



Miguel Oliveira Cruz

Vacina contra o HIV

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Borges e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Miguel Oliveira Cruz

Vacina contra o HIV

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Borges e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora da Monografia:

(Dr.^a. Olga Borges)

O Estagiário:

(Miguel Oliveira Cruz)

Eu, Miguel Oliveira Cruz, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 207105531, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, de 2015.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento muito especial à Dr.^a Olga Borges por todo interesse demonstrado, desde a completa disposição a ajudar, às ideias que auxiliaram ao sucesso deste projecto.

Aos meus amigos, que fizeram parte destes cinco anos, com os quais passei momentos inesquecíveis, e aos meus colegas de casa, que me animavam sempre que chegava a casa desmotivado, muito obrigado por todo o apoio e amizade. – Carla, Catarina, Cláudia, Inês, Mariana, Mónica, Pedro R., Pedro S., Regina, Sara F., Sara T., Sandra, Sílvia, Vera.

Aos meus pais, Manuel e Elizabete e ao irmão, André, um agradecimento muito especial. Sei que durante estes anos a atenção que dei a cada um de vocês não foi a merecida mas valeu a pena pois chego ao fim deste percurso com o sentimento de dever cumprido, e espero deixar-vos orgulhosos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | 1 |
| ABREVIATURAS..... | 3 |
| RESUMO..... | 4 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS..... | 6 |
| 2.1 Disposição Estrutural e Organização dos Constituintes da Glicoproteína do Envelope..... | 6 |
| i. Organização da Glicoproteína 120..... | 7 |
| ii. Organização da Glicoproteína 41 | 9 |
| 2.2 Adsorção às células do Hospedeiro e consequentes Alterações Conformacionais | 10 |
| 3. VACINA IDEAL..... | 12 |
| 3.1 Barreiras à obtenção de uma vacina eficaz | 12 |
| i. Diversidade do <i>HIV-1</i> | 12 |
| ii. Evasão à Resposta Imune | 13 |
| iii. Dificuldade de Indução de Resposta imunitária ao Nível das Mucosas | 13 |
| iv. Proteção dos antigénios | 14 |
| v. Síntese de Antígenos..... | 14 |
| 4. PONTOS DE INTERESSE E NOVAS ESTRATÉGIAS | 15 |
| 4.1 Elevado número de Ensaio e Investigações já realizados | 15 |
| 4.2 Infecções não progressivas | 15 |
| 4.3 Local de Ligação de CD₄⁺ | 16 |
| 4.4 Anticorpos altamente eficazes | 16 |
| 4.5 Vacina Baseada em Células T | 16 |
| 4.6 Novos alvos | 17 |
| 4.7 Tipos de vacinas | 17 |
| 5. ENSAIOS RELEVANTES | 17 |
| 5.1 Segurança e Eficácia dos Principais Antígenos Utilizados | 18 |
| 5.2 Ensaio VAX 003..... | 18 |
| 5.3 Ensaio RV144 | 19 |
| 5.4 VAX003 vs RV144 – Comparação e Explicação dos Diferentes Resultados..... | 20 |
| 5.5 Ensaio posteriores ao ensaio RV144 | 21 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| i. | Ensaio RVI52 | 21 |
| ii. | Ensaio RV305 e RV306 | 22 |
| iii. | Ensaio HVTN097 | 222 |
| iv. | Ensaio HVTN505 | 22 |
| v. | Ensaio HVTN 092 e 096..... | 22 |
| 5.6 | Resultados e Ensaio Promissores..... | 23 |
| 6. | CONCLUSÃO | 25 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |
| 8. | ANEXOS | 33 |

ABREVIATURAS

Algumas das abreviaturas serão escritas em inglês uma vez que são as mais conhecidas e mais facilmente associadas aos termos a que se referem, sendo que a tradução para português estará entre parêntesis.

A_C - Anticorpo(s)

A_CN - Anticorpo Neutralizante(s)

ADCC - *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (Citotoxicidade celular dependente de Anticorpos -CCDA)

A_G - Antígeno(s)

Crio-ME - Crio- Microscopia Electrónica (*Cryo-EM- Cryo-Electron Microscopy*)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico-ADN)

Gp - Glicoproteína(s)

HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy* (Terapia Antiretroviral Altamente Activa)

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana- VIH)

HR - Hepta Repetições

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico- ARN)

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SIV - *Simian Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Símia - VIS)

TAD - *Trimer Association Domain* (Domínio de Associação do Trímero)

TAT - *HIV-1 Trans-activating transcription Protein* (Proteínas Trans-ativadoras transcricionais do VIH-1)

RESUMO

Desde a sua descoberta que o *HIV* tem sido alvo de muita investigação. Análises estruturais, que possibilitaram criar réplicas do envelope viral, as quais permitiram a realização de estudos *in vitro* para avaliar a capacidade e a forma de indução da produção de A_C capazes de travar a infeção pelo vírus. Passaram 30 anos sem se conseguir uma vacina capaz de neutralizar o vírus, impedindo a propagação da infeção. Numerosos estudos foram iniciados mas poucos foram concluídos, e, no universo dos que chegaram ao fim, apenas alguns obtiveram resultados positivos, sendo RVI44 o ensaio com melhores resultados até hoje, com 31, 2% de eficácia. Nos ensaios VAX004 e VAX003, os primeiros ensaios de Fase III realizados em Humanos, a vacina em estudo não demonstrou qualquer eficácia no entanto, o ensaio foi considerado importante pois permitiu perceber o que não resulta como vacina, sendo que depois a seu A_G foi utilizado como reforço no ensaio RVI44. Muitos outros estudos foram realizados depois deste, alguns chegando mesmo a utilizar RI44 como base, tal como HVTN097, outros utilizando antigénios e regimes de vacinação diferentes (HVTN092), mas sempre com o mesmo objectivo: obter uma vacina o mais rapidamente possível para o controlo desta doença.

ABSTRACT

Since it was discovered, HIV has been the subject of many investigations. The structural analyzes, which permitted to create reproductions of the viral envelope, allowing *in vitro* studies to assess the capacity of induction, and shape, of Antibody (A_B) that are able to halt the infection. However, 30 years have passed without achieving a vaccine capable of neutralizing the virus and preventing the spread of the infection. Many studies have been conducted but few have been completed, and even those who come to an end, only a few of them had positive results, being the RVI44 trial the one with best results to date, with 31.2% efficacy. VAX004 and VAX003, the first Phase III trials conducted in Humans, and although the results have not shown any effectiveness, the realization that it was ineffective as a vaccine has guaranteed the study a place of high importance, providing the A_G as boost in RVI44 . Many other studies have been carried out after this, some using RI44 as base, such as HVTNI00, and other using different antigens and vaccine regimens (HVTN092), with the same objective: obtain a vaccine as quickly as possible to control this disease.

I. INTRODUÇÃO

Até há poucos anos atrás era impensável para o Homem a cura ou o controlo de doenças letais e infeções por determinados vírus e bactérias. No entanto, a evolução tecnológica e científica permitiram ao Homem encontrar a cura para muitas destas situações, sendo que no que às infeções diz respeito, o desenvolvimento de vacinas foi um grande avanço na prevenção. No entanto, algumas doenças infecciosas, como é o caso da infeção do pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*HIV*), que infecta actualmente cerca de 36,9 milhões de pessoas¹, e que faz parte do grupo de doenças infecciosas para as quais ainda não existe prevenção ou um tratamento que permita a cura.

