivíduos infectados pelo HIV-1**

O HIV-1 subtipo B pandêmico (GPGR na alça V3) é prevalente no Brasil, no entanto, uma típica variante genética (GWGR, chamado B / Bbr) também é detectada em uma proporção elevada, além do subtipo F1 e C. Embora a classificação do HIV-1 em subtipos tem sido utilizada para categorizar o HIV-1 geneticamente, a relevância dos subtipos em induzir anticorpos neutralizantes e a discriminação da sensibilidade de neutralização do vírus não são claras. Portanto, com o objetivo de identificar as assinaturas subtipo específicas no envelope viral e associá-las a indução de atividade neutralizante, selecionamos amostras de plasma de indivíduos infectados cronicamente pelo HIV-1 dos subtipos brasileiros e realizamos o ensaio de neutralização com pseudovírus (psV). Após a confirmação do subtipo do HIV-1 das 60 amostras selecionadas analisamos 51 amostras que não apresentaram perfil recombinante para o gene *env*. Com o ensaio de neutralização em TZM-bl, caracterizamos fenotipicamente os psVs e segregamos as amostras conforme seu potencial de neutralização. Verificamos uma maior amplitude e potência da resposta humoral anti-HIV-1 em indivíduos infectados pelo subtipo B ou F1 do HIV-1 do que em indivíduos infectados com o subtipo C ou B/Bbr, mostrando que os anticorpos neutralizantes foram distintamente induzidos nesses dois grupos. Verificou-se também que o psV expressando o triptofano na alça V3 foi mais sensível a neutralização, quando comparado com aqueles que apresentavam a prolina. Em relação as assinaturas subtipo-específicas a região V3 mostrou-se impactante, juntamente com outras assinaturas nas regiões C2 e gp41 diferenciando as amostras F1 das amostras B/Bbr. Em relação a proximidade imunogênica entre os subtipos C e B/Bbr detectamos a presença de uma arginina na posição 355 do V3 em C, que pode estar facilitando a neutralização, assim como a presença do triptofano no V3 em B/Bbr. Observamos que as regiões V1 e V4 apresentaram tamanhos diferentes ( $p < 0,005$ ) para os subtipos e uma tendência no aumento de sítios de glicosilação associado com as amostras agrupadas como baixo potencial neutralizante. Estes resultados indicam que epítomos específicos podem interferir na indução da potência da resposta neutralizante e que uma única substituição de aminoácido na alça V3 pode levar a uma exposição conformacional distinta no domínio de associação ao trímero da gp120, o que afeta a sensibilidade aos anticorpos neutralizantes, tendo uma implicação significativa para a concepção de uma vacina.

## **Delineamento metodológico - (Documento 2)**



**Figura 15: Delineamento metodológico do documento 2**

#### 4.1 Metodologia

**Casuística:** Foram selecionados pacientes em acompanhamento no hospital Evandro Chagas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ), as amostras foram coletadas entre 2009 e 2015. Os critérios de inclusão foram a presença de carga viral detectável, contagem de células T CD4<sup>+</sup> acima de 500 células/ $\mu$ L e com diagnóstico positivo para HIV-1 com aproximadamente 5 anos. Nós selecionamos 15 indivíduos infectados pelo HIV-1 dos subtipos B, variante B/Bbr, C ou F1 que foram previamente subtipados com base na sequência C2-V3 do gene do envelope (*env*). Algumas das amostras do subtipo C foram provenientes do estado de Santa Catarina e coletadas em 2009 durante estudos prévios do Laboratório de Aids. Todos os protocolos deste estudo foram realizados de acordo com os as diretrizes da comissão de biossegurança (CQB: 105/99) e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Oswaldo Cruz (CAAE: 01080112.4.0000.5248). O termo de consentimento livre e esclarecido segue em anexo.

**Amostras Biológicas:** O sangue total obtido foi centrifugado a 400 x g e o plasma foi separado, aliquotado e armazenado a -70° C, para posterior utilização no ensaio de neutralização. A extração do DNA proviral foi realizada a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pelo método cromatográfico (colunas de sílica), utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), após o procedimento as mesmas foram armazenadas a -20°C.

**Sequenciamento de DNA:** O gene do envelope foi amplificado a partir de PBMC pelo método de reação em cadeia da polimerase – *touchdown* (TD-PCR) <sup>174</sup>, a fim de aumentar a especificidade dos iniciadores, nas seguintes condições: 94°C×2' por um ciclo; 94°C×30", 64°C×45" (decréscimo de 0.2°C por ciclo) e 68°C×2' por 20 ciclos; 94°C×30", 60°C×45", 68°C×2' por 20 ciclos e extensão final de 68°C×10'. Em formato de *nested*-PCR usando DNA polymerase Platinun® Taq High Fidelity (Thermo-Fisher, EUA) com iniciadores externos BC1s (AGAAATGGAGCCAGTAGATC)/*env*M e internos *env*Atopo e



*envM*<sup>175</sup>. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v.3.1 com sequenciador automático ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

**Análise das sequências de DNA:** A visualização e edição dos cromatogramas foi realizada com a utilização do programa *SeqMan* do pacote *DNASTAR Lasergene* (Madison, EUA). As sequências de nucleotídeos/aminoácidos foram inicialmente alinhadas utilizando o programa *ClustalW* contido no programa *Mega 6*<sup>176</sup> (Madison, EUA). O arquivo Fasta foi realinhado com a sequência do isolado HXB2 utilizando a ferramenta *Gene Cutter* do banco de dados de *Los Alamos National Laboratory* (LANL). Para a análise filogenética das amostras utilizaremos o método de *Neighbor-Joining* do programa *Mega 6* (Madison, EUA). Todas sequências foram inspecionadas quanto a possível recombinação pelo programa *REGA HIV-1 subtyping*<sup>177</sup>. Para os cálculos de distância entre pares do gene *env* (divergência genética), utilizamos o método de Tamura-Nei, com bootstrap de 1000 replicatas com distribuição Gamma e parâmetro de 0,5 com deleção parcial dos *gaps*, no programa *Mega 6* (Madison, EUA).

**Análise das características da proteína Env:** Para avaliar as características de Env utilizamos os programas contidos no site de LANL (<http://www.hiv.lanl.gov>): *Variable Region Characteristics* e *N-linked glycosylation sites (PNLG)*<sup>178</sup>, o primeiro nos informou o número de aminoácidos de cada região variável e o segundo o número de sítios de glicosilação de Env. O Programa CATNAP<sup>179</sup> foi utilizado para facilitar a análise dos anticorpos neutralizantes (nAbs) monoclonais. Também utilizamos o programa VESPA (*viral epidemiology signature pattern analysis*) para identificar os possíveis padrões de assinaturas.

Para modelagem molecular da alça V3 foi utilizada como base comparativa a estrutura 4M1D (HIGPGR)<sup>131</sup>. O modelo da alça com o HIGWGR e RIGPGQ foi realizado no programa SPDBViewer<sup>180</sup>. Para a otimização foram executados 50 passos com o método *Steepest Descent*, mais 50 de Gradiente conjugado e mais uma etapa de *Steepest Descent* que convergiu em 27 passos

para uma diferença de energia total de menos de 0.05kJ/mol. Para o cálculo do potencial eletrostático e da superfície foi utilizado o programa GRASP2<sup>181</sup> com fator dielétrico interno de 2.0 e externo de 80.0 com condição de contorno ajustada para “Coulombic”, a metodologia foi realizada por Luciano Pinho Gomes, tecnologista do Laboratório Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – IOC/Fiocruz.

O Programa *Bepipred Linear Epitope* que encontra-se disponível no site: <http://www.cbs.dtu.dk/>, do *Center for Biological Sequence Analysis* (Dinamarca) e utiliza como base o modelo estatístico *Hidden Markov* foi utilizado para análise preditiva de epítomos lineares de células B<sup>182</sup>, utilizando os seguintes parâmetros: limite de 0.90 para cada resíduo, 0.25 de sensibilidade e 0.91 de especificidade

**Banco de sequências de DNA do gene *env*:** As 51 sequências do gene *env* do HIV-1 obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank com a identificação: KX181891 até KX181941, segue em anexo a lista com a identificação de cada sequência contendo ano e procedência da coleta.

**Pseudovírus (psV):** O psVB (Rhpa4259) e psVC (CAP210.08) foram selecionados a partir do painel internacional de neutralização do NIH, com base na menor distância genética entre o gene *env* do painel e dos isolados de HIV-1 do Brasil. O plasmídeo com o gene *env* obtido do vírus da leucemia murina (MuLV) foi montado com o plasmídeo pSG3Δ*env* e utilizado como controle negativo. Para produzir os psV F1 e B/Bbr foram geradas sequências consenso obtidas a partir das sequências provirais do HIV-1 B/Bbr (psVGWGR) e F1 geradas neste estudo. O psVGPGR possui a mesma sequência de Env do psVGWGR, contudo este apresenta uma troca de aminoácido inserida por mutagênese sítio dirigida de um triptofano por uma prolina no topo de alça V3. As sequências consensos foram geradas utilizando o programa DamBe (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>) e otimizadas através do algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®), de acordo com parâmetros como *codon usage* (estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo GC, motivos repetitivos de DNA), com o intuito de aumentar a expressão

proteica. As sequências de DNA otimizadas foram enviadas para síntese comercial pela Genscript™ (Piscataway, EUA) e clonadas no vetor de expressão eucariótico pcDNA3.1DV5-His TOPO TA (Thermo-Fisher Scientific, EUA). Os plasmídeos foram expandidos em *E. coli* Top10, extraídos utilizando o kit de extração Wizard Plus Miniprep DNA purification Systems (Promega, EUA) e quantificados em espectrofotômetro Nanodrop (Wilmington, EUA).

Os estoques virais foram produzidos por transfecção em células 293T/17 (ATCC, EUA) após confluência de 70% em garrafas de cultura T75, com 4 µg do plasmídeo de HIV-1 *rev/env* e 10 µg do pSG3ΔEnv. Para o ensaio de transfecção, 50 µL do reagente P3000 e 35 µL de Lipofectamine 3000 (Lipofectamine® 3000 reagent, Thermo-Fischer Scientific, EUA) foram utilizados em 715 µL de meio de cultura celular Opti-MEM® *Reduce Serum Medium*, após essa otimização seguiu-se com os procedimentos de acordo com as recomendações do fabricante. Os psVs contidos no sobrenadante da cultura celular foram coletados filtrados e armazenados a -80°C. O ensaio de transfecção com o reagente Lipofectamine foi estabelecido por apresentar um melhor rendimento em comparação com o reagente Fugene 6 utilizado no documento 1 (dados não apresentados).

Para a caracterização fenotípica dos psVs produzidos e controle do ensaio utilizamos os anticorpos monoclonais 2F5, 2G12, CH01, 447-D e o inibidor sCD4 com concentração final de 10 µg/mL em triplicata e realizamos o ensaio de neutralização segundo as condições descritas abaixo, substituindo a presença dos plasmas por estes inibidores no ensaio de fenotipagem dos psV.

**Teste da infectividade dos pseudovírus (TCID<sub>50</sub>%) em TZM-bl:** O teste foi realizado para os psVB, psVC, psVGWGR e psVGPGR, segundo descrito na metodologia do documento 1, página 54.

**Ensaio de neutralização em células TZM-bl:** Para o teste de avaliação da resposta imune humoral, todos os plasmas foram inicialmente inativados a 56°C por 60 minutos, posteriormente, 8 diluições seriadas fator 3 foram incubadas com cada psV (200TCID<sub>50</sub>) e com células TZM-bl (o ensaio foi realizado da mesma forma que descrito no documento 1, aumentando apenas o

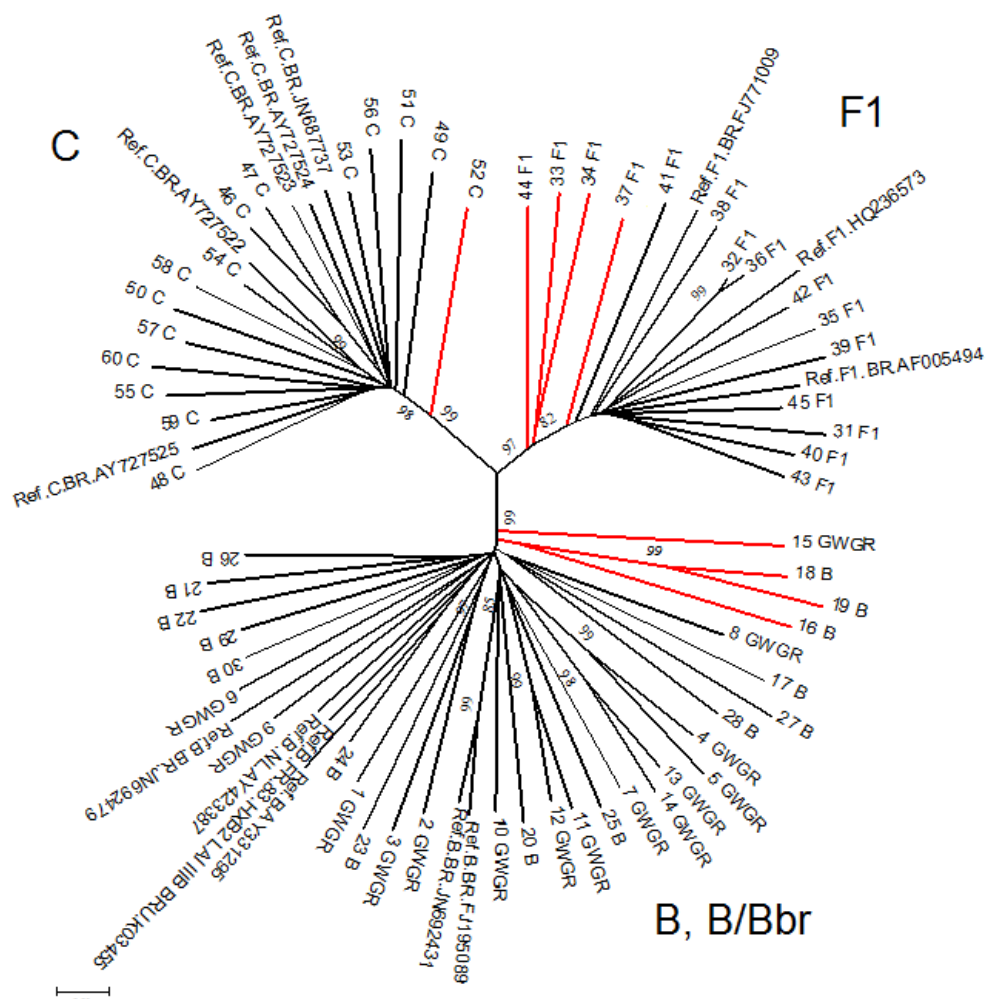
número de diluições de 5 para 8). A inibição da infecção foi detectada utilizando o kit Britelite Plus (PerkinElmer, EUA) e calculado por subtração da média entre os controles positivos (psV + TZM-bl). Utilizamos plasmas normal humano como controle negativo para determinar a capacidade do ensaio em discriminar a neutralização por anticorpos de neutralização por artefatos do plasma. A diluição do plasma onde ocorreu 50% da inibição viral, foi determinada pelo cálculo da regressão linear pelo programa Excel Macro “Measurement of Neutralization Titers”, disponível no banco de dados de Los Alamos e os valores foram apresentados como recíproca da diluição, como previamente descrito <sup>146</sup>.

**Análise estatística:** Para verificar se existia diferença estatística entre as médias geométricas de sensibilidade (GMS) de cada psV e para diferenças entre títulos de neutralização entre cada grupo de amostras de plasma usamos o teste One-way ANOVA com correção de *Bonferroni's multiple comparisons test*. Para avaliar as diferenças no tamanho das regiões variáveis e número de sítios de glicosilação de Env entre os diferentes subtipos e entre as faixas de neutralização utilizamos o teste One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's.

## 4.2 Resultados

### Diversidade genética

Das 60 sequências do gene *env* do HIV-1 que foram classificadas de acordo com o agrupamento filogenético verificamos que 51 amostras eram pertencentes a subtipos únicos, sendo 26 do subtipo B (destes 13 B/Bbr), 11 F1 e 14 C. Na figura 16 podemos observar a árvore filogenética destas com as sequências de referências obtidas do banco de Los Alamos e em vermelho as amostras que foram excluídas das demais análises por apresentarem perfil recombinante. As sequências 32 e 36 do subtipo F1 apresentaram elevado grau de similaridade e com o acesso aos prontuários médicos foi possível evidenciar um possível caso de transmissão sexual entre estes indivíduos infectados pelo HIV-1.



**Figura 16: Árvore filogenética do gene *env* do HIV-1.**

A árvore foi gerada pelo método de *Neighbor-Joining*, com sequências do gene *env* do estudo e sequências de referências (Ref) do HIV-1 (2574-nt), para a análise utilizamos 1000 replicatas de bootstrap. Os ramos discriminados em vermelho são referentes as amostras recombinantes (determinadas utilizando o programa *REGA HIV-1 subtyping*) e excluídas das demais análises do estudo.

Realizamos a matriz de distância genética entre as 51 sequências de nucleotídeos do gene *env* e observamos uma menor divergência genética (19%) entre o subtipo B e a variante B/Bbr do HIV-1 e maior divergência (34%) entre C e B/Bbr (tabela 4), corroborando com a figura 16 onde observamos o agrupamento das sequências *env* do subtipo B e da variante B/Bbr em único ramo. Também observamos que a variante B/Bbr possui 1% de distância a mais que o subtipo B quando correlacionada com os outros subtipos (tabela 4), indicando que essa variante B/Bbr possui outras assinaturas genéticas que não apenas a substituição da prolina pelo triptofano. Comparamos e inspecionamos o alinhamento de Env entre as sequências de B e B/Bbr e observamos algumas

trocas de aminoácidos em posições específicas. Portanto, selecionamos as posições em que o aminoácido com frequência de 50% ou superior, foi substituído por outro que não fosse o segundo de maior frequência. Desta forma, identificamos as seguintes frequências relevantes entre as trocas aminoácidos de B e B/Bbr por posição no alinhamento: <sup>(66%)</sup> G186E <sup>(57%)</sup>, <sup>(75%)</sup> S198G <sup>(71%)</sup>, <sup>(50%)</sup> I358L/M <sup>(50%)</sup>, <sup>(100%)</sup> P360W <sup>(100%)</sup> (figura suplementar). Além destas substituições verificamos que outros fatores também contribuem para a divergência genética entre B e a variante B/Bbr como as inserções e deleções detectadas em sequências individuais específicas e mutações sinônimas.

**Tabela 4: Distância genética inter subtipo do HIV-1 no gene *env***

Subtipos do HIV-1	Distância genética
B - B/Bbr	19%
B - F1	31%
B – C	33%
F1 – C	32%
F1 – B/Bbr	32%
C – B/Bbr	34%

Após a aquisição e inspeção das sequências de *env*, com o objetivo de selecionar os psVs dos subtipos B e C do painel internacional de neutralização que tivessem sequência mais próxima geneticamente das sequências de HIV-1 B e C do Brasil. Para tanto, alinhamos as sequências desses psVs frente as sequências consenso *env* obtidas para cada subtipo do HIV-1 deste estudo. As matrizes de distância genética geradas a partir destes alinhamentos estão apresentadas na figura 17 A e B. Na Figura 17 A estão representados os valores referentes ao consenso C frente aos psVs C, onde encontra-se destacado o psV com menor distância genética do consenso C (0,13), ou seja, uma distância de 13% do HIV-1 subtipo C do Brasil com a sequência do psV CAP210. Já na figura B, estão representados os valores referentes ao consenso B frente aos psVs B, e a menor distância genética do consenso B foi verificada para o psV Rhpa4259 (0,06, ou seja 6%).

**A**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. DU156PSV		0.0120	0.0150	0.0151	0.0151	0.0152	0.0142	0.0146	0.0165	0.0168	0.0124	0.0159	0.0139
2. DU144PSV	0.1303		0.0140	0.0141	0.0151	0.0146	0.0136	0.0144	0.0161	0.0155	0.0131	0.0148	0.0131
3. DU172PSV	0.1918	0.1724		0.0142	0.0141	0.0155	0.0147	0.0147	0.0151	0.0154	0.0154	0.0146	0.0130
4. ZM197MPSV	0.1964	0.1650	0.1680		0.0152	0.0152	0.0144	0.0153	0.0153	0.0154	0.0152	0.0158	0.0134
5. ZM214MPSV	0.1964	0.1858	0.1724	0.1843		0.0148	0.0148	0.0148	0.0166	0.0159	0.0157	0.0152	0.0140
6. ZM233MPSV	0.1888	0.1709	0.1828	0.1621	0.1635		0.0144	0.0149	0.0167	0.0167	0.0158	0.0153	0.0149
7. ZM249MPSV	0.1873	0.1709	0.1813	0.1798	0.1858	0.1680		0.0140	0.0156	0.0159	0.0143	0.0161	0.0134
8. ZM53M.PB12PSV	0.1828	0.1680	0.1724	0.1769	0.1709	0.1739	0.1680		0.0157	0.0159	0.0144	0.0161	0.0131
9. ZM109F.PB4PSV	0.2101	0.1994	0.1888	0.1754	0.2055	0.2009	0.2025	0.1873		0.0168	0.0165	0.0160	0.0148
10. ZM139M.PL10aPSV	0.1979	0.1873	0.1918	0.1843	0.1979	0.1934	0.1934	0.1858	0.2055		0.0158	0.0166	0.0143
11. CAP45.2.00.G3PSV	0.1289	0.1332	0.1873	0.1724	0.1934	0.1843	0.1754	0.1680	0.1858	0.1798		0.0148	0.0143
12. CAP210.2.00.E8	0.2071	0.1843	0.1769	0.1888	0.1783	0.1843	0.1964	0.1934	0.2040	0.2040	0.1798		0.0133
13. consenso C	0.1665	0.1475	0.1403	0.1475	0.1577	0.1606	0.1635	0.1375	0.1635	0.1562	0.1635	0.1303	

**B**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. PsV HIV-1 isolate CAAN		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2. PsV HIV-1 isolate WITO	0.12		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3. PsV HIV-1 isolate TRJO	0.13	0.14		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4. PsV HIV-1 isolate REJO	0.12	0.13	0.12		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5. PsV HIV-1 isolate THRO	0.13	0.14	0.14	0.14		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6. PsV HIV-1 isolate TRO	0.12	0.12	0.12	0.12	0.14		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
7. PsV HIV-1 isolate AC10	0.12	0.13	0.13	0.12	0.14	0.12		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
8. PsV HIV-1 isolate PVD	0.12	0.12	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12		0.01	0.01	0.01	0.01
9. PsV HIV-1 isolate RHPA	0.11	0.11	0.11	0.11	0.13	0.10	0.11	0.10		0.01	0.01	0.01
10. PsV HIV-1 isolate SC42	0.12	0.13	0.14	0.12	0.16	0.12	0.12	0.12	0.11		0.01	0.01
11. PsV HIV-1 isolate QH0692	0.12	0.12	0.14	0.13	0.15	0.12	0.13	0.11	0.11	0.11		0.01
12. consenso B	0.08	0.09	0.09	0.09	0.11	0.08	0.09	0.09	0.06	0.09	0.08	

**Figura 17 Distância genética entre as sequências consensos de env C e B de isolados do Brasil e os pseudovírus do painel internacional.**

**A:** pseudovírus subtipo C e consenso C brasileiro, indicando a amostra 12 (sombreado em azul) como menos divergente. **B:** pseudovírus B e consenso B brasileiro, indicando a amostra 9 (sombreado em azul) como a amostra menos divergente. Os valores apresentados em azul são referentes ao desvio padrão.

### Fenótipo de neutralização dos pseudovírus

Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente os pseudovírus consensos (psVGWGR, psVGPGR, psVF1) avaliamos juntamente os psVs do painel psV CAP210 e psV RHPA, neste estudo denominados como psVC e psVB, respectivamente. A caracterização destes serviu como controle do nosso ensaio, visto que para estes, esta caracterização já foi realizada em outros estudos<sup>146183</sup>. Neste ensaio de neutralização com anticorpos monoclonais (mAb) e inibidor solúvel CD4 (sCD4) observamos que a média geométrica da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi menor para os psVs consensos do que para os obtidos a partir de isolados (psVB e psVC). Observamos também que os psVs consensos foram inibidos por todos os mAb e sCD4 (tabela 5). O mAb 2F5, foi capaz de neutralizar a maioria dos psVs, com exceção do psVC. O anticorpo 2G12 e o

447-D foram capazes de inibir apenas os psVs consensos, enquanto que o CH01 inibiu os psVs consensos e o psVC, na concentração de até 10 µg/mL. O inibidor sCD4 foi o mais potente inibindo todos os psVs, sendo que a concentração mais alta para a inibição foi de 3,7 µg/mL para o psVB.

**Tabela 5: Caracterização fenotípica dos pseudovírus:**

	Média IC <sub>50</sub> em TZM-bl (µg/mL)				
	2F5	2G12	447_D	CH01	sCD4
psVF1	0.1	0.06	0.01	0.05	1.09
psVGPGR	3.5	6.7	2.15	8.7	1.24
psVGWGR	4	3.05	8.72	3.3	0.15
psVB	9.9	>10	>10	>10	3.7
psVC	>10	>10	>10	3.2	1.9
GM do detectado	1.92	1.07	0.57	1.46	1.04
GM para todos	4.24	6.57	4.51	3.40	1.04
% de detectados	80%	60%	60%	80%	100%

● ≤0.625 (1st Quartil) ● ≤3.000 (2nd Q.) ● ≤3.750 (3rd Q.) ● >3.750 ○ não detectado

Média da concentração inibitória 50 (IC<sub>50</sub>) e a Média Geométrica (GM) do ensaio em triplicata. Os resultados foram inseridos no programa CATNAP (<http://hiv.lanl.gov/catnap>). A faixa de potência está sombreada por cor, com a cor branca representando a não neutralização de 50% dos pseudovírus com 10 µg/mL de mAb. O verde representa fraca inibição, o amarelo para o laranja moderada neutralização e vermelho representando forte neutralização. O psV MuLV foi testado como controle negativo e o valor de IC<sub>50</sub> não foi detectado.

### **Análise da amplitude e potência da neutralização por anticorpos em relação aos subtipos do HIV-1**

A potência dos nAbs para inibir os psVs foi exibida de acordo com a magnitude de sua resposta, sendo estas agrupadas de acordo com sua média geométrica de título (GMT) ID<sub>50</sub>. Deste modo, as amostras que apresentaram a faixa de 20 a 99 GMT foram agrupadas como baixo potencial de neutralização, amostras com 100-999 GMT como potencial moderado e amostras com GMT acima de 1000, como alto potencial de neutralização. Foram considerados como neutralizadores de elite as amostras que obtiveram a capacidade de neutralizar os pseudovírus de subtipos distintos a um título igual ou acima de 300, conforme



definido por Simek, *et. al.*, (2009) <sup>184</sup>. Das 51 amostras de plasma analisadas, 16 (31,4%) foram classificados com baixo potencial, 19 (37,2%) com potencial moderado e 16 (31,4%) com elevado potencial de neutralização (tabela 6). Tomados em conjunto, quase todos os 51 indivíduos exibiram resposta neutralizante, apenas 18 indivíduos não tiveram nAb contra um ou dois psVs (amostras: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 25, 38, 43, 46, 47, 48, 49, 50, 53). Nenhuma atividade significativa de nAb foi observada quando os plasmas foram testados contra os controles negativo (psV MuLV e utilizando plasma normal humano).

Quando analisamos os subtipos do HIV-1 que induziram a resposta imune humoral observamos que as amostras de plasma F1 e B foram mais frequentes nas faixas de neutralização alta ou moderada (figura 18). Comparando a média geométrica entre os grupos de subtipos verificamos que as amostras de plasma do subtipo F1 e da variante B/Bbr apresentaram diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ), como para as amostras de plasma subtipos B e C ( $p < 0,05$ ). Assim, observamos um potencial de neutralização associado ao subtipo do HIV-1, indicando propriedades imunogênicas distintas induzidas pela infecção crônica do HIV-1 nestes distintos subtipos (tabela 7).

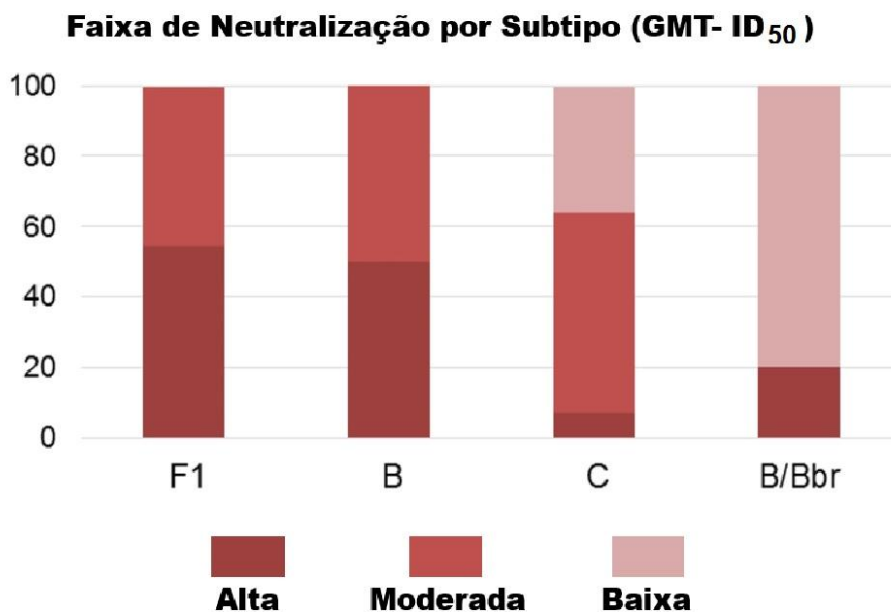
Comparando a média geométrica dos títulos das amostras B (1605) e B/Bbr (144) verificamos que os nAb induzidos pelo HIV-1 B apresentaram uma média 11 vezes maior do que B/Bbr ( $p < 0,001$ ) indicando que os indivíduos infectados pelo HIV-1B teriam uma melhor resposta neutralizante do que os indivíduos infectados pelo HIV-1 B/Bbr, embora a distância genética entre a variante e o subtipo tenha sido pequena (19%).

**Tabela 6: Atividade neutralizante das amostras de plasma B, B/Bbr, C e F1 contra os psVs.**

Amostra (subtipo)	Recíproca da diluição do título de neutralização					GMT
	ID <sub>50</sub> contra os pseudovirus (subtipo)					
	psVGWGR (B/Bbr)	CAP210.08 (C)	psVF1 (F1)	psVGPGR (B)	Prhpa 42597 (B)	
17 (B)	6250	43740	43740	6250	43740	20085
23 (B)	43740	13898	9739	3704	43740	15717
22 (B)	6250	31075	12417	6250	5813	9739
14 (B/Bbr)	6250	5260	11589	3984	20866	7946
13 (B/Bbr)	6000	2217	12824	4525	17893	6731
32 (F1)	6250	2382	6372	3953	8284	4994
28 (B)	6250	1462	1926	6250	12220	4224
31 (F1)	56180	1430	6631	2273	1000	4136
42 (F1)	6250	10844	3215	3623	1000	3797
30 (B)	2545	2953	1940	2618	4488	2797
12 (B/Bbr)	13106	2104	746	4854	1134	2575
35 (F1)	5025	3486	11252	60	2182	1916
21 (B)	3472	8492	30	4545	5728	1873
40 (F1)	20	24450	41283	20	43740	1776
56 (C)	2778	523	3007	3378	185	1222
38 (F1)	70423	273	3003	4000	10	1182
27 (B)	3472	165	5420	4545	44	909
26 (B)	16000	702	109	276	1562	880
24 (B)	1055	356	97	730	2061	559
41 (F1)	119	1726	103	1444	1388	531
29 (B)	1250	197	2313	258	151	467
58 (C)	207	5691	749	71	115	373
55 (C)	6250	1073	47	237	61	340
39 (F1)	98	7636	42	33	1397	271
60 (C)	847	2626	109	55	40	222
25 (B)	352	2104	52	256	10	158
53 (C)	3831	1007	96	20	10	149
54 (C)	3497	122	58	116	20	142
20 (B)	110	20	83	43	4777	130
59 (C)	495	586	57	64	25	121
43 (F1)	305	1602	10	115	37	116
45 (F1)	280	68	33	253	126	115
48 (C)	621	55	1945	20	10	106
49 (C)	293	547	84	94	10	105
36 (F1)	85	20	216	363	88	103
6 (B/Bbr)	168	865	10	92	59	95
9 (B/Bbr)	12870	10	10	100	37	86
7 (B/Bbr)	83	20	1654	63	20	81
50 (C)	2500	10	95	38	20	71
10 (B/Bbr)	1044	324	10	52	10	71
8 (B/Bbr)	341	30	118	57	20	67
11 (B/Bbr)	134	430	10	228	10	67
46 (C)	2932	36	48	25	10	66
57 (C)	138	546	20	20	20	57
2 (B/Bbr)	104	407	10	83	10	51
3 (B/Bbr)	39	818	10	28	22	46
47 (C)	350	10	119	45	10	45
51 (C)	20	52	110	20	45	40
5 (B/Bbr)	67	81	10	10	54	31
4 (B/Bbr)	20	488	10	20	10	29
1 (B/Bbr)	10	169	33	32	10	28
GMS	886	572	258	238	185	

Legenda: <1000 999-100 99-20 <20

\*As amostras de plasmas dos indivíduos HIV-1 positivos do subtipo B, B/Bbr, C ou F1 apresentaram distintos perfis de atividade neutralizante contra os pseudovírus. Nas colunas encontram-se o resultado da recíproca da diluição capaz de inibir 50% da infecção pelo pseudovírus. A tabela foi apresentada como mapa de calor indicado conforme a legenda. Os valores abaixo de 20 (negativos) foram considerados como 10 para os cálculos de média geométrica de títulos (GMT) e de sensibilidade (GMS).