O *HIV* tipo 1 (*HIV-1*), principal responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), motivo pelo qual é o tipo mais investigado, foi descoberto em 1983². Dois anos após a sua descoberta, em 1985, um grupo de investigadores Luso-Francês conseguiu isolar e identificar o *HIV* tipo 2 (*HIV-2*) que se transmite com menor facilidade, e cujo o período entre infeção e o desenvolvimento de SIDA é maior que o do *HIV-1*³.

A complexa estrutura do vírus, constituída por subestruturas meticulosamente organizadas em forma de pirâmide, as várias, e constantes, mutações que sofre, as alterações conformacionais de que é alvo quando se liga ao recetor dos Linfócitos CD₄⁺, as suas células alvo, e outras formas de proteção de que dispõe, tornam possível perceber o porquê de ao fim de 30 anos ainda não existir uma vacina.

Apesar disso, já muitos estudos foram feitos em Humanos, como o VAX003 e RV144 que foram, e continuam a ser, marcos na história da descoberta de uma vacina contra este vírus por terem sido, respetivamente, o segundo de fase III a ser realizado em humanos⁴, e o primeiro com resultados animadores. Após o sucesso de RV144 muitos foram os ensaios desenvolvidos quer tendo por base RV144, como RV305, HVTN097, quer tendo sido apenas despoletados pela ideia de que o sucesso estaria perto, como HVTN092 e 096, que utilizaram um antigénio diferente.

No entanto, e colocando em questão muitas das ideologias existentes, nenhum ensaio permitiu até hoje a produção de uma vacina a nível mundial, Contudo, existem várias publicações, reportando resultados de estudos que se revelaram muito promissores. Desde novos anticorpos (A_C), a alterações de adjuvantes, a ensaios com regimes de vacinação com mais reforços e novos antigénios, tudo o que seja possível e plausível, é, e será, testado e averiguado até que uma vacina com resultados satisfatórios seja conseguida.

2. CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

O *HIV* é um retrovírus da família *Retroviridae*, do género *Lentivirus*, tendo como hospedeiro o Homem.

O *HIV*, tipo 1 e 2 são vírus envelopados e esféricos, com um diâmetro que varia entre 100 nm e 150 nm de diâmetro e o seu envelope é obtido a partir da membrana citoplasmática, sendo formado por fosfolípidos⁵. O seu genoma encontra-se sob a forma de cadeia simples de *RNA* de polaridade positiva que serve de molde para a formação, através da enzima Transcriptase reversa, da cadeia de *DNA* que será posteriormente introduzida no *DNA* da célula hospedeira.

A verdade, é que para lá da existência de dois tipos de *HIV*, o *HIV-1* pode ainda ser dividido por linhagens. As descobertas mais recentes indicam a existência de 4 linhagens (M, O, N, P), sendo a M a responsável pela pandemia existente⁶. A linhagem M é ainda dividida em 9 subtipos que se encontram disseminados de forma diferente pelo globo, sendo o subtipo B o mais encontrado na Europa, América Latina e do Norte, Japão e Austrália, e o C na África do Sul e Índia⁷. Relativamente à África Subsariana, a realidade é que nesta localização se podem encontrar quase todos os subtipos de M^{8,9}.

2.1 Disposição Estrutural e Organização dos Constituintes da Glicoproteína do Envelope



FIG. I Estrutura Trimerica da Glicoproteína do Envelope¹⁰;
Adaptada (01 agosto 2015)

Apesar de serem muito semelhantes morfológicamente, os dois tipos de *HIV* têm apenas 50% de homologia genómica, o que implica que as proteínas que codificam sejam diferentes e, por isso, a exposição a um deles não confira qualquer tipo de proteção contra o outro. Estruturalmente os seus genomas são muito semelhantes e possuem, para além de outros, três genes principais: o *gag*, que codifica as proteínas estruturais da cápside e nucleocápside, o *pol*, que codifica as enzimas virais, e o *env*, que é o responsável pela glicoproteína 160 (Gp160), posteriormente clivada em seis subunidades, três Gp120 e três Gp41, que pelo seu arranjo estrutural com forma tetraédrica, com um vazio interior em torno do eixo central formam a glicoproteína do envelope (Fig.I), designada de Env ou trímero¹⁰. Esta estrutura constitui o principal alvo de investigação para o desenvolvimento da vacina pois esta é reconhecida como antigénio pelo

sistema imunitário do hospedeiro, levando a que seja o alvo dos A_C produzidos para neutralizar o vírus¹¹. Cada partícula viral tem entre 10 a 14 Env¹⁰ e cada protômero de Env (conjunto formado pela interação entre uma GP120 e uma Gp41) sofre entre 20 a 35 N-glicosilações¹². O denso escudo de glicosilações, que constitui perto de metade da massa do trímero¹³, e o elevado grau de variabilidade entre as estirpes, ajudam Env a escapar da resposta humoral¹⁰.

Na verdade, ainda muito falta saber sobre a estrutura do trímero para que se consiga, não só obter resultados mais promissores, mas também desenvolver uma vacina contra o vírus. No entanto, com o avanço da tecnologia e novas ferramentas de investigação a surgirem todos os dias, Env tem sido estudado e já existem reconstruções através de Crio-ME, com qualidade suficiente para permitir a diferenciação entre os diferentes segmentos que fazem parte do trímero e para os quais existem informações já documentadas que coincidem com as estruturas obtidas¹⁰. Contudo é necessário salientar que as estruturas obtidas por esta técnica, em laboratórios diferentes, apresentam pequenas diferenças e que permanece por determinar se tal facto se deve à utilização do trímero em diferentes formas, solubilizado, ligado ou clivado, ou se existem problemas na tecnologia de Crio-ME que ainda não foram solucionados¹¹.

i. Organização da Glicoproteína 120



FIG. II- Organização de Gp120¹³;
Adaptada (01 agosto 2015).

Relativamente à Gp120, as estruturas obtidas indicam a existência de três subunidades: o domínio interno, domínio externo e o domínio de associação do trímero (TAD) (Fig.II), formado pelos segmentos de cada protômero que promovem o contacto entre os 2 anteriores¹³.

Esta glicoproteína tem ainda outros segmentos que, por influenciarem a capacidade de ligação dos A_C ao vírus, são também alvo de muita pesquisa. Estes segmentos são designados de regiões variáveis (V_1 - V_5) e regiões constantes (C_1 - C_5)¹⁴, consoante sofrem mais ou menos alterações quando ocorre a replicação do vírus, sendo que a variabilidade de V_1 - V_5 surge através de recombinações, mutações pontuais, inserções ou deleções. O *loop* V_1/V_2 é aquele que possui o maior número de aminoácidos que podem aparecer alterados (50-90), sendo o V_3 , juntamente com C_2 , C_3 e C_4 , os que demonstram menos variabilidade¹⁵.

Outro factor interessante é o facto de existir uma correlação entre o tamanho do *loop* V_1/V_2 e a progressão da doença, levando os cientistas a acreditar que esta variabilidade auxilia o vírus na sua fuga à resposta imune do Hospedeiro^{16,17}.