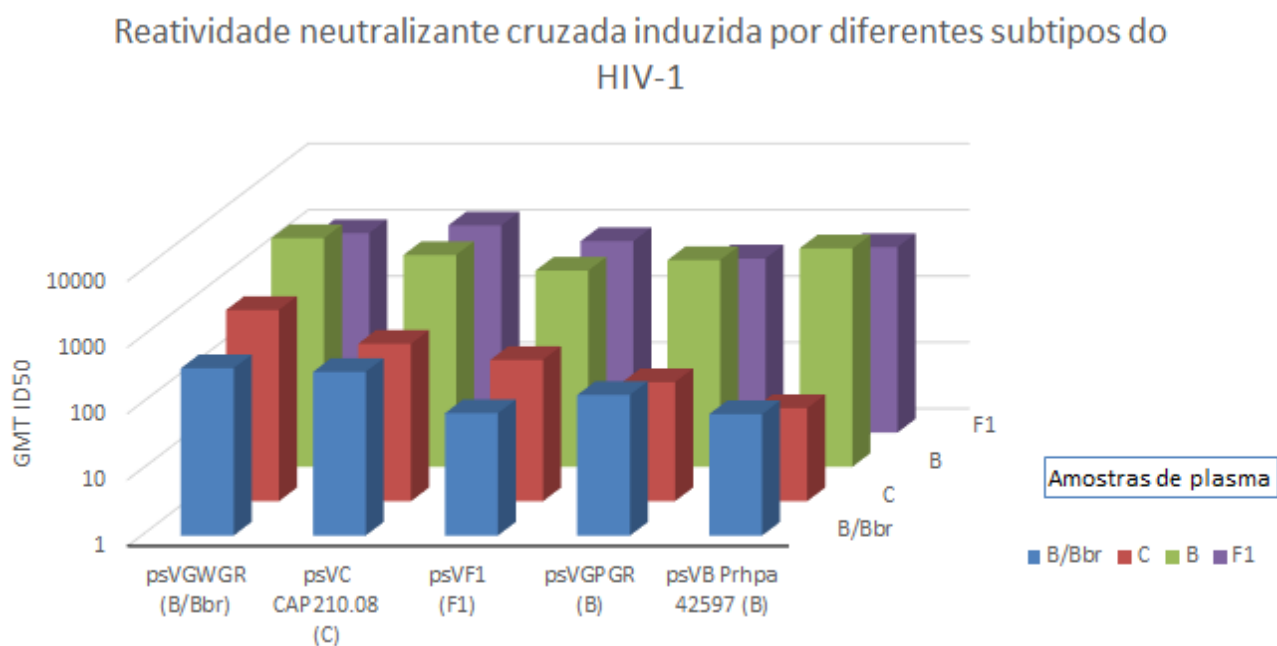


**Figura 18: Faixa de neutralização por subtipo.** As barras representam a contribuição de cada faixa de neutralização dentro de cada subtipo do HIV-1.

**Tabela 7: Média geométrica de títulos (GMT) dos anticorpos neutralizantes frente aos pseudovírus.**

	Amostras de plasmas			
	GMT B	GMT F	GMT C	GMT B/Bbr
psVGWGR	2833	1025	771	335
psVC	1577	1338	238	296
psVB	1977	631	25	68
psVF1	914	772	136	70
psVGPGR	1320	424	63	132
GMT	1605	777	180	144

Além das amostras de plasma B e F1 apresentarem maior potência neutralizante elas foram capazes de neutralizar todos os psVs, apresentando uma amplitude de resposta cruzada. Enquanto que as amostras de plasma do subtipo C e B/Bbr também apresentaram resposta cruzada, no entanto com menor magnitude (figura 19 e tabela 7). Esperávamos que os grupos de plasmas B, B/Bbr, C e F1 fossem mais potentes em neutralizar o pseudovírus do mesmo subtipo, devido sua menor distância genética em relação ao vírus indutor da resposta, porém observamos que apenas as amostras de plasmas B/Bbr obtiveram este perfil. As amostras de plasma C e B apresentaram uma maior capacidade em neutralizar o psVGWGR e em segundo grau o psV correspondente ao mesmo subtipo. As amostras F1 apresentaram anticorpos que neutralizaram preferencialmente o psVC, seguido do psVGWGR (figura 19).



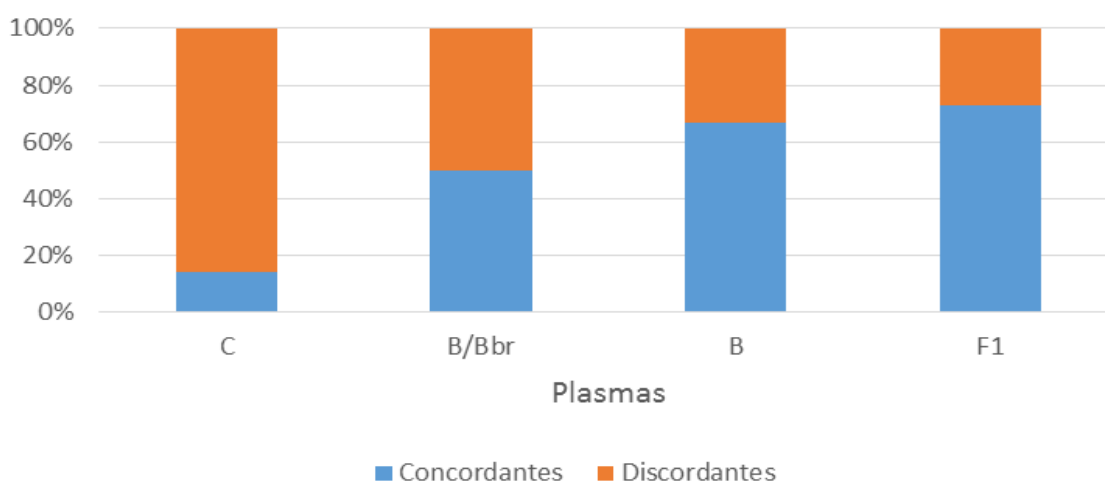
**Figura 19: Reatividade neutralizante cruzada induzida por diferentes subtipos do HIV-1.**

Análise gráfica que evidencia a capacidade dos anticorpos neutralizantes presentes no plasma em neutralizar os pseudovírus de diferentes subtipos. Figura de apoio à tabela 6.

A respeito do perfil de susceptibilidade dos psVs, o psVGWGR foi o mais suscetível com GMS de 886, subseqüentemente o psVC apresentou uma GMS de 575, quase o dobro da suscetibilidade verificada para os psVF1 (258), psVGPGR (238) e psVB (185) (tabela 6). O psVGWGR também apresentou

distinta sensibilidade quando comparado com o psVB e com o psVGPGR. O psVGWGR foi inibido com uma maior frequência e por plasmas mais diluídos, por exemplo, os anticorpos presentes na amostra 31F foram capazes de reduzir 50% da infecção na diluição de 1:56.180 (13,5 vezes acima da GMT). Portanto, o psVGWGR apresentou em geral uma reatividade maior, sendo semelhante aos psVs *tier* 1, do painel de neutralização, dentre as 51 amostras apenas uma (1 B/Bbr) não apresentou anticorpos com capacidade de inibir o psVGWGR.

Afim de avaliar o impacto da substituição do triptofano para a prolina comparamos os resultados de neutralização entre os psVGWGR e psVGPGR. Avaliamos o índice de dissonância entre as faixas de neutralização, ou seja, aferimos se cada amostra de plasma permanecia na mesma faixa de potência frente cada um destes dois pseudovírus (figura 20). Observamos que para o grupo de plasma F1 houve 28% de dissonância entre a faixas de potência dos nAbs, para as amostras B 34%, para as amostras B/Bbr 50% e para as amostras C 86%. Isso indica a presença de anticorpos específicos para a região do V3 nas amostras com dissonância entre as faixas de neutralização. Também verificamos que as amostras de plasma C, embora tenham apresentado baixos títulos de neutralização, apresentaram anticorpos mais específicos para o V3 e com maior preferência ao epítipo GWGR do que para GPGR (figura 19 e 20).



**Figura 20: Dissonância entre as faixas de neutralização para os pseudovírus GWGR e pseudovírus GPGR.**

Os títulos de neutralização foram separados por grupos de subtipos e quantificados quanto a porcentagem de amostras que permaneciam ou não com a mesma faixa de neutralização para os dois psV.

## **Análise dos potenciais sítios de glicosilação (PNLG) e das regiões variáveis do HIV-1 subtipos B, B/Bbr, F1 e C**

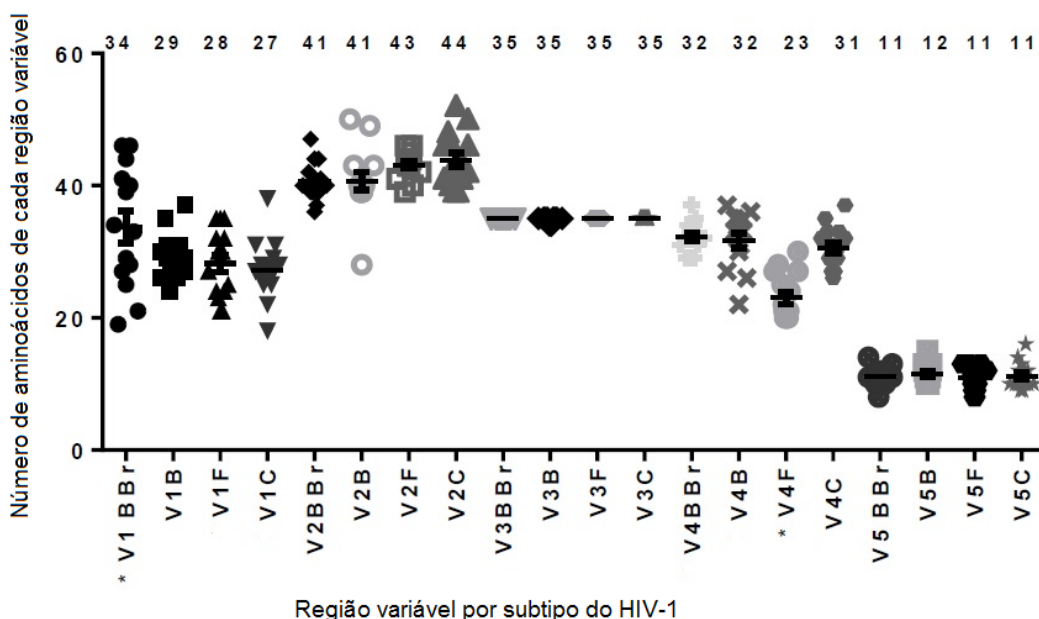
Foi avaliada a correlação entre as características na proteína Env do HIV-1 (sítios de glicosilação e tamanho das regiões variáveis) de acordo com os subtipos e com a potência de neutralização. Com relação aos sítios de glicosilação na gp120 verificamos que o subtipo B/Bbr apresentou uma média de 26,5 potenciais sítios de glicosilação, seguido do subtipo B e F1 com 26 sítios e o subtipo C o qual apresentou 24.5 sítios em média. Não observamos correlação estatística entre o número de sítios de glicosilação e as faixas de potência neutralizante. Como podemos observar, na tabela 8, a variação da média entre as amostras foi de +/- 1 sítio de glicosilação para a gp120 e quando observamos a gp41, apenas a média do F1 diferiu das demais. O número total de sítios de glicosilação para as sequências de *env* indutoras de baixos títulos de neutralização foi de 504 sítios e para alto título de neutralização foi 489 sítios.

**Tabela 6: Número de potenciais sítios de N-glicosilação (PNLG) do envelope viral dos subtipos F1, B, B/Bbr, C e quando agrupados por faixa de neutralização.**

Grupo	Número de PNLG					
	Gp120		Gp41		Gp160 (total)	
	Min-Max	Média	Min-Max	Média	Min-Max	Média
Alto nAb	21 – 30	25.5	3 - 6	4.5	25 – 36	30.5
Baixo nAb	22 – 30	26.0	3 - 5	4.0	27 – 35	31.0
F1	21 – 31	26.0	4 - 7	5.5	25 – 38	31.5
B	22 – 30	26.0	3 - 5	4.0	26 – 35	30.5
B/Bbr	23 – 30	26.5	3 - 5	4.0	27 – 35	31.0
C	20 – 29	24.5	4 - 5	4.5	24 – 32	28.0

Na análise do tamanho das regiões variáveis da gp120 (alças expostas) em relação ao subtipo (figura 21) observamos uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos o tamanho da região variável (V1) da variante B/Bbr em relação aos subtipos F1 e C ( $p < 0,005$ ) do HIV-1, em média o tamanho dessa alça variou de 27 aminoácidos a 34 entre os subtipos. A região V2 apresentou um tamanho de 41 a 44 aminoácidos. A região V3 não variou apresentando 35 aminoácidos para todos subtipos estudados. Em relação ao

V4, seu tamanho foi de 23 a 32 aminoácidos, de modo que para esta região o subtipo F1 também teve uma média estatisticamente significativa em relação aos outros subtipos ( $p < 0,005$ ). Por fim, a região V5 apresentou entre 11 e 12 aminoácidos em seu comprimento, com pouca variação entre os subtipos.



**Figura 21: Comparação do tamanho das regiões variáveis por subtipo do HIV-1 (B, B/Bbr, F1 e C).**

Os valores acima do gráfico na horizontal representam a média do tamanho de cada região variável para cada coluna. Os asteriscos indicam as médias que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,005$ ) tanto para V1 como para V4.

Em relação aos pseudovírus também analisamos o tamanho das alças variáveis e o número de sítios de glicosilação, como visto na tabela 7. Para os psVB, psVGWGR e psVGPGR o número total de aminoácidos da gp160 foi de 855, sendo que os psVs consensos (GWGR/GPGR) apresentaram um maior número de sítios de glicosilação na gp120 (V1, V4 e V5) e na gp41, do que o psVB do painel internacional de neutralização. O psVC apresentou maior número de aminoácidos totalizando 866 e o psVF1 apresentou o menor número de aminoácidos. Em relação as regiões variáveis o psVC apresentou a menor alça V1, de acordo com as características de Env das amostras C. Contudo para os demais psVs essa relação não se reproduziu, uma vez que a média das amostras F1 foi de 28 e para o psVF1 a alça V1 apresentou 32 aminoácidos.

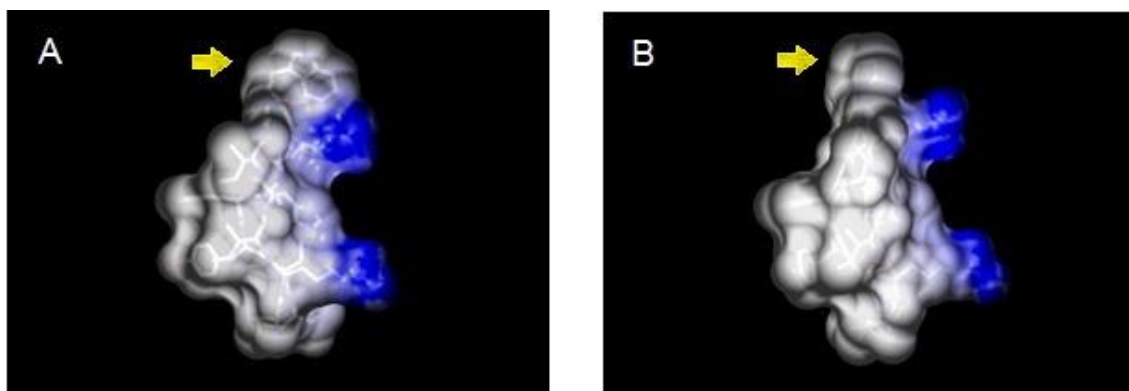
Desta forma verificamos que a média do número de aminoácidos de um grupo amostral não reflete o número de aminoácidos da sequência consenso. Isso pode ser explicado pela localização dos intervalos (*gaps*) inseridos no alinhamento.

Com relação ao número de sítios de glicosilação dos psVs, temos: psVF1 (31), psVGWGR (35), psVGPGR (35), enquanto que para psVB (29) e psVC (33) em Env.

**Tabela 7:** Características do envelope por número de aminoácidos (L) e sítios de glicosilação (N) das regiões variáveis (V) da gp120, gp41 e total (gp160) dos pseudovírus.

Pseudovirus	V1		V2		V3		V4		V5		Gp 120		Gp 41		Gp 160	
	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N
PSVB	23	2	45	3	35	1	34	5	9	0	509	25	346	4	855	29
PSVC	19	2	44	3	35	1	39	6	13	2	513	29	353	4	866	33
PSVF1	32	2	42	2	35	1	20	3	12	2	503	25	346	6	849	31
PSVGWGR/GPGR	30	3	39	3	35	1	31	6	10	1	509	30	346	5	855	35

Devido à grande diferença na sensibilidade entre o psVGWGR e psVGPGR, o mesmo padrão de glicosilação e o mesmo tamanho das regiões variáveis, podemos inferir, que a mudança conformacional derivada da troca de aminoácidos (triptofano por prolina) destes *env*-pseudovírus pode resultar numa melhor acessibilidade ao epítipo GWGR como pode ser observado na predição por modelagem estrutural comparativa das alças V3 da gp120 destes (figura 22).



**Figura 22:** Modelagem estrutural da superfície molecular da alça V3 da gp120, sendo em A representado o psVGWGR, com o motivo CRIHIGWGRAFYTC e em B o psVGPGR com o motivo CRIHIGPGRAFYTC.



A superfície molecular foi colorida de acordo com a sobreposição do potencial eletrostático. A cor azul indica a carga positiva e em branco os resíduos neutros. As setas em amarelo indicam a posição da substituição do aminoácido (W por P), evidenciando a diferença espacial entre estas estruturas.

### **Padrão de assinatura de neutralização**

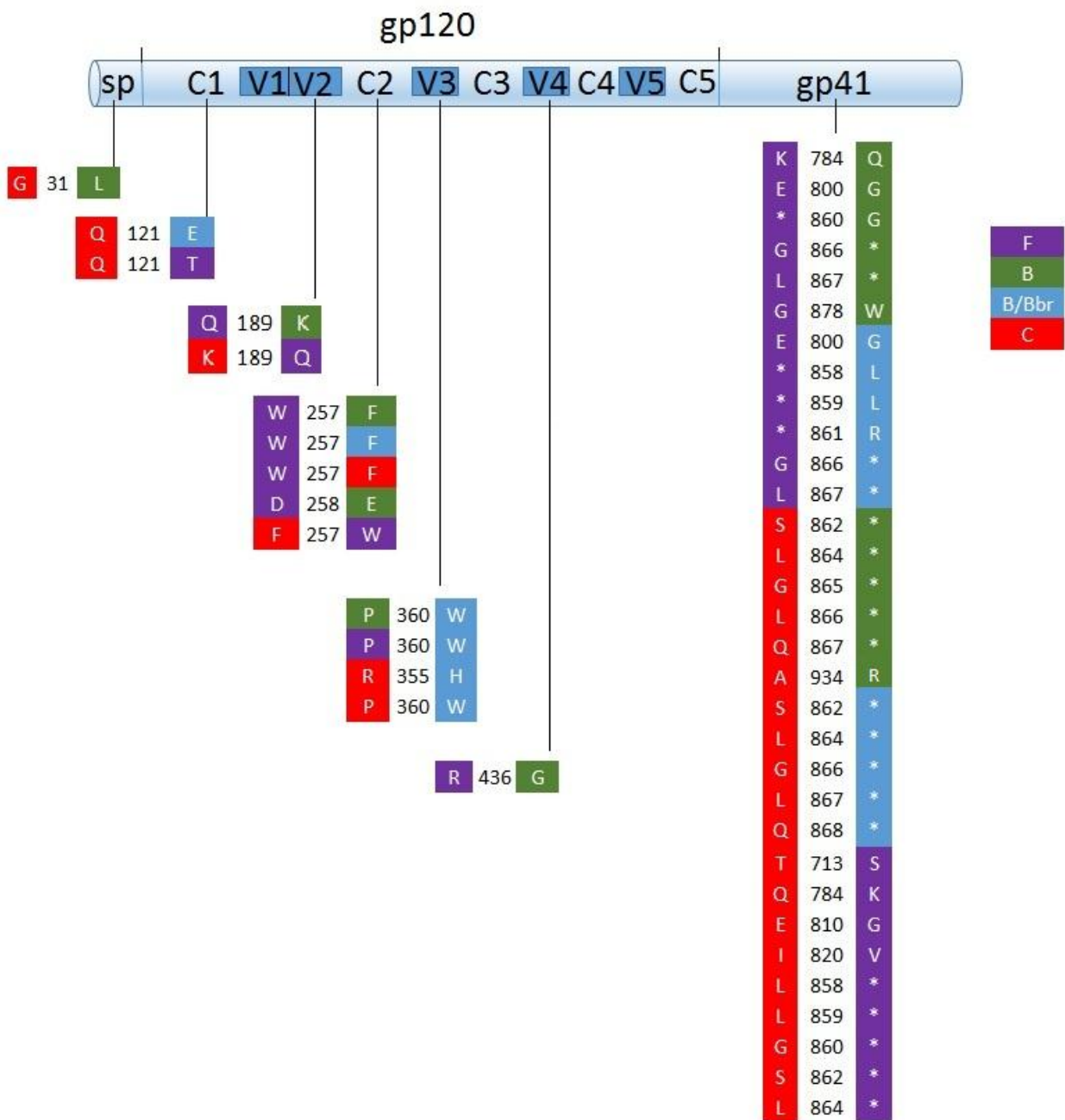
A identificação de epítomos virais associados a anticorpos neutralizantes de alta potência pode contribuir para o desenvolvimento de uma vacina com maior possibilidade de induzir uma resposta protetora. Para explorar estes potenciais epítomos comparamos dois grupos de sequências, as 16 sequências Env consideradas como neutralizadores de elite e o grupo contendo as 16 sequências de baixa faixa de neutralização. Para isto estas sequências foram alinhadas e os 937 aminoácidos analisados. Desta análise nenhuma assinatura foi identificada com 100% de frequência em cada um dos grupos, apenas três assinaturas foram consideradas com frequência acima de 60% e relacionadas com a potência de neutralização: L14W (peptídeo sinal), P360W (V3), R843H (cauda citoplasmática gp41), onde o primeiro aminoácido representa o detectado no grupo com alta faixa neutralização e o segundo no grupo de baixa faixa de neutralização, conforme figura suplementar.

Para avaliarmos possíveis assinaturas subtipo específicas (com frequência de 100%), realizamos comparações par a par entre os subtipos, conforme figura 23, observamos que:

- Entre os subtipos B e F1 verificamos 10 assinaturas, destas sete eram trocas de aminoácidos sendo uma localizada no V2, duas no C2, uma no V4 e três na gp41. Adicionalmente verificamos duas inserções na gp41 de F1 e uma na gp41 de B,
- Entre B e B/Bbr observamos apenas a troca da prolina pelo triptofano na posição 360.
- Entre F1 e B/Bbr obtivemos oito assinaturas, destas três eram trocas de aminoácidos, sendo uma no C2 outra no V3 e gp41. Além de três inserções na gp41 de B/Bbr e duas na gp41 de F1.

- Entre C e B verificamos sete assinaturas, destas duas trocas de aminoácidos, uma no peptídeo sinal e outra na gp41 e cinco inserções em C, na gp41.
- Entre C e B/Bbr verificamos oito assinaturas, destas três eram trocas de aminoácido sendo uma em C1 e duas no V3 e as mesmas 5 inserções em C, na gp41, descritas acima.
- Entre C e F1 verificamos 12 assinaturas, destas sete eram trocas de aminoácidos sendo uma em C1, uma em V2, uma em C2 e quatro na gp41, além de cinco inserções em C, na gp41.

Com relação as assinaturas subtipos-específicas descritas acima apenas a troca da prolina pelo triptofano na posição 360, foi evidenciada quando comparamos as amostras por faixa de neutralização.

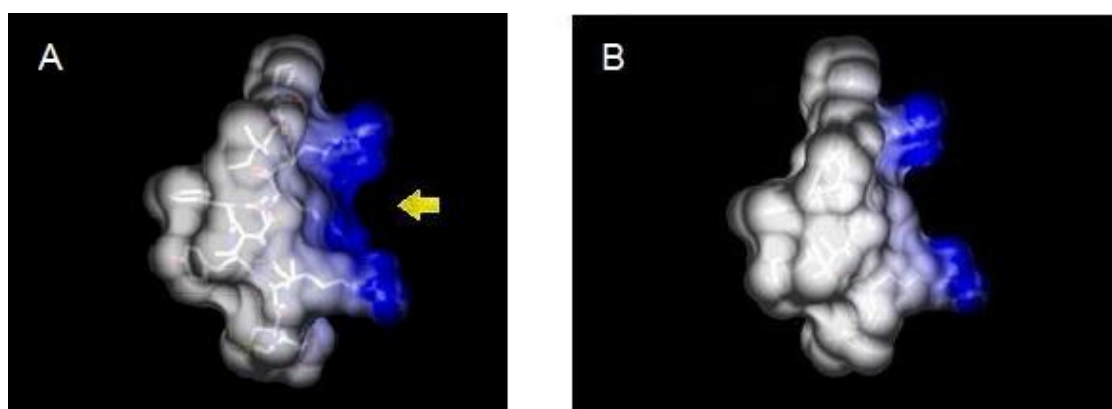


**Figura 23: Esquema da seqüência de aminoácidos do envelope viral (gp120 e gp41) em relação as assinaturas subtipo-específicas.**

SP: peptídeo sinal, C: regiões conservadas, V: regiões variáveis

Quando comparamos o alinhamento dos aminoácidos das amostras B/Bbr com as amostras C encontramos além da substituição do triptofano pela prolina outra alteração, de histidina por arginina na região V3. Esta poderia estar

contribuindo para uma maior reatividade na alça V3 em C, assim inferimos que estas duas alterações podem estar interferindo na sensibilidade aos anticorpos neutralizantes. Portanto, investigamos se a presença da arginina na posição 355 poderia estar alterando alguma característica importante na alça V3. Com auxílio da modelagem molecular de parte da alça V3 (CRIRIGPGQAFYTC)<sup>185</sup>, observamos uma mudança no potencial eletrostático com a presença da arginina (RIGPGR) no envelope das amostras C (figura 24), quando comparamos com a imagem na figura 22B (subtipo B). Suponhamos que essa alteração eletrostática poderia estar contribuindo para uma maior interação com os anticorpos anti-V3.



**Figura 24: Modelagem da superfície molecular da alça V3 da gp120, com motivo CRIRIGPGQAFYTC, presente no subtipo C, em A. Com motivo CRIRIGPGRAFYTC presente no subtipo B, em B.**

A superfície molecular foi colorida de acordo com a sobreposição do potencial eletrostático. A cor azul indica a carga positiva do resíduo de arginina e em branco os resíduos neutros.

Adicionalmente, quando comparamos o alinhamento de Env das amostras C com os demais, verificamos que este também apresenta uma importante inserção na gp41, o que pode estar contribuindo adicionalmente com uma maior sensibilidade aos anticorpos neutralizantes (figura 26 suplementar).

### Predição de epítomos lineares de células B

A estratégia de predição utilizada foi baseada na detecção de epítomos lineares de Env com potencial de indução da resposta imune por anticorpos produzidos por células B <sup>182</sup>. Uma vez que os psVs também podem ser utilizados como indutores de resposta avaliámos as potenciais regiões capazes de induzir resposta neutralizante. Na figura 25, se destacaram as regiões indicadas pelo *Bepipred linear Epítomo* onde verificamos 15 epítomos lineares, destes 5 em regiões variáveis e um epítomo na cauda citoplasmática, região intracelular. Comparando com o mapa de peptídeos disponível na base de dados de Los alamos, verificamos 3 regiões que ainda não foram descritas, sendo estas as demarcadas na região V2, C2 e V4.

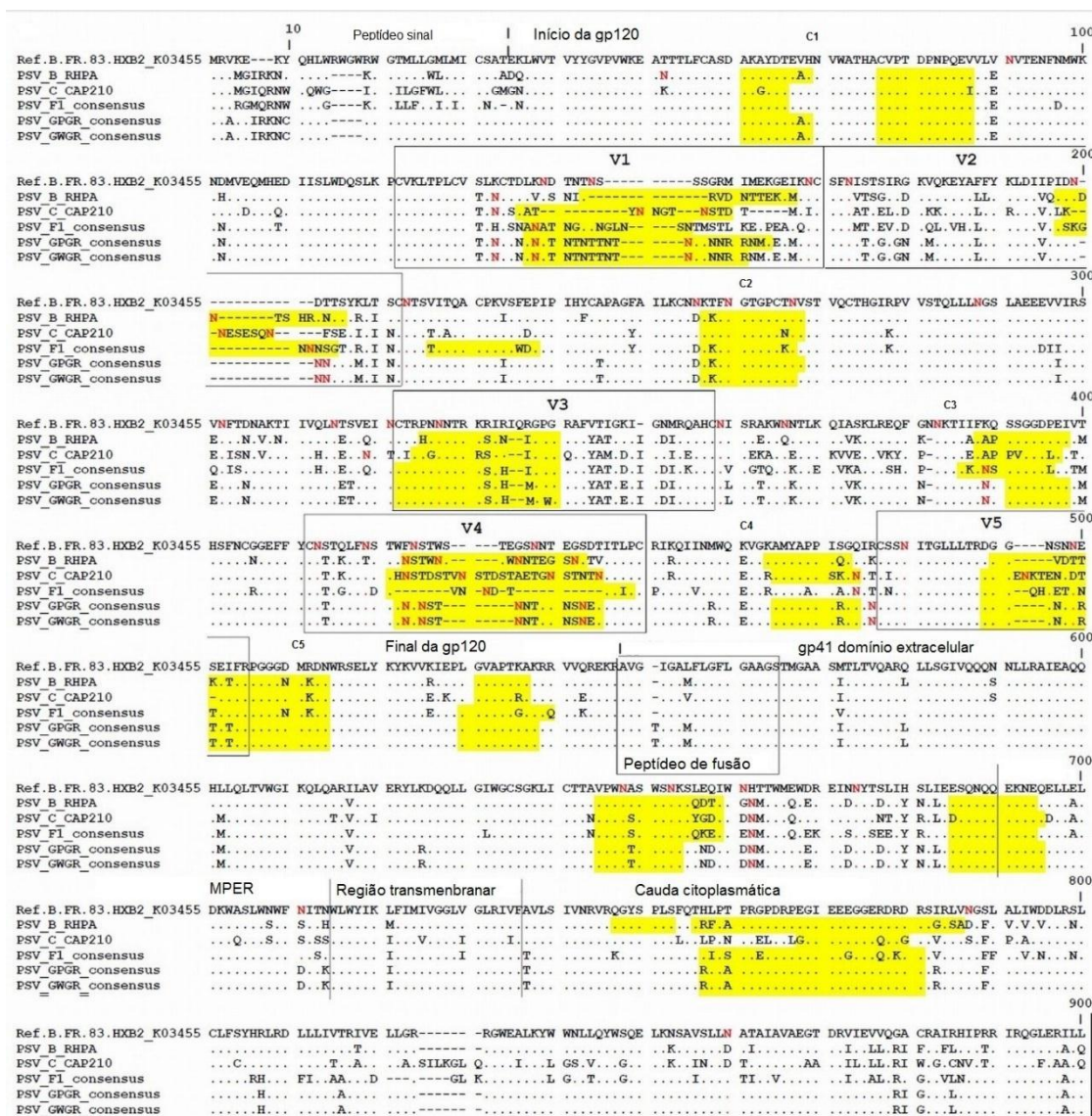


Figura 25: Alinhamento dos pseudovírus (psV) em relação a linhagem de referência HXB2 e características da gp160.

As sequências de nucleotídeos derivadas do gene *env* foram traduzidas para aminoácidos e alinhadas. As sequências dos psVs Cap210 (C) e psVRhpa (B) foram obtidas pela identificação AY835447.1 e FJ443315.1 do *GeneBank*. Os traços indicam intervalos de aminoácidos introduzidos para otimizar o alinhamento e os pontos indicam identidade de aminoácidos. Os potenciais sítios de glicosilação, detectados no programa glycosite estão destacados na cor vermelha. Em amarelo estão destacadas as regiões que foram preditas como potenciais epítomos para anticorpos pelo *Bepipred linear epítomo*.

## 5. DISCUSSÃO

Décadas após o descobrimento e isolamento do HIV-1, o desenvolvimento de uma vacina protetora ou terapêutica anti-HIV/AIDS ainda não foi obtida, sendo um dos maiores desafios o desenvolvimento de um imunógeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes que possam inibir diversas cepas do HIV-1. Embora uma grande proporção de indivíduos desenvolva certo grau de resposta cruzada de anticorpos, poucos foram capazes de desenvolver bNAbs anti-HIV-1, sendo este tipo de anticorpo o esperado na indução de uma vacina. Portanto, o entendimento de fatores do hospedeiro ou virais que contribuem para a produção destes bNAbs na infecção natural são de grande importância para o desenvolvimento de ensaios vacinais. Além disso, os avanços tecnológicos e a padronização dos testes de neutralização vêm contribuindo para o aprimoramento de conhecimento nesta área. Assim, o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular tem trabalhando neste enfoque desde 1991, com produção de anticorpos monoclonais contra peptídeos de HIV-1<sup>186</sup> e posteriormente com implementação de técnicas de neutralização para estudo das variantes virais prevalentes no Brasil<sup>43,187-189</sup>. Mais recentemente, com implementação da técnica de TZM-bl, foi possível realizar um estudo comparativo entre as técnicas de TZM-bl e PBMC e ainda avaliar a resposta de anticorpos neutralizantes em indivíduos com distintos perfis de progressão para aids. Das amostras analisadas apenas uma não apresentou reatividade, sendo esta pertencente a um indivíduo classificado como não progressor de longo tempo - controlador de elite (LTNP-EC) que apresentou virêmia controlada abaixo de 50 cópias de RNA/mL, em mais de 90% das contagens periódicas. Adicionalmente, as amostras de LTNP se agruparam com baixa média geométrica de título (GMT), variando de indetectável a 31.89 de GMT, inibindo principalmente o psV SF162.Ls, pertencente ao *tier* 1, considerado como facilmente neutralizável<sup>146</sup>. Esta baixa resposta inume mediada por anticorpos neutralizantes (nAb) detectada nos LTNP já foi similarmente encontrada na literatura<sup>84</sup>. Atualmente, tem se observado que este grupo de controladores da virêmia tem exibido grande capacidade de induzir funções efetoras como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)<sup>190</sup>. Adicionalmente, outro

estudo tem indicado que a atividade antiviral de células efectoras da imunidade inata podem contribuir no combate à virêmia até a geração de anticorpos neutralizantes potentes <sup>139</sup>, tanto para LTNPs como para progressores.