Para além destas regiões, existem alguns resíduos de cisteína (Cys), que formam ligações dissulfeto intramoleculares muito importantes para formação do trímero. São resíduos altamente conservados, e localizados, não só em Gp120 mas também em Gp41¹⁸. V_1 e V_2 são separados por duas ligações dissulfeto mas ambos estão contidos num outro *loop*, de maiores dimensões, que, tal como V_3 e V_4 , é delimitado por uma ligação dissulfeto¹².

A estrutura do trímero é conseguida pelo contacto ente os protómeros de Gp120, processo que envolve uma junção entre dois prolongamentos de cada subunidade de Gp120 em direcção ao centro da estrutura. Um dos elementos origina-se no domínio externo de Gp120, na base da região variável V_3 , que é rodeada por resíduos de pontes dissulfeto de cisteína e termina a cerca de 1,7 nm do centro do trímero. O segundo elemento, que

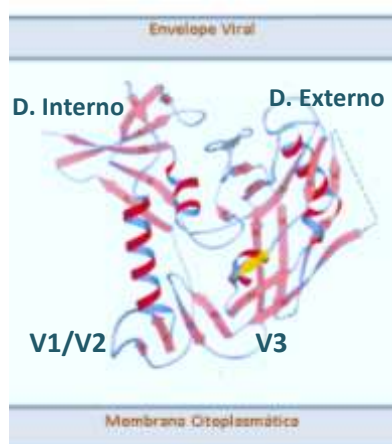


FIG. III- Domínios de Gp120 e repetitivos *loops*¹⁹;

Adaptada (01 agosto 2015)

contém o segmento de V_1/V_2 , composto por duas bandas antiparalelas β , estabilizadas por pontes dissulfeto, estende-se do domínio interno de Gp120 e dirige-se directamente para o centro do trímero. O segmento V_1/V_2 projecta-se 2,7 nm do domínio interno e serve de ponto de origem e retorno para a regiões variáveis de V_1 e V_2 (Fig.III)^{10,19}.

A verdade é que previamente à utilização da Crio-ME foi especulado que as regiões variáveis V_1/V_2 e V_3 fossem muito desorganizadas quando o vírus não está ligado. No entanto, as estruturas obtidas não corroboram esta ideia pois a reconstrução obtida é muito estável e os seis prolongamentos são bem visíveis e definidos, o que seria impossível caso fossem estruturas desorganizadas. É então possível concluir que V_1/V_2 e V_3 tenham uma conformação relativamente estável²⁰. Esta situação explica o porque de quando são efectuados pequenas alterações em V_3 se verifique uma diminuição na associação de Gp120 com o trímero do envelope¹⁰. Apesar desta descoberta, a estrutura da ligação de um $A_C N$ PG9, à região variável de V_1/V_2 sugere que esta pode formar estruturas secundárias uma vez que na estrutura obtida por Crio-ME durante a ligação, a região V_1/V_2 não se encaixa na estrutura obtida quando a estrutura não está ligada ao A_C ²¹.

Através de todos os dados obtidos pelos estudos desenvolvidos, e tendo em conta tudo o que anteriormente foi descrito, tornou-se possível articular algumas relações importantes, tais como o facto de V_1/V_2 e V_3 serem capazes de formar estruturas secundárias, possivelmente metastáveis, e que se consigam interconverter em diferentes formas, dependendo do ambiente e contexto estrutural, e ainda, a evidência de que a arquitectura das estruturas de V_1/V_2 e V_3 devem ser conservadas ao longo de diferentes isolados para manter a integridade de um trímero funcional. Para além destas conclusões, as estruturas mais recentes, e com maior resolução, permitiram obter dados muito interessantes relativos à estabilidade do trímero. Com estas estruturas foi possível perceber que a região conservada de V_2 contém tirosinas sulfatadas que no estado nativo do vírus mediam a interação entre este *loop* e V_3 , uma das chaves estruturais do trímero. Com a realização de estudos foi possível chegar mais longe e perceber que as tirosinas em V_2 , principalmente a que ocupa a posição 177, mimetizam as posições das tirosinas em CCR_5 que irão ligar ao V_3 no momento da infeção do linfócito²².

ii. Organização da Glicoproteína 41

A Gp41, tal como Gp120, faz parte da glicoproteína do envelope e está dividida em 3 protómeros, que por sua vez se encontram divididos em 2 subunidades (Fig.IV).

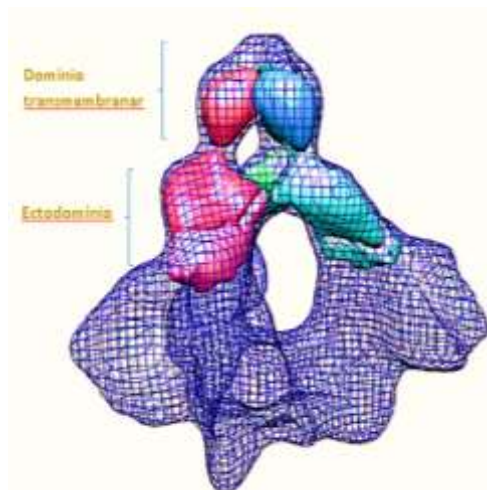


FIG. IV- Organização de Gp 41¹⁰;
Adaptada (01 agosto 2015)

Uma das subunidades, e tal como o próprio nome indica, domínio transmembranar, altamente compacto, encontra-se integrado no envelope viral e serve como ponto de contacto e fixação de Env ao vírus, sendo também responsável por parte das interações que, em conjunto com TAD e secções do ectodomínio, estabilizam a estrutura de Env¹⁰. O segmento de cada protómero que faz parte deste domínio tem estrutura de hélice α e dispõe-se perpendicularmente ao envelope viral¹³.

Relativamente ao ectodomínio, muito menos compacto, este dispersa-se desde a base formada pelas hélices α transmembranares e a cerca de 2 nm da superfície da membrana viral¹⁰, segmentos do ectodomínio, transversais à membrana, e em forma de hélices α ou *loops*, emanam e retornam ao domínio, levando ao contacto entre os dois domínios de Gp41, o que estabiliza o domínio transmembranar e permite ao ectodomínio adquirir a conformação *torus-like*, conformação cilíndrica¹³. Para

além disso, o ectodomínio contacta com o domínio interno de Gp120 aumentando a estabilidade da estrutura tetraédrica formada¹⁰. Este domínio possui ainda outros segmentos cuja existência é suportada através de estruturas obtidas por visualização em Crio-ME, onde é possível perceber que três hélices centrais, constituídas por repetições de 7 aminoácidos, e por isso designadas de hepta-repetições I (HRI), se estendem ao longo do eixo do trímero, e perpendicularmente à membrana do vírus. Outras três HRI, mais curtas, estendem-se de cada uma das anteriores mas não acompanham o eixo central, formando uma curvatura relativamente ao eixo central da estrutura¹¹. Para além destas existem ainda outras, designadas de HR2, que se encontram muito próximas do envelope viral e que se dispõem em torno das anteriores. Estas hélices estão inclinadas relativamente ao vírus e a sua extremidade C-terminal é a porção que se encontra mais próxima do envelope viral²³.