Em contrapartida, em nossa análise com os indivíduos progressores, o teste de TZM-bl detectou títulos de anticorpos em todas amostras de plasma, sendo que duas destas foram capazes de neutralizar todos pseudovírus. No ensaio de PBMC não foi detectada a presença de anticorpos em amostras de 10 indivíduos sendo que, seis amostras eram de plasma dos indivíduos progressores, vale mencionar que o teste de TZM-bl apresentou uma sensibilidade maior em relação ao teste PBMC, achado este, pertinente com o encontrado na literatura <sup>146</sup>.

A presença de nAb nas amostras de plasma de indivíduos progressores sugere que uma estimulação antigênica devido a sua continuada replicação viral e consequentemente diversificação viral, são fatores que podem estar contribuindo para uma maior resposta imune humoral anti-HIV-1, assim como visto por Carter *et. al.*, (2015) <sup>191</sup>. Em 2016, o programa IAVI Protocolo C investigou longitudinalmente na África uma grande coorte com infecção pelo HIV-1 ainda na fase primária. Nesta, foi verificado que 15% dos indivíduos desenvolveram ampla respostas neutralizante (bNAbs) e os resultados sugeriram que fatores virais e do hospedeiro foram críticos para o desenvolvimento de bNAbs <sup>192</sup>.

Em relação aos fatores virais, no “documento 1” deste trabalho” iniciamos uma breve análise da interferência dos subtipos do HIV-1 na indução da resposta neutralizante, para isso avaliamos um *pool* de plasmas provenientes de indivíduos infectados pelo subtipo B, pela variante B/Bbr ou pelo subtipo F1 e testamos nos ensaios de neutralização. Observamos que o conjunto de plasmas B/Bbr apresentou maior potência, sendo seguido do subtipo F1 e após pelo subtipo B.

Diante desse contexto o buscamos estudar se as alterações nas características do envelope viral, tais como: tamanho das regiões variáveis, quantidade e posição dos sítios de glicosilação e assinaturas subtipo específicas, dos diferentes subtipos prevalentes no Brasil (documento 2)



estariam associadas com a resposta imune mediada por anticorpos neutralizantes.

Para este estudo selecionamos 60 amostras, sendo 15 de cada subtipo (B, B/Bbr, F1 e C) previamente caracterizadas através do sequenciamento da região C2V3. Contudo, quando aumentamos a cobertura de sequenciamento do envelope para 2500 pares de base, algumas amostras se mostraram recombinantes e foram excluídas do estudo, desta forma analisamos um total de 51 amostras. Com base em dados da literatura temos observado um crescente número de recombinantes detectados no Brasil, como também demonstrado por Pessoa *et. al.*, (2016) <sup>36</sup> em uma análise de sequenciamento do genoma viral de 259 amostras onde detectaram que 71,2% eram subtipos puros e 28.8% eram recombinantes, principalmente recombinantes BF (16%) e BC (2,7%), fator que evidencia a necessidade de estudos de caracterização epidemiológica com ampla cobertura genômica.

Após a caracterização dos subtipos, iniciamos avaliando a distância genética do envelope viral intra-subtipos e com base nos dados da literatura verificamos que esta divergência é de 15-20%, enquanto que a variação inter-subtipos é de aproximadamente 25-35%, dependendo da região genômica analisada <sup>193</sup>, com base neste dado observamos que a distância genética entre os subtipos do HIV-1 das amostras analisadas variou de 31% a 34%, o que vai de acordo com a literatura para a região do envelope viral. Enquanto que entre o subtipo B e sua variante B/Bbr a distância foi de 19%, ou seja similar à distância detectada intra-subtipo demonstrando que a troca da prolina pelo triptofano e algumas outras substituições que ocorrem, mas não são tipo específicas, e portanto não são capazes de provocar um aumento significativo na distância genética, levando a caracterização de sub-subtipo. Porém, devido à grande alteração na estrutura terciária do V3 e da distinta reatividade imune entre amostras desta variante e do subtipo B pandêmico, optamos por manter as análises destes dois grupos separadamente <sup>194-196</sup>.

Após a determinação da sequência consenso para os subtipos F1, B/Bbr e obtenção dos plasmídeos C e B para montagem dos psVs realizamos a caracterização quanto a susceptibilidade utilizando anticorpos monoclonais. Neste estudo o anticorpo 447-D foi o mais potente, capaz de neutralizar os psVs

consensos com uma média geométrica (GM) de 0,57 µg/mL seguido do inibidor CD4 solúvel (1.04 µg/mL), adicionalmente, este foi capaz de inibir todos psV, o que vem corroborar com alguns estudos que demonstram que a região variável 3 (V3) é a principal região de inibição da replicação viral <sup>197</sup> e tem promovido imunidade esterilizante em vários modelos animais <sup>128,198</sup>. Em relação a diferença na sensibilidade dos psVs, o psVGPGR apresentou uma maior sensibilidade para o anticorpo 447-D quando comparado com o psVGWGR (triptofano no loop V3) conforme esperado, uma vez que esse anticorpo é específico para a assinatura GPGR <sup>199</sup>, em nossa análise o psVB (Rhpa4259) não foi inibido pelo 447-D, contudo em outro estudo a concentração de 48.9 µg/mL, ou seja muito superior à que foi utilizada no presente estudo, foi capaz de inibir a infecção (ID<sub>50</sub>) <sup>171</sup>, o que sugere que a conformação estrutural da proteína também pode estar interferindo na exposição desse epítipo.

Com base no alinhamento de Env dos psV (figura 25) identificamos que a troca de uma alanina para a glutamina (posição 704) no sítio de ligação do anticorpo anti-gp41 (2F5) pode estar relacionada ao impedimento da neutralização do psVC. Alguns estudos observaram que o principal peptídeo de ligação com o 2F5 seria DKW e que a substituição da lisina para uma serina tornaria o fenótipo sensível, assim como também foi observado que a substituição da glutamina por uma asparagina na posição 704 teria o mesmo efeito de reversão do fenótipo, ou seja que estas substituições levariam à mutações de escape <sup>200–202</sup>. Outra mutação de escape também foi observada, a perda de um sítio de glicosilação no psV B (troca por uma glutamina) e no C (troca por uma treonina), tornando esses pseudovírus resistentes ao anticorpo 2G12 (o qual interage com as asparaginas nas posições 321, 359, 366 e 413 em relação ao alinhamento da figura 25). Essa alteração também foi verificada em outros estudos <sup>203,204</sup>, contudo atribuída apenas ao HIV-1 subtipo C.

A alta reatividade do anticorpo CH01 contra os psVs demonstrada neste estudo é uma característica conhecida deste anticorpo recentemente descrito, obtido de um indivíduo Africano infectado pelo HIV-1 subtipo A <sup>114</sup>, considerado como neutralizador de elite. Este anticorpo neutralizante cobre aminoácidos na alça V2/V3 dependente do sítio de glicosilação N160 <sup>115</sup>, sendo capaz de

neutralizar o psVB com 14 µg/mL como apresentado por Bonsignori *et. al.*, (2011)<sup>114</sup>.

O ensaio de neutralização com os anticorpos monoclonais também foi realizado com o psV MuLV (psV contendo Env do vírus da leucemia murina), pois poderia haver algum efeito citotóxico, não específico da presença do psV + anticorpo nas células alvo, como o caso de presença de antirretrovirais nestes plasmas acarretando resultado falso-positivo o que poderia ser um problema significativo para a avaliação tanto da sensibilidade aos anticorpos monoclonais como dos anticorpos neutralizantes plasmáticos, em concentrações elevadas. O uso do psV MuLV utilizado neste estudo ajudou a eliminar este problema assim como em outros estudos<sup>205,206</sup>.

Nádas *et. al.*, em 2004<sup>207</sup> sugeriram que uma vacina contra o HIV-1 não precisaria ser baseada na origem geográfica do vírus ou no subtipo, mas que deveria ser baseada em propriedades antigênicas que agrupariam os vírus indutores de respostas humorais similares. No estudo aqui apresentado, observamos que indivíduos infectados pelo HIV-1 subtipo F1 induziram resposta similar aos indivíduos infectados pelo subtipo B, assim como também se agruparam, as respostas induzidas pelo subtipo C e pela variante B/Bbr. Em adição, observamos uma proximidade genética efetiva entre as amostras do subtipo B e da variante B/Bbr, porém esses dois grupos divergiram quanto a resposta imune humoral induzida. Confirmando, que determinados epítomos influenciam na indução dos anticorpos neutralizantes, o que vem a corroborar com Nádas *et. al.*, (2004) e Seaman *et. al.* (2010)<sup>171</sup>.

A resposta neutralizante induzida pelo HIV-1 B/Bbr, neste estudo mostrou-se principalmente na faixa de baixo potencial de neutralização e com uma resposta mais específica para o motivo GWGR (figura 18), assim como visto por Bongertz *et. al.* (2005) em um estudo com peptídeos sintéticos<sup>187</sup>. O psVGWGR demonstrou alta sensibilidade frente a todos os anticorpos neutralizantes, tendo em vista que alguns estudos têm reportado que esta variante está relacionada a uma progressão mais lenta da doença<sup>195,196</sup> e juntamente com o embasamento prévio de Bongertz *et. al.*, (2005)<sup>187</sup>, que os anticorpos induzidos pelo epítopo GWGR sejam direcionados para essa região, contribuindo para o progresso lento para a aids. Contudo, quando os anticorpos

anti-GWGR encontram o antígeno não específico (GPG, dos demais psVs) a eficiência de interação pode ser menor, acarretando uma redução na neutralização <sup>87</sup>.

Continuando nesta linha, observamos um resultado controverso em relação aos dados de resposta neutralizante de B/Bbr entre os documentos 1 e 2. No documento 1, observamos alta resposta neutralizante de B/Bbr frente aos psVs, utilizando *pools* de amostras de plasma B/Bbr, já no documento 2, analisando isoladamente amostras deste subtipo tivemos baixa resposta neutralizante. Estes resultados controversos foram analisados com base nos achados publicados por Kong *et. al.*, (2015) <sup>197</sup> e Whag *et. al.*, (2016) <sup>208</sup> que analisaram o efeito da combinação de anticorpos na amplitude de neutralização, e verificaram que em todos os grupos de combinações houve aumento na amplitude de neutralização quando comparado com o anticorpo individual correspondente. Adicionalmente, com a resolução da estrutura nativa do trímico de Env <sup>209</sup>, juntamente com a cristalografia das estruturas ligantes dos mAbs <sup>210-212</sup>, houve um maior entendimento dos modelos de reconhecimento dos antígeno/anticorpo e esses resultados sugerem que os mAbs direcionados aos distintos epítomos podem se ligar ao trímico de Env e gp41 sem competição cruzada, causando um sinergismo.

Em uma abordagem específica para a região V3 analisamos se as amostras que foram categorizadas por faixa de potência se manteriam na mesma faixa quando avaliássemos sua capacidade em inibir apenas os psVGWGR ou psVGPGR. Assim, verificamos que as amostras do subtipo C apresentaram dissonância nesta análise, e assim inferimos que estas podem ter uma maior presença de anticorpos específicos para a região do V3 (GWGR) do que para outras regiões do envelope, fator que pode estar contribuindo para a similaridade de resposta entre as amostras B/Bbr e C.

Quando analisamos as características das sequências de aminoácidos de Env dos 51 indivíduos HIV-1<sup>+</sup> observamos uma associação estatisticamente significativa em relação aos subtipos e o tamanho das regiões variáveis, para o HIV-1 subtipo F1 observamos um menor tamanho da região V4, assim como para o HIV-1 B/Bbr foi observado um maior tamanho de V1. Contudo, não conseguimos identificar correlação estatística entre as faixas de potência

neutralizante e tamanho de cada regiões variáveis do envelope ou número de sítios de glicosilação, assim como visto em outros estudos <sup>95,213,214</sup>. Em relação a essas características do envelope ainda existe muita controvérsia no impacto destas na resposta neutralizante. Em estudos prévios foram detectadas associações significativas entre o tamanho mais curto de V1 e V4 com uma resposta neutralizante mais ampla, porém avaliando apenas o subtipo C <sup>165,215</sup>.

A correlação entre as características de Env dos psVs e a sensibilidade a neutralização indicaram uma tendência para maior número de sítios de glicosilação em psVs mais sensíveis, o que também foi verificado em outro estudo <sup>95</sup>. Foi demonstrado que a retirada de um sítio de glicosilação próximo a alça V3 aumentou a sensibilidade do isolado viral para a neutralização <sup>216</sup>. Frente a estes resultados corroboramos com a hipótese de que carboidratos ao longo do envelope tem o papel principal de proteger o HIV-1 da neutralização mediada por anticorpos, embora saibamos da existência de anticorpos potentes (2G12) direcionados a esses sítios.

Quando comparamos a média geométrica de sensibilidade dos psVGWGR e psVGPGR, verificamos, como esperado, o mesmo número de sítio de glicosilação e mesmo tamanho do envelope, portanto, diante dessa diferença na sensibilidade, assumimos que os anticorpos neutralizantes prevalentes nas amostras foram mais voltados ao epítopo V3 do que para outras regiões ou carboidratos.

As assinaturas de aminoácidos nos indicam que características genéticas subtipo específicas do antígeno (Env) podem estar direcionando a resposta inume humoral na produção de anticorpos. Atualmente, pouco se sabe a respeito da afinidade de maturação do anticorpo em relação ao antígeno apresentado. É entendido que a célula B pode ser ativada diretamente por exposição ao antígeno por infecção ou vacinação <sup>217</sup>. Este linfócito ativado migra para o centro germinativo em um órgão linfoide secundário, onde prolifera adquirindo mutações e sendo selecionado pela presença de antígenos apresentados, podendo recircular e adquirir uma maior afinidade <sup>217</sup>. Neste processo, que envolve interações antígeno-anticorpo, são de grande relevância as forças eletrostáticas (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e força de Van der Waals) para a seleção de células B, portanto, sendo importante características

como tamanho do peptídeo e carga dos aminoácidos, também para o reconhecimento mútuo estrutural das sequências <sup>218</sup>. Neste trabalho verificamos que alguns aminoácidos em determinada localização do envelope viral podem estar influenciando o reconhecimento de anticorpos de modo a facilitar a neutralização do vírus, como a presença do triptofano no topo da alça V3 (HIGWGR), assim como a presença da arginina na posição 355 (RIGPGR). Adicionalmente, a proximidade da resposta antigênica entre B e F, também foi refletida pela similaridade na região V3, principalmente no topo da alça, e por poucas diferenças nas assinaturas subtipos específicos nas regiões expostas, sugerindo que características genéticas compartilhadas podem estar influenciando capacidade de gerar anticorpos neutralizantes. Segundo Doria-Rose N e Gordon Joyce M em revisão publicada na revista *Current Opinion in Virology*, em 2015, os autores relatam que o desenvolvimento da amplitude dos anticorpos em associação com diversificação viral ainda não está claro, que é possível que determinada sequência viral pode ser recrutada para ativar um “correto” BCR e facilitar o desenvolvimento de determinados anticorpos potentes <sup>219</sup>.

A predição de epítomos lineares em células B foi a última análise realizada neste trabalho. Submetemos as sequências de Env dos psVs ao programa Bepipred e a análise indicou 15 regiões antigênicas, principalmente compreendendo as regiões variáveis e a gp41. Como já abordado essas regiões possuem os sítios que mais contribuem para a neutralização por anticorpos <sup>220,221</sup>. Contudo, a identificação da região da cauda citoplasmática na predição de epítomos de células B é uma indicação relevante, uma vez que essa região é pouco explorada no contexto da neutralização, embora já tenha sido descrita. Recentemente, anticorpos intracelulares anti-HIV-1 começaram a ser estudados em conjunto com a ubiquitina ligase E3 e um receptor de anticorpo intracelular (TRIM21), que medeia a neutralização intracelular dependente de anticorpos, no citosol <sup>222</sup>. Foss *et. al.*, (2016) <sup>223</sup> estudaram como a afinidade de anticorpos intracelulares modula a função imune de TRIM21 e observaram que antígenos ligados a IgG1 foram neutralizados por esta via. Portanto, a cauda citoplasmática, também pode ser alvo de neutralização.

Desta forma, a biologia computacional tem contribuído nas análises, assim como a incorporação de testes estatísticos utilizados na predição de epítomos, o que vem acelerando o processo de desenvolvimento de vacinas. Outros estudos já obtiveram sucesso em decorrência das análises *in silico* e têm fornecido grandes avanços científicos no enfoque do HIV-1 <sup>114,165,208,224-227</sup> e com outros agentes patogênicos <sup>228-231</sup>.

Em conjunto os resultados obtidos no presente estudo visam contribuir para as análises de imunógenos anti-HIV que venham a ser testados em futuros testes vacinais no Brasil como também trazer importantes contribuições a respeito da resposta neutralizante dos subtipos de HIV-1 aqui prevalentes.

## 6. CONCLUSÕES

- O frequente estímulo antigênico induz uma resposta humoral mais eficiente como visto quando comparamos a resposta neutralizante entre indivíduos progressores e não progressores.
- O ensaio de neutralização em células TZM-bl teve uma maior sensibilidade de detecção em relação ao ensaio de neutralização em PBMC.
- O fenótipo de sensibilidade de neutralização dos psVs apresentou a seguinte ordem: psVGWGR, psVC, psVF1, psVGPGR e psVB, evidenciando que a alteração espacial observada pela presença do W360 no V3 (B/Bbr) e a alteração eletrostática na R355 no subtipo C, podem estar facilitando a interação com anticorpos anti-V3. Com relação ao psVF1 verificamos uma maior reatividade com os anticorpos monoclonais, indicando que sua susceptibilidade pode ter influência também na reatividade policlonal dos plasmas, sendo o terceiro mais sensível a neutralização.
- A troca de um único aminoácido no topo da alça V3 (P-W) foi capaz de alterar a sensibilidade do psVs frente aos anticorpos monoclonais e policlonais do plasma. Essa alteração pode ter refletido em toda estrutura terciária da proteína, visto que observamos alterações na sensibilidade a anticorpos anti-V2 (CH01) e 2G12, facilitando a neutralização na presença do motivo GWGR no topo da alça V3.
- Encontramos uma maior potência de resposta humoral anti-HIV-1 em plasmas de indivíduos infectados pelo HIV-1 B e F1 do que com os infectados pelo HIV-1 subtipo C ou variante B/Bbr.
- Não foi possível associar as características do envelope viral (tamanho das regiões variáveis, número de sítios de glicosilação, assinaturas de aminoácidos) com as faixas de neutralização.
- Com relação as características do envelope viral e os subtipos detectamos correlação estatisticamente significativa para o



tamanho das regiões variáveis. Além de assinaturas subtipo-específicas, sendo estas principalmente localizadas na gp41.

Por fim, concluímos que existem evidências de assinaturas em epítomos que devem ser investigadas quanto a sua afinidade aos anticorpos induzidos, pois possuem potencial para serem utilizados em construções vacinais anti-HIV.

### **Perspectivas:**

Visto que o epítomo GWGR induz uma resposta mais específica inferimos que o anticorpo das amostras da variante B/Bbr poderia não estar sendo detectado livremente no plasma, pelos ensaios de neutralização, por estar ligado a gp120. Essa hipótese pode ser corroborada por relatos na literatura da associação entre indivíduos infectados pelo HIV-1 B/Bbr e uma progressão mais lenta para a doença. Portanto uma análise da interação *in vivo* antígeno-anticorpo segue como uma perspectiva para continuidade do estudo.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS by the numbers. *Jc2571/1/E* 1–11 (2015). doi:JC2571/1/E
2. Unaid. *GLOBAL REPORT: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*. Unaid (2013).
3. Bradshaw, D. *et al.* HIV/AIDS in South Africa: how many people died from the disease between 1997 and 2010? *AIDS* **30**, 771–8 (2016).
4. HSRC. 05/2016 at <<http://www.hsrc.ac.za/en/research-data/view/6871>>
5. UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS). Fast-Track Ending the AIDS epidemic by 2030. 1–40 (2014).
6. BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. *Bol. Epidemiológico HIV/AIDS* 1–100 (2015).
7. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, B. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. *Bol. Epidemiológico - Aids e DST* **Ano II - n**, 01–68 (2013).
8. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis*. (2015).
9. Van Heuverswyn, F. *et al.* Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* **368**, 155–71 (2007).
10. Li, Y. *et al.* Eastern chimpanzees, but not bonobos, represent a simian immunodeficiency virus reservoir. *J. Virol.* **86**, 10776–91 (2012).
11. Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* **25**, 679–89 (2011).
12. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). at <<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>>
13. Hemelaar, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* **18**, 182–92 (2012).
14. Niculescu, I. *et al.* Recent HIV-1 Outbreak Among Intravenous Drug Users in Romania: Evidence for Cocirculation of CRF14\_BG and Subtype F1 Strains. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 488–95 (2015).
15. Delgado, E. *et al.* Phylogeny and Phylogeography of a Recent HIV-1 Subtype F Outbreak among Men Who Have Sex with Men in Spain Deriving from a

- Cluster with a Wide Geographic Circulation in Western Europe. *PLoS One* **10**, e0143325 (2015).
16. Hudgens, M. G. *et al.* Subtype-specific transmission probabilities for human immunodeficiency virus type 1 among injecting drug users in Bangkok, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 159–68 (2002).
  17. Kiwanuka, N. *et al.* HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS* **23**, 2479–84 (2009).
  18. Kato, S. *et al.* Differential prevalence of HIV type 1 subtype B and CRF01\_AE among different sexual transmission groups in Tokyo, Japan, as revealed by subtype-specific PCR. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**, 1057–63 (2003).
  19. Williamson, C. *et al.* HIV-1 subtypes in different risk groups in South Africa. *Lancet (London, England)* **346**, 782 (1995).
  20. Guimarães, M. L. *et al.* Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. *PLoS One* **10**, e0141372 (2015).
  21. Morgado, M. G. *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 569–76 (1994).
  22. Inocencio, L. A. *et al.* Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: A survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J. Int. AIDS Soc.* **12**, 1–6 (2009).
  23. Pimentel, V. F. *et al.* Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **29**, 1553–61 (2013).
  24. Eyer-Silva, W. A. & Morgado, M. G. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 809–815 (2007).
  25. Gräf, T. & Pinto, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology* **435**, 170–8 (2013).
  26. Bello, G. *et al.* Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* **22**, 1993–2000 (2008).
  27. Delatorre, E. *et al.* Tracing the origin and northward dissemination dynamics

- of HIV-1 subtype C in Brazil. *PLoS One* **8**, e74072 (2013).
28. Bello, G., Guimarães, M. L. & Morgado, M. G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *AIDS* **20**, 763–8 (2006).
  29. Sanabani, S. S. *et al.* Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in São Paulo, Brazil. *Virology* **6**, 78 (2009).
  30. de Castro, C. A. V. *et al.* Prevalence, estimated HIV-1 incidence and viral diversity among people seeking voluntary counseling and testing services in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect. Dis.* **10**, 224 (2010).
  31. Velasco-de-Castro, C. A. *et al.* HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* **9**, e87622 (2014).
  32. De Sá Filho, D. J. *et al.* Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 1–13 (2006).
  33. Guimarães, M. L., Eyer-Silva, W. A., Couto-Fernandez, J. C. & Morgado, M. G. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* **22**, 433–5 (2008).
  34. Pessôa, R., Carneiro Proietti, A. B. de F., Busch, M. P. & Sanabani, S. S. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72\_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. *Genome Announc.* **2**, (2014).
  35. Pessôa, R. *et al.* Deep sequencing of HIV-1 near full-length proviral genomes identifies high rates of BF1 recombinants including two novel circulating recombinant forms (CRF) 70\_BF1 and a disseminating 71\_BF1 among blood donors in Pernambuco, Brazil. *PLoS One* **9**, e112674 (2014).
  36. Pessôa, R. *et al.* Ultra-Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length and Partial Proviral Genomes Reveals High Genetic Diversity among Brazilian Blood Donors. *PLoS One* **11**, e0152499 (2016).
  37. Araujo, A. F. *et al.* Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **26**, 1249–54 (2010).
  38. Monteiro, J. P. *et al.* Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. *J. Med. Virology* **81**, 391–9 (2009).
  39. Santos, L. A. *et al.* Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1

- circulating recombinant forms in northeast Brazil. *J. Med. Virol.* **83**, 2066–72 (2011).
40. Stefani, M. M. A. *et al.* Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J. Clin. Virol.* **39**, 205–9 (2007).
  41. Vêras, N. M. C. *et al.* HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**, 1481–90 (2007).
  42. Machado, L. F. A. *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 961–6 (2009).
  43. Bongertz, V. *et al.* Correlation between anti-V3 peptide and neutralizing antibodies in plasma from HIV-1 infected individuals resident in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **89**, 113–114 (1994).
  44. Junqueira, D. M. *et al.* Detection of the B"-GWGR variant in the southernmost region of Brazil: unveiling the complexity of the human immunodeficiency virus-1 subtype B epidemic. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 735–40 (2013).
  45. Gómez, C. E. *et al.* Isolates from four different HIV type 1 clades circulating in Cuba identified by DNA sequence of the C2-V3 region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**, 55–8 (2001).
  46. Morgado, M. G. *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **18**, 488–94 (1998).
  47. Okoye, A. A. & Picker, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol. Rev.* **254**, 54–64 (2013).
  48. Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (80- )*. **220**, 868–871 (1983).
  49. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9**, 853–60 (2003).
  50. Laakso, M. M. *et al.* V3 loop truncations in HIV-1 envelope impart resistance to coreceptor inhibitors and enhanced sensitivity to neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* **3**, e117 (2007).
  51. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. Change

- in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* **185**, 621–8 (1997).
52. Tsao, L.-C., Guo, H., Jeffrey, J., Hoxie, J. A. & Su, L. CCR5 interaction with HIV-1 Env contributes to Env-induced depletion of CD4 T cells in vitro and in vivo. *Retrovirology* **13**, 22 (2016).
53. Perfettini, J.-L. *et al.* Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 1**, 916–23 (2005).
54. Joshi, A., Nyakeriga, A. M., Ravi, R. & Garg, H. HIV ENV glycoprotein-mediated bystander apoptosis depends on expression of the CCR5 co-receptor at the cell surface and ENV fusogenic activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 36404–13 (2011).
55. Fleury, S. *et al.* Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5393–8 (2000).
56. McCune, J. M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974–9 (2001).
57. Deeks, S. G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu. Rev. Med.* **62**, 141–55 (2011).
58. Colado Simão, A. N., Victorino, V. J., Morimoto, H. K., Reiche, E. M. V. & Panis, C. Redox-driven events in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and their clinical implications. *Curr. HIV Res.* **13**, 143–50 (2015).
59. Deeks, S. G. *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* **104**, 942–7 (2004).
60. Michalek, R. D. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* **186**, 3299–303 (2011).
61. Palmer, C. S. *et al.* Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. *AIDS* **28**, 297–309 (2014).
62. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology, 9th edition.* (Garland Science, 2016).
63. Thomas, M. D., Srivastava, B. & Allman, D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell. Immunol.* **239**, 92–102 (2006).

64. Pensiero, S. *et al.* B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS* **27**, 1209–17 (2013).
65. Hu, Z. *et al.* HIV-associated memory B cell perturbations. *Vaccine* **33**, 2524–9 (2015).
66. Malaspina, A. *et al.* Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* **109**, 2086–8 (2007).
67. Ho, J. *et al.* Enhancing effects of adjuvanted 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine on memory B-cell responses in HIV-infected individuals. *AIDS* **25**, 295–302 (2011).
68. Moir, S. & Fauci, A. S. Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 12–9; quiz 20–1 (2008).
69. Ramratnam, B. *et al.* Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet (London, England)* **354**, 1782–5 (1999).
70. Sprent, J. & Surh, C. D. T Cell dynamics in HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 551–579 (2003).
71. Simon, V., Ho, D. D. & Abdool Karim, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**, 489–504 (2006).
72. van der Helm, J. J. *et al.* Characterisation of long-term non-progression of HIV-1 infection after seroconversion: A cohort study. *Lancet HIV* **1**, e41–e48 (2014).
73. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**, 406–16 (2007).
74. Okulicz, J. F. & Lambotte, O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 163–8 (2011).
75. Baker, B. M., Block, B. L., Rothchild, A. C. & Walker, B. D. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 55–69 (2009).
76. Chen, H. *et al.* CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J. Clin. Invest.* **121**, 1549–60 (2011).
77. Carrington, M. & O'Brien, S. J. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* **54**, 535–551 (2003).
78. Lamine, A. *et al.* Replication-competent HIV strains infect HIV controllers

- despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS* **21**, 1043–5 (2007).
79. Julg, B. *et al.* Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 233–8 (2010).
  80. Hersperger, A. R., Migueles, S. A., Betts, M. R. & Connors, M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 169–73 (2011).
  81. Owen, R. E. *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS* **24**, 1095–105 (2010).
  82. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE . *Science* **273**, 1856–62 (1996).
  83. Pereyra, F. *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* **330**, 1551–7 (2010).
  84. Bailey, J. R. *et al.* Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* **80**, 4758–70 (2006).
  85. Archin, N. M., Sung, J. M., Garrido, C., Soriano-Sarabia, N. & Margolis, D. M. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 750–64 (2014).
  86. Ward, A. B. & Wilson, I. A. Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 101–7 (2015).
  87. Ward, A. B. & Wilson, I. A. Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 101–107 (2015).
  88. Kwong, P. D. *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648–59 (1998).
  89. Shi, W. *et al.* Structural characterization of HIV gp41 with the membrane-proximal external region. *J. Biol. Chem.* **285**, 24290–8 (2010).
  90. Shcherbakov, D. N., Bakulina, A. Y., Karpenko, L. I. & Ilyichev, A. A. Broadly Neutralizing Antibodies against HIV-1 As a Novel Aspect of the Immune



- Response. *Acta Naturae* **7**, 11–21(2015).
91. Zolla-Pazner, S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 199–210 (2004).
  92. Wibmer, C. K. *et al.* Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003738 (2013).
  93. Johnson, W. E. & Desrosiers, R. C. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu. Rev. Med.* **53**, 499–518 (2002).
  94. Sagar, M., Wu, X., Lee, S. & Overbaugh, J. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* **80**, 9586–98 (2006).
  95. van Gils, M. J. *et al.* Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* **85**, 6986–95 (2011).
  96. Raska, M. & Novak, J. Involvement of Envelope-Glycoprotein Glycans in HIV-1 Biology and Infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **58**, 191–208 (2010).
  97. Cohen, Y. Z. *et al.* Glycan-Dependent Neutralizing Antibodies are Frequently Elicited in Individuals Chronically Infected with HIV-1 Clade B or C. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 1–37 (2015).
  98. Huber, M. & Trkola, A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J. Intern. Med.* **262**, 5–25 (2007).
  99. Forthal, D. N. & Moog, C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr. Opin. HIV AIDS* **4**, 388–93 (2009).
  100. Moore, P. L. *et al.* Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **80**, 2515–28 (2006).
  101. Connick, E. *et al.* HIV-specific cellular and humoral immune responses in primary HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1129–40 (1996).
  102. Gray, E. S. *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.* **85**, 4828–40 (2011).
  103. Kong, L. *et al.* Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 796–803 (2013).
  104. Li, Y. *et al.* Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived

- from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* **83**, 1045–59 (2009).
105. van Gils, M. J. & Schuitemaker, H. Correlations between HIV-1 clades and HIV-1 antibody neutralization sensitivity: significant for vaccine development? *Curr. HIV Res.* **8**, 579–86 (2010).
106. Burton, D. R. & Mascola, J. R. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* **16**, 571–576 (2015).
107. Burton, D. R. *et al.* A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10134–7 (1991).
108. Diskin, R. *et al.* Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science* **334**, 1289–93 (2011).
109. Scheid, J. F. *et al.* Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding. *Science (80-. ).* **333**, 1633–1637 (2011).
110. Wu, X. *et al.* Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856–61 (2010).
111. Zhou, T. *et al.* Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811–7 (2010).
112. Kwong, P. D. & Mascola, J. R. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. *Immunity* **37**, 412–25 (2012).
113. Walker, L. M. *et al.* Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285–9 (2009).
114. Bonsignori, M. *et al.* Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. *J. Virol.* **85**, 9998–10009 (2011).
115. McLellan, J. S. *et al.* Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* **480**, 336–43 (2011).
116. Walker, L. M. *et al.* A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog.* **6**, e1001028 (2010).
117. Huang, J. *et al.* Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**, 406–12 (2012).
118. Barbas, C. F. *et al.* Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9339–9343 (1992).

119. Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 693–701 (2013).
120. Mascola, J. R. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* **20**, 1922–5 (2002).
121. Baba, T. W. *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* **6**, 200–6 (2000).
122. Huang, J. *et al.* Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**, 406–12 (2012).
123. Falkowska, E. *et al.* Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity* **40**, 657–68 (2014).
124. Blattner, C. *et al.* Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 Env trimers. *Immunity* **40**, 669–80 (2014).
125. Scharf, L. *et al.* Antibody 8ANC195 Reveals a Site of Broad Vulnerability on the HIV-1 Envelope Spike. *Cell Rep.* **7**, 785–795 (2014).
126. Walker, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466–70 (2011).
127. Cavacini, L. A. *et al.* Human monoclonal antibodies to the V3 loop of HIV-1 gp120 mediate variable and distinct effects on binding and viral neutralization by a human monoclonal antibody to the CD4 binding site. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**, 353–8 (1993).
128. Watkins, J. D. *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* **6**, e18207 (2011).
129. Murin, C. D. *et al.* Structure of 2G12 Fab2 in complex with soluble and fully glycosylated HIV-1 Env by negative-stain single-particle electron microscopy. *J. Virol.* **88**, 10177–88 (2014).
130. Scanlan, C. N. *et al.* The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* **76**, 7306–21 (2002).
131. Killikelly, A. *et al.* Thermodynamic Signatures of the Antigen Binding Site of mAb 447-52D Targeting the Third Variable Region of HIV-1 gp120.

- Biochemistry* **52**, 6249–6257 (2013).
132. Javaherian, K. *et al.* Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* **250**, 1590–3 (1990).
  133. Zolla-Pazner, S., Gomy, M. K. & Nyambi, P. N. The implications of antigenic diversity for vaccine development. *Immunol. Lett.* **66**, 159–64 (1999).
  134. Munro, J. B. *et al.* Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science* **346**, 759–63 (2014).
  135. Pinter, A. *et al.* The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J. Virol.* **78**, 5205–15 (2004).
  136. Zolla-Pazner, S. *et al.* Structure/Function Studies Involving the V3 Region of the HIV-1 Envelope Delineate Multiple Factors That Affect Neutralization Sensitivity. *J. Virol.* **90**, 636–49 (2015).
  137. Qin, Y. *et al.* Eliciting neutralizing antibodies with gp120 outer domain constructs based on M-group consensus sequence. *Virology* **462-463**, 363–76 (2014).
  138. Haynes, B. F. *et al.* HIV-Host Interactions: Implications for Vaccine Design. *Cell Host Microbe* **19**, 292–303 (2016).
  139. Ackerman, M. E. *et al.* Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLOS Pathog.* **12**, e1005315 (2016).
  140. Létourneau, S. *et al.* Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One* **2**, e984 (2007).
  141. Gaschen, B. *et al.* Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**, 2354–60 (2002).
  142. Nickle, D. C. *et al.* Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science* **299**, 1515–8; author reply 1515–8 (2003).
  143. Hulot, S. L. *et al.* Comparison of Immunogenicity in Rhesus Macaques of Transmitted-Founder, HIV-1 Group M Consensus, and Trivalent Mosaic Envelope Vaccines Formulated as a DNA Prime, NYVAC, and Envelope Protein Boost. *J. Virol.* **89**, 6462–80 (2015).
  144. Karasavvas, N. *et al.* The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine trial (RV144) regimen induces antibodies that target conserved regions within the V2 loop of gp120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**, 1444–57 (2012).

145. Gorse, G. J. *et al.* Antibody to native human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins induced by IIIB and MN recombinant gp120 vaccines. The NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**, 378–86 (1996).
146. Li, M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* **79**, 10108–25 (2005).
147. Choudhry, V. *et al.* Increased efficacy of HIV-1 neutralization by antibodies at low CCR5 surface concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1107–15 (2006).
148. Heyndrickx, L. *et al.* International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report II. *PLoS One* **7**, e36438 (2012).
149. Polonis, V. R. *et al.* Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology* **375**, 315–20 (2008).
150. Georgiev, I. *et al.* NIH Public Access. **153**, 126–138 (2013).
151. Liao, H. *et al.* Founder Virus. **496**, 469–476 (2013).
152. Shingai, M. *et al.* Most rhesus macaques infected with the CCR5-tropic SHIV(AD8) generate cross-reactive antibodies that neutralize multiple HIV-1 strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19769–74 (2012).
153. Jardine, J. *et al.* Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science* **340**, 711–6 (2013).
154. Dosenovic, P. *et al.* Immunization for HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies in Human Ig Knockin Mice. *Cell* **161**, 1505–15 (2015).
155. Jardine, J. G. *et al.* HIV-1 VACCINES. Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. *Science* **349**, 156–61 (2015).
156. Caskey, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **522**, 487–91 (2015).
157. IMPAACT Study P1112. at <<http://impaactnetwork.org/studies/P1112.asp>>
158. NIH Launches Large Clinical Trials of Antibody-Based HIV Prevention. at <<https://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2016/Pages/AMP-studies-launch.aspx>> (05/2016)
159. West, A. P. *et al.* Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. *Cell* **156**, 633–648 (2014).

160. Sanders, R. W. *et al.* HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science* (80-. ). **349**, aac4223–aac4223 (2015).
161. Haynes, B. F. *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1275–86 (2012).
162. Bonsignori, M. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J. Virol.* **86**, 11521–32 (2012).
163. Rong, R. *et al.* Role of V1V2 and Other Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Domains in Resistance to Autologous Neutralization during Clade C Infection. *J. Virol.* **81**, 1350–1359 (2007).
164. Liu, Y. *et al.* Env length and N-linked glycosylation following transmission of human immunodeficiency virus Type 1 subtype B viruses. *Virology* **374**, 229–33 (2008).
165. Rademeyer, C. *et al.* Genetic characteristics of HIV-1 subtype C envelopes inducing cross-neutralizing antibodies. *Virology* **368**, 172–81 (2007).
166. Mascola, J. R. *et al.* Two antigenically distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1: viral genotype predicts neutralization serotype. *J. Infect. Dis.* **169**, 48–54 (1994).
167. Mascola, J. R. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody serotyping using serum pools and an infectivity reduction assay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1319–28 (1996).
168. Moore, J. P. *et al.* Inter- and intraclade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *J. Virol.* **70**, 427–44 (1996).
169. Casado, C. *et al.* Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* **5**, e11079 (2010).
170. REED, L. J. & MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS,. *Am. J. Epidemiol.* **27**, 493–497 (1938).
171. Seaman, M. S. *et al.* Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **84**, 1439–52 (2010).
172. van Gils, M. J., Euler, Z., Schweighardt, B., Wrin, T. & Schuitemaker, H. Prevalence of cross-reactive HIV-1-neutralizing activity in HIV-1-infected patients with rapid or slow disease progression. *AIDS* **23**, 2405–14 (2009).

173. Zolla-Pazner, S. & Cardozo, T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 527–35 (2010).
174. Korbie, D. J. & Mattick, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* **3**, 1452–6 (2008).
175. Gao, F. *et al.* Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. *J. Virol.* **70**, 1651–67 (1996).
176. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–9 (2013).
177. Alcantara, L. C. J. *et al.* A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–9 (2009).
178. Zhang, M. *et al.* Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**, 1229–46 (2004).
179. Yoon, H. *et al.* CATNAP: a tool to compile, analyze and tally neutralizing antibody panels. *Nucleic Acids Res.* **43**, W213–9 (2015).
180. Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–23 (1997).
181. Petrey, D. & Honig, B. GRASP2: visualization, surface properties, and electrostatics of macromolecular structures and sequences. *Methods Enzymol.* **374**, 492–509 (2003).
182. Larsen, J. E. P., Lund, O. & Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* **2**, 2 (2006).
183. Li, M. *et al.* Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in Southern Africa. *J. Virol.* **80**, 11776–90 (2006).
184. Simek, M. D. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm.

- J. Virol.* **83**, 7337–7348 (2009).
185. Chain P, Crystal Structure Of Anti-hiv-1 Fab 447-52d In Complex With V - Protein - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/538261344>> (2016).
186. Bongertz, V., Wigzell, H. & Rossi, P. Production of human monoclonal antibodies against HIV-1 peptides. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. médicas e biológicas / Soc. Bras. Biofísica ... [et al.]* **24**, 815–8 (1991).
187. Bongertz, V. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by plasma from B or F genotype infected individuals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100**, 85–89 (2005).
188. Bongertz, V. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by plasma from B or F genotype infected individuals. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* **100**, 85–9 (2005).
189. Bongertz, V. *et al.* Correlation between susceptibility of primary HIV-1 isolates to autologous and heterologous neutralizing antibodies. Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. *AIDS* **11**, 969–75 (1997).
190. Alshafi, N. *et al.* Nef Proteins from HIV-1 Elite Controllers Are Inefficient at Preventing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J. Virol.* **90**, 2993–3002 (2015).
191. Carter, C. C. *et al.* HIV-1 neutralizing antibody response and viral genetic diversity characterized with next generation sequencing. *Virology* **474**, 34–40 (2015).
192. Landais, E. *et al.* Broadly Neutralizing Antibody Responses in a Large Longitudinal Sub-Saharan HIV Primary Infection Cohort. *PLoS Pathog.* **12**, e1005369 (2016).
193. Korber, B. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br. Med. Bull.* **58**, 19–42 (2001).
194. Côrtes, F. H. *et al.* Higher cross-subtype IFN- $\gamma$  ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1 subtype B- and F1- than in C-infected subjects. *Vaccine* **31**, 1106–12 (2013).
195. Casseb, J. *et al.* HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int. J. Infect. Dis.* **6**, 164–9 (2002).
196. de Brito, A. *et al.* Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1476–81 (2006).



197. Kong, R. *et al.* Improving neutralization potency and breadth by combining broadly reactive HIV-1 antibodies targeting major neutralization epitopes. *J. Virol.* **89**, 2659–71 (2015).
198. Emini, E. A. *et al.* Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* **355**, 728–30 (1992).
199. Binley, J. M. *et al.* Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* **78**, 13232–52 (2004).
200. Stiegler, G. *et al.* A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**, 1757–65 (2001).
201. Purtscher, M. *et al.* Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS* **10**, 587–93 (1996).
202. D'Souza, M. P., Livnat, D., Bradac, J. A. & Bridges, S. H. Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralization assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials. AIDS Clinical Trials Group Antibody Selection Working Group. *J. Infect. Dis.* **175**, 1056–62 (1997).
203. Chen, H., Xu, X., Bishop, A. & Jones, I. M. Reintroduction of the 2G12 epitope in an HIV-1 clade C gp120. *AIDS* **19**, 833–5 (2005).
204. Gray, E. S., Moore, P. L., Pantophlet, R. A. & Morris, L. N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization. *J. Virol.* **81**, 10769–76 (2007).
205. van den Kerkhof, T. L. G. M. *et al.* HIV-1 envelope glycoprotein signatures that correlate with the development of cross-reactive neutralizing activity. *Retrovirology* **10**, 102 (2013).
206. Sarzotti-Kelsoe, M. *et al.* Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods* **409**, 131–46 (2014).
207. Nádas, A. *et al.* Defining human immunodeficiency virus (HIV) type 1 immunotypes with six human monoclonal antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 55–65 (2004).
208. Wagh, K. *et al.* Optimal Combinations of Broadly Neutralizing Antibodies for Prevention and Treatment of HIV-1 Clade C Infection. *PLOS Pathog.* **12**,

- e1005520 (2016).
209. Bartesaghi, A., Merk, A., Borgnia, M. J., Milne, J. L. S. & Subramaniam, S. Prefusion structure of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein determined by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1352–1357 (2013).
  210. Pejchal, R. *et al.* A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* **334**, 1097–1103 (2011).
  211. Zhou, T. *et al.* Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811–7 (2010).
  212. Scheid, J. F. *et al.* Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding. *Science* (80-. ). **333**, 1633–1637 (2011).
  213. Sather, D. N. *et al.* Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **83**, 757–69 (2009).
  214. Dhillon, A. K. *et al.* Dissecting the neutralizing antibody specificities of broadly neutralizing sera from human immunodeficiency virus type 1-infected donors. *J. Virol.* **81**, 6548–62 (2007).
  215. Li, B. *et al.* Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **80**, 5211–8 (2006).
  216. Koch, M. *et al.* Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**, 387–400 (2003).
  217. MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 117–39 (1994).
  218. Sun, P. *et al.* Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. *Comput. Math. Methods Med.* **2013**, 943636 (2013).
  219. Doria-Rose, N. A. & Joyce, M. G. Strategies to guide the antibody affinity maturation process. *Curr. Opin. Virol.* **11**, 137–47 (2015).
  220. Gottardo, R. *et al.* Plasma IgG to linear epitopes in the V2 and V3 regions of HIV-1 gp120 correlate with a reduced risk of infection in the RV144 vaccine efficacy trial. *PLoS One* **8**, e75665 (2013).
  221. Jacob, R. A. *et al.* Anti-V3/Glycan and Anti-MPER Neutralizing Antibodies, but Not Anti-V2/Glycan Site Antibodies, Are Strongly Associated with Greater Anti-HIV-1 Neutralization Breadth and Potency. *J. Virol.* **89**, 5264–75 (2015).
  222. Fletcher, A. J. & James, L. C. Coordinated neutralization and immune

- activation by the cytosolic antibody receptor TRIM21. *J. Virol.* (2016).
223. Foss, S. *et al.* TRIM21 Immune Signaling Is More Sensitive to Antibody Affinity Than Its Neutralization Activity. *J. Immunol.* (2016).
224. Yokoyama, M. *et al.* In silico Analysis of HIV-1 Env-gp120 Reveals Structural Bases for Viral Adaptation in Growth-Restrictive Cells. *Front. Microbiol.* **7**, 110 (2016).
225. Oyarzun, P. & Kobe, B. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Hum. Vaccin. Immunother.* (2015).
226. Park, H. *et al.* Presentation of available CTL epitopes that induction of cell-mediated immune response against HIV-1 Koran clade B strain using computational technology. *HIV Med.* (2015).
227. Rosa, D. S. *et al.* Multiple Approaches for Increasing the Immunogenicity of an Epitope-Based Anti-HIV Vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 1077–88 (2015).
228. Rodrigues-da-Silva, R. N. *et al.* In silico Identification and Validation of a Linear and Naturally Immunogenic B-Cell Epitope of the Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein-9. *PLoS One* **11**, e0146951 (2016).
229. Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D’Oro, U., Finco, O. & De Gregorio, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J. Exp. Med.* **213**, jem.20151960 (2016).
230. Dhanda, S. K. *et al.* Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Brief. Bioinform.* (2016). doi:10.1093/bib/bbw025
231. Lin, Y. *et al.* [Mapping of the B Cell Neutralizing Epitopes on ED III of Envelope Protein from Dengue Virus]. *Bing Du Xue Bao* **31**, 665–73 (2015).

## 8. ANEXOS

### 8.1 Publicação

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES  
Volume 29, Number 3, 2013  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/aid.2012.0052

## Short Communication Neutralizing Antibodies in HIV-1-Infected Brazilian Individuals

Dalziza Victalina Almeida,<sup>1</sup> Mariza Gonçalves Morgado,<sup>1</sup> Fernanda Heloíse Côrtes,<sup>1</sup>  
Monick Lindermeier Guimarães,<sup>1</sup> Leila Mendonça-Lima,<sup>2</sup> Jose Henrique Pilotto,<sup>1</sup> Beatriz Grinsztejn,<sup>3</sup>  
Valdiléa Gonçalves Veloso,<sup>3</sup> and Vera Bongertz<sup>1</sup>

#### Abstract

Tests for the detection of the humoral immune response to HIV-1 have to be standardized and established, demanding regional efforts. For this purpose the neutralizing antibody (NAb) assay for HIV-1 in TZM-bl cells was introduced in Brazil. Twenty plasma samples from HIV-1-infected individuals were assayed: 10 progressors and 10 long-term nonprogressors. These were tested against eight *env*-pseudotyped viruses (psVs) in the TZM-bl NAb assay and against HIV-1 strain HTLV-III<sub>B</sub> (HIV-1 III<sub>B</sub>) in primary lymphocytes. Forty-four percent of the samples showed neutralizing titers for psVs and 55% for HIV-1 III<sub>B</sub>. Plasma from progressors showed a broader neutralization and a higher potency. The introduction of these reference reagents encourages the participation of Brazil in future comparative assessments of anti-HIV-1 antibodies.

**T**O REDUCE AND CONTROL the HIV epidemic in the world the development of an anti-HIV/AIDS vaccine that prevents infection or substantially reduces transmission is of paramount relevance.<sup>1</sup> To evaluate the effectiveness of such vaccines several assays must be standardized and in routine use for the evaluation of cellular and humoral immune responses, including the determination of the ability of the antibodies induced by the vaccine to neutralize the replication of HIV-1. In fact, today, the presence of broadly neutralizing antibodies (NAb) is considered a "precondition" for prioritizing the assessment of a candidate vaccine.<sup>2-8</sup>

The most recent HIV/AIDS vaccine trial combined two vaccines designed to stimulate both humoral and cellular immunity, and protected 30% of the vaccinated individuals. In this trial the samples were screened for the presence of anti-gp120 B/E and p24 antibody-binding, NAb, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ELISpot and (IFN- $\gamma$ )/interleukin (IL)-2 intracellular cytokine staining.<sup>9</sup> In the TZM-bl NAb assay only tier 1 *env*-pseudovirus (psV) were neutralized.<sup>10</sup> This demonstrates that the development of a protective vaccine will require more than current strategies for generating anti-HIV responses.

The contribution of NAb to the prevention of disease progression after the establishment of infection is still doubtful, and the long-term presence of protective NAb when viremia is undetectable can only be explained by low, fluctuating

levels of Nab-inducing antigens.<sup>11</sup> In fact, an association between high plasma viral RNA load and a stronger neutralizing antibody response has been observed,<sup>12</sup> although other studies have shown that broadly neutralizing antibody responses are stronger and more frequent in long-term non-progressors (LTNP).<sup>13</sup>

Recently, a highly reproducible methodology using TZM-bl cells (cells that carry an HIV-1-tat-inducible luciferase reporter gene)/*env*-pseudovirus (different *env* gene on a standard backbone) was developed, which allows the evaluation of NAb in international comparisons.<sup>14-16</sup> In our study, we introduced the NAb assay using TZM-bl cells and aimed to evaluate broadly neutralizing antibodies in Brazilian HIV-1-infected individuals with distinct rates of HIV disease progression in parallel to the standard peripheral blood mononuclear cell (PBMC) HIV-1 neutralization assay employing the commonly used reference strain HIV-1 III<sub>B</sub>.

Plasma was obtained from 20 patients at the Evandro Chagas Clinical Research Institute/Fiocruz (18 samples) or Central Laboratory of Public Health of the Porto Alegre (2 samples), collected between 2006 and 2009. The subjects were stratified according to Casado *et al.*,<sup>17</sup> which considered 10 samples as progressors (P) and 10 as long-term non-progressors (LTNP) (Table 1). The study was approved by the Fiocruz Ethical Committee (approval #240/04). All plasma

<sup>1</sup>AIDS and Molecular Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Functional Genomics and Bioinformatics Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Evandro Chagas Clinical Research Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS AT THE TIME OF PLASMA SAMPLE COLLECTION FOR THE NEUTRALIZING ANTIBODY STUDY

Samples	Gender	Exposure category	Antiretroviral therapy	CD4 <sup>+</sup> T cell count	HIV RNA copies/ml	HIV-1 env subtype
P1	M	MSM	AZT+EFV+3TC	704	2,200	B/Bbr
P2	M	Het	AZT+EFV+3TC	379	<80	F
P3	M	Het	–	317	16,000	B/Bbr
P4	M	NA	–	856	430,000	B
P5	F	Het	–	484	10,310	C
P6	M	Het	–	317	8,352	C
P7	F	Het	–	639	9,000	B
P8	F	Het	–	467	7,000	B/Bbr
P9	F	Het	AZT+EFV+3TC	273	540	F
P10	F	Het	–	948	670	C
LTNP-NC 1	M	MSM	–	712	2,000	C
LTNP-NC 6	M	MSM	–	582	5,889	B
LTNP-EC 2	M	IDU	–	1,206	<80	C
LTNP-EC 4	F	Het	–	1,817	<50	F
LTNP-EC 8	F	Het	–	1,089	<50	B
LTNP-EC 7	F	Het	–	1,130	<50	B
LTNP-EC 9	F	NA	–	1,509	<50	B
LTNP-EC 10	F	Het	–	1,416	<50	B
LTNP-VC 3	M	Het	–	920	<50	B
LTNP-VC 5	M	MSM	–	1,225	115	B

P, progressor; LTNP, long-term nonprogressor; NC, viremic noncontroller; EC, elite controller; VC, viremic controller; F, female; M, male; MSM, men who have sex with men; Het, heterosexual; IDU, intravenous drug user; NA, not available; AZT, zidovudine; EFV, efavirenz; 3TC, lamivudine; –, antiretroviral-naive individuals.

specimens were heat-inactivated at 56°C for 60 min. The samples were evaluated in triplicate by TZM-bl NAb and PBMC assays according to the protocol received from the Bill and Melinda Gates Foundation Collaboration for AIDS vaccine discovery (CAVD) project Global HIV Vaccine Enterprise ([www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm](http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm)).

Pools of antiretroviral-naive plasma samples were separated by HIV-1 subtype/variant: subtype B (GPGR amino acid sequence at the top of the V3 loop), B/Bbr (GWGR at the top of the V3 loop), and subtype F1, randomly selected in a previous study<sup>18</sup>; MAb 2F5 and soluble CD4 (sCD4) inhibitor were used as controls. The MAb and sCD4 were tested at starting concentrations of 20 µg/ml and 15 µg/ml, respectively, followed by five 2-fold dilutions. Locally collected normal human plasma pools were used as negative controls in the analyses. All samples were used to standardize the neutralization technique in TZM-bl NAb, with psV of subtype B (SF162.Ls, WITO4160.33, PVO.4, PRhpa42597, Rejo4541.67, QH0692.42, Trjo4551.67) and C (ZM53M.PB12). Plasmids were expanded in *Escherichia coli* Top10 or DH5α, extracted using the Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega, Madison, WI) and quantified in a Nanodrop (Wilmington, DE) spectrophotometer. To produce psVs, stocks were prepared from transfected 293/T17 cells (ATCC, Manassas, VA) as described by Li *et al.*<sup>16</sup> The TZM-bl (JC53-BL) cells were expanded, tested for Mycoplasma, and stored following the instructions of the Global HIV Vaccine Enterprise (GHVE).<sup>16</sup> Titration of psV infectivity (TCID<sub>50%</sub>) in TZM-bl was performed following GHVE procedures.

The production of luciferase was evaluated after the addition of the luciferase substrate (Bright Glo reagent/Roche, Madison, WI) and luminescence was measured in a Victor 3 luminometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences,

Shelton, CT) and evaluated following the GHVE protocol. The psV (200 TCID<sub>50</sub>) were incubated with five dilutions of each plasma, added to TZM-bl cells in the presence of DEAE-dextran (20 µg/ml, nontoxic concentration). Inhibition of infection was given, after subtraction of background values, by the difference in relative luminescence units (RLU) between the positive control (100% infection—only psV and cells) and RLU measured in the sample wells, determining the dilution of plasma that inhibited 50% of psV infection, after adjusting the values by linear regression and 95% confidence intervals, using the statistical program GraphPad Prism (version 5.01). Neutralizing antibody titers were expressed by the reciprocal of plasma dilutions required to reduce RLU by 50%. Concentrations above the 1:20 dilution were considered negative. To consider the neutralization test as valid, observed values of standard deviations between the points of viral control up to 10% were considered.

A total of eight psV (seven Tier 2 and one Tier 1, according to Seaman *et al.*<sup>19</sup>) were used to first assess the samples. It can be inferred that the psV HIV SF162.Ls has a higher susceptibility to neutralization by the reference inhibitors (CD4s and MAb 2F5), as reported before,<sup>20</sup> followed by psV HIV pRejo4541.67 (Table 2).

The plasma samples grouped themselves by geometric mean titer (GMT); of these 10% had titers >1:1000 designated as highly potent neutralizing. Eighty matrix points for LTNP plasma were tested (10 plasma × 8 psV); of these 17 points (21.2%) had neutralizing titers between 1:50 and 1:6250. The psV SF162.Ls was sensitive to nine plasma samples and the psV WITO4160.33 was sensitive to three samples (one LTNP-EC and two LTNP-NC).

Among progressors (P), 55 (62.5%) had neutralizing titers from 1:20 to 1:4374 dilutions (Table 3). Two samples were exceptionally potent and broad in their neutralizing

TABLE 2. ANALYSIS OF HIV-1 INHIBITORS AGAINST *env*-PSEUDOVIRUSES AND HIV-1III<sub>B</sub>

Inhibitors ( $\mu$ g/ml)	<i>env</i> -pseudoviruses/TZM-bl (50% neut)								III <sub>B</sub> /PBMC (90% neut)
	SF162.Ls	WITO4160	PVO.4	PRhpa42597	ZM53mPL12	Rejo4541.67	QH0692.42	Trjo4551.67	X4 HIV-1 III <sub>B</sub>
sCD4	0.07	>15	9.44	3.9	>10	1.29	0.53	2.6	<0.4
MAb 2F5	<0.17	2	>20	22	>20	1.45	2.42	>20	>10

PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

capacity (100%). Eight samples (80%) were found to neutralize 50% of the psVs; sample P1 (B/Bbr) showed the highest cross-neutralization ability when compared to the other plasma, achieving a GMT of 1150 with neutralization titers above 1:4000 against psV WITO4160.33 and psV HIV PRhpa4259.7 and the other *env*-pseudotyped viruses with titers above 1:1000. The plasma of individual P2 (F1), although not reaching such high titers, neutralized all psVs with titers ranging from 1:71 to 1:1000. The other plasma samples showed neutralizing titers varying from 1:1000 to not neutralizing (<1:20).

The TZM-bl technique is an important tool in the evaluation of neutralizing antibodies, being highly reproducible with a lower biological risk due to the use of psV.<sup>20</sup> However, psVs present a great susceptibility to neutralization, with much higher plasma titers when tested in the TZM-bl NAB assay, and this may lead to an overestimation of the protective response generated by neutralizing antibodies. On the other hand, an underestimation may be associated with an inability

to synthesize viral DNA in infected cells due to the presence of antiretrovirals in low-dilution samples, indicating the addition of a positive control, as VSV-G/HIV psV, in the neutralization anti-HIV panel in future studies.

Also of great importance would be the correlation of test results with a protective effect in vaccinated healthy subjects.<sup>21,22</sup> This is most important as several studies have shown differences in results between PBMC and TZM-bl NAb/psV assays.<sup>2,20,23,24</sup> Therefore, the neutralization of HIV-1 III<sub>B</sub> with normal human peripheral blood mononuclear cells (PHA-PBMC NHu - 10<sup>5</sup> cells/well) was performed. The cells were phytohemagglutinin activated and infected after preincubation with the plasma samples (including controls) with 10–50 infective units of the reference X4 HIV-1 III<sub>B</sub> and quantification of the HIV-1 p24 antigen as described previously.<sup>25</sup> Approximate plasma concentrations needed for neutralizing 90% of the viral input were derived from linear regression curves (MicroCal Origin Software Inc, Northampton, MA). Of 10 samples from LTNP, 40% (4/10) had neutralizing activity in

TABLE 3. NEUTRALIZING ACTIVITY IN PLASMA OF PROGRESSOR AND LONG-TERM NONPROGRESSOR INDIVIDUALS IN TZM-bl NEUTRALIZING ANTIBODY ASSAY (50% NEUTRALIZATION)

Plasma (subtype)	Plasma neutralizing ID <sub>50</sub> titers against psV (subtype)								GMT
	SF162.Ls (B)	WITO4160.33 (B)	PVO.4 (B)	PRhpa42597 (B)	ZM53MPB 12 (C)	Rejo4541.67 (B)	QH0692.42 (B)	Trjo4551.67 (B)	
P1(B/Bbr)	637	4374	1000	4374	252	1000	1000	1000	1150.57
P2(F1)	170	1000	328	71	141	202	182	120	199.03
P3(B/Bbr)	4374	559	78	77	74	162	10	10	107.33
P4(B)	249	10	70	4374	50	4374	10	10	106.60
P5(C)	313	1000	81	40	90	10	28	10	63.23
P6(C)	260	1000	85	10	66	10	20	10	48.21
P7(B)	666	22	77	25	150	10	50	10	46.31
P8(B/Bbr)	10	1000	69	76	50	10	10	10	35.67
P9(F1)	363	1000	10	33	10	10	10	10	32.34
LTNP-NC 1(C)	311	30	53	73	10	10	27	10	31.52
LTNP-EC 2(B)	6250	171	10	10	10	10	10	10	31.89
P10(C)	642	1000	10	10	10	10	10	10	29.92
LTNP-VC 3(B)	445	10	62	10	50	10	10	10	24.69
LTNP-EC 4(F1)	6250	10	10	10	10	10	10	10	22.36
LTNP-VC 5(B)	6250	10	10	10	10	10	10	10	22.36
LTNP-NC 6(B)	389	61	10	10	10	10	10	10	19.81
LTNP-EC 7(B)	812	10	10	10	10	10	10	10	17.33
LTNP-EC 8(B)	47	10	10	10	10	10	10	10	12.13
LTNP-EC 9(B)	44	10	10	10	10	10	10	10	12.03
LTNP-EC 10(B)	10	10	10	10	10	10	10	10	10.00
GMS	367.30	92.22	29.49	29.33	26.10	21.15	17.12	13.80	

Plasma neutralizing titers ID<sub>50</sub> were expressed by the reciprocal of plasma dilutions. Plasma titers of <20 were assigned a value of 10 for GMT calculations. GMT, geometric media titer; GMS, geometric media susceptibility; P, progressor; LTNP, long-term nonprogressor; VC, viremic controller; NC, viremic noncontroller; EC, elite controller; psV, pseudovirus.

Legend: ■ highly potent neutralizing; ■ potent neutralizing; ■ medium neutralizing; ■ poor neutralizing; □ nonneutralizing. Color image available online at [www.liebertpub.com/aid](http://www.liebertpub.com/aid)



the PBMC assay as did 60% (6/10) of progressor individuals, with titers ranging from 1:30 to >1:160. It is also noteworthy that X4 HIV-1 IIIB, although originally a viral isolate, no longer exhibits characteristics of a primary isolate, increasing the bias toward their representation *in vivo*. This isolate was chosen as many of the neutralization studies available for Brazilian plasma employed this virus, thereby allowing comparison of results. The TZM-bl NAb assay demonstrates a sensitivity of 95% and 60% concordance with the PBMC assay according to Polonis *et al.*<sup>2</sup> However, the NeutNet project recommends that both tests be performed until agreement is reached on which *in vitro* assay best correlates with protection *in vivo*.<sup>20</sup> The comparison of the neutralization potency of different reagents in the TZM-bl NAb/psV assay with results from the PBMC neutralization assay showed a discrepancy in the titration of plasmas as described by other studies.<sup>2,20,23,24</sup>

A difference between pools of plasma from individuals infected with the same subtype (B or F1) or variant of the HIV-1 B subtype (B/Bbr) was observed (Fig. 1). However, the B/Bbr (GWGR) pool showed high neutralization titers in both techniques. The Mann-Whitney test was used to determine if neutralization titers against HIV-1 IIIB and psVs differed between HIV-1 subtype plasma pools and *p* values of <0.05 indicated statistical significance (GraphPad Prism version 5.01). The pool of B/Bbr plasma had a neutralization capacity similar to subtype F1 (*p* value=0.2114), and was higher than the pool of B plasma versus F1 (*p*=0.0337) or B versus B/Br (*p*=0.0017); therefore in order of potency neutralizing the results are B/Br pool=F1 pool > B pool. In Brazil, subtype B infections are characterized by high frequencies of viruses with GWGR in the *env* gene (HIV-1 B/Bbr subtype/variant).<sup>26</sup> Some studies have associated this genotype with a slower disease progression.<sup>27</sup> Additionally, Casseb *et al.*<sup>28</sup> observed an avidity of the anti-V3 (GWGR) antibodies greater than in GPGR patients and Bongertz *et al.*<sup>6</sup> revealed that the genotype B/Bbr was able to induce a greater response against peptides V3-GWGR than the opposite. Corroborating, we observed that the humoral immune response to HIV-1 was broader for Bbr pools neutralizing psV B and HIV-1 IIIB

(GPGR). This indicates that the proline-to-tryptophan substitution on top of the V3 loop may interfere with pathogenicity and immunogenicity.

A higher breadth and magnitude of the anti-HIV-1 Nab was observed in the P plasma from Brazilian individuals infected with the locally prevalent HIV-1 subtypes, with GMT 10 times greater than LTNP individuals. The majority of plasma from LTNP in both tests showed a less broad neutralization, suggesting that the low levels of replication that occur in these patients may lead to a more limited viral diversification and low antigen stimulation preventing a high-titer broad antibody response. Van Giels *et al.*<sup>29</sup> observed an association between high plasma viral RNA load and low CD4<sup>+</sup> cells and the development of cross-reactive neutralizing activity; however, no correlation between the presence of cross-reactive neutralizing activity and the clinical course of infection was demonstrated.

In conclusion, 44% of plasma had the ability to neutralize the psVs in the Nab TZM-bl assay and 55% neutralized strain HIV-1 IIIB in the PBMC assay. These interesting neutralization percents with Brazilian plasma reveal the type of antibody response that could promote the design of improved vaccines correlating with epitope specificity of antibodies induced during infection.

The data presented in this study may contribute to the selection of candidate vaccines in preclinical and clinical studies in Brazil. Although the induction of HIV-1 neutralizing antibodies remains a major scientific challenge in vaccine development, the success of the introduction of these reference assays encourages the participation of Brazil in future comparative assessments of anti-HIV-1 neutralizing antibodies.

#### Acknowledgments

We are grateful to the Collaboration for AIDS Vaccine Discovery (CAVD) funded by the Bill and Melinda Gates Foundation (grant 38619) Global HIV Vaccine Enterprise (GHVE) Central Service Facilities (CSFs), specifically Dr. D. Montefiori's Vaccine Immune Monitoring Center (VIMC) (grant 383-0920). We thank the NIH AIDS Research and Reagent Program for the donation of HIV-1 psVs and TZM-bl cells (#8129). Monoclonal antibody 2F5 and soluble CD4 (sCD4) were kindly donated by the National Institute for Biological Standards and Control with funding from the Project Neut Net-EC FP6-2003-LifeSciHealth contract no. LSSP-CT-2004-012190. We also thank for the donation of normal human buffy coats by the University Hospital Clementino Fraga Filho/UFRJ and Dr. Luciene C. Scherer of the Central Laboratory of Public Health of the Porto Alegre, RS. We are grateful to all individuals for donating blood to enable us to carry out this study.

This study was supported by the Brazilian Ministry of Health (# 147/08 DST/AIDS-UNESCO/IOC-/LABAIDS). The Bill and Melinda Gates Foundation Collaboration for AIDS vaccine discovery (CAVD) project Global HIV Vaccine Enterprise (grant 38619) financed the training and materials for use in the TZM-bl NAb assay.

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

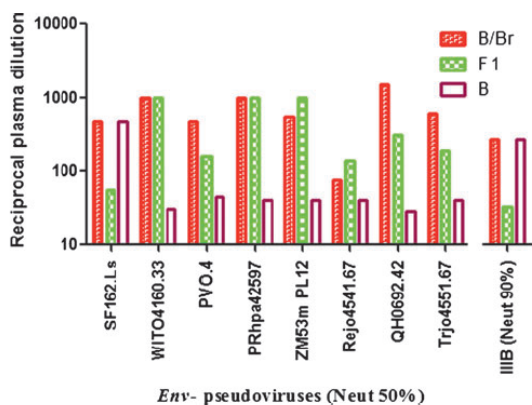


FIG. 1. Neutralizing activity of pooled subtype B, F1, or variant B/Bbr plasma for each of the *env*-pseudoviruses and HIV-1 IIIB. Color image available online at [www.liebertpub.com/aid](http://www.liebertpub.com/aid)

## References

1. Baum L: Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS* 2010;7(1):11–18.
2. Polonis VR, *et al.*: Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology* 2008;375(2):315–320.
3. Ho DD, Rota TR, and Hirsch MS: Antibody to lymphadenopathy-associated virus. *N Engl J Med* 1985;312:649–650.
4. Robert-Guroff M, Brown M, and Gallo RC: HTLV-III neutralising antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* 1985;316:72–74.
5. Weiss RA, *et al.*: Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature* 1985;316(6023):69–72.
6. Bongertz V, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by plasma from B or F genotype infected individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(1):85–89.
7. Brown BK, *et al.*: Cross-clade neutralization patterns among HIV-1 strains from the six major clades of the pandemic evaluated and compared in two different models. *Virology* 2008;375(2):529–538.
8. Gray ES, *et al.*: The CAPRISA 002 study team. HIV-1 neutralization breadth develops incrementally over 4 years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *J Virol* 2011;85(10):4828–4840.
9. Rerks-Ngarm S, *et al.*: Vaccination with ALVAC and AIDS-VAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *J Med* 2009;361(23):2209–2220.
10. 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(3):431–441.
11. Bello G, *et al.*: Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *J Med Virol* 2009;81(10):1681–1690.
12. Verity EE, *et al.*: Viral phenotypes and antibody responses in long-term survivors infected with attenuated human immunodeficiency virus type 1 containing deletions in the *nef* and long terminal repeat regions. *J Virol* 2007;81:9268–9278.
13. Carotenuto P, Looij D, Keldermans L, De Wolf F, and Goudsmit J: Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. *AIDS* 1998;12(13):1591–1600.
14. Montefiori DC: Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV, and SHIV in luciferase reporter gene assays. *Curr Protoc Immunol* 2005;Chapter 12:Unit 12.11.
15. Montefiori DC: Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. *Methods Mol Biol* 2009;485:395–405.
16. Li M, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol* 2005;79(16):10108–10125.
17. Casado C, *et al.*: Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 2010;5(6).
18. Bongertz V, *et al.*: High neutralization sensitivity of a Brazilian subtype F HIV-1 primary isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24(Suppl 1):P04.
19. Seaman MS, *et al.*: Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J Virol* 2010;84(3):1439–1452.
20. Fenyo EM, *et al.*: International network for comparison of HIV neutralization assays: The NeutNet report. *PLoS One* 2009;4(2):e4505.
21. Ochsenbauer C and Kappes JC: New virologic reagents for neutralizing antibody assays. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4(5):418–425.
22. Mascola JR and Montefiori DC: The role of antibody in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010;(28):413–444.
23. Binley JM, *et al.*: Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 2004;78(23):13232–13252.
24. Choudhry MY, *et al.*: Increased efficacy of HIV-1 neutralization by antibodies at low CCR5 surface concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(3):1107–1115.
25. Bongertz V, *et al.*: Vertical HIV-1 transmission: importance of neutralizing antibody titer and specificity. *Scand J Immunol* 2001;53(3):302–309.
26. Morgado MG, *et al.*: V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10(5):569–576.
27. Diaz RS, *et al.*: Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. *Virology* 2008;381(2):184–193.
28. Casseb J, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B variant showed an increasing avidity of the anti-V3 antibodies over time compared to the subtype B US/European strain in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(1):69–71.
29. Van Gils MJ, *et al.*: Prevalence of cross-reactive HIV-1 neutralizing activity in HIV-1-infected patients with rapid or slow disease progression. *AIDS* 2009;23(18):2405–2414.

Address correspondence to:

Dalziza Almeida  
 Fundação Oswaldo Cruz—Ministry of Health  
 Av. Brasil 4365, Pav. 26, sala 413  
 Rio de Janeiro 21040-900  
 Brazil

E-mail: dalziza@gmail.com



1       **Cross-neutralizing antibodies in HIV-1 individuals**  
2       **infected by subtypes B, F1, C or the B/Bbr variant in**  
3       **relation to the genetics and biochemical**  
4       **characteristics of the *env* gene**

5       Running title: Cross-neutralizing antibodies anti-HIV-1 in Brazilian individuals

6       **Authors:** Almeida DV<sup>1\*</sup>, Venegas KM<sup>1</sup>, Grinsztejn, B<sup>2</sup>, Veloso VG<sup>2</sup>, Guimarães ML<sup>1</sup>

7       **Address:**

8       <sup>1</sup> Laboratory of AIDS and Molecular Immunology. Oswaldo Cruz Institute - FIOCRUZ. Rio  
9       de Janeiro. Brazil.

10      <sup>2</sup> National Institute of Infectology/ FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brazil.

11

12      **Corresponding author:**

13      \*Dalziza Victalina de Almeida

14      Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular

15      Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

16      Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos.

17      21045-900 - Rio de Janeiro, Brasil. Phone +55 21 38658154

18      Fax: + 55 21 38658173

19      E-mail: dalziza@ioc.fiocruz.br

## 20 **Abstract**

21 Various HIV-1 *env* genetic and biochemical features impact the elicitation of cross-reactive  
22 neutralizing antibodies in natural infections. Thus, we aimed to investigate cross-  
23 neutralizing antibodies in individuals infected with HIV-1 *env* subtypes B, F1, C or the B/Bbr  
24 variant as well as *env* characteristics. Therefore, plasma samples from Brazilian chronically  
25 HIV-1 infected individuals were submitted to the TZM-bl neutralization assay. We also  
26 analyzed putative N-glycosylation sites (PNGLs) and the size of gp120 variable domains  
27 in the context of HIV-1 subtypes prevalent in Brazil. We observed a greater breadth and  
28 potency of the anti-Env neutralizing response in individuals infected with the F1 or B HIV-  
29 1 subtypes compared with the C subtype and the variant B/Bbr. We observed greater V1  
30 B/Bbr and smaller V4 F1 than those of other subtypes ( $p < 0.005$ ), however neither was  
31 there a correlation verified between the variable region length and neutralization potency,  
32 nor between PNGL and HIV-1 subtypes. The enrichment of W at top of V3 loop in weak  
33 neutralizing response viruses and the P in viruses with higher neutralization susceptibility  
34 was statistically significant ( $p = 0.013$ ). Some other signatures sites were associated to HIV-  
35 1 subtype-specific F1 and B/Bbr samples might influence in the distinct neutralizing  
36 response. These results indicate that a single amino acid substitution may lead to a distinct  
37 conformational exposure or load in the association domain of the trimer of gp120 and  
38 interfere with the induction power of the neutralizing response, which affects the sensitivity  
39 of the neutralizing antibody and has significant implications for vaccine design.

40 **Keywords:** HIV-1 subtypes, Broadly Neutralizing Antibodies, consensus pseudovirus.

## 41 **Introduction**

42 A vaccine that aims to elicit strong HIV neutralizing antibodies (nAb) must overcome  
43 their genetic variability at least at the antigenic level. The neutralizing activity induced by  
44 HIV-1 should aid in the understanding of the immune response elicited by vaccine  
45 candidates [1–3]. Several studies have reported that antibodies from plasma obtained  
46 during chronic HIV-1 infection could potently neutralize primary isolates of HIV-1 and were  
47 able to neutralize genetically diverse and distinct HIV-1 strains [4–8]. These nAb primarily  
48 recognize five different epitopes on Env, including the CD4 binding site (CD4bs), V1/V2  
49 loop, V3 loop, interface gp120/gp41 and the membrane-proximal external region (MPER)  
50 on gp41 [9–12].

51 In response to the constant HIV-1 genetic evolution, the epitope specificity of the  
52 nAb that is gradually developed during infection also influences the breadth of the nAb  
53 responses [13,14]. Some viral features, such as variable loop lengths and the number of  
54 glycosylation motifs, are associated with the neutralization breadth [3,15–17]. Therefore,  
55 the characterization of neutralization specificities for distinct subtypes is a difficult but  
56 critical process to accumulate knowledge and develop a successful vaccine.

57 In Brazil, HIV-1 subtypes B, their B/Bbr variants, F1 and C, as well as diverse  
58 recombinants evolving these subtypes are prevalent [18,19]. The B/Bbr variant, which  
59 represents 37 to 57% of HIV-1 subtype B strains in the country, differs from the pandemic  
60 subtype B by the substitution of the amino acid proline by a tryptophan at the top of the V3  
61 loop of gp120 (GWGR instead of the classical GPGR) [18,20–22] and its antigenic  
62 characteristics [20,23,24]. HIV-1 subtype C is the most prevalent worldwide and is involved  
63 in 20 to 80% of HIV-1 infections in Southern Brazil [25]. This subtype is spreading in other  
64 Brazilian geographic regions, and most of these sequences formed a monophyletic cluster  
65 [26]. The F1 subtype has a prevalence of 8.4 to 24.4% in the Southeastern region of Brazil  
66 [27]. The F1 subtype is also highly prevalent in Romania [28] and Galicia [29] despite its

67 reduced prevalence worldwide. In this context, the present study aimed to investigate  
68 possible *env* genetic characteristics related to broad and potent neutralization in plasma  
69 from individuals infected with HIV-1 predominant subtypes in Brazil.

## 70 **Materials and Methods**

71 **Study group:** HIV-1-infected patients undergoing clinical follow-up at the Evandro Chagas  
72 Nacional Institute of Infectious Diseases from the Oswaldo Cruz Foundation (INI-  
73 FIOCRUZ) were invited to participate in this study and selected for enrollment. The main  
74 criteria for inclusion were: having at least 6 months of HIV-1 infection, and plasma samples  
75 representing the following HIV-1 Brazilian subtypes (B, B/Bbr, F1 and C), which have been  
76 previously classified in other studies from our group, based on C2-V3 *env* region subtyping.  
77 All protocols in the present study were performed in accordance with institutional guidelines  
78 and resolutions and were approved by the Oswaldo Cruz Institute Ethics Committee  
79 (CAAE: 01080112.4.0000.5248). However, we were not able to obtain informed consent  
80 for all participants included in this study, but plasma samples have been de-identified prior  
81 to analysis in order to maintain participant confidentiality. Moreover, a confidentiality letter  
82 was signed by the research team responsible for the experiments, thus ensuring the  
83 patients anonymity.

84 **Full-length *env* Sequencing:** The *env* gene was amplified from PBMC by touchdown  
85 PCR [30] under the following conditions: 94°C×2' for one cycle; 94°C×30", 64°C×45"  
86 (decreasing 0.2°C per cycle) and 68°C×2' for 20 cycles; 94°C×30", 60°C×45", 68°C×2' for  
87 20 cycles and a final extension cycle of 68°C×10'. The outer primers were BC1s  
88 (AGAAATGGAGCCAGTAGATC)/*env*M, and the inner primers were *env*Atopo and *env*M  
89 [31]. Sequences were generated using the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing

90 Ready Reaction Kit with an automated ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,  
91 CA, USA).

92 **Sequence analysis:** Sequences were assembled and edited using the SeqMan software  
93 from the package DNASTAR Lasergene (MA, USA). Nucleotide and deduced amino acid  
94 sequences were initially aligned using ClustalW on Mega 6 [32] and then re-aligned with  
95 HXB2 on Gene Cutter tools of the HIV sequence database from Los Alamos National  
96 Laboratory (LANL). HIV-1 subtyping was obtained via the REGA HIV-1 subtyping tool [33]  
97 and confirmed using neighbor-joining phylogenetic trees from the *env* region. We also used  
98 the programs Variable Region Characteristics, N-linked glycosylation sites (PNLG) [34],  
99 and CATNAP (Compile, Analyze and Tally NAb Panels ) [35]. For the analysis of HIV-1-  
100 specific signatures, VESPA (viral epidemiology signature pattern analysis) was used. All  
101 programs were available from LANL. For the analysis of HIV-1 subtype-specific and  
102 neutralization potency signatures, thresholds of 1.0 and 0.6 were used, respectively.

103 **Sequence data:** The 51 HIV-1 sequences obtained in the present study are available in  
104 the GenBank database (accession numbers KX181891-KX181941).

105 **Pseudovirus (psV):** The psVB (plasmid Rpha42597) [16] and psVC (plasmid Cap210.08)  
106 [15] from the NIH neutralization panel were selected based on minor genetic *env* distances  
107 to the Brazilian HIV-1 subtype B and C consensus 0.24 and 0.19 of divergence,  
108 respectively. Two pseudoviruses (psVGWGR and psVF1) were produced based on the  
109 consensus sequence obtained from Dambe software  
110 (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>) using HIV-1 Env B/Bbr (n=15) and F1 (n=11)  
111 sequences. The psVGPGR was produced by site-directed mutagenesis of the tryptophan  
112 from the B/Bbr consensus sequence to the proline on the top of the V3 loop of gp120. All  
113 three consensus pseudovirus sequences were synthesized by GenScript™ (NJ, USA),

114 and amplicons were cloned into the expression vector pcDNA3.1DV5-His TOPO TA  
115 (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA). The plasmids were expanded in *E. coli* Top10,  
116 extracted using Wizard Plus Miniprep DNA Purification Systems (Promega, WI, USA) and  
117 quantified in a Nanodrop (Wilmington, USA) spectrophotometer. The viral stocks of single  
118 round HIV-1 *env* psVs infection were produced by co-transfecting 293T/17 cells (ATCC,  
119 VA, USA) (70% of confluent cells in T75) with 4 µg of an HIV-1 rev/env expression plasmid  
120 and 10 µg of pSG3ΔEnv. For transfections, 50 µL P3000 reagent and 35 µL Lipofectamine  
121 3000 (Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagent, Thermo-Fischer Scientific, MA, USA) were used in  
122 715 µL of Opti-MEM<sup>®</sup> Reduce Serum Medium for each mix. After optimization, we followed  
123 proceedings according to the manufacturer's recommendation. Using *env* amplification,  
124 the psVs were sequenced to confirm that they exactly matched the initial sequences.

125 **Neutralization Assay:** The 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) for each  
126 pseudovirus preparation was determined by infection of TZM-bl cells as previously  
127 described [16]. To determine the capacity of the assay to discriminate between neutralizing  
128 antibodies and possible plasma artifacts, we used normal human plasma samples and the  
129 plasmid murine leukemia virus (MuLV) *env* as controls. Plasma was inactivated after the  
130 neutralization assay at 56°C x 60'. TZM-bl cells were expanded and stored following the  
131 instructions provided at [http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-](http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm)  
132 [strains/html/home.htm](http://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm). TZM-bl is a HeLa cell that was engineered to express CD4 and  
133 CCR5 [36] and contains integrated reporter genes for firefly luciferase and *Escherichia coli*  
134 β-galactosidase under the control of an HIV-1 LTR [37], permitting sensitive and accurate  
135 measurements of the HIV-1 infection. The psVs (200 TCID<sub>50</sub>) were incubated with plasma  
136 in triplicate and added to TZM-bl cells in the presence of DEAE-dextran 20 µg/mL.  
137 Neutralizing antibodies titers were expressed by the reciprocal of plasma dilutions. The  
138 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the monoclonal antibodies (mAbs) 2F5, 2G12, 447-

139 D, and CH01 and soluble CD4 inhibitor were used at a given range of dilutions (final  
140 concentration: 10 µg/mL), this experiment was repeated three times to generate the mean  
141 value. These values were measured and analyzed with Excel-based Macro [38]. The mAbs  
142 and sCD4 were obtained from the AIDS Research and Reference Program, Division of  
143 AIDS (DAIDS), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National  
144 Institutes of Health (NIH).

145 **Statistics:** The statistical analysis was performed using GraphPad Prism (V-5.01-  
146 GraphPad, USA). One-away ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test  
147 for correction were used to analyze significant differences between the means of geometric  
148 media sensibility (GMS) according to the psV and the nAb titers of the different plasma  
149 samples grouped by subtype and neutralization potency. Additionally, one-way ANOVA  
150 followed by Dunnett's multiple comparison tests was used to evaluate the differences in  
151 the length of variable regions and the PNLG of gp160. To indicate that there might be  
152 significant associations between amino acids in particular positions in the alignment and  
153 the neutralization susceptibility of a given Env, contingency tables and respective statistics  
154 were used (i.e. chi-square or Fisher's exact test for categorical variables). P-values less  
155 than 0.05 were considered statistically significant

## 156 **Results**

### 157 **HIV-1 *env* diversity and phylogeny**

158 Based on the REGA HIV subtyping tool and in the phylogenetic analyses of the 60  
159 full-length *env* sequences (2.5 kb) from HIV-1 participants, 26 were reclassified as HIV-1  
160 subtype B (12 HIV-1 B pandemic and 14 HIV-1 B/Bbr), 14 C subtype and 11 subtype F1  
161 (Fig 1). In addition, nine subtypes, which were classified as HIV-1 unique recombinant  
162 forms (8 BF1 and 1 BC) were excluded from subsequent analysis. The following genetic

163 divergence intersubtypes/variants were observed: B and B/Bbr was 0.19, B-F1=0.31, B-  
164 C=0.33, F1-C=0.32, F1-B/Bbr=0.32 and C-B/Bbr=0.34.

165 **Fig 1. Phylogenetic tree of *env* gene (nt-2574) was generated by the Neighbor-  
166 Joining method using HIV-1 reference sequences (Ref).**

167 The bootstrap analysis was performed with 1000 replicates. The branches in red represent  
168 the recombinant samples.

### 169 **Neutralization phenotype**

170 To characterize the neutralization phenotypes of HIV-1 Env-pseudoviruses  
171 (psVGWGR, psVGPGR and psVF1) obtained from Brazilian consensus sequences and  
172 those selected from the neutralization panel psVB (Rhpa) and psVC (Cap210), we  
173 characterized their phenotypes using mAbs and sCD4. The Brazilian psVs were inhibited  
174 by all mAbs and presented reduced IC<sub>50</sub> geometric means when compared to psVB and  
175 psVC (Table 1). sCD4 neutralized all of the studied psVs, and mAbs 2F5, and CH01 were  
176 able to neutralize almost all of the psVs with the exception of the psVC and psVB,  
177 respectively. The mAbs 2G12 and 447-D inhibited only Brazilian psVs. Furthermore, the  
178 psVF1 had the strongest neutralization sensitivity for all mAbs.



179 **Table 1. Mean inhibitory concentration (IC) 50 values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for triplicate assays**  
 180 **with pseudoviruses (psVs) and the geometric mean (GM) as indicated.**

	Mean IC <sub>50</sub> in TZM-bl ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
	2F5	2G12	447_D	CH01	sCD4
psVF1	0.10	0.06	0.01	0.05	1.09
psVGPR	3.50	6.70	2.15	8.70	1.24
psVGWGR	4.00	3.05	8.72	3.30	0.15
psVB(Rhpa)	9.90	>10	>10	>10	3.70
psVC(Cap210)	>10	>10	>10	3.20	1.90
GM of detected	1.92	1.07	0.57	1.46	1.04
GM of all	4.24	6.57	4.51	3.40	1.04
% detected	80%	60%	60%	80%	100%

●  $\leq 0.625$  (1st Quartile) ●  $\leq 3.000$  (2nd) ●  $\leq 3.750$  (3rd) ●  $> 3.750$  ○ Undetected

181 **Legend Table 1.** The results were plotted on CATNAP (<http://hiv.lanl.gov/catnap>). The cell  
 182 color indicates the following categories: white, no neutralization ( $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ); green,  
 183 weak neutralization; orange and yellow, moderate neutralization; and red, strong  
 184 neutralization. The psV MuLV was tested together as a negative control, and the  $\text{IC}_{50}$  was  
 185 undetected.

#### 186 **Association of breadth of neutralizing antibody potency to HIV-1 ENV subtypes**

187 The potential of the HIV-1 plasma samples to neutralize the psVs was displayed in  
 188 magnitude sorting and grouped according to the geometric mean titer (GMT)  $\text{ID}_{50}$  values.  
 189 Samples were grouped as with low neutralization potential (GMT 20-99), moderate  
 190 potential (GMT 100-999) or high neutralization potential (GMT  $> 1000$ ) (S1 Table). Taken  
 191 together, almost all of our 51 subjects exhibited nAb response; however, 18 (35%) of them  
 192 had no nAb response for one or two psVs. Of the 51 plasma samples analyzed, 16 (31.4%)  
 193 were classified as low potential, 19 (37.2%) as moderate potential and 16 (31.4%) as high  
 194 neutralization potential (S1 Table). According to this analysis, plasma samples from all

195 studied individuals infected with HIV-1 subtypes B and F1 presented high or moderate  
196 neutralization potency ID<sub>50</sub> values, and most individuals from the B/Bbr variant and subtype  
197 C exhibited low and moderate neutralization potency, respectively (Fig 2). Additionally, the  
198 GMT of variant B/Bbr (144) was 11-fold smaller ( $p < 0.001$ ) than the GTM of subtype B  
199 samples (1605). This result reveals distinct immunogenic properties between HIV-1  
200 subtypes. No significant nAb activity was observed when plasmas were tested against a  
201 negative control (psV MuLV).

202 **Fig 2. Neutralization range according to HIV-1 subtypes.**

203 **Legend Fig 2.** The bars represent the percentage of potential neutralizing antibody for  
204 each plasma group, according to HIV-1 subtype.

205 **Cross neutralize reactive response to *env* psV**

206 The psVGWGR had the strongest reactive response between analyzed psVs, with  
207 a geometric mean of sensibility (GMS) of 886, indicating similar sensitivity as psV tier 1. In  
208 addition, only one nAb B/Bbr plasma sample did not neutralize this psV. Interestingly, the  
209 GMS of psVGWGR is 3.7-fold higher compared with psVGPGR ( $p < 0.01$ ), even though  
210 they differ in only one single amino acid (W to P) (S1 Table). Following the sequence of  
211 susceptibility, the psVC (tier 2) exhibited a GMS of 572, which is approximately double the  
212 susceptibility of psVF1 (258), psVGPGR (238) and psVB (185) (S1 Table).

213 In addition to the potent nAb detected in subtype B (GMT 1605) and F1 plasma  
214 samples (GMT 777), broad cross neutralization to the psV was noted. Although subtype  
215 C plasma samples exhibited low neutralization antibody titers, the antibodies were more  
216 specific for the V3 GWGR epitope, and the GMT values from psVGWGR and psVC were  
217 771 and 238, respectively (Table 2).

218 **Table 2. Geometric mean titer of nAb from HIV-1 plasma samples B, B/Bbr, C and F1**  
 219 **against psVs.**

	Plasma Samples			
	GMT B	GMT F	GMT C	GMT B/Bbr
psVGWGR	2833	1025	771	335
psVC	1577	1338	238	296
psVB	1977	631	25	68
psVF1	914	772	136	70
psVGPGR	1320	424	63	132
GMT	1605	777	180	144

220 **Legend Table 2.** Data from the neutralization assay of all psV evidenced by GMT of  
 221 subtype plasma samples. (psV: pseudovirus; GMT: geometric mean titer).

222 To assess the impact of the tryptophan to proline substitution, we compared the  
 223 disagreement in the neutralization ranges between psVGWGR and psVGPGR in each  
 224 plasma subtype group. From this analysis, we note that the disagreement in neutralization  
 225 ranges were as follows: 28% of discordance in plasma samples from subtype F1, 34% for  
 226 B, 50% for B/Bbr and 86% for C (Fig 3).

227 **Fig 3. Dissonance of neutralization range between psVGWGR and psVGPGR.**

228 **Legend Fig 3.** The bars represent the percentage of dissonance in neutralization range  
 229 for each HIV-1 subtype.

### 230 **Analysis of the PNLG sites and variable regions of HIV-1 in plasma samples**

231 Here, we analyzed the Env protein characteristics described to influence HIV-1  
 232 neutralization sensitivity, such as the number of PNLG and length of gp120 variable regions  
 233 in HIV-1 plasma samples grouped by subtypes. Our results showed that the size of each  
 234 gp120 variable region among HIV-1 subtypes had a statistically significant difference. We  
 235 observed greater V1 B/Bbr and smaller V4 F1 than those of other subtypes ( $p < 0.005$ )

236 (Fig 4). However, neither was a correlation verified between variable region length and  
 237 neutralization magnitude, nor between PNLG and HIV-1 subtypes (Table 3).

238 **Fig 4. Comparison of variable region lengths among Brazilian HIV-1 (B, B/Bbr, F1**  
 239 **and C) subtypes.**

240 One-way ANOVA p-values in subsequent Dunnett's multiple comparison tests indicating  
 241 statistically significant difference ( $p < 0.005$ ) are marked with an asterisk. The horizontal  
 242 bars at the top of each column indicate the means of length for each variable region.

243 **Table 3. Number of potential N-linked glycosylation (PNLG) sites of HIV-1 Env**  
 244 **sequences according to the range of neutralization potency and HIV-1 subtypes.**

Group	Number of PNLG					
	Gp120		Gp41		Gp160	
	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean	Min-Max	Mean
High nAb	21 - 30	25.5	3 - 6	4.5	25 - 36	30.5
Low nAb	22 - 30	26.0	4 - 5	4.0	27 - 35	31.0
F1	21 - 31	26.0	4 - 7	5.5	25 - 38	31.5
B	22 - 30	26.0	3 - 5	4.0	26 - 35	30.5
B/Bbr	23 - 30	26.5	3 - 5	4.0	27 - 35	31.0
C	20 - 29	24.5	4 - 5	4.5	24 - 32	28.0

#### 245 Neutralization signature patterns

246 Some authors have proposed that some Env features that elicit strong antibodies  
 247 in natural infection might be useful to integrate vaccine design immunogens [39,40]. Thus,  
 248 we verified possible association of some Env signatures patterns with neutralization  
 249 potency and HIV-1 subtypes in an alignment of 937 amino acids sites containing all 51  
 250 ENV sequences (S2 Fig).

251 In order to verify the potential signatures related to neutralization susceptibility 16  
 252 Env sequences that presented a high neutralization range were compared with 16

253 sequences with lower neutralization ranges. From this analysis, three signatures were  
254 suggested to be enrichment, (68.8%) L14W (56.2%), (81.2%) P360W (68.8%), and  
255 (56.2%) R843H (62.5%). Here, the first amino acid represents high neutralization and the  
256 second amino acid represents low neutralization potency. The results of signature  
257 analyses were combined on contingency table (Chi-square or Fisher's exact tests) and  
258 only one statistically significant signature was identified, the site P360W ( $p=0.013$ ), position  
259 313 in relation to HXB2.

260         Concerning HIV-1 subtype signatures, we verified seven to twelve signatures  
261 (substitution or insertions) in a pair-to-pair comparison. These signatures were localized in  
262 the signal peptide, C1, V2, C2, V3, and V4, with the majority located in gp41 (Fig 5 and S1  
263 Fig). From this analysis, comparing HIV-1 subtype F1 samples (GMT 777), which showed  
264 better neutralizing response than B/Bbr samples (GMT 144), we verified subtype-specific  
265 signatures located in regions C2, V3 and gp41, which might influence in the distinct  
266 neutralizing response.

267 **Fig 5. Scheme of viral envelope gene (gp120 and gp41) and representation of HIV-1**  
268 **subtype-specific signatures.**

269 **Legend Fig 5:** The asterisk indicates insertions or deletions. The numbers represent the  
270 position of each HIV-1 subtype-specific signatures in reference to amino acid alignment.

## 271 **Discussion**

272         We evaluated the neutralization breadth and potency of plasma samples from HIV-1-  
273 infected Brazilian individuals using a representative panel of psVs and attempted to  
274 correlate the antibody response to the genetic and biochemical characteristics of HIV-1  
275 subtypes. Comparing the neutralizing phenotype of psVs, we verified that psVF1 and

276 psVGPGR were the most cross-susceptible to the inhibitors. The resistance of psVC and  
277 psVB to some mAbs were also verified in others studies [39,41–44], and in the present  
278 study this resistance could be associated with escape mutations. In the mAb 2F5, which  
279 recognizes the ELDKWA epitope [45] from gp41, we verified a change from an alanine to  
280 a glutamine in psVC. For the 2G12 mAb, which recognizes the mannose residues N295,  
281 N332, N339, and N392 and the V4 loop in relation to HXB2 positions [46], we observed  
282 that some asparagine residues are absent in psVC and psVB, leading to a phenotypical  
283 resistant profile (S2 Fig, alignment residues: N321, N359, N366, and N419) [41,47–51].  
284 Given that mAb 447-D is specific for viruses that carry the GPGR motif at the top of V3  
285 loop [52], a strong neutralization of psVGPGR, psVB (Rhpa) and psV F1 was expected.  
286 However, the psVB (Rhpa) was not inhibited at 10 µg/mL (IC50), but in previous studies in  
287 concentrations of 48.9 µg/mL [52] and 46.2 µg/mL [53] a susceptibility was observed,  
288 indicating that this relevant epitope on the V3 loop was not easily exposed in this psV. The  
289 CH01 is a broad nAb used to target the second Env site of vulnerability by covering amino  
290 acid residues in V1V2 loops and sugar moieties at N160 (S2 Fig, N173 on V2) [53]. Given  
291 that this asparagine was present in all psVs, we suggested that the distinct neutralization  
292 susceptibility verified to CH01 could be associated with the V1V2 length [49–51]. All psVs  
293 were sensitive to sCD4, which causes irreversible shedding of gp120 from and  
294 subsequently inactivates Env [54]. Therefore, our results are in full agreement with  
295 previous studies, confirming the reliability and accuracy of the assay. We also emphasize  
296 that the use of broadly neutralization panel including psVs based on local HIV consensus  
297 sequences is of paramount importance to better characterize HIV humoral immune  
298 response.

299         Screening the neutralizing activity of a panel of 51 HIV-1 plasmas samples against  
300 the five psV, we observed nAbs in 31.4% of the analyzed samples, which is consistent

301 with the 10 to 30% values detected in recent studies [55,56]. Herein, nAbs were detected  
302 in most of the samples from HIV-1 subtypes F1 and B (GPGR). Although these subtypes  
303 are genetically distant, they are correlated immunologically as verified by V3 peptide  
304 seroreactivity [57] and IFN- $\gamma$  ELISpot response to Gag and Nef [58].

305         We have not determined whether the serum neutralization breadth observed here  
306 is specifically prevalent in the plasma samples using assays. However, by dissonance  
307 analysis, we observed that subtype C plasma samples exhibited a specific response to  
308 GWGR that is increased when compared with GPGR or GPGQ motifs present in V3 of the  
309 psVs. Thus, we suggest that the conformational change deriving from amino acid  
310 substitution (GWGR) could result in a better accessibility of the epitope. As previously  
311 described, the influence of the modified variable regions on the adjacent protomers results  
312 in altered access to nAbs [12,59,60]. Additionally, in general, broad serum neutralization is  
313 characterized by the presence of one or very few antibody specificities [10,45].

314         We detected an increased amount of N-glycosylation sites in plasma sample  
315 sequences of low neutralization range and psVs with minor GMS, however it was not  
316 statistically significant. This finding suggests a masking of the nAb epitope by glycans on  
317 the surface of Env, forming a “glycan shield” that reduces access to protein epitopes and  
318 nAb induction. According to van Gils et al., [60] an increase in the length of the V1V2 loop  
319 and the number of PNLG on the glycoprotein is directly associated with the protection of  
320 HIV-1 against HIV-specific neutralizing antibodies. In relation to the psVs, we observed  
321 that psVGWGR and psVGPGR had the same number of PNLG but discordant GMS to  
322 plasma samples, and we assume that nAb in the plasma samples were more directional  
323 to the top of the V3 loop.