2.2 Adsorção às células do Hospedeiro e consequentes Alterações Conformacionais

O HIV tem a capacidade de se ligar a todas as células com um recetor CD_4^+ . No entanto, apenas os Linfócitos T CD_4^+ possuem outra característica essencial para a

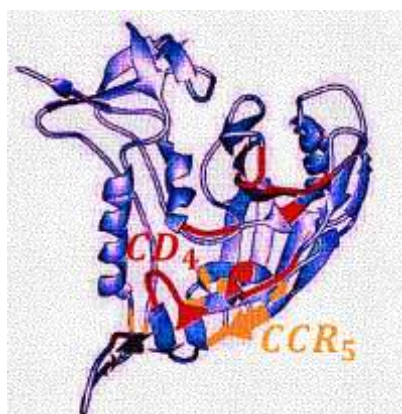


FIG. V- Segmentos pertencentes aos locais de ligação de CD_4^+ e CCR_5 ¹⁹;

Adaptada (01 agosto 2015)

capacidade de infeção deste vírus, os co-recetores $CXCR_4$ e CCR_5 ¹⁰, sendo que a variação de tropismo do vírus para com os co-recetores está relacionada com mutações em V_3 pois um aumento da carga positiva neste *loop* leva a maior interação com $CXCR_4$ pois este é negativamente mais carregado¹². No entanto, o local de ligação dos co-recetores é constituído por segmentos descontínuos de regiões constantes (C_1 , C_3 e C_4) que apenas se ordenam para formar o local de ligação após a ligação de CD_4^+ e as consequentes alterações conformacionais (Fig.V)^{12,24}.

Estruturas obtidas por visualização em Crio-ME permitiram perceber que a interação do recetor CD_4^+ com o trímero do vírus desencadeia alterações conformacionais, que se caracterizam por rotações em torno do eixo central do trímero e deslocamentos verticais²⁵, e que permitem quer a exposição do local de ligação ao co-recetor (pertencente a Gp120), quer a formação e exposição do péptido de Gp41, que favorece a fusão entre o envelope viral e a membrana citoplasmática do Linfócito²⁶.

No estado inativo, o trómero é mantido por interações, quer em Gp41 quer em Gp120, e também entre ambos, e que parecem ter contributos de V_1/V_2 e de V_3 . Estes contactos entre as glicoproteínas são considerados a chave para a estrutura tão complexa do vírus.²² A verdade é que estudos realizados indicam que a estrutura é mantida por interações muito ténues e que quando o CD_4^+ se liga ao vírus são alteradas²⁴. Ensaio realizados indicam que existe uma grande contribuição entrópica durante a interação do vírus com o recetor CD_4^+ pois após o processo a estrutura adquire um estado de menor energia devido às alterações conformacionais, tornando-se mais estável²⁶.

Segundo algumas estruturas obtidas, o local ao qual o recetor CD_4^+ se liga encontra-se cerca de 20 Å abaixo da superfície e está protegido por frações de V_1/V_2 e também por hidratos de carbono, que formam uma capa de proteção que encobre a zona de ligação, implicando que CD_4^+ tenha de penetrar no trómero para atingir o local de ligação, o que conseqüentemente leva a uma alteração da orientação dos domínios do recetor CD_4^+ , levando a uma maior aproximação da membrana do linfócito e do envelope viral²⁵. A hipótese de V_1/V_2 estar localizado na zona de ligação dos linfócitos é corroborada pelo resultado de testes que incluíam a deleção do segmento com o intuito de averiguar a alteração de afinidade entre o recetor e o trómero. Os resultados demonstraram que ao retirar o segmento a afinidade entre as duas estruturas aumentava²⁷.

Logo após a ligação do linfócito ao vírus, o *loop* V_3 é libertado pela lateral do vírus e liga-se ao linfócito, enquanto V_1/V_2 e CD_4^+ se movem para as zonas mais afastadas do eixo do trómero¹³.

Quanto ao péptido de fusão, encontra-se no interior do trómero, e é a ligação do recetor e co-recetor da célula alvo a Gp120 que culmina na exposição do peptídeo e na sua ligação à célula alvo, levando posteriormente à fusão do envelope viral e da membrana citoplasmática²⁸. O péptido é formado por seis segmentos pertencentes a Gp41, 3 HRI e 3 HR2 que formam um núcleo em hélice em que as três primeiras se curvam na direção oposta às outras 3 (feixe de sentido antiparalelo)¹¹. Este feixe é o responsável pela aproximação das duas membranas até um ponto em que a fusão é possível¹⁰.

Seguidamente, após a fusão e a libertação da cápside do vírus para o citoplasma da célula, enzimas celulares promovem a descapsidação, sendo posteriormente iniciado o processo de replicação do genoma e respetiva integração no genoma da célula, levando, por fim, à formação de novos vírus que infetarão outros Linfócitos T CD_4^+ .¹⁰

3. VACINA IDEAL

As vacinas contra vírus actualmente no mercado previnem maioritariamente doenças agudas, citopáticas e eventualmente letais, cuja elevada carga viral, e a consequente abundancia de Antígenos, permitem, ao contrário do *HIV* a utilização de A_C como forma de combate eficaz.

Contrariamente a muitas infeções virais, aquela que é provocada pelo *HIV*, tende a ter uma progressão lenta, não produzindo uma estimulação eficaz do sistema imunitário. Para além disso, o vírus tem capacidade de escapar a todas as formas de combate à infeção de que o organismo dispõe. Sendo assim, a necessidade de uma vacina contra este vírus é enorme pois apesar dos avanços das terapias anti-retrovirais, estas não são terapias curativas, fazendo com que a doença, mesmo sendo considerada uma doença crónica, continue a matar milhões por ano.

Uma vacina ideal para este vírus seria aquela que, através da estimulação sistema imunitário com a consequente produção de A_C , fosse capaz de neutralizar o vírus antes de este se hospedar nos linfócitos T CD_4^+ , mas que também fosse capaz de impedir que vírus já hospedados, continuassem a sua jornada, travando assim a progressão da infeção ou seja a vacina teria de ser capaz de induzir resposta imunológica mediada por células²⁹. Para além disso, teria de induzir imunidade nos locais de entrada do vírus no corpo humano e, tendo em conta os locais de primeiro contacto com o vírus, a resposta imune das mucosas torna-se essencial pois a transmissão sexual é a mais expressiva.

3.1 Barreiras à obtenção de uma vacina eficaz

Na verdade, e apesar de se perceber o que é necessário na vacina para que esta tenha sucesso no controlo desta doença infecciosa, o *HIV* é um vírus muito peculiar e tem características que o tornam único, e que tornam difícil a obtenção de uma vacina eficaz. As dificuldades têm sido muitas e apesar de algumas já terem sido ultrapassadas outras surgem e deitam por terra a esperança de milhões.

i. Diversidade do *HIV-1*

A acrescentar à variabilidade já característica do vírus devido à sua divisão em várias linhagens, onde o envelope viral, que medeia a entrada no vírus na célula, sendo o principal alvo dos A_C neutralizantes, tem uma variabilidade de 35% entre as diferentes linhagens e de 20% entre os subtipos da mesma linhagem⁷, a elevada capacidade de replicação do vírus leva

a um número significativo de mutações devido a falhas da transcriptase reversa³⁰. Sendo assim, e quanto mais cópias mais mutações existem, esta diversidade torna-se um grande obstáculo à produção da vacina, uma vez que reação imune induzida para um subtipo específico de *HIV-1* não será eficaz noutro vírus do mesmo tipo, se este tiver algum tipo de mutação.