324 Of the 937 amino acids compared between the 51 sequences, only three (L14W,  
325 P360W and R843H) amino acids positions were more frequent in a particular neutralizing  
326 response groups. The amino acid position 14, which is part of the signal peptide, plays a  
327 role in the efficiency of the protein secretion, in the orientation of Env protein to the  
328 membrane, impacting folding and the exit from the endoplasmic reticulum [63]. The amino  
329 acid change of proline to tryptophan at 360 position can directly interfere with the formation  
330 of bridging sheet and adjacent surfaces from the outer domain of gp120, and this also  
331 impact to V3-loop antibodies that block the binding of gp120–CD4 complexes [64].  
332 Therefore, we observed that virus with W360 were more sensitive to neutralization and  
333 induced weak anti-Env response. The other signature pattern was observed on the  
334 cytoplasmic tail (R843H). The substitutions in this region can lead to effects on the binding  
335 of antibodies to the V1-V2 region, the V3 loop, or the C5 domain of gp120 [65]. This might  
336 suggest that alterations of amino acids composition in these regions (signal peptide, V3  
337 loop and cytoplasmic tail) are an important determining factor in the induction of nAb, at  
338 least in our study population. Such changes could be influencing the expression or binding  
339 to antibodies in exposed regions of each protomer.

340 Currently, little is known about antibody affinity maturation in relation to the  
341 presented antigen. In this process, antibody-antigen interactions are of great importance  
342 for the selection of B cell characteristics, such as structural peptide size and charge of the  
343 amino acids surrounding the electrostatic forces (hydrogen bridges, hydrophobic  
344 interactions and Van der Waals force) [66]. Recently, Doria-Rose and Gordon report about  
345 the possibility of the recruitment of specific viral sequences to activate a "correct" BCR and  
346 facilitate the development of particular powerful antibodies [67].

347 The limitations of our study are the same shared by most authors working with  
348 neutralizing antibodies. In fact, studies addressing nAb could be influenced by host genetic



349 characteristics, disease progression profile, HIV-1 viral load, and studies with small sample  
350 size due to the high costs of the experiments, especially in resource-limited settings. In our  
351 analysis, we considered only chronic HIV-1 infected individuals and explored viral  
352 characteristics such as HIV-1 subtypes, length of the variable regions, and differences on  
353 N-linked glycosylation sites (PNLG) that have been described to be implicated in the  
354 potency and breadth of nAb. We were able to observe that some individuals especially  
355 infected with HIV-1 subtypes B and F1 produce high titers of broadly reactive neutralizing  
356 antibodies, which are of particular interest for vaccine design. The presence of tryptophan  
357 instead of proline on the top of the V3 loop facilitates the exposure of the trimeric structural  
358 domain, contributing to viral neutralization. Therefore, it is important to highlight that these  
359 kinds of studies are able to increase understanding and add to the growing body of  
360 evidence that the antigenic and immunogenic properties of Env should facilitate the  
361 development of an effective HIV-1 vaccine.

362 **Acknowledgments:** We are grateful to the Collaboration for AIDS Vaccine Discovery  
363 (CAVD) funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Grant # 38619) Global HIV  
364 Vaccine Enterprise (GHVE) Central Service Facilities (CSFs) especially Dr D Montefiori's  
365 Vaccine Immune Monitoring Center (VIMC) (Grant # 383-0920). This work was partially  
366 supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ  
367 (grant number E26/110.517/2012). The funders had no role in study design, data collection  
368 and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Monick Lindenmeyer  
369 Guimarães is recipient of a CNPq Fellowship. We thank the NIH AIDS Research &  
370 Reagent Program for donation of HIV-1 pseudovirus, mAbs, plasmids and TZM-bl cells and  
371 to participants of the study for donation of blood. Julio Lima and Marcel de Sousa B.  
372 Santana thanks for his support on the statistical analyses. Also, we thank Dr. V Bongertz  
373 and Dr. H Pilotto for helpful suggestions.

374

375 **References:**

- 376 1. Klein F, Mouquet H, Dosenovic P, Scheid JF, Scharf L, Nussenzweig MC. Antibodies  
377 in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science*. 2013;341: 1199–204.  
378 doi:10.1126/science.1241144
- 379 2. Hraber P, Seaman MS, Bailer RT, Mascola JR, Montefiori DC, Korber BT.  
380 Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1  
381 infection. *AIDS*. 2014;28: 163–9. doi:10.1097/QAD.000000000000106
- 382 3. Gnanakaran S, Daniels MG, Bhattacharya T, Lapedes AS, Sethi A, Li M, et al.  
383 Genetic signatures in the envelope glycoproteins of HIV-1 that associate with broadly  
384 neutralizing antibodies. *PLoS Comput Biol*. Public Library of Science; 2010;6:  
385 e1000955. doi:10.1371/journal.pcbi.1000955
- 386 4. Almeida DV, Morgado MG, Côrtes FH, Guimarães ML, Mendonça-Lima L, Pilotto  
387 JH, et al. Short communication: neutralizing antibodies in HIV-1-infected Brazilian  
388 individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29: 488–92.  
389 doi:10.1089/AID.2012.0052
- 390 5. Binley JM, Wrinn T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, et al. Comprehensive  
391 cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus  
392 type 1 monoclonal antibodies. *J Virol*. 2004;78: 13232–52.  
393 doi:10.1128/JVI.78.23.13232-13252.2004
- 394 6. Walker LM, Simek MD, Priddy F, Gach JS, Wagner D, Zwick MB, et al. A limited  
395 number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in  
396 selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6: e1001028.

- 397           doi:10.1371/journal.ppat.1001028
- 398   7.   Asokan M, Rudicell RS, Louder M, McKee K, O'Dell S, Stewart-Jones G, et al.  
399       Bispecific Antibodies Targeting Different Epitopes on the HIV-1 Envelope Exhibit  
400       Broad and Potent Neutralization. *J Virol.* 2015;89: 12501–12.  
401       doi:10.1128/JVI.02097-15
- 402   8.   Kong R, Louder MK, Wagh K, Bailer RT, deCamp A, Greene K, et al. Improving  
403       neutralization potency and breadth by combining broadly reactive HIV-1 antibodies  
404       targeting major neutralization epitopes. *J Virol.* 2015;89: 2659–71.  
405       doi:10.1128/JVI.03136-14
- 406   9.   Guenaga J, Wyatt RT. Structure-guided alterations of the gp41-directed HIV-1  
407       broadly neutralizing antibody 2F5 reveal new properties regarding its neutralizing  
408       function. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002806. doi:10.1371/journal.ppat.1002806
- 409   10.   Klein F, Gaebler C, Mouquet H, Sather DN, Lehmann C, Scheid JF, et al. Broad  
410       neutralization by a combination of antibodies recognizing the CD4 binding site and a  
411       new conformational epitope on the HIV-1 envelope protein. *J Exp Med.* 2012;209:  
412       1469–79. doi:10.1084/jem.20120423
- 413   11.   West AP, Scharf L, Scheid JF, Klein F, Bjorkman PJ, Nussenzweig MC. Structural  
414       insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. *Cell.* Elsevier Inc.;  
415       2014;156: 633–648. doi:10.1016/j.cell.2014.01.052
- 416   12.   Gorman J, Soto C, Yang MM, Davenport TM, Guttman M, Bailer RT, et al. Structures  
417       of HIV-1 Env V1V2 with broadly neutralizing antibodies reveal commonalities that  
418       enable vaccine design. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;23: 81–90. doi:10.1038/nsmb.3144
- 419   13.   Mascola JR, Haynes BF. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's

- 420 pathways. *Immunol Rev.* 2013;254: 225–44. doi:10.1111/imr.12075
- 421 14. Wibmer CK, Bhiman JN, Gray ES, Tumba N, Abdool Karim SS, Williamson C, et al.  
422 Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma  
423 neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and  
424 immunotypes. *PLoS Pathog.* 2013;9: e1003738. doi:10.1371/journal.ppat.1003738
- 425 15. Li M, Salazar-Gonzalez JF, Derdeyn CA, Morris L, Williamson C, Robinson JE, et al.  
426 Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus  
427 type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections  
428 in Southern Africa. *J Virol.* 2006;80: 11776–90. doi:10.1128/JVI.01730-06
- 429 16. Li M, Gao F, Mascola JR, Stamatatos L, Polonis VR, Koutsoukos M, et al. Human  
430 immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections  
431 for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol.*  
432 2005;79: 10108–25. doi:10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005
- 433 17. Tang H, Robinson JE, Gnanakaran S, Li M, Rosenberg ES, Perez LG, et al. epitopes  
434 immediately below the base of the V3 loop of gp120 as targets for the initial  
435 autologous neutralizing antibody response in two HIV-1 subtype B-infected  
436 individuals. *J Virol.* 2011;85: 9286–99. doi:10.1128/JVI.02286-10
- 437 18. Pimentel VF, Morgado MG, Bello G, Guimarães MDC, Castilho EA, Veloso VG, et  
438 al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de  
439 Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29: 1553–61.  
440 doi:10.1089/AID.2013.0050
- 441 19. Guimarães ML, Marques BCL, Bertoni N, Teixeira SLM, Morgado MG, Bastos FI.  
442 Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology  
443 Approach. *PLoS One.* 2015;10: e0141372. doi:10.1371/journal.pone.0141372

- 444 20. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, et al.  
445 V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains  
446 divergent from North American/European prototype and detection of subtype F.  
447 AIDS Res Hum Retroviruses. 1994;10: 569–76. Available:  
448 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522493>
- 449 21. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Veloso VG, et al.  
450 Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and  
451 identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil.  
452 Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. J Acquir Immune Defic  
453 Syndr Hum Retrovirol. 1998;18: 488–94. Available:  
454 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715846>
- 455 22. Covas DT, Bíscaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the  
456 GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. J Acquir Immune Defic  
457 Syndr Hum Retrovirol. 1998;19: 74–9. Available:  
458 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732073>
- 459 23. Bongertz V, Jansson M, Flodby P, Morgado MG, Galvão-Castro B, Wigzell H.  
460 Analysis of antibody specificity against the third variable region of the envelope  
461 glycoprotein gp120 of HIV-1 in plasma from HIV-1-positive individuals residing in  
462 Brazil. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras  
463 Biofísica . [et al]. 1994;27: 1225–36. Available:  
464 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8000344>
- 465 24. Bongertz V, Wigzell H, Rossi P. Production of human monoclonal antibodies against  
466 HIV-1 peptides. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas /  
467 Soc Bras Biofísica . [et al]. 1991;24: 815–8. Available:

- 468 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797270>
- 469 25. Gräf T, Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil  
470 and its dispersion through the continent. *Virology*. 2013;435: 170–8.  
471 doi:10.1016/j.virol.2012.08.048
- 472 26. Delatorre E, Couto-Fernandez JC, Guimarães ML, Vaz Cardoso LP, de Alcantara  
473 KC, Stefani MM de A, et al. Tracing the origin and northward dissemination dynamics  
474 of HIV-1 subtype C in Brazil. *PLoS One*. Public Library of Science; 2013;8: e74072.  
475 doi:10.1371/journal.pone.0074072
- 476 27. Guimarães ML, Bastos FI, Telles PR, Galvão-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, et al.  
477 Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil:  
478 prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol*. 2001;21:  
479 143–51. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378495>
- 480 28. Niculescu I, Paraschiv S, Paraskevis D, Abagiu A, Batan I, Banica L, et al. Recent  
481 HIV-1 Outbreak Among Intravenous Drug Users in Romania: Evidence for  
482 Cocirculation of CRF14\_BG and Subtype F1 Strains. *AIDS Res Hum Retroviruses*.  
483 2015;31: 488–95. doi:10.1089/aid.2014.0189
- 484 29. Delgado E, Cuevas MT, Domínguez F, Vega Y, Cabello M, Fernández-García A, et  
485 al. Phylogeny and Phylogeography of a Recent HIV-1 Subtype F Outbreak among  
486 Men Who Have Sex with Men in Spain Deriving from a Cluster with a Wide  
487 Geographic Circulation in Western Europe. *PLoS One*. 2015;10: e0143325.  
488 doi:10.1371/journal.pone.0143325
- 489 30. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in  
490 PCR amplification. *Nat Protoc*. Nature Publishing Group; 2008;3: 1452–6.  
491 doi:10.1038/nprot.2008.133

- 492 31. Gao F, Morrison SG, Robertson DL, Thornton CL, Craig S, Karlsson G, et al.  
493 Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human  
494 immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and  
495 NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. *J Virol.* 1996;70: 1651–67.  
496 Available:  
497 [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189989&tool=pmcentrez](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)  
498 [&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
- 499 32. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular  
500 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30: 2725–9.  
501 doi:10.1093/molbev/mst197
- 502 33. Alcantara LCJ, Cassol S, Libin P, Deforche K, Pybus OG, Van Ranst M, et al. A  
503 standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant  
504 and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: 1–9.  
505 doi:10.1093/nar/gkp455
- 506 34. Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, et al. Tracking global  
507 patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins:  
508 HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology.* 2004;14:  
509 1229–46. doi:10.1093/glycob/cwh106
- 510 35. Yoon H, Macke J, West AP, Foley B, Bjorkman PJ, Korber B, et al. CATNAP: a tool  
511 to compile, analyze and tally neutralizing antibody panels. *Nucleic Acids Res.*  
512 2015;43: W213–9. doi:10.1093/nar/gkv404
- 513 36. Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D. Effects of CCR5 and CD4  
514 Cell Surface Concentrations on Infections by Macrophagetropic Isolates of Human  
515 Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol.* 1998;72: 2855–2864.

- 516 37. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization  
517 and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422: 307–12. doi:10.1038/nature01470
- 518 38. Sarzotti-Kelsoe M, Bailer RT, Turk E, Lin C, Bilska M, Greene KM, et al. Optimization  
519 and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing  
520 antibodies against HIV-1. *J Immunol Methods*. 2014;409: 131–46.  
521 doi:10.1016/j.jim.2013.11.022
- 522 39. Chuang G-Y, Acharya P, Schmidt SD, Yang Y, Louder MK, Zhou T, et al. Residue-  
523 level prediction of HIV-1 antibody epitopes based on neutralization of diverse viral  
524 strains. *J Virol*. 2013;87: 10047–58. doi:10.1128/JVI.00984-13
- 525 40. Bonsignori M, Montefiori DC, Wu X, Chen X, Hwang K-K, Tsao C-Y, et al. Two  
526 distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a  
527 single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. *J Virol*. American  
528 Society for Microbiology (ASM); 2012;86: 4688–92. doi:10.1128/JVI.07163-11
- 529 41. Li M, Salazar-Gonzalez JF, Derdeyn CA, Morris L, Williamson C, Robinson JE, et al.  
530 Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus  
531 type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections  
532 in Southern Africa. *J Virol*. 2006;80: 11776–90. doi:10.1128/JVI.01730-06
- 533 42. Li M, Gao F, Mascola JR, Stamatatos L, Polonis VR, Koutsoukos M, et al. Human  
534 immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections  
535 for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*.  
536 2005;79: 10108–25. doi:10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005
- 537 43. Zhu Z, Qin HR, Chen W, Zhao Q, Shen X, Schutte R, et al. Cross-reactive HIV-1-  
538 neutralizing human monoclonal antibodies identified from a patient with 2F5-like  
539 antibodies. *J Virol*. 2011;85: 11401–8. doi:10.1128/JVI.05312-11



- 540 44. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and  
541 potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*. 2012;491:  
542 406–12. doi:10.1038/nature11544
- 543 45. Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, Krogsgaard M, Ott RG, Shukair S, et al.  
544 Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation.  
545 *Nature*. 2010;467: 591–5. doi:10.1038/nature09385
- 546 46. Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson  
547 IA, et al. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody  
548 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of  
549 gp120. *J Virol*. 2002;76: 7306–21. Available:  
550 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136327&tool=pmcentrez>  
551 &rendertype=abstract
- 552 47. Corti D, Langedijk JPM, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, Fernandez-Rodriguez BM,  
553 et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal  
554 antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One*.  
555 2010;5: e8805. doi:10.1371/journal.pone.0008805
- 556 48. McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien J-P, Khayat R, et al. Structure  
557 of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature*.  
558 2011;480: 336–43. doi:10.1038/nature10696
- 559 49. Georgiev IS, Doria-Rose NA, Zhou T, Kwon Y Do, Staupe RP, Moquin S, et al.  
560 Delineating antibody recognition in polyclonal sera from patterns of HIV-1 isolate  
561 neutralization. *Science*. 2013;340: 751–6. doi:10.1126/science.1233989
- 562 50. Hraber P, Seaman MS, Bailer RT, Mascola JR, Montefiori DC, Korber BT.  
563 Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1

- 564 infection. *AIDS*. 2014;28: 163–9. doi:10.1097/QAD.000000000000106
- 565 51. Doria-Rose NA, Schramm CA, Gorman J, Moore PL, Bhiman JN, DeKosky BJ, et al.  
566 Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies.  
567 *Nature*. 2014;509: 55–62. doi:10.1038/nature13036
- 568 52. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat*  
569 *Rev Immunol*. 2004;4: 199–210. doi:10.1038/nri1307
- 570 53. McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien J-P, Khayat R, et al. Structure  
571 of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature*.  
572 2011;480: 336–43. doi:10.1038/nature10696
- 573 54. Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. Dissociation of gp120 from HIV-  
574 1 virions induced by soluble CD4. *Science*. 1990;250: 1139–42. Available:  
575 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2251501>
- 576 55. Li Y, Svehla K, Louder MK, Wycuff D, Phogat S, Tang M, et al. Analysis of  
577 neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency  
578 virus type 1-infected individuals. *J Virol*. 2009;83: 1045–59. doi:10.1128/JVI.01992-  
579 08
- 580 56. Sather DN, Armann J, Ching LK, Mavrantoni A, Sellhorn G, Caldwell Z, et al. Factors  
581 associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during  
582 human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2009;83: 757–69.  
583 doi:10.1128/JVI.02036-08
- 584 57. Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez  
585 JC, et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic  
586 characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites.

- 587 Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic*  
588 *Syndr.* 2000;23: 184–93. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737434>
- 589 58. Côrtes FH, Bello G, Vorsatz C, Pilotto JH, Guimarães ML, Grinsztejn B, et al. Higher  
590 cross-subtype IFN- $\gamma$  ELISpot responses to Gag and Nef peptides in Brazilian HIV-1  
591 subtype B- and F1- than in C-infected subjects. *Vaccine.* 2013;31: 1106–12.  
592 doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.023
- 593 59. Ward AB, Wilson IA. Insights into the trimeric HIV-1 envelope glycoprotein structure.  
594 *Trends Biochem Sci.* Elsevier Ltd; 2015;40: 101–107. doi:10.1016/j.tibs.2014.12.006
- 595 60. van Gils MJ, Bunnik EM, Boeser-Nunnink BD, Burger JA, Terlouw-Klein M, Verwer  
596 N, et al. Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked  
597 glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific  
598 neutralizing antibodies. *J Virol.* 2011;85: 6986–95. doi:10.1128/JVI.00268-11
- 599 61. Julg B, Pereyra F, Buzón MJ, Piechocka-Trocha A, Clark MJ, Baker BM, et al.  
600 Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+)  
601 T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis.* 2010;51: 233–8. doi:10.1086/653677
- 602 62. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and  
603 potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature.* Nature  
604 Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.;  
605 2012;491: 406–12. doi:10.1038/nature11544
- 606 63. Boyd D, Beckwith J. The role of charged amino acids in the localization of secreted  
607 and membrane proteins. *Cell.* Cell Press; 1990;62: 1031–1033. doi:10.1016/0092-  
608 8674(90)90378-R
- 609 64. Hendrickson WA, Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J. Structure

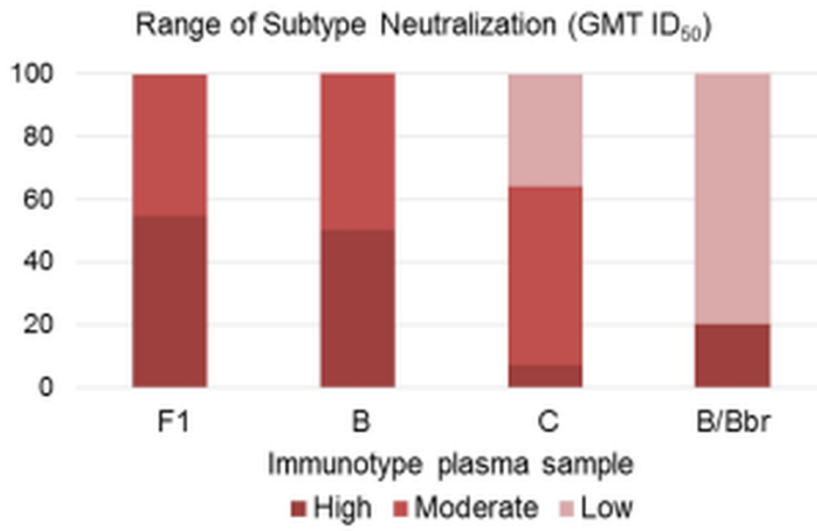
- 610 of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a  
611 neutralizing human antibody. *Nature*. Nature Publishing Group; 1998;393: 648–659.  
612 doi:10.1038/31405
- 613 65. Edwards TG, Wyss S, Reeves JD, Zolla-Pazner S, Hoxie JA, Doms RW, et al.  
614 Truncation of the Cytoplasmic Domain Induces Exposure of Conserved Regions in  
615 the Ectodomain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *J Virol*.  
616 American Society for Microbiology; 2002;76: 2683–2691.  
617 doi:10.1128/JVI.76.6.2683-2691.2002
- 618 66. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 1994;12: 117–39.  
619 doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001
- 620 67. Doria-Rose NA, Joyce MG. Strategies to guide the antibody affinity maturation  
621 process. *Curr Opin Virol*. 2015;11: 137–47. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.002

## 622 Supporting information

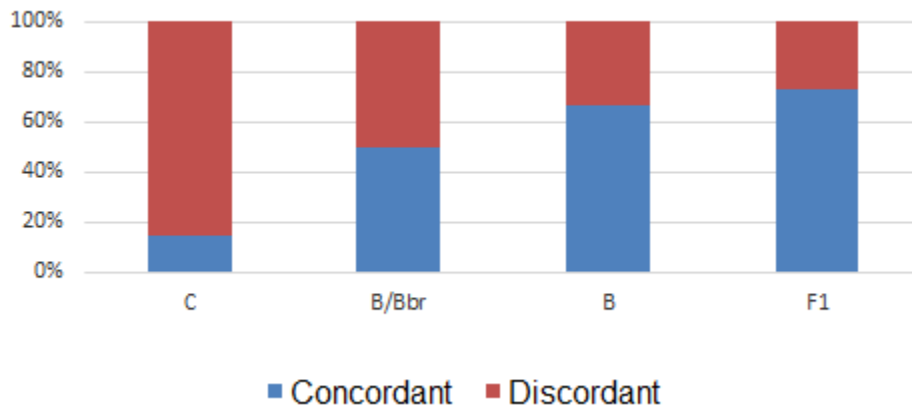
- 623 **S1 Table: Plasma samples from individuals infected with the different HIV-1**  
624 **subtypes exhibit antibodies activity profiles against distinct pseudoviruses.**
- 625 **S1 Fig. Alignment of 51 HIV-1 envelope amino acid sequences according to B, B/Bbr**  
626 **F1 and C subtypes.**
- 627 **S2 Fig. Alignment of *env*-psVs in relation to the HXB2 reference virus.**



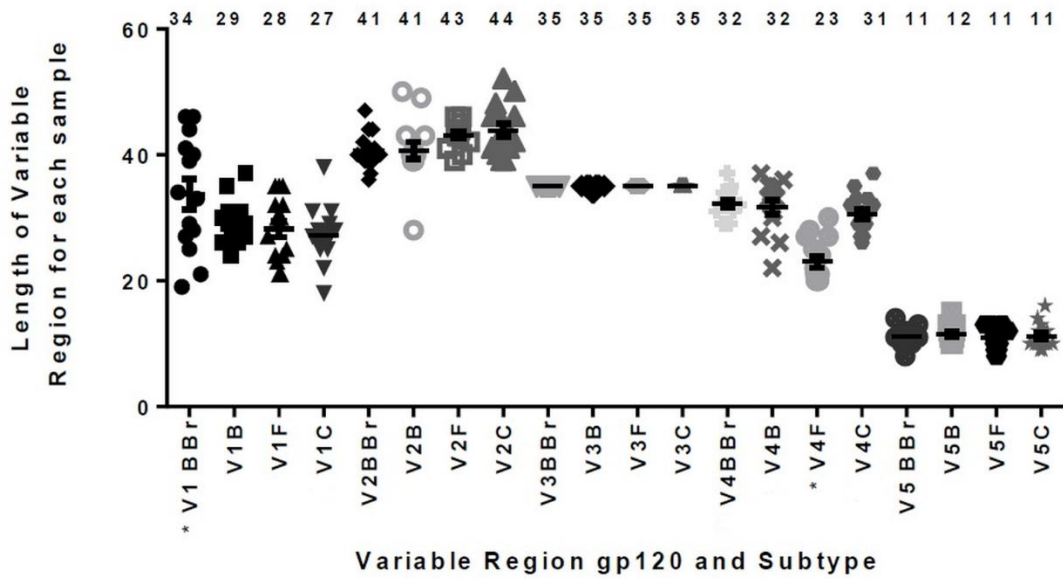
2



3

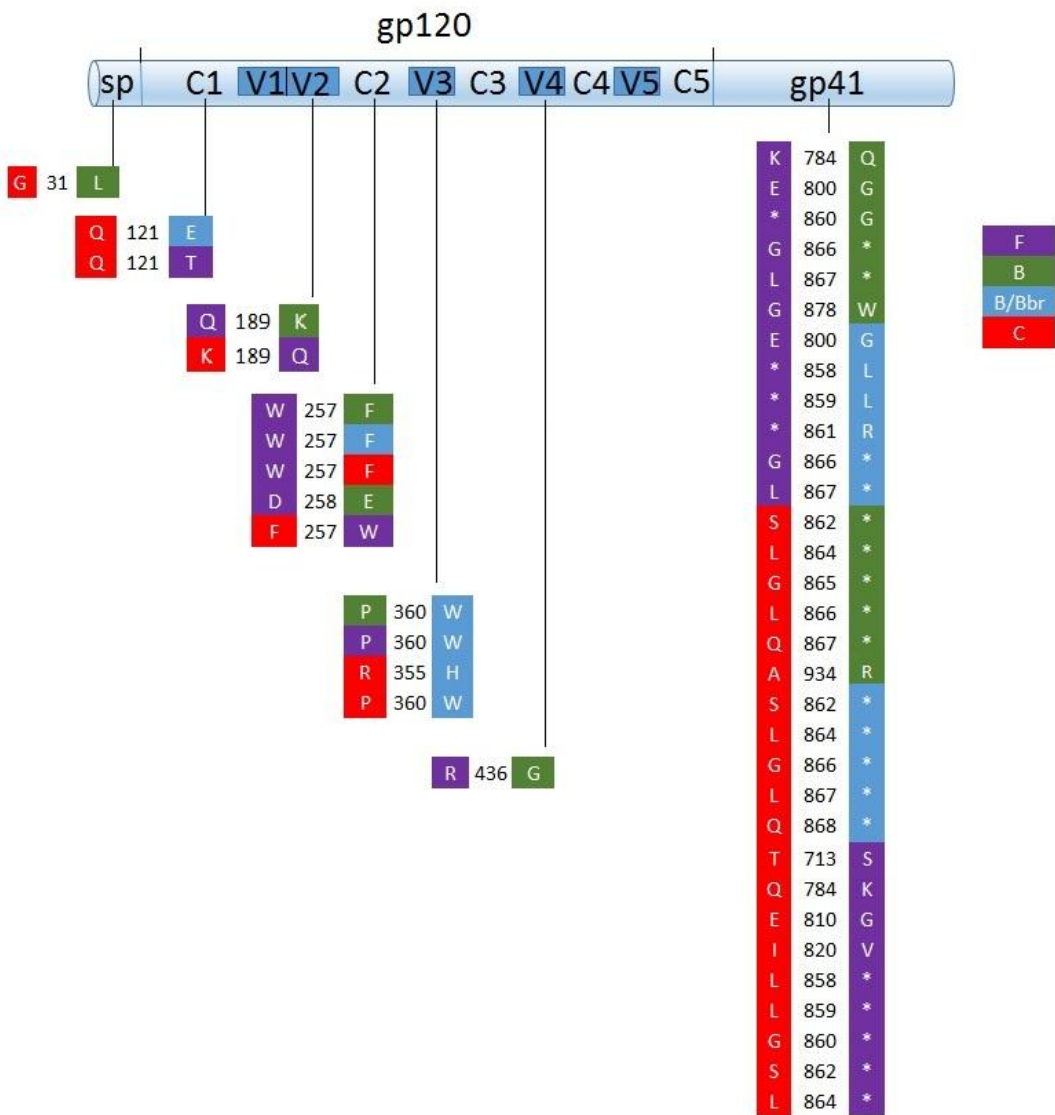


4





5.