Na tentativa de contornar esta dificuldade, a combinação de genes de diferentes subtipos, e a utilização de sequências de genes criadas por sistemas informáticos, são as principais estratégias utilizadas pelos cientistas.

ii. Evasão à Resposta Imune

Um dos grandes entraves a todo o processo de desenvolvimento da vacina é o facto de o vírus conseguir fugir facilmente e com elevada frequência ao sistema Imunitário.

Um das principais formas de evasão do vírus passa por utilizar células do próprio sistema imunitário como células hospedeiras. Os Linfócitos T CD_4^+ , que têm um papel fundamental na resposta imune adaptativa contra o *HIV-1* são também o primeiro alvo do vírus.

Outra das principais características que facilitam a evasão às defesas do Organismo Humano, é o facto de o vírus sofrer muitas e diferentes mutações, que, para além de aumentar a diversidade do *HIV*, leva à produção de cópias do vírus que as células citotóxicas não são capazes de identificar e aniquilar tão rapidamente quanto o necessário.

iii. Dificuldade de Indução de Resposta imunitária ao Nível das Mucosas

A grande maioria das infeções por *HIV* dão-se através de contacto sexual, sendo que o vírus consegue entrar no organismo através da mucosa vaginal e anal.

O Sistema Imune associado às mucosas é o primeiro a ser estimulado. Neste sentido uma vacina preventiva da infeção deveria ser capaz de induzir uma resposta imune eficaz ao nível das mucosas. No entanto, pouco se sabe sobre a forma como a resposta imunitária das mucosas previne a infeção por *HIV* e, no caso de uma resposta celular desejável, a informação ainda é mais escassa.

O desenvolvimento de uma vacina que induza resposta ao nível da mucosa tem o grande entrave das vias de administração. Concretamente, vacinas administradas pela via oral por exemplo, são normalmente menos eficazes devido à destruição dos componentes da vacina no trato gastrointestinal. Por esta razão, e de uma forma geral, as vacinas são de

aplicação intramuscular ou intradérmica, o que não leva a uma indução satisfatória da resposta do sistema imunitário ao nível das mucosas.

iv. Proteção dos antígenos

Os avanços tecnológicos permitiram a obtenção de estruturas tridimensionais do vírus que possibilitaram perceber algumas das alterações conformacionais que ocorrem quando o vírus se liga à célula alvo.

Através de comparações de estruturas, foi possível perceber que as ligações de CD_4^+ e de determinados AcN, como por exemplo, o b12, apesar de ocorrerem nos mesmos locais do vírus, induzem alterações conformacionais diferentes²⁵, sendo deste modo possível perceber o porquê de a ligação do A_C apenas ser capaz de neutralizar 50% das variantes do vírus, pois as alterações que induz em alguns vírus não são suficientes para os neutralizar. Estudos mais focados neste A_C permitiram perceber que o contacto de b12 com o vírus inclui apenas 58% da superfície de Gp120 necessária, e não tem a maioria dos resíduos de V_1/V_2 , V_3 e amino e carboxi terminais⁵, o que justifica a dificuldade em provocar alterações conformacionais efectivas. Para além disso, foi possível também perceber que a exposição de V_3 e de outros determinados antígenos ocorrem na interface formada entre o vírus e a célula alvo, o que os protege de A_C que poderiam neutralizar o vírus¹².

Recentemente, a utilização de estruturas com algumas alterações, permitiu perceber que o local de ligação do A_C 412d, que se liga ao péptido de Gp120 que ligaria ao co-recetor, só é visível após a primeira interação com CD_4^+ pois o péptido sulfatado de Gp120 (V_2) inibe a ligação do A_C ao local específico, enquanto o péptido não sulfatado já tem um poder de inibição muito menos pronunciado²². A verdade, é que esta descoberta, e apesar de hoje em dia ser uma dificuldade à produção da vacina, pode, futuramente, vir a ser utilizada como uma ferramenta.

v. Síntese de Antígenos

Uma vez que a utilização do vírus na composição das vacinas não é possível, não só devido ao elevado de risco social que acarreta, mas também a dificuldades técnicas na inactivação do HIV, como por exemplo a perda do envelope durante o processo³¹, a síntese de antígenos, com base nas estruturas da Glicoproteína, foi a melhor solução encontrada para ultrapassar este entrave³¹. Reconstruções recentes, com maior definição, obtidas por crio-ME, permitiram descobrir que interações entre Gp120 e Gp41, e possivelmente a própria organização de Gp41, diferem quando V_1/V_2 e V_3 são retirados dos trímeros sintetizados, o que deita por terra algumas investigações anteriores onde foram utilizadas

estruturas do trímero com algum tipo de deleções²⁴. A este factor há ainda a acrescentar que, apesar de toda a tecnologia existente, mesmo actualmente as estruturas de antigénios diferem de laboratório para laboratório, levando a algum desentendimento e à dúvida sobre qual será realmente a estrutura correcta, pois pequenas alterações da estrutura podem significar o fracasso no que à indução de A_C contra o *HIV* diz respeito. Para além disso, e como referido anteriormente, o vírus tem capacidade de ocultar os seus A_G até ao momento em que infecta o Linfócito, pelo que algumas estruturas são obtidas recorrendo a combinações do trímero do vírus e do recetor CD_4^+ das células, o que dificulta ainda mais a obtenção de estruturas bem definidas³².

4. PONTOS DE INTERESSE E NOVAS ESTRATÉGIAS

Apesar de todas as dificuldades e entraves que existem na procura de uma vacina ideal, há também situações que se tornam oportunidades, podendo levar a descobertas promissoras, e surgem também, e à medida que a tecnologia avança, novas estratégias, que se espera, possam ajudar no combate ao *HIV*.

4.1 Elevado número de Ensaio e Investigações já realizados

Desde a sua descoberta que o *HIV* tem sido alvo de diversas investigações na tentativa de perceber toda a sua estrutura e o porquê de tanta dificuldade em conseguir uma vacina eficaz. Para além disso, já foram realizados inúmeros ensaios, quer em animais quer em humanos, que até hoje também não permitiram obter qualquer resultado satisfatório. No entanto, todos estes processos não foram em vão, e devido ao seu elevado número, e à partilha de informação que existe, todos estes estudos tiveram o seu lado positivo, pois permitiram perceber o que poderá funcionar daquilo que, com certeza, não irá funcionar.

4.2 Infeções não progressivas

Hoje em dia os portadores do vírus vivem em média mais 20 anos do que em 2000³³, sendo isto possível devido ao grande desenvolvimento dos tratamentos disponíveis. No entanto, há casos muito específicos de portadores, que mesmo sem medicação conseguem controlar a replicação viral, mantendo os níveis de linfócitos T CD_4^+ por mais de 10 anos. A Interleucina-2 (IL-2) que os seus linfócitos CD_4^+ e CD_8^+ produzem, ao contrário das células T de outros indivíduos, ditos normais que só produzem interferão γ , e ainda o título de A_{CN} superior ao encontrado nos restantes portadores, leva a que consigam controlar os níveis

virais durante mais tempo. Estes factos encorajam os investigadores a procurar soluções que induzam este tipo de respostas, prevenindo que a infeção se estabeleça⁷.

4.3 Local de Ligação de CD_4^+

Apesar de estar resguardado do ataque dos $A_C N$, por, e como já foi descrito acima, estar coberto por segmentos das regiões variáveis, o facto de o vírus ser também formado por regiões constantes¹² trás alguma esperança no desenvolvimento de uma vacina. Neste caso, trata-se de isolar e caracterizar estes antigénios e de os tornar imunogénicos de forma a poderem induzir uma elevada quantidade de $A_C N^2$.

4.4 Anticorpos altamente eficazes

Embora a maioria dos A_C contra o vírus sejam pouco eficazes, existem alguns com elevada especificidade para o *HIV* e alguns tem a capacidade de neutralizar vírus pertencentes a diferentes subtipos. Exemplo disso são 2F5 e 4E10 que ao ligarem a Gp41 inibem a fusão do envelope viral com a membrana do Linfócito, impedindo assim que a cápside do vírus seja libertada no interior da célula. No entanto, e apesar de serem muito promissores, estes A_C são encontrados em concentrações muito pequenas num organismo infectado pelo vírus, e por isso não conseguem combater eficazmente a propagação da infeção. Ainda a acrescentar a esta desvantagem, existe o facto de o local de ligação destes A_C estar muito próximo do envelope viral, o que pode significar que o vírus esteja susceptível aos A_C durante um curto período⁷. Existe ainda outro A_C , o VRC01, descoberto recentemente no soro de um portador com uma infeção não progressiva³⁴, e que tem a capacidade de neutralizar cerca de 90% de todos os tipos de *HIV* existentes. Para comprovar a sua capacidade, o A_C foi produzido em laboratório e administrado a primatas não Humanos obtendo resultados muito positivos contra SIV, chegando mesmo a mostrar resultados ao nível das mucosas. No entanto, e tal como os anteriores, a sua produção no decorrer de uma infeção não atinge os níveis necessários para que seja eficaz.

Na pesquisa por $A_C N$, um centro de investigação descobriu PG9 e Pgl6 que têm a capacidade de neutralizar entre 70% a 80% dos tipos de *HIV*³⁵.

4.5 Vacina Baseada em Células T

Estudos realizados indicam que são os Linfócitos T CD_8^+ os principais responsáveis pela diminuição da carga viral logo após a fase de replicação inicial, pelo que se acredita também que uma indução da resposta imunitária mediada por estas células possa ser um dos

melhores meios para delimitar as consequências da infecção³⁶, sendo que para isso, e tal como noutra tipo de vacinas, a variabilidade do vírus teria de ser ultrapassada, e a utilização de zonas conservadas como A_G parece ser a melhor solução neste tipo de vacina².

4.6 Novos alvos

As proteínas Tat, mais conservadas que as proteínas do envelope, são responsáveis por regular a transcrição, sendo essenciais à replicação do vírus, e por isso são expressas logo no início da infecção. Estudos recentes com A_C contra estas proteínas demonstraram proteção parcial contra o HIV, levando os cientistas a continuar a investigação baseada nesta nova abordagem^{37,38}.

4.7 Tipos de vacinas

Actualmente são vários os tipos de vacinas já testados contra o HIV. No entanto, a sua maioria não obteve resultados promissores. No entanto, uma vacina utilizando um vector vivo atenuado³⁹ obteve resultados que, apesar de não serem completamente satisfatórios foram promissores, e são até hoje o melhor resultado obtido⁴⁰. Contudo, e como a resposta imunitária das mucosas e os custos de toda esta operação, são muitos importantes, foi equacionada a utilização de uma vacina soba forma de *spray* nasal, uma vez que tem elevada capacidade de indução de resposta das mucosas e tem custos de produção mais baixos^{41,42}.

5. ENSAIOS RELEVANTES

A verdade, é que mesmo após anos de pesquisa não foi possível a obtenção de uma vacina com eficácia apropriada, e que pudesse justificar a sua produção e distribuição a nível mundial.

Apesar dos muitos ensaios já realizados, poucos foram aqueles cujos resultados foram positivos, e muitos houve, que apesar de um resultado positivo, não tiveram grande influência pois não justificavam a distribuição mundial devido à baixa taxa de sucesso.

No entanto, será importante realçar três destes estudos (Anexo I) pois implicaram um grande avanço, não só em relação à própria vacina, mas no que se deve e não deve apostar para o seu desenvolvimento, até porque num deles, e apesar de ter sido concluído, os resultados foram desanimadores⁴³.

5.1 Segurança e Eficácia dos Principais Antígenos Utilizados

Realizado no final da década de 90⁴⁴, este foi um ensaio muito importante pois os seus resultados permitiram o avanço para ensaios de Fase III, que trouxeram alguns resultados positivos, como é o caso de RV144, explicado mais à frente.

Este ensaio foi desenvolvido utilizando como antígeno principal o vector viral geneticamente modificado da varíola do canário, ALVAC-HIV (vCPI521), da Sanofi Pasteur, que expressa a Gp120 (subtipo E) ligada à porção transmembranar de Gp41³⁹, e também o gene Gag e a protéase viral, tendo como placebo os mesmos excipientes sem o vector. Para além disso, foi também utilizado como reforço a vacina bivalente desenvolvida pela VaxGen, contendo uma mistura altamente purificada de GPI20 dos subtipos B e E (AIDSVAX B/E)⁴⁵ unidas por uma sequência de 27 aminoácidos de uma proteína proveniente do vírus *herpes simplex*³⁹, e cujo placebo consiste na administração do adjuvante (alum) sem o antígeno⁴⁵.

O Antígeno ALVAC-HIV foi testado, numa primeira fase, sozinho e posteriormente em combinação com AIDSVAX B/E, recorrendo a diferentes regimes de vacinação durante ambas fases, sendo que na segunda fase existiram que reforços cujo regime de administração fora também aletrado consoante os resultados obtidos⁴⁶.

Os resultados do ensaio de fase I em 133 voluntários indicam que as vacinas utilizadas são seguras e que produzem, nos regimes de vacinação utilizados, resposta imune específica, celular e humoral. Estas conclusões promissoras permitiram que estas vacinas pudessem ser testadas em Ensaios de fase III em Humanos, na tentativa de obter uma vacina que fosse plausível de ser comercializada mundialmente⁴⁵.

5.2 Ensaio VAX 003

Em 1999 tiveram início os dois primeiros ensaios de fase III em Humanos, VAX004 na América do Norte e VAX003 na Tailândia. Os dois eram muito semelhantes, sendo a principal diferença o subtipo, da linhagem M, que foi utilizado para a produção do antígeno recombinante AIDSVAX. No primeiro, e pelo facto de ser quase o único existente na Região, foi utilizado unicamente o subtipo B (AIDSVAX B/B)). Já em Banguécoque, e devido à presença do subtipo E, para além do B, foi utilizado um Antígeno recombinante com os dois subtipos (AIDSVAX B/E)^{44,47}. Contudo, e devido ao facto de ser usado como termo de comparação para análise dos resultados em vários artigos, o VAX003 será o utilizado no restante trabalho aqui desenvolvido.