628 **Supporting information**

629 **S1 Table: Plasma samples from individuals infected with the different HIV-1**  
630 **subtypes exhibit antibodies activity profiles against distinct pseudoviruses.**

631 **S1 Fig. Alignment of 51 HIV-1 envelope amino acid sequences according to B, B/Bbr**  
632 **F1 and C subtypes.**

633 **S2 Fig. Alignment of *env*-psVs in relation to the HXB2 reference virus.**

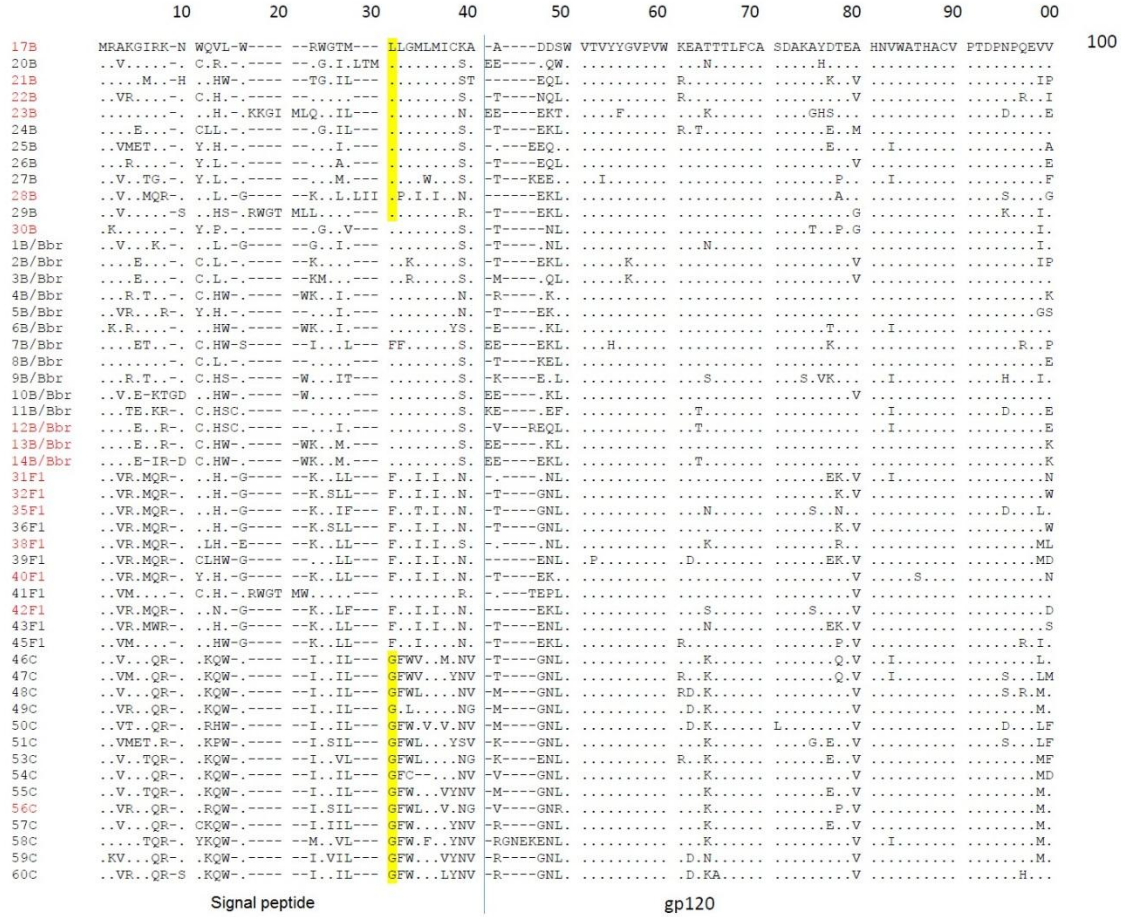
**S1 Table: Plasma samples from individuals infected with the different HIV-1 subtypes exhibit antibodies activity profiles against distinct pseudoviruses.**

Sample (subtype)	Plasma neutralizing ID <sub>50</sub> titers against <i>env</i> psV					GMT
	psV GWGR	psV Cap210	psV F1	psV GPGR	psV pRhpa	
17 (B)	6250	43740	43740	6250	43740	20085
23 (B)	43740	13898	9739	3704	43740	15717
22 (B)	6250	31075	12417	6250	5813	9739
14 (B/Bbr)	6250	5260	11589	3984	20866	7946
13 (B/Bbr)	6000	2217	12824	4525	17893	6731
32 (F1)	6250	2382	6372	3953	8284	4994
28 (B)	6250	1462	1926	6250	12220	4224
31 (F1)	56180	1430	6631	2273	1000	4136
42 (F1)	6250	10844	3215	3623	1000	3797
30 (B)	2545	2953	1940	2618	4488	2797
12 (B/Bbr)	13106	2104	746	4854	1134	2575
35 (F1)	5025	3486	11252	60	2182	1916
21 (B)	3472	8492	30	4545	5728	1873
40 (F1)	20	24450	41283	20	43740	1776
56 (C)	2778	523	3007	3378	185	1222
38 (F1)	70423	273	3003	4000	10	1182
27 (B)	3472	165	5420	4545	44	909
26 (B)	16000	702	109	276	1562	880
24 (B)	1055	356	97	730	2061	559
41 (F1)	119	1726	103	1444	1388	531
29 (B)	1250	197	2313	258	151	467
58 (C)	207	5691	749	71	115	373
55 (C)	6250	1073	47	237	61	340
39 (F1)	98	7636	42	33	1397	271
60 (C)	847	2626	109	55	40	222
25 (B)	352	2104	52	256	10	158
53 (C)	3831	1007	96	20	10	149
54 (C)	3497	122	58	116	20	142
20 (B)	110	20	83	43	4777	130
59 (C)	495	586	57	64	25	121
43 (F1)	305	1602	10	115	37	116
45 (F1)	280	68	33	253	126	115
48 (C)	621	55	1945	20	10	106
49 (C)	293	547	84	94	10	105
36 (F1)	85	20	216	363	88	103
6 (B/Bbr)	168	865	10	92	59	95
9 (B/Bbr)	12870	10	10	100	37	86
7 (B/Bbr)	83	20	1654	63	20	81

50 (C)	2500	10	95	38	20	71
10 (B/Bbr)	1044	324	10	52	10	71
8 (B/Bbr)	341	30	118	57	20	67
11 (B/Bbr)	134	430	10	228	10	67
46 (C)	2932	36	48	25	10	66
57 (C)	138	546	20	20	20	57
2 (B/Bbr)	104	407	10	83	10	51
3 (B/Bbr)	39	818	10	28	22	46
47 (C)	350	10	119	45	10	45
51 (C)	20	52	110	20	45	40
5 (B/Bbr)	67	81	10	10	54	31
4 (B/Bbr)	20	488	10	20	10	29
1 (B/Bbr)	10	169	33	32	10	28
GMS	886	572	258	238	185	

Legend: >1000 999-100 99-20 <20

**S1 Fig.: Alignment of 51 HIV-1 envelope amino acid sequences according to B, B/Bbr F1 and C subtypes.**





	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00	300
17B	DKKHQEYALF	YKADVVTTKD	-----	-SNSTTSYML	ISCNASVVTQ	ACPKITFEPI	PIHYCTPAGF	VILKCNDRMF	NGTGFCKNVS	TVQCTHGIRP	
20B	..VQK...I.	N.Y...PIDN	-----	-DNNRT...N.	T.I.I...TS	.....P.	AL...N.T.	.....T.	.....K.		
21B	..MQTQ.S.	..L...PLET	NSSVK--EAN	S.QNYSD.R.	T.I.I...V.	.....A.	A.....K.	.....S.T.	.....K.		
22B	..RRRK....	..T.I.SADG	-----	--GN...TM	N.T.I.I...T.V.	.....A.	A.....K.	.....S.	.....K.		
23B	NTVRE.H...	NRL...PIDN	-----	..NNE...G.	T.I.I...T.	.....A.	A...G.K.	.....Q.	.....K.		
24B	N.MQK....	..VH...L.N.	-----	--T...T.	N.T.I.I...VS	.....A.	A.....K.	R.....R.	.....K.		
25B	KRVKVD..I.	N.L.I.PIDN	-----	--KNS.E...	N.T.I.I...VS	.....A.	A...K.E.	.....R.	.....K.		
26B	..RQKK....	..RL...PIDT	-----	--DN...T.	N.T.I.I...VS	.....A.	A...K.K.	.....R.	.....K.		
27B	S.MQK....	..L...TPIE	-----	--GDN...T.	N.T.I.I...VS	.....A.	A.....Q.	.....G.	.....K.		
28B	KGISK....	..L.I.QIDN	-----	..SN...T.	N.T.I.I...N.	.....A.	AL...K.	.....R.	.....K.		
29B	N.IRK....	..TL.L.PIDN	KTYI--DNT	TNINY...T.	H.DT.I.I...VS	.....A.	A.....K.	.....S.	I.....K.		
30B	N.RQK....	..NSL...PIDQ	N-----	KTVNH...LN.	T.I.I...S.	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
18B/Bbr	N.MQK....	RTLYIQINT	-----	I.T...N.	T.I.I...S.	.....A.	A.....K.	.....R.	.....K.		
28B/Bbr	..MQK....	..LN...PIDN	-----	--K.T...N.	N.T.I.I...VS	.....A.	A.Q.K.K.	.....T.	.....R.		
38B/Bbr	N.MQKQ....	..L...QIDQ	-----	--TDN...N.	N.T.I.I...VS	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
48B/Bbr	NEVRKD..I.	NRL.L.S.VP	-----	--TDN...H.	T.I.I...S.Q.	.....A.	A...Q.GK.	.....R.	.....K.		
58B/Bbr	N.VRK...I.	..AL.I.PINA	-----	..SN...T.	H.T.I.I...S.Q.	.....A.	A...Q.GK.	.....R.	.....K.		
68B/Bbr	GRWRK....	..S.L...PIDN	TS-----	AAAND...N.	DT.I.I...S.	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
78B/Bbr	K.VRKD..I.	NRI.I.PID.	NDS-----	KN.SNN...R.	DT.I.I...V.	.....A.	Y A.....K.	.....T.	.....K.		
88B/Bbr	N.RQK....	..S.I.PMDN	D-----	-N.NS...R.	TQ.T.I.R...TS	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
98B/Bbr	N.LQK....	..QL.LEQIDK	-----	--DN...T.	T.I.I...S.	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
10B/Bbr	K.VRK.N.I.	DSL.I.PIDE	DN-----	NNETNR...VN.	T.I.I...VS	.....A.	A...N.T.	S.....S.	.....K.		
11B/Bbr	K.MRR...I.	N.L.I.PINN	-----	--NN...VN.	T.I.R...T.	.....A.	AL...K.E.	S.....T.	.....K.		
12B/Bbr	N.VRR....	NRL.I.PINP	-----	-DNN...VN.	T.I.R...T.	.....A.	AL...K.E.	.....T.	.....K.		
13B/Bbr	NEVRKD..I.	NRL.L.S.VP	-----	--TDN...G.	T.I.R...T.	.....A.	A...N.T.	T.....I.	.....K.		
14B/Bbr	N.RQK....	..S.I.PMDN	D-----	-N.NS...R.	TQ.T.I.R...TS	.....A.	A.....K.	.....T.	.....K.		
31F1	..QLKVQ...	..L.I.PISN	-----	--NSNE.R.	H.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...E.N.	.....R.	.....K.		
32F1	..QKRVH...	..RL.I.PING	T-----	GNQNESE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...S.	.....R.	.....K.		
35F1	..QKRVH...	..L.I.PING	NG-----	SG.GSGE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...K.	.....R.	.....K.		
36F1	..QKRVH...	..RL.I.PING	T-----	GNQNESE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...S.	.....R.	.....K.		
38F1	..TRKVH...	..RL.I.PLNN	EDK-----	S.SNG.A.R.	N.T.TI...TSWD	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
39F1	..QKRVH...	..L.I.PISN	GS-----	NN.DSKE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...R.Q.	.....R.	.....K.		
40F1	..QLKAN...	..L.I.PISN	G-----	-G.GSGTNR.	T.TI...VSWD	.....A.	Y A...K.	.....R.	.....K.		
41F1	..QKRVH...	..RL.I.PMKN	S-----	SNE.GNY.R.	N.E.II...VSWD	.....A.	A...N.T.	.....R.	.....K.		
42F1	..QLKVH...	..RL.I.PINN	KS-----	SND.SIK.R.	H.T.TI...VSWD	.....A.	SY A...K.K.	.....R.	.....K.		
43F1	..QLKVHS...	..RL.I.PINN	V-----	-GSGE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...E.E.	.....R.	.....K.		
45F1	..MKVH...	..RL.I.PISN	S-----	SNS.NRE.R.	N.T.TI...VSWD	.....A.	Y A...N.	.....R.	.....K.		
46C	..TTKVH...	..L.I.QL.E	-----	-GSN.SE.R.	N.T.AI...VK.D	.....A.	Y A...N.T.	T.....T.	.....K.		
47C	..QKRVH...	..RL.E.PLE	DNNT----	SE.N.TSVE.R.	N.T.AI...VK.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
48C	..R.ERVH...	..RL.I.PLE	E-----	--NDST.R.	N.T.AI...VS.D	.....A.	AL...N.T.	.....N.	.....K.		
49C	N.RQKV...	..RL.E.PLE	REN-----	N.A.GNYSD.I.	N.T.AI...V.D	.....A.	Y AL...N.T.	.....N.	.....K.		
50C	..Q.T....	..RL.I.PISN	-----	--E.SNN.R.	N.T.AI...S.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
51C	..KKVH...	..RL.I.PLE	KSNNASGSNN	TVANA.E.R.	N.T.TI...VS.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
53C	..R.SKVQ...	..S.L.PLEN	-----	-SENNN.R.	H.T.TIA...VS.D	.....A.	A...N.T.	.....N.	.....K.		
54C	..RRKVH...	..RL.I.PLE	K NNQTS--DEE	SDGTFNN.R.	N.T.AI...VS.D	.....A.	Y A...K.K.	.....N.I.	.....K.		
55C	..KKVQ...	..L.I.PLE	NS-----	N.SDSY.R.	N.T.AI...VS.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
56C	..K.V....	..L.I.PLE	GSN-----	N.T.TSGN.R.	N.T.AI...VS.D	.....A.	A...N.T.	.....N.	.....K.		
57C	..REA....	..L.I.PLE	NS-----	-NEN.S.R.	N.T.AIA...V.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
58C	..KKVH...	..RL.I.PLE	S-----	-EYGN.R.	N.T.AIA...V.D	.....A.	Y A...N.T.	.....H.	.....K.		
59C	..R.VH...	..RL.I.PLE	E-----	-P.NSRD.R.	N.T.AI...VS.D	.....A.	Y A...N.T.	.....N.	.....K.		
60C	..KKVH...	..RP...PLE.	-----	--DNS.R.	N.T.AT...VS.D	.....A.	Y A.I...N.T.	.....H.	.....K.		

V2

C2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00	400
17B	VVSTQLLLNG	SLSEGDIVVR	SENVTDNGKT	IIVQLNESIV	INCTRPNNNT	RKRVT--LGF	GRVYYTTGEI	IGDIRKAYCN	ISGIKWNNTL	QQIAKLLK--	
20B	.....EGVII	.....I...S...	.....HKPVK	.....I.....	.....GIH--M	.....TF.AR...	.....N...S...	.....RA...D...	.....KE...E...	.....	
21B	.....A.EEV.II	.....F.N.AR.	.....T.VE	.....I.....	.....SI--I	.....AAPP.....	.....S...T...	.....N.TQ...	.....K.VVT...R--	.....	
22B	.....A.EEV.II	.....Q.I...AR.	.....H...VQ	.....I.....	.....RSIH--I	.....SAW...D...	.....Q.H...	.....EAA...R...	.....K.VVA...R--	.....	
23B	.....E.II	.....IS...AN	.....Q.V	.....I.....	.....GI--I	.....AFFA.S...	.....Q.H...	.....L.KKD.GD...	.....KK.EE...	.....	
24B	.....A.EEVII	.....F.N.A.	.....A...Q.V	.....I.....	.....SIH--I	.....AL.A.S...	.....R...H...	.....LNKTH....	.....K.VV...S--	.....	
25B	.....A.E.VII	.....I...A...	.....TVE	.....I.....	.....RSIH--M	.....AF.A.D...	.....R.H.T	.....L.KA....	.....E.V.G...R--	.....	
26B	.....A.E.VII	.....I.W.A.	.....TVE	.....I.....	.....RSIH--P	.....TL.A...Q...	.....Q.H...	.....NAT.....	.....EK.VRE.PKL	.....	
27B	.....A.EGV...	.....K.FS.AE	.....K.PVE	.....I.....	.....R.LS--P	.....TI.A...Q...	.....Q...T	.....LNTT....	.....T.V.E...R--	.....	
28B	.....A.EEVI	.....F.Q.T.	.....Q.VE	.....I.....	.....GIH--M	.....KAF.L.D...	.....Q.H...	.....ET...M	.....K.V.E...--	.....	
29B	.....A.E...I	.....T.ISN.A.N	.....A.VA	.....I.....	.....RSIN--I	.....AFF...Q...	.....Q...I	.....LN.TI....	.....R.V...Q--	.....	
30B	.....H...A	.....E.V.I	.....F.N.A.N	.....I.....	.....VE	.....I.S...S	.....SIH--I	.....AF.AI.G	.....LNRGN.EK...	.....K.VVT...G--	
1B/Bbr	.....A.EE.VI	.....K.FS.T.	.....H.HTVK	.....I.....	.....S.G...G	.....GIH--W	.....SLPA.EI...	.....V...Q.H...	.....L.AE.D...	.....R.VVE...G--	
2B/Bbr	.....A.EE.II	.....F.N.A.	.....T.VK	.....I.....	.....D.L.S...S	.....SIH--W	.....AF.A...D...	.....Q.H...	.....L.KTE.KKL...	.....E...I...R--	
3B/Bbr	.....A.EE.VII	.....F.N.V.	.....K.E	.....I.....	.....S...S	.....SIH--W	.....AF...K...	.....Q.H...	.....L.RVE.GT...	.....G...T...--	
4B/Bbr	.....AKE.VII	.....Q.I.N.S.N	.....T.VE	.....I.....	.....G...G	.....GIH--W	.....AF.A...A...	.....V...H...	.....LNKTQ.E...	.....KYVEA...Q--	
5B/Bbr	.....AKE.VII	.....Q.I.N.S.N	.....I.VG	.....I.....	.....G...G	.....GIH--W	.....AF.A...V...	.....H...H...	.....LNSTQ.ES...	.....KYVEA...Q--	
6B/Bbr	.....A.EEVII	.....I.S.V.N	.....K.A	.....I.....	.....LH...LH	.....GIH--W	.....ALFA.DR...	.....V.N...Q.H...	.....L.RAA...D...	.....K.V...R--	
7B/Bbr	.....A.EEVII	.....I.S.V.N	.....TVK	.....I.....	.....S...S	.....SIH--M.W	.....AF.A...A...	.....Q.H...	.....L.RAE...K...	.....EK...I...--	
8B/Bbr	.....A.EE.II	.....F...V...	.....Q	.....I.....	.....S...S	.....S.GIH--W	.....AF.A.ER...	.....E.H...	.....L.KA...ED...	.....K.N...--	
9B/Bbr	.....A.KE.II	.....I.S.N	.....A.VE	.....I.....	.....S...S	.....SIH--M.W	.....AF.A.D...	.....Q.H...	.....LNNV...S...	.....K...G...--	
10B/Bbr	.....A.KEVII	.....F.N.A.	.....TVQ	.....I.....	.....S...S	.....SIH--M.W	.....AF.AR.D...	.....R.H...	.....NEAQ...K...	.....G...VE...--	
11B/Bbr	.....A.E.II	.....I.N.A.	.....I...AVE	.....I.....	.....G...G	.....SIH--M.W	.....KAF.A...D...	.....N...Q.H...	.....EAR....	.....KG.VT...R--	
12B/Bbr	.....A.EE.II	.....I.N.A.	.....TVE	.....I.....	.....G...G	.....SIH--M.W	.....AF.A.Q...	.....N...Q.H...	.....N.T...T...	.....YL...T...R--	
13B/Bbr	.....A.EE.MI	.....I.N.A.	.....K.A.Q	.....I.....	.....S...S	.....RSIH--M.W	.....AF.A...V...	.....Q.H...	.....LN.TQ.KKI...	.....N.TVI...R--	
14B/Bbr	.....A.EE.II	.....I.N.A.	.....Q	.....I.....	.....S...S	.....S.GIH--M.W	.....AF.A...V...	.....N...Q.H...	.....LN.TQ.KKI...	.....N.TVI...R--	
31F1	.....A...II	.....Q.LS.V...	.....H...Q.VF	.....I.....	.....R...R	.....SIQ...Q...	.....AF.A.N...	.....H...H...	.....V.RSQ...T...	.....D.VKT...R--	
32F1	.....A...II	.....Q.ISN.A.	.....H...Q.VF	.....I.....	.....R...R	.....SIQ...Q...	.....QAF.A.D...	.....H...H...	.....V.RSQ...K.I	.....GLVKT...E--	
35F1	.....A.EN.II	.....Q.IS.T.N	.....HF...VQ	.....I.....	.....S...S	.....SIA--I	.....AF.A...D...	.....R.H...	.....V.TQ...K...	.....H.VKAE...--	
36F1	.....A...I	.....I.K	.....I.SN.A.	.....H...Q.VQ	.....I.....	.....SI--I	.....QAF.A.D...	.....H...H...	.....V.SQ...K.I	.....GLVKT...E--	
38F1	.....A.E.II	.....Q.IS.T.N	.....H...Q.VQ	.....I.....	.....S...S	.....SIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....V.EQ...K.I	.....E.VRT...G--	
39F1	.....A.E.II	.....Q.IS.A.I	.....H...Q.VQ	.....I.....	.....S...S	.....GIH--I	.....QAF.A.TD...	.....Q.H...	.....V.TQ...K...	.....ERVKAA...--	
40F1	.....A.EN.II	.....Q.IS.A.	.....H...Q.VQ	.....I.....	.....S...S	.....SIH--I	.....AF...R...	.....H...H...	.....V.TQ...K.I	.....ERVKAA...R--	
41F1	.....A.E.II	.....Q.IS.A.	.....H...Q.VQ	.....I.....	.....S...S	.....SIH--I	.....KAPFA...V...	.....H...H...	.....V.RTQ...T...	.....NKVKA...--	
42F1	.....A.E.II	.....Q.IS.A.	.....HF...VQ	.....I.....	.....S...S	.....SIP--M	.....AF.A.D...	.....H...H...	.....N...Q...KK	.....REVKE...--	
43F1	.....A.E.II	.....Q.IS.A.	.....HF...VQ	.....I.....	.....S...S	.....RSIH--I	.....AF...R...	.....H...H...	.....V.RSQ...K.I	.....E.VFA...--	
45F1	.....A.DE.II	.....Q.IS.T.	.....HF...VK	.....I.....	.....S...S	.....SIH--I	.....QAF.A.D...	.....H...H...	.....V.EV...A...	.....EKVK...Q--	
46C	.....A.EE.II	.....K.L.A.	.....K.PVL	.....I.....	.....G...G	.....TSIR--I	.....QTF.A.A...	.....Q.H...	.....TA...K...	.....KVGE...A--	
47C	.....A.EE.II	.....K.L.A.	.....K.PVL	.....I.....	.....G...G	.....TSIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....TA...K...	.....KVGE...A--	
48C	.....A.EE.II	.....K.L.A.	.....K.PVE	.....I.....	.....G...G	.....S.R--I	.....QTF.A...D...	.....Q.H...	.....N.Q.S...T	.....LNETE...K...	.....KEVRD...R--
49C	.....A.Q.II	.....K.I.S.T.	.....TVE	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....E.H...	.....ATA...K...	.....YRV.EA...A--
50C	.....A.E.II	.....K.L.A.	.....H...TVR	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....RTE...R...	.....EVRE...A--	
51C	.....A.EE.IIS	.....K.LSN.ADN	.....H.R.VE	.....I.....	.....G...G	.....TSIR--I	.....QAF.A.D...	.....Q.H...	.....RRA...E...	.....EVK.A.G--	
53C	.....A.EG.II	.....K.L.N.A.I	.....H...VE	.....I.....	.....G...G	.....S.R--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....KEA...R...	.....LVG...--	
54C	.....A.E.II	.....K.L.A.V.	.....H.K.PVE	.....I.....	.....G...G	.....ESIR--I	.....QIF.A.D...	.....R.H...	.....WTA...R...	.....EVRG...T--	
55C	.....A.ER.II	.....K.L.N.A.	.....K.PVE	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QTF.A...D...	.....Q.H...	.....NKAA.EKM	.....YGV.TE...Q--	
56C	.....A.EQVIIS	.....CK.L.A.	.....H.KTPE	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....KTR...Q...	.....EVG...A--	
57C	.....A.N.TI	.....K.I...T.I	.....H.K.PVQ	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QAF.A...D...	.....Q.H...	.....K.A...K...	.....EVG.E.A--	
58C	.....A.EE.II	.....K.I.S.V.	.....H.TPVE	.....I.....	.....G...G	.....TSIR--I	.....QSFFA...D...	.....Q.H...	.....RAQ...D...	.....KKVGE...A--	
59C	.....A.EE.II	.....I.A.A.	.....K.VE	.....I.....	.....G...G	.....SIR--I	.....QTF.A.D...	.....Q.H...	.....KAE.EE...	.....KVRN...A--	
60C	.....I...A	.....K.E.II	.....K.I.N.VN	.....H...VE	.....I.....	.....TSIR--I	.....QTF.A.D...	.....N...Q.H...	.....KNA.YK...	.....REVS...E--	



	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00	
17B	GIF-----	-NKTIVF-KN	ASGGDPEVVM	HSFNCGSEFF	YCNTTKLFDW	NDTTKVFNW-	NKSWTFTEG	NDTIHIPCRI	KQIINRWQEV	GKAMYAPPIG	500
20B	DH.K-----	...LI-NH	S.....I..	.T.....	...SQ.NS	TWYWNSS--	--FNE.NLNE	SE...T...	.....	.....R	
21B	EQ.G-----	NTT...S-QP	P.....I.F	.....	...Q.NS	TWNNTMV--	--NGT.NGTT	...IL...	...V.M...	...LR	
22B	EK.G-----	.....NS	S.....IEK	.T.....	...D...NS	TWNNTG---	--ESNY...A	...IL...	.....	...LS	
23B	.Y-----	...A-NQ	S.....I..	.T.....	...AE.SN	TWLN-----	--KSGNN	DG...TL...	.....	...R	
24B	EQ.G-----	.....NR	S.....I..	.....	...SQ.NS	TWFANGTR--	--ENGTAGN	TF...TL...	.....	...S	
25B	EH-----	...N-TQ	S.....I..	F.L.....	...S.Q.NS	SW.NGSWT--	--GIEGNNTS	ES...TL...	.....	...R.I...S	
26B	EL.K-----	.....NQ	S.....I..	.....	...S.NS	TWNNTKE---	--WHGT.GR	N...TL.K.	.....	...Q...S	
27B	KQ.G-----	-R.K-TR	S...L.IA.	.T.....	...P.N	TEGSN-----	--NTQWP	K.N.TLQ.	.....	...V...S	
28B	EQ.E-----	...N-TR	S...L.IA.	.T.....	...Q.N	SSKLVNG--	--S.NQTSN	R...TL...	.....	...Q...R	
29B	E.LAQA--QL	V...A.AQP	PP.....I..	.N.....	...R.NN	GTQLLPNDT-	WQFNGSKIE	.G...IL...	.....	...S	
30B	EQ.LKLRGQFN	NST...I-NQ	S.....I..	.T.....	...S.Q.NS	SWRFNNTT-	KVVNNNTGNS	.N...TL...	.....	...D...R	
1B/Bbr	EQ.N-----	-KT.I-NH	S.....I..	.....	...D...NS	TWVINNTW--	--QFVNN.KN	ESK...IL.K	.....	...R...R	
2B/Bbr	EQ-----	...I-NQ	S.....I..	.....	...Q.NS	TWNSTQLFNS	TWLYN.TRNR	TEN...TL...	.....	...R...K	
3B/Bbr	EQ.N-----	-KT.I-NQ	S...K.....	...RK...	...D.Q.NI	TWYNGTW--	--QS.NINEN	.EI...TL...	.....	...I.R...K	
4B/Bbr	EH.P-----	-R.Y-NQ	S...L.I.T	.....	...R.HS	YWLNTW--	--VN.TL.I	.G...TL...	.....	...R...R	
5B/Bbr	EH.P-----	-R.Y-NQ	S...L.IET	.....	...R.NS	FWVKGTW--	--GNSTLQN	.G...IL...	.....	...TK...LR	
6B/Bbr	EQW-----	...I-NQ	SA...I.I.T	.....	...F...Q.NS	TWLLNDTW--	--DSTGESNNT	AEN...TL...	.....	...G...E	
7B/Bbr	ERVN-----	-KTK.I-NQ	S...S.IE.	.....	...Q.NS	TWNGTH--	--LNSI..E	...TL...	.....	...S	
8B/Bbr	EHYN-----	-R.S-NK	S...D.I.R	.....	...SQ.N	TERNRNS--	--SDG.GSNE	TE...TL...	.....	...K...K	
9B/Bbr	EL-----	...NP	SA...I.E.	.T.....	...SQ.NS	TWNGIE--	--NISNDT	ENY...TL...	.....	...K...K	
10B/Bbr	EQ-----	...I-NQ	S.....I..	.TV.....	...NS	TWNSST--	--WYNKSA..	.S...IL...	.....	...P...P	
11B/Bbr	EK.N-----	...I-NQ	S.....I..	.FH.....	...DS.Q.NS	TWLFNDT--	--RNG.DI..	E...TL...	.....	...I...E	
12B/Bbr	EK.N-----	...I-NQ	S.....I..	.FH.....	...S.Q.NS	TWFNGTW.S	TDTKGNNT	S.K...IL...	.....	...A...A	
13B/Bbr	EH.N-----	-DR.I-NH	S...L.I.Q	.....	...Q.NS	TWDIYG--	--NGTI	PAN...TL...	.....	...VS...VS	
14B/Bbr	EH-----	-DR.I-NH	S...L.I.Q	.....	...Q.NS	TWDIYG--	--NLNGTI	PAN...TL...	.....	...VS...VS	
31F1	SH.N-----	...I-RP	P...L.I.T	...L	...SF.NN	NDTVI-----	--NDTT	TVN...TL...	...K.L.VR...	EG...N...	
32F1	SY.H-----	-T.K-NS	S...L.I.T	...R...	...SW.NN	TE-----	--FN	DS...TL...	...V.M.G.	R...A.A	
35F1	SH.P-----	-G.K-NS	S...L.I.T	...T.R...	...SGM.ND	T-----	--S	EN.TFQ.C	...V.M...	R...K.N.VA	
36F1	SY.H-----	-TN.K-NS	P...L.I.T	...R...	...SR.NN	SE-----	--FN	S...TL...	...V.M.G.	R...A.A	
38F1	AH.P-----	-K-EP	S...L.I.T	...R...	...R.NI	T.KN-----	--IIDK	S...TL...	...M...	R...A.A	
39F1	PH.N-----	-A.K-NS	S...L.I.T	...M.R...	...S.ND	T-----	--VS	...IF.K	...M...	R...A.A	
40F1	PH.P-----	-K-NS	ST...L.I.T	...R...	...SR.ND	T-----	--KF	...VL...	R.LVRL...	R...V.A	
41F1	AH.P-----	NTTI.K-NS	...L.I.T	...R...	...SG.ND	TGFSN-----	--D.RSND	TEV...TL...	...V.M...	R...A.A	
42F1	SH-----	-PVN.T-NS	SA...L.I.T	...R...	...SA.NN	ETGSN-----	--DT.GS	S...TL...	...V.V.M...	R...TA.A	
43F1	FY.P-----	-A.K-NS	S...L.I.T	...R...	...SG.ND	SI-----	--IN	TES...TL...	...V.M...	R...V.A	
45F1	SY.P-----	NRTE.R-NS	S...L.I.T	...R...	...SG.NM	SHNN-----	--GNDTT	TV...TL...	...V.M...	R...A.A	
46C	ER.H-----	...K-T	H...V.N	NII...G...	...F.SS.NN	TYCPNPF--	--NATYNATE	S...T.Q.K	...V.M...	R...P.K	
47C	ER.P-----	...E-TK	H...I.I.T	...R...	...SG.NS	TYWPNAT--	--YNA.ENSE	S...T...	...F.V.M...	R...R	
48C	RH.P-----	-R.S-A	H...L.I.T	...R...	...SS.NR	I.E-----	--KI.DN	SS.T.T...	...V.M.G.	R...I...E	
49C	KY.P-----	-S.N-TE	P...L.I.T	...R...	...SN.NN	IYPKWNMPD-	WSNANK.NT	TTN.TLR...	R.F.M...	R...E	
50C	EH.P-----	-R.K-AK	H...L.I.T	...R...	...SI.ND	TYWVNG--	--TGS.N	TEN...TL...	...M.G.	Q.I...K	
51C	KH.P-----	...T-T	H...L.I.T	...R...	...D.G.TE	S.EI-----	--DNGTE	S...I...	R.FV.M...	R...I...A	
53C	EH.P-----	...Q-TK	P...L.I.T	...R...	...SN.NS	TYNSNC--	--TSNRT	TEN...T...	...M.G.	R...K	
54C	EH.P-----	...Q-AE	HA...L.I.T	...R...	...S.NS	TYWPN-----	--GTENT	I...T...	...M...	R...K	
55C	KH.P-----	-K.K-T	H...L.I.T	...R...	...S.NY	PNIGNSTYND	TENRNSTYND	TEN...T.K.	F.M...	R...S.E	
56C	EH.P-----	-G.K-Q	H...L.I.T	...R...	...D.ST.NS	IYWEHSTS--	--T.S.PGAE	...LT.Q.	...V.M...	R...A	
57C	KH.P-----	...K-T	S...L.IAT	...R...	...SG.NG	TY.PNS---	--NSTET	S...T...	...M.G.	R...S	
58C	EH.P-----	...I-NS	SA...L.I.T	...R...	...SG.NS	TYFNGT--	--YNS.GN	SPN...TL...	...VRM.R.	Q...A	
59C	KH.P-----	...S-TR	H...L.I.T	...R...	...SS.NR	TYPANST--	--GYNNET	S...T...	...M.G.	Q...A	
60C	KH.P-----	-S...K-E	S...L.I.T	...R...	...SN.NY	YKVNS---	--ANKD.KS	G...T...	...M.G.	R...A	

C3

V4

C4

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00			
17B	GLIR	CSSNIT	GLLLTRDGG	-----NET	RDNDTF	EGG	GDMRDNRSE	LYKYKVVRIE	PLGVAPTAK	RRVVQREKHA	V-GAIGAMFL	GFLGAAGSTM	600
20B	.M.N.T.	.I.W.		-----NN	.T.E.				.K.	.L.			
21B	.K.N.V.	.I.		-----INR	NETE				.K.	.P.			
22B	.N.S.L.	.V.		-----NAPE	.Q.	.N.K.G.			.K.	.P.			
23B	.E.	.I.		-----NNSAN	NASE				.K.Q	.I.R.			
24B	.Y.N.			-----TGNK	TEPEI	.RR			.K.	.I.			
25B	.QLM			-----NRTN	GEAEV				.K.	.I.			
26B	.K.N.L.	.I.		-----V.VS	NTTE	.A.			.K.	.F.	.ERS.	.S.	
27B	.M.L.			-----NK	TSPEI	.A.			.K.	.I.	.PR.		
28B	.Q.	.T.		-----NR	NTTD	NNTEV			.K.	.I.	.R.		
29B		.I.		-----YN	KS	NNTE			.K.	.R.			
30B	.Q.S.	.S.		-----NK	ESPEA				.K.G.	.G.			
1B/Bbr	.Y.N.			-----DNN	NN.E.	.Q.			.N.K.	.G.			
2B/Bbr	.Q.			-----RD	NN	.TSEI	.RR		.K.	.K.			
3B/Bbr	.Q.		.SS	-----NSSDK	NRPE				.K.	.R.			
4B/Bbr	.H.N.L.	.I.A.		-----I.V.	N.SE.				.K.				
5B/Bbr	.HLM	.F.	.VI.A.	-----I.V.	NNTE				.K.G.	.G.			
6B/Bbr				-----GDNN	.SKE				.G.G.	.G.			
7B/Bbr	.Q.S.	.I.	.S	-----NDNS	ST.E.				.N.K.	.G.			
8B/Bbr	.N.S.	.T.		-----TNLTGS	NGTE	.Q.			.N.K.				
9B/Bbr	.N.S.	.T.	.I.	-----N.	S	NNTE			.K.	.I.			
10B/Bbr	.H.N.L.			-----NN	SSSE					.R.			
11B/Bbr	.Q.	.T.		-----N	SGTE				.K.	.I.			
12B/Bbr	.Q.K.T.			-----NGN	R.	EPSE			.I.	.KN.			
13B/Bbr	.N.T.			-----I.	N	NISE			.K.	.I.	.S.	.Q	
14B/Bbr	.N.L.			-----I.	N	NISE			.K.	.I.	.S.	.Q	
31F1	.K.T.T.I.	.IV.	.E.	-----N	RG	NN.E.			.N.K.				
32F1	.N.T.N.			-----QN	NT.E.				.E.	.E.			
35F1	.N.T.N.	.I.		-----NS	TG.E.				.N.	.G.			
36F1	.N.T.N.			-----QN	NT.E.				.E.	.E.			
38F1	.S.T.N.	.I.		-----SC	D	NGTEI			.N.K.				
39F1	.NLT.R.		.E.	-----N	KE.E.				.N.K.	.G.			
40F1	.S.T.N.T.			-----QH		NKTEI			.N.K.				
41F1	.N.T.N.			-----NN		NKTEI			.N.K.				
42F1	.S.T.N.			-----Y.N	NQTE				.N.K.	.E.Q			
43F1	.N.T.I.			-----LN	D	NQTE			.N.K.				
45F1	.S.T.K.		.S	-----SN	NSTH	NNTE			.KNIK.				
46C	.P.T.A.			-----ANS	NNTE				.E.K				
47C	.P.M.T.	.I.		-----INS	S	TEI			.E.K				
48C	.V.T.R.			-----TN	NNTE				.E.K				
49C	.I.T.R.		.R	-----GDT	N	GT			.NKTE				
50C	.R.T.K.	.I.		-----ET		NATEV			.E.K				
51C	.N.T.R.			-----EGNETQ	N	TE			.N.K.				
53C	.Q.T.R.	.V.E.		-----EGNETQ	N	TE			.N.K.				
54C	.I.T.R.			-----NGDF	DSPE				.E.K				
55C	.V.T.K.	.F.		-----K	TK.E.	.E.N.			.E.K				
56C	.N.T.N.S.		.E	-----NR	TEKG	TRKEE			.E.K				
57C	.I.T.R.	.I.		-----DSN	N	TEI	.T.		.E.K				
58C	.I.T.R.			-----PSD	NRTE				.E.K				
59C	.I.T.R.			-----T	NKTEI	.E.N.			.E.K				
60C	.I.S.N.S.			-----N	NN	T.TEI	.N.		.E.K				