Desenrolado ao longo de 36 meses, VAX003 contou com 2527 voluntários não infectados e que cumpriam todos os critérios de inclusão definidos: idade entre os 20 e os 60 anos, utilização de drogas injectáveis e, especificamente para as mulheres, não estar grávida ou a amamentar. A vacina foi administrada aos meses 0, 1, 6, 12, 18, 24 e 30. Os resultados indicam que a vacina não produziu efeitos secundários significativos e que existiram 106 infeções por *HIV-1* no grupo de ensaio e 105 no grupo placebo, demonstrando que a vacina, apesar de segura, não teve capacidade de indução de resposta imunitária suficiente à protecção contra o vírus⁴⁴.

5.3 Ensaio RVI44

RVI44, iniciado em outubro de 2003, foi o primeiro ensaio de fase III onde foram obtidos resultados positivos no que à protecção contra o vírus diz respeito. No entanto, a taxa de seroconversão não foi considerada suficientemente alta para a decisão de produção a nível industrial da vacina.

O ensaio foi realizado em cerca 16000 voluntários que cumpriam todos os critérios de inclusão no estudo (Anexo I), variando estes desde negatividade ao *HIV*, terem idades entre 18 a 30, até ao facto de as mulheres não poderem estar grávidas, ou a amamentar durante o período do ensaio.

O regime de vacinação foi mais complexo do que em VAX003, até porque foram utilizadas duas vacinas, ALVAC-HIV e AIDSVAX B/E em regime de reforço. A primeira vacina, tida como antigénio principal foi administrada nos meses 1, 3 e 6 enquanto a segunda apenas foi administrada no 3º e 6º meses.

Os resultados do ensaio testaram mais uma vez a segurança das duas vacinas que tinha sido testada, anos antes no ensaio de Fase I/II acima referido e, mostraram também que ao fim de 6 meses após a vacinação a eficácia na prevenção da infeção era de 60.5% o que seria um óptimo valor. No entanto, 42 meses após a vacinação a capacidade de prevenção baixou para os 31.2%⁴³, e foi ainda possível perceber que a vacinação não afecta a virémia ou contagem de CD₄⁺ em voluntários cuja infeção tenha ocorrido após o ensaio. Tudo isto levou a que, apesar de ser um resultado positivo, não existisse a satisfação e protecção suficientes à industrialização da produção da Vacina, não deixado de ser um resultado promissor^{43,45}.

5.4 VAX003 vs RV144 – Comparação e Explicação dos Diferentes

Resultados

O facto de AIDSVAX B/E não ser capaz de conferir protecção contra a infeção poderia levar a pensar que a utilização de ALVAC-HIV seria suficiente, no entanto, o facto de no primeiro a produção de AcN ser maior, e apesar de sozinhos não serem capazes de controlar a infeção, estes tornam o antigénio de VAX003 indispensável ao sucesso de RV144⁴⁸.

Uma análise dos A_C produzidos durante os dois ensaios permitiu perceber que as diferentes subclasses de IgG se encontram presentes em ambos os ensaios, mas também que a sua percentagem varia entre os dois, levando a resultados diferentes, transmitindo informação sobre a qualidade de resposta dos Linfócitos B aos diferentes regimes de vacinação.

Quadro 1-Comparação entre RV144 e VAX003 com avaliação das concentrações das subclasses de IgG existentes em ambos.

| | Ensaio | | |
|--------------|--|---------------------------|---|
| | RV144 | | VAX003 |
| Antigénio | ALVAC-HIV + AIDSVAX B/E | | AIDSVAX B/E |
| | Administração intramuscular | | |
| Reforço | ALVAC-HIV 0, 1, 3, 6 mês | AIDS VAX B/E mês 3 e 6 | AIDS VAX B/E Mês 0, 1, 6, 12, 18, 24 e 30 |
| Tipos de IgG | [IgG1] +++ [IgG2] --- [IgG3]Total ++ ([IgG3].V1-V2+++) [IgG4] -- | | [IgG1] +++ [IgG2] -- [IgG3]Total + ([IgG3].V1-V2+) [IgG4] +++ |
| Resultados | Eficácia de 31.2% | | Eficácia de 0.1% |

Dado que diferentes subclasses de IgG, e apesar de poderem ligar ao mesmo epítopo, originam diferentes resultados, a pesquisa foi aprofundada e permitiu concluir que IgG3, a única subclasse de IgG que é maior em RV144, como pode ser visto no quadro 1, poderá estar relacionada com a diminuição do risco de infeção. Este pensamento é coerente com o facto de a capacidade de combate à infeção dos voluntários de RV144 diminuir quando a concentração das IgG3 diminui, o que indica que esta Imunoglobulina poderá ser a solução para este problema que se abate sobre a Humanidade há décadas⁴³.

Com esta possibilidade em mente, as IgG3 foram separadas de acordo com o epítopo a que se ligam, levando os cientistas a perceber que IgG3 que se ligam às regiões variáveis V_1 e V_2 (V_1 - V_2 IgG3) estão em maior concentração no regime de vacinação de RV144 do que em VAX003 onde a vacinação consistiu apenas numa proteína. Uma análise com estes A_C permitiu perceber a existência de uma relação inversa entre a capacidade de protecção

contra o vírus e o nível de V_1 - V_2 IgG3⁴⁰. Para além disso, e examinando a relação entre estes A_C e a sequência de V_1 e V_2 , foi possível perceber que a posição 169, parte da região conservada de V_2 ⁴⁹, é um local de pressão imunológica, e que A_C específicos para V_2 são muito sensíveis a alterações nesta posição⁵⁰, comprovando assim a importância de V_1 - V_2 IgG3. Descoberta foi também a relação significativa, apenas presente em RVI44, que existe entre IgG3, totais ou específicas de V_1 - V_2 , e os níveis de citotoxicidade celular dependente de A_C (ADCC)⁵¹.

Todas estas descobertas, e apesar de ainda muito pouco se saber sobre o potencial protector das IgG3⁴³, permitiram perceber a razão de RVI44 ter uma eficácia de protecção muito superior a VAX003.

5.5 Ensaio posteriores ao ensaio RVI44

Após o sucesso, mesmo que relativo, obtido em RVI44, muitos foram os ensaios e investigações realizados na tentativa de perceber os resultados deste ensaio.

Alguns estudos posteriores acabaram por se dedicar à análise, a longo prazo, dos voluntários de RVI44, na tentativa de, ao avaliar as alterações das concentrações de IgG3 e a presença ao não de infeção, perceber qual o ponto que até agora tem falhado a todas as tentativas de obtenção da Vacina. Outros optaram por, utilizando os mesmos antigénios, alterar o regime de vacinação na tentativa de uma protecção elevada durante mais tempo.

Por outro lado, também existiram estudos que impulsionados pelo sucesso de RVI44, utilizaram antigénios ligeiramente diferentes na esperança de que as pequenas alterações fossem suficientes para a obtenção de uma eficácia superior e de maior duração.