V5 C5 (gp120 end) gp41 Fusion peptide

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      00
17B    GAAAVTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE AQQHLLQLTV WGIKQLQARV LAVERYLRDQ QLLGIWGCSSG KIICTTAVPW NTSWS----N KSREDIWNM 700
20B    ...S.....L.....M.....L.....TRWK..R.LS...
21B    ...SI.....L.....E.....L.....LN...D...
22B    ...SL.....L.....S.....L.....LNQ...D...
23B    ...S.....S...K.....EV.....E.....L...T...I.....R.QKE..K.I
24B    ...S.A.....S...K.....M.....K.....L...P...A.....LNE...
25B    ...SI.....L.....M.....L...S.....LDT..N...
26B    ...SMG...K.....F.....M.....K.....L.....LDQ...
27B    ...M.....T.....K.....F.Q.....L...T.....V.M..Q...
28B    ...S.....K.....L.....L...K..N...
29B    ...SL.....T.....Q.....L.....A.....R.LDT..N...
30B    ...SL.....L.....L...T...N.....L...K..N...
1B/Bbr ...SI.....S...Q.....L.....L.....TLK...
2B/Bbr ...SM.....S.....K.....R...R...L.....A.....TM.E...
3B/Bbr ...SMA.....L.....K.....L.....A.....TLDK..N...
4B/Bbr ...T.....L.....M.....L...T.....L.Y..N...
5B/Bbr ...S.....L.....S.....F.K.....L...T.....LDY..N...
6B/Bbr ...P.SI.....LV.F.....K.....Q.....L...S...A.....AYDH..G...
7B/Bbr ...SL.....M.....H.....S.....L.....YLSY..N...
8B/Bbr ...SM.....K.....H.....S.....L.....A.....K.E..G...
9B/Bbr ...SI.....V.....M.....Q...R...L...H...P...A.....R.LNN...
10B/Bbr ...SI.....L.....M.....L...S...S.....LDA..D...
11B/Bbr ...S.....L.....K.....M.....L.....S.....NLST..D...
12B/Bbr ...S.....L.....K.....M.....L...T...S.....VNY..D...
13B/Bbr ...A.....L.....M.....L.....YDH...
14B/Bbr ...T.....K.....M.....L.....AYDH..G...
31F1  ...SM.....K.....L...N...S.....Q.E..N...
32F1  ...SI.....KV...H...F.....K.....L...N...S.....Q.Q..Q.I
35F1  ...SM.....K.....L...N...S.....R.HDY..G...
36F1  ...S.A.....F.....M.....F.....L...N...S.....Q.Q..Q...
38F1  ...GSL.....I.F.....K.....K...R...L...L...S...S.....YNM..Q...
39F1  ...S.....K..D..M.....K.....L...S...S.....LDQ...
40F1  ...S.....S.....M.....Q...R...L...L...N...S...S.....TQTE..G...
41F1  ...SIA.....S.....M.....I.....K.....L...N...S.....TQTE..G...
42F1  ...S.....M.....I.....K.....L...N...S.....R.HGE...
43F1  ...GSM.....S.....M.....I.....K.....L...T...S.....R.Q...N.L
45F1  ...S.....S.....M.....I.....K.....RL...R...L...N...S.....R.Q...N.L
46C   ...SI.....F...S.....M.....T...I...K.....L...S.....LG...D...
47C   ...SL.....F...T.....M.....T...I...K.....L...S.....R.KDY...
48C   ...SI.....F...S.....M.....T...I...K.....L...S.....Q...D...
49C   ...SI.....S.....M.....T...I...K.....L...N...A.....Q.A..D...
50C   ...SIA.....S.....M.....T...I...K.....L...S.....R.Q.E...
51C   ...SMM..A...F...S...G...M..PPF...F...F...VI...K.....L...P...A.....Q.E..N...
53C   ...SI.....S.....M.....I.....K.....L...S.....R.Q...
54C   ...SI.....S.....M.....T...I...K.....L...S.....L...D...
55C   ...SI.....S.....M.....T...R.I...K.....L...A.....QQ...D...
56C   ...S.A.....S...K.....M.....I.....K.....L...S.....H.E..N...
57C   ...SI.....F...S.....M.....L...Q.....L...L...S.....R.QK...D...
58C   ...SI...H...S.....M.....T...I...Q...R.....H...S.....LGE..N...
59C   ...SI.....S.....M.....T...I...Q...R.....L...S.....Q...N...
60C   ...SMM.....S.....M.....T...I...K...R.....L...T...S.....R.Q.E..D...

```

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00	800	
17B	TWMQWEKEIE	NYTGVIVSLL	EESQNOQEK	EQELLELDKW	ASLWNWFSIT	QWLWVIKIFI	MIVGGGLIGR	IVFAVLSIVN	RVRGYSPLS	FQIRLPAQR	S	
20B	..E..R..D	..DF..T..	.....KD.....	.....D..N	.....L..	.....TA.....	.....I..	.....L..	.....L..	.....L..	.....L..	.....L..
21B	..I..R..D	..BT.....	..NA.....	..D..Q.....	.....H.....	.....L.....	.....T.....	.....K.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
22B	..IE..R..D	..DL..I..	.....K..A..	.....D..S	.....R.....	.....R.....	.....T.....	.....K.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
23B	.....K..K..D	.....L..E..	.....K.....K.....	.....K..N..	.....N.....D..S	.....N.....	.....L..V..	.....V..S..	.....S.....	.....T.....	.....L.....	.....L.....
24B	..E..DR..N	..Q..N..	.....K.....	.....A..T..	.....D..S	.....N.....	.....L..V..	.....V..S..	.....S.....	.....T.....	.....L.....	.....L.....
25B	.....R..D	.....L..N..	.....D.....	.....N.....D..	.....D.....	.....R.....	.....A.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
26B	.....R..D	..DS..K..I	..Q.....	.....D..A..T..	.....N.....D..	.....R.....	.....A.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
27B	..IE..R..D	K..ST..Q..	.....	.....N..S.....	.....N.....	.....R.....	.....V.....	.....I.....	.....T.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
28B	..E..R..D	.....L..N..	.....L.....	.....K.....D.....	.....D.....	.....L.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
29B	.....R..D	.....L..T..I	..Q.....	.....D.....	.....D.....	.....L.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
30B	..E..R..D	.....L..N..	.....L.....	.....K.....D.....	.....D.....	.....L.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
1B/Bbr	..IE..R..G	.....E..N..	.....K.....	.....A.....	.....D..S	.....H.....	.....R.....	.....S.....	.....T.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
2B/Bbr	.....R..D	.....N..T..I	..K.....	.....T.....	.....D..N	.....R.....	.....S.....	.....T.....	.....R.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
3B/Bbr	.....E..D	.....S..L..T..I	.....	.....D..S.....	.....K.....	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
4B/Bbr	.....D..R..G	.....D..L..N..I	.....	.....L.....D.....	.....D..K	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
5B/Bbr	.....E..R..G	.....D..L..N..I	.....	.....L.....D.....	.....D..K	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
6B/Bbr	.....R.....	.....I..N.....	.....	.....L.....D.....	.....D..N	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
7B/Bbr	.....R..D	.....N..L..N.....	.....	.....N.....D..S	.....K.....	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
8B/Bbr	.....R..D	.....E..Y..N.....	.....K.....	.....S..D.....	.....K.....	.....V.....	.....V..S..	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
9B/Bbr	.....E..R.....	.....D..L..T..I	..G..I.....	.....	.....K.....	.....I..V.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
10B/Bbr	.....E..R..D	.....L..T.....	.....K.....	.....T.....D..S	.....N.....	.....A..V.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
11B/Bbr	.....E..R..D	.....L..K.....	.....N.....	.....D..S	.....K.....	.....R.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
12B/Bbr	.....E..R..D	.....L..N.....	.....I.....	.....D..A.....	.....D..S	.....K.....	.....R.....	.....V.....	.....T.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
13B/Bbr	.....R.....	.....I..N.....	.....	.....D..N	.....D..N	.....R.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
14B/Bbr	.....R.....	.....I..N.....	.....	.....D..N	.....D..N	.....R.....	.....V.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
31F1	.....V..S.....	..SQE..R..I	..K..T.....	.....K.....	.....T..D..S	.....N.....	.....K.....	.....T..V..R	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
32F1	.....N.....	..SNE..R..I	.....K.....	.....A.....	.....D..S	.....N.....	.....K.....	.....T..V..R	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
35F1	.....E.....S	..SSE..R..I	.....A.....	.....I.....	.....K.....	.....D..S	.....N.....	.....R.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
36F1	.....N.....	..SNE..R..I	.....K.....	.....A.....	.....D..S	.....N.....	.....K.....	.....T..V..R	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
38F1	.....N.....	..SNE..R..I	.....K.....	.....A.....	.....D..S	.....N.....	.....K.....	.....T..V..R	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
39F1	.....E.....S	..SSE..R..I	.....Q.....S.....	.....D.....	.....A.....	.....S..E..S	.....N.....	.....R.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
40F1	.....E.....S	..SSE..R..I	.....K.....	.....M.....	.....A.....	.....S..D.....	.....N.....	.....R.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
41F1	.....E.....S	..SKE..K..I	.....K.....	.....A.....	.....D..N	.....D..N	.....I.....	.....T.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
42F1	.....E.....S	..SKE..K..I	.....K.....	.....A.....	.....D..N	.....D..N	.....I.....	.....T.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
43F1	.....E.....S	..SSE..R..I	.....Q.....	.....A.....	.....S..D.....	.....N.....	.....I.....	.....T.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
45F1	.....E.....S	..SSE..R..I	.....Q.....	.....A.....	.....D..S	.....N.....	.....K.....	.....T.....	.....R.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
46C	.....DR..N	.....NT..K.....	.....A.....	.....D..S	.....N.....	.....G..H.....	.....I.....	.....T.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
47C	.....DR..N	.....NT..T.....	.....I.....	.....A.....	.....Q..N.....	.....G..K.....	.....I.....	.....T.....	.....K.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
48C	.....DR..S	.....NT..K.....	.....D.....	.....D..A..Q	.....K..N.....	.....T..D..H	.....I.....	.....T.....	.....M.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
49C	.....DR..N	.....DT..K.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....T..D..K	.....R.....	.....I.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
50C	.....E..DR..N	.....NT..R.....	.....V.....	.....Q.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....S..G..R	.....I.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
51C	.....DR..N	.....T..R.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....S..G..N	.....I.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
53C	.....R..D	.....E..R.....	.....V.....	.....D..A.....	.....Q..S.....	.....N..N	.....N.....	.....I.....	.....V.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
54C	.....DR..N	.....NT..R.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....T..D..K	.....I.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
55C	.....D..N	.....DT..R.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..S.....	.....N..N	.....N.....	.....I.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
56C	.....R..D	.....DT..R.....	.....V..I.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....N..S	.....K.....	.....I.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
57C	.....D..S	.....NT..R.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....S.....	.....K.....	.....I.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
58C	.....DR..S	.....RT..E.....	.....K.....	.....D..A.....	.....N..N.....	.....G..S	.....I.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
59C	.....DR..S	.....YT..R.....	.....D.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....S..N..H	.....I.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....
60C	.....DR..N	.....DT..R.....	.....V.....	.....D..A.....	.....Q..N.....	.....S..D..N	.....I.....	.....T.....	.....I.....	.....L.....	.....L.....	.....L.....

MPER

Transmembranar  
Region

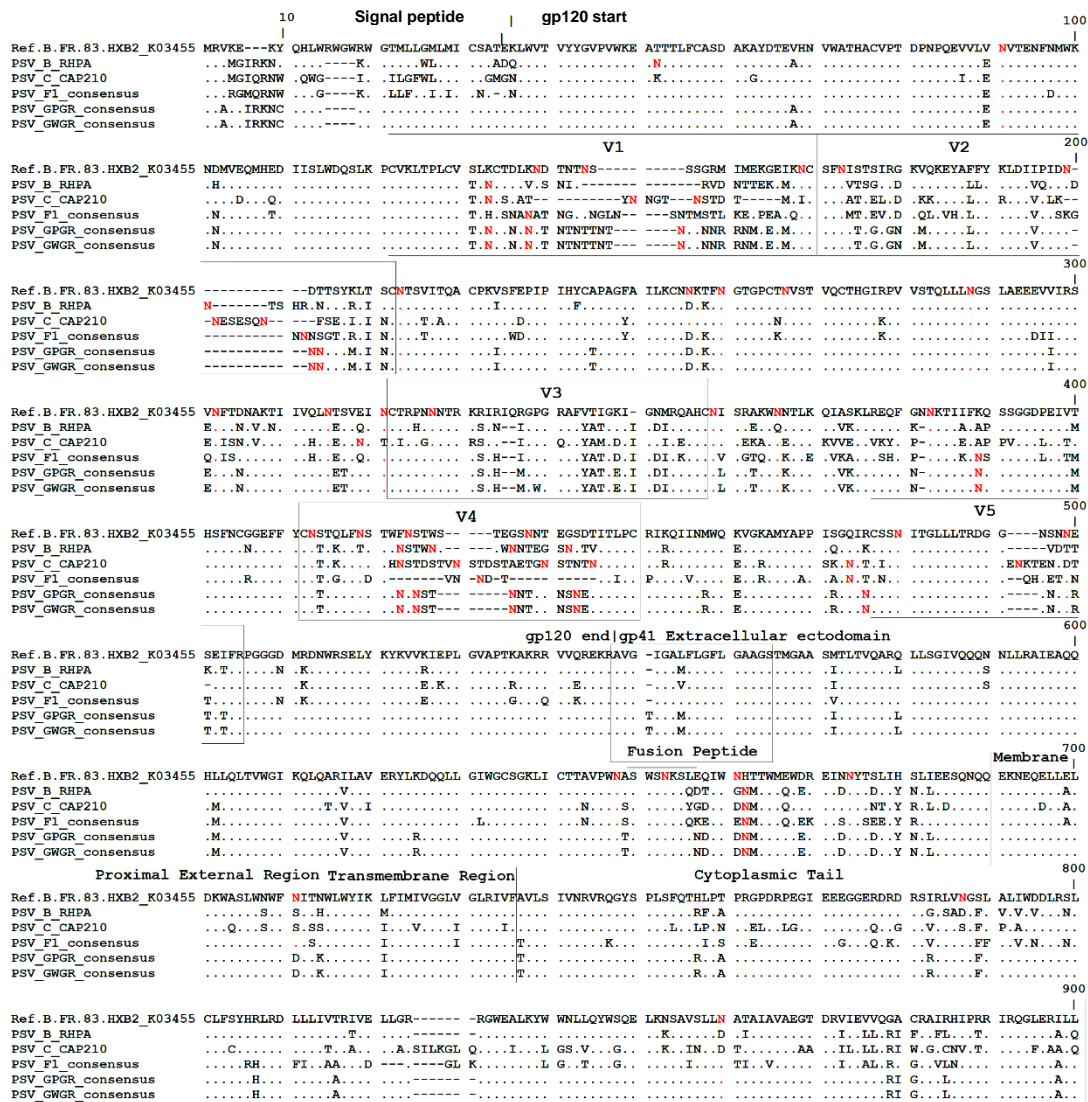
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	00		
17B	HERPFGGIEEE	GGERDRDRSG	PLVNGFLELI	WDDLRLCLF	SYRRLRDL	IVARIVELLS	R	RG	WEALKYWN	LLYWIQELKN	SAVSLLNATA	900
20B	PD...T...	N R.H..A.V	R..R.VI	L..F.	G.			V..S	Q..S..S	F..I.		
21B	PG..E.T...	D.N..T.S	R.H..A.	R..R.	H.				Q..S..S	F..I.		
22B	PD..E.T...	G..T.S	Q.AT..AI	R..T.	HL	SA..V.G.			Q..S..S	F..I.		
23B	PD..E.T...	T R.T..FA	R..R.V.	H.					Q..S..S	TI.		
24B	PD..RET...	D.N..S.E	R.AT..A.	V..R.F.W	HQ..I.	VA.K.G.			L	Q..S..S		
25B	PD..E.TG...	SG.FN	Q.AP..A.V	V..RN.F.	HH	T..SL			L	G..S..S	I..F..	
26B	PD..E...	N..T	R..A.	R..R.	H.				C	Q..S..S		
27B	PDG.E...	N..S.E	R.A..FA	R..R.	H.				G.I.	FQ..S..S	F..IV	
28B	PD..E...	N..R.T..P.	R..R.	H.	A..I.					Q..S..S	I..N.F..I.	
29B	PD..E...	T R.T..P.	R..RN.	HH	AT..G.					Q..S..S	I..N.FGTI.	
30B	PD..E...	N..R.T..P.	R..R.	H.	A..I.					Q..S..S	I..N.F..I.	
1B/Bbr	PD..E...	R..G.	W..LS.	H.						Q..S..S	I..V.TI.	
2B/Bbr	PDK.E.R...	R..R..R.A.	R..R.	H.	A..KVM				R	Q..S..I.		
3B/Bbr	PD..A.T.KK	S..R..R.A.	R..R.	HH	A..R					Q..C..		
4B/Bbr	PD..E...	A..R..G.	W..LS.	H.						Q..S..S	I..F..L.	
5B/Bbr	PD..E...	D..SP..R	R..D..A.V	R..R.	H.				V	Q..S..S	F..L.	
6B/Bbr	PD..E.G...	D..S.E	R.AT..A.	V..R.F.C	HH	S..AT				Q..S..S		
7B/Bbr	PD..E.G...	R..D..A.	R..RN.	H..S.	AT					Q..S..S		
8B/Bbr	PD..E.T...	V R.H..A.V	R..RN.	H..T.I.	R					L	Q..S..S	
9B/Bbr	PD..E.G...	S.GG.T	R.H..A.V	R..R.V.	H					Q..S..R	FD.I.	
10B/Bbr	PD..E.G...	DK..R	R.H..A.V	R..R.	HH	T				R.G	Q..S..I.	
11B/Bbr	PD..E.G...	N..N	R.H..A.V	R..R.	HN					G	Q..S..S	
12B/Bbr	PD..E...	D..P..R	R..D..A.V	R..R.	H.					G	Q..S..S	
13B/Bbr	PD..E...	D..SP..R	R..D..A.V	R..R.	H.				A	Q..S..S	F..L.	
14B/Bbr	PD..E...	D..SP..R	R..D..A.V	R..R.	H.				A	Q..S..S	F..L.	
31F1	PD..E...	Q.K.	V R..FA.V	E..RN.	H..FI	A..D			RGLR	..HL	V..S	I..DT.
32F1	PD..EE...	Q.G.	V R..S.V	E..RN.	H..FI	A..T.D			RGLKW	..Q..L	TQ..L.K.	I..T.
35F1	PD..LEE...	Q.G.	V R..FA.V	E..RN.	H..FI	A..D			RGLR	..L	I..Q..GL	I..T.
36F1	PD..EE...	Q.G.	V R..S.V	E..RN.	H..FI	A..T.D			RGLRW	..Q..L	TQ..L.K.	I..T.
38F1	PG..E...	Q.G.	V R..FA.V	E..RN.	H..I	D			RGLK	..V..LL	T..GR	I..TV.
39F1	LD..E...	Q.GK.	V R..L.A.	E..RN.	H..FI	A..N			RGLR	..L	A..S	I..TI.
40F1	PD..D...	Q.K.	V R..S.V	E..RN.	H..FI	A..T.D			KGLK	..L	TQ..G	I..TI.
41F1	PD..D...	Q.K.	V R..S.V	E..RN.	H..FI	A..T.D			KGLK	..L	TQ..G	I..TI.
42F1	PD..E...	D..Q.GK.	V R..H..A.V	T..RN.	L..FI	A..D			RGLR	..LL	AQ..S	I..T.
43F1	PD..E...	D..Q.GK.	V R..H..A.V	T..RN.	L..FI	VA..D			RGLR	..LL	TQ..S	I..TI.
45F1	PD..E...	D..Q.GK.	V R..H..A.V	T..RN.	L..FI	VA..D			RGLR	..LL	TQ..S	I..TI.
46C	PD..L...	Q.KGK	I R..S..A.V	R..R.	H..T	A..AL			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..K	I..DT.
47C	P.....	Q.KGS	I R..S..A.V	R..RN.	HQ..T	AT.AL			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..SL..K	I..DT.
48C	PD..L...	Q.....	I R..S..A.A	R..R.	H..I	A..A			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..K	I..DT.
49C	PD..L...	K.....	I R..S..A.A	R..R.	H..IS	A..A			HSLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..K	IG.FDTI.
50C	PD.....	Q.G.	I R..S..P.F	R..R.	H..IS	A..AA			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..R	I..FDTI.
51C	QD..E..D.	Q.....	I R..S..A.A	R..R.	H..T	A..A			SILRGLQ	..L..LGS	VQ..GL..R	I..FDTI.
53C	PG..L...	Q.K.	I R..S..A.A	R..R.	H..I	A..A			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..SL..K	I..DTI.
54C	PD..L...	Q.....	I R..S..A.A	R..R.	H..I	A..A			HSLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..K	I..DTI.
55C	PD..L...	Q.A.	I R..S..FS.A	R..R.	H..I	AT.A			HSLRGLQ	..I..LGS	VQ..GI..K	I..DTI.
56C	PD..L.E...	Q.KE.	I R..S..FS.A	R..R.	H..V	AT.T			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..R	N.IR..DTI.
57C	PD..L..K.	Q.....	I R..S..A.A	R..R.	H..I	A..A			SRLRGLQ	..I..LGS	AQ..GL..R	VI..FDTV.
58C	PD..L...	Q.K.	I R..S..A.T	R..R.	I..H..I	A..A			SRLRGLQ	..I..LKS	VQ..GL..K	I..DTI.
59C	PD..L...	Q.....	I R..D..A.A	R..RN.	C..H..I	AT.A			SRLRGLQ	..I..LGS	VQ..GL..K	I..DTI.
60C	PD..L...	Q.....	I R..S..A.A	R..R.	H..T..A	A			SRLRGLQ	..I..LG	VQ..SL..R	I..N..DTI.

Citoplasmic Tail (gp41)

	10	20	30	
17B	I A V A E G T D R V	L E I L Q R I G R A	I L H I P T R I R Q	G F E R A L L 937
20B	.....I	I . A V . . . . .	. . . . . R . . . . .	. L . . . . .
21B	.....I	I . . A . . . F . .	F . . . . . R . . . . .	. L . . . . . Q
22B	...G.....I	I . A I . . . . .	F . N . . . . . R . . . . .	. . . . .
23B	V V . . . . .	I . V V . G . . . G	. . . . . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . . S . . . . .
24B	....R...I	V . . I . K V . . G	. . . . . R . . . . .	S L . . . . .
25B	V T . . . . .	I . L A . . . . I G	L . . . . . R . . . . .	. L . . . . .
26B	.....I	I . V A . . . V T .	F . N V . R . . . . .	. L . . . . .
27B	. P . . . . .	I . T I . . . C . . .	. . . . . R . . . . . T . . . . .	. L . . . . .
28B	.....I	K . V V . T . W . .	F . . . . . R . . . . .	. A . . . . . F . . . . .
29B	.....I	I . A G . . L C . . .	. . . . . R . . . . .	. L . . . . . L . . . . .
30B	.....I	K . V V . T . W . .	F . . . . . R . . . . .	. A . . . . . F . . . . .
1B/Bbr	.....I	I . A A . . . F . . G	. . . . . R . . . . .	. L . . . . .
2B/Bbr	....R..K..	. . V A . . V S . S	. . . . . R . . . . .	. L . K I . . . . .
3B/Bbr	V . . . R . . K .	I . A V . . . S . G	. . . . . R . . . . .	. L . . . . .
4B/Bbr	V T . . . . .	I . V V . . . N . .	. . N V . R . . . . .	. L . . . . .
5B/Bbr	. V . . . . .	I . A V L . . C . . .	. . . . . V . . . . .	. L . . . . .
6B/Bbr	V T . . . . .	I . V V . . . N . .	. . N V . R . . . . .	. L . . . . .
7B/Bbr	.....I	I . V V . . . . G	. . . . . R . . . . .	. L . . . . .
8B/Bbr	.....I	I . V I . . . C . . .	. . . . .	. L . . . . .
9B/Bbr	.....I	I G V A . . . . G	. I . . . . R . . . . .	. L . . . . I . . . . .
10B/Bbr	.....I	I . V A . . . . .	. . . . .	. L . . . . . Q
11B/Bbr	.....I	I . L A . . L . G	. . . . .	. L . . . . .
12B/Bbr	.....I	I . L A . . L . G	. . . . .	. L . . . . .
13B/Bbr	V T . . . . .	I . V V . . . N . .	. . N V . R . . . . .	. L . . . . .
14B/Bbr	V T . . . . .	I . V V . . . N . .	. . N V . R . . . . .	. L . . . . .
31F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	. . . . . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . .
32F1	. V . . . . .	I . A V . . . A . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . . Q
35F1	. V . . . . .	. . V . . . . . G	. . . . . R . . . . .	. L . . . . . S . . . . .
36F1	. V . . . . .	I . A V . . . A . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . . Q
38F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . .
39F1	. V . . . . .	. . A . . . A . . .	. . . . . R . . . . .	. L . . . . .
40F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	. . . . . N . . . . . R . . . . .	. L . G . . . . .
41F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	. . . . . N . . . . . R . . . . .	. L . G . . . . .
42F1	. V . . . W . . . .	. . A . . . V . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . .
43F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . . S . . . . .
45F1	. V . . . . .	I . A . . . A . . .	V . N . . . . . R . . . . .	. L . . . . . S . . . . .
46C	.....I	I . . I . . . C . . .	. C E . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
47C	.....I	I . . . . . C . G	. C E . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
48C	. V . . . . .	I . V . . . G . . . .	. Y N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
49C	. V . . . . .	I . L V . . W . . .	. C N . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
50C	...GR...I	I . L I . G . W . . .	. C S . . . R . . . . .	. L . . . . . A . . . . . Q
51C	.....I	I . G V . . . . .	. Y N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
53C	.....I	I . V I . . W G . .	. C N V . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
54C	.....I	I . V I . G . W . . .	. C N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
55C	.....I	I . A I . . F W . . .	. C N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
56C	.....I	I . L V . . W . G	. R N V . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
57C	.....I	I . V V . . W . . .	. C N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
58C	.....I	I . V I . G . W . . .	. C N V . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
59C	.....I	I . . I . G . . . .	. Y . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q
60C	...G...I	I D . V R G . C . . .	. C N . . . R . . . . .	. . . . . A . . . . . Q

**S1 Fig. legend:** The HIV-1 subtype-specific signatures are highlighted in yellow. Samples with high neutralization potency are noted in red.

**S2 Fig.: Alignment of *env*-psVs in relation to the HXB2 reference virus.**



**S2 Fig. legend:** Nucleotide sequences of HIV samples from the *env* gene were translated, aligned, and produced a consensus sequence for subtype F1 and B/Bbr to produce the psVF1 and psVGWGR, respectively. psVCap210 and psVRhpa were obtained from nucleotide sequence AY835447.1, whereas psVCap 210 was obtained from FJ443315.1. All psVs were aligned with the HXB2 reference. Dots indicate sequence identity, whereas dashes represent gaps introduced to optimize alignments.

## 8.2 Figura complementar:

### **Figura 26: Suplementar: Alinhamento de seqüências de aminoácidos do envelope do HIV-1 dos subtipos B, B/Bbr, F1 e C.**

A cor amarela indica as assinaturas subtipo específicas (regiões de aminoácidos com frequência de 100% para cada subtipo).

Segue a mesma figura da página 157 a 167, citada acima como S1.

### **8.3 Lista de identificação das seqüências de nucleotídeos submetida a banco de dados GenBank**

Abaixo segue a lista de identificação das seqüências de nucleotídeos (gene *env* completo) submetida a banco de dados GenBank.

Exemplo - Projeto: NEUT.sqn, ano: 2013, origem: BR, RJ, nome da amostra: NEUT1, identificação: KX181891

NEUT.sqn 2013BRRJNEUT1 KX181891  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT2 KX181892  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT3 KX181893  
NEUT.sqn 2011BRRJNEUT4 KX181894  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT5 KX181895  
NEUT.sqn 2011BRRJNEUT6 KX181896  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT7 KX181897  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT8 KX181898  
NEUT.sqn 2014BRRJNEUT9 KX181899  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT10 KX181900  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT11 KX181901  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT12 KX181902  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT13 KX181903  
NEUT.sqn 2014BRRJNEUT14 KX181904  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT17 KX181905  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT20 KX181906  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT21 KX181907  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT22 KX181908  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT23 KX181909  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT24 KX181910  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT25 KX181911  
NEUT.sqn 2011BRRJNEUT26 KX181912  
NEUT.sqn 2015BRRJNEUT27 KX181913  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT28 KX181914  
NEUT.sqn 2015BRRJNEUT29 KX181915  
NEUT.sqn 2015BRRJNEUT30 KX181916  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT31 KX181917  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT32 KX181918  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT35 KX181919  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT36 KX181920  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT38 KX181921  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT39 KX181922  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT40 KX181923  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT41 KX181924  
NEUT.sqn 2013BRRJNEUT42 KX181925  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT43 KX181926  
NEUT.sqn 2012BRRJNEUT45 KX181927  
NEUT.sqn 2009SCNEUT46 KX181928  
NEUT.sqn 2009SCNEUT47 KX181929  
NEUT.sqn 2009SCNEUT48 KX181930  
NEUT.sqn 2009SCNEUT49 KX181931  
NEUT.sqn 2009SCNEUT50 KX181932



NEUT.sqn 2009SCNEUT51 KX181933  
NEUT.sqn 2009SCNEUT53 KX181934  
NEUT.sqn 2009SCNEUT54 KX181935  
NEUT.sqn 2009SCNEUT55 KX181936  
NEUT.sqn 2009SCNEUT56 KX181937  
NEUT.sqn 2009SCNEUT57 KX181938  
NEUT.sqn 2009SCNEUT58 KX181939  
NEUT.sqn 2009SCNEUT59 KX181940  
NEUT.sqn 2009SCNEUT60 KX181941

634 **8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: **Produção de reagentes baseados em sequências de indivíduos HIV-1 soropositivos do subtipo F1 e da variante B” do subtipo B para avaliação de resposta imune humoral.**  
Pesquisadores: Dra. Beatriz Grinsztejn e Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos médicas do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas IPEC/FIOCRUZ. Dra. Monick Guimarães Lindenmeyer e Msc. Dalziza de Almeida pesquisadoras do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ.

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Como voluntário o Senhor (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que pretende produzir reagentes a serem usados em futuras avaliações de vacina anti-HIV/AIDS. Sabe-se que o HIV-1, ao infectar um indivíduo, induz uma resposta de anticorpos protetores, capazes de neutralizar o vírus. Entretanto, esta resposta não é suficiente para proteger o indivíduo em longo prazo, e é diferente para cada indivíduo infectado. Portanto, substâncias capazes de induzir anticorpos protetores (ou neutralizantes) estão sendo estudadas com o intuito de produzir vacinas que protejam da infecção pelo HIV-1. Neste estudo, uma amostra do vírus contido em seu sangue será utilizada para análise por biologia molecular e os anticorpos serão testados quanto à quantificação de proteção por anticorpos neutralizantes.

- Se concordar em participar deste estudo, serão solicitadas informações a respeito de sua saúde e a maneira provável de como o Senhor(a) adquiriu o vírus da AIDS.
- O seu nome, endereço ou outra informação que possa identificá-lo (la) **não serão divulgados**, para manter a sua privacidade.
- Caso não concordar em participar do estudo, não haverá nenhuma diferença em seu atendimento ou tratamento neste Hospital.
- Nós coletaremos cerca de 20 ml de seu sangue, uma única vez, da veia do seu braço. Durante a coleta, a Senhora (o Senhor) poderá experimentar uma leve dor e mesmo a formação de um pequeno hematoma no local da picada.

A participação neste projeto pode não lhe trazer benefícios diretos com relação ao seu problema, porém o conhecimento obtido do estudo do vírus do seu sangue e de sua resposta imune poderá contribuir para o desenvolvimento de reagentes de avaliação e produção de vacinas ou imunoterapias. Nada será publicado que inclua a sua identificação, portanto sua participação será mantida em sigilo.

Estaremos à disposição para quaisquer informações adicionais:

**Médica: Dra Beatriz Grinsztejn: telefone: 25984266. Pesquisadores: Dra Monick Guimarães Lindenmeyer ou Msc. Dalziza de Almeida, telefone: 38658106. E-mail: dalziza@ioc.fiocruz.br.**

Consentimento:

Concordo em participar no estudo proposto, doando 20ml de sangue para que possa ser utilizado nas pesquisas científicas que me foram explicadas.

Rio de Janeiro, ..... de ..... de 20.....

Assinatura do voluntário: .....

Assinatura do Pesquisador responsável:.....

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz IOC), a saber: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) - Manguinhos - RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 - E-mail: etica@fiocruz.br