Na verdade, muitos foram os ensaios realizados sendo que aqui apenas alguns serão brevemente apresentados, e encontram-se também descritos no anexo II, dando ênfase aos que estão directamente relacionados com RVI44 ou que de alguma forma podem vir a contribuir para o sucesso desta longa caminhada.

i. Ensaio RVI52

Desenvolvido logo após RVI44, o intuito deste ensaio era avaliar as diferenças existentes entre os infectados de RVI44, tendo em conta se receberam placebo ou a vacina. Os resultados do estudo indicaram que após a infeção, não existem diferenças significativas na capacidade de resposta e propagação da infeção, sendo a contagem, e diminuição, de CD_4^+ muito semelhante quer tenham recebido placebo ou as duas vacinas⁵².

ii. Ensaios RV305 e RV306

Estes dois ensaios foram iniciados alguns anos após RVI44, estando ainda a decorrer, e o seu intuito é prolongar a eficácia da vacina e por isso, na tentativa de aumentar e prolongar a resposta imune adaptativa dos voluntários não infectados de RVI44, ALVAC-HIV e AIDSVAX B/E serão administradas, sozinhas ou em combinação, com regimes de vacinação diferentes, na tentativa de perceber qual a melhor estratégia para prolongar a proteção conferida em RVI44⁵³.

iii. Ensaio HVTN097

Este foi um estudo apenas com 100 voluntários que utilizou exactamente o mesmo regime e antigénios de RVI44, em voluntários Sul-africanos, demonstrando segurança e eficácia muito semelhantes aos obtidos na Tailândia. Está previsto para este ano (2015) que um ensaio seja iniciado numa escala maior de forma a avaliar a capacidade dos antigénios ALVAC-HIV e AIDSVAX, desta feita sintetizados com base no subtipo C, o predominante na África do Sul, induzir resposta imunitária satisfatória. Para além da alteração no antigénio serão ainda usados mais reforços e novos adjuvantes que se espera poderem potenciar a eficácia de vacina⁵⁴.

iv. Ensaio HVTN505

Apesar de se ter percebido que as vacinas utilizadas, plasmídeo de DNA e Adenovírus recombinantes, eram seguras, a verdade, é que apesar de terem a capacidade de, *in vitro*, induzir resposta celular e humoral, incluindo IgG contra Gp120, isso não se verificou no ensaio, tendo o numero de infectados do grupo ensaio sido superior ao do grupo placebo, levando ao cancelamento do ensaio em 2013 devido a ausência de eficácia na prevenção da infeção^{55,56}.

v. Ensaios HVTN 092 e 096

Estes dois ensaios, iniciados com poucos meses de diferença, utilizaram como antigénio NYVAC, um vetor viral derivado do vírus da varíola, com o subtipo C (da linhagem M)⁵⁷. Inicialmente a vacina foi considerada segura e passou nos testes de controlo de qualidade, no entanto, ao iniciar HVTN096, e por ter sido utilizado um método mais sensível para a verificação da contaminação, foi descoberto que as vacinas se encontravam contaminadas com *Mycoplasma hyorhinis*, levando ao cancelamento de ambos os ensaios mesmo que não se tenha verificado qualquer efeito secundário relacionado com a contaminação pelo micoplasma⁵⁸.

Apesar disso, e de acordo com alguns estudos de comparação de pequena escala realizados antes da descoberta da contaminação, NYVAC tem uma maior capacidade de indução de resposta celular, envolvendo CD_4^+ e CD_8^+ , e também humoral, isto no que às IgG diz respeito, pois a nível de AcN os títulos sorológicos são muito semelhantes. Tudo isto leva a crer, e quando ultrapassado o problema da contaminação, que NYVAC possa ser uma melhor alternativa do que ALVAC-HIV, que nestes estudos foi, também, sintetizada com o subtipo C, ao contrário do que aconteceu em RVI44⁵⁷.

5.6 Resultados e Ensaio Promissores

Muitas investigações, muitos testes *in vitro*, muitos ensaios em Humanos, sem no entanto se obter qualquer resultado que justificasse a produção mundial de uma vacina. É este o panorama com que nos deparamos mais de 30 anos depois da descoberta deste vírus. Apesar deste cenário, já foram alguns os ensaios onde resultados positivos foram observados mas que no entanto não justificavam a industrialização da produção da vacina.

No final de 2014, um grupo de investigação, liderado por um português, descobriu que 10% a 15% dos infectados pelo HIV, produz, ao fim de alguns anos, uma família de A_C muito eficazes na neutralização do vírus. Esta equipa conseguiu descobrir todos os passos necessários ao desenvolvimento desta família de A_C , conseguindo ainda codificar a sequência genética do vírus que é responsável pelo desenvolvimento deste tipo de A_C .

O grupo de investigação alega ainda que um A_C induzido por vacinação, para ter a mesma eficácia do que aqueles descobertos no decurso da sua investigação, tem de seguir exactamente os mesmos passos, levando a que se acredite que vacinas tem de ser capaz de induzir a formação de A_C pelos mesmo processos e passos que o próprio vírus, onde o intuito é “ensinar o sistema imunitário de pessoas saudáveis, não infectadas com HIV, a produzirem esses A_C para que, na eventualidade de uma infeção, o sistema esteja preparado para ter uma resposta rápida e eficiente”⁵⁹.

No início do corrente ano, os resultados de um estudo em Macacos utilizando e- CD_4 -Ig, um A_C modificado, demonstraram uma maior potência quando comparados com A_C N normalmente produzidos em outros estudos. Para além disso, tem uma maior amplitude de ação, conseguindo neutralizar cerca de 100% de HIV-1 e HIV-2 resistentes à maioria dos A_C N, incluindo o recentemente descoberto VRC01. Macacos Rhesus, inoculados com vectores virais (adenovírus), demonstraram protecção contra diversas tentativas de infeção, levando os cientistas a acreditar que e- CD_4 -Ig possa funcionar como uma vacina⁶⁰.

A utilização de adjuvantes mais potentes, novos ou melhorados, poderá também conduzir a aumentos de eficácia das vacinas futuramente produzidas. Sendo assim, e já no início de 2015, a primeira análise detalhada de AS01B, um lipossoma⁶¹ largamente utilizado como adjuvante, permitiu idealizar pequenas alterações na sua estrutura que poderão potenciar a sua ação, levando ao aumento de eficácia das vacinas administradas utilizando este produto⁶².

Outras revelações importantes este ano, desta feita relativas à realização de novos ensaios, reforçam a ideia de que a busca pela vacina contra este vírus está a ser intensificada. HVTN 100, o ensaio de larga escala nos moldes de HVTN 097, tem por base RV144 e RV305 e RV306. Apesar de os dois últimos estarem ainda em curso, ajudaram no *design* do estudo, levando mesmo à realização de um reforço extra relativamente a RV144^{63,64}.

RV363, também ele iniciado este ano, é um estudo de Cohort, que tem como objectivo avaliar a incidência de *HIV* na população Moçambicana, avaliando também a sua disponibilidade para ingressar num ensaio que seguirá um regime de vacinação semelhante ao de RV144 mas tendo como alvo o subtipo C, o predominante nesta região⁶⁵.

Recentemente, realizou-se em Lisboa uma conferência que juntou os maiores especialistas Europeus no que a *HIV/AIDS* diz respeito. Aqui foi revelado que um ensaio realizado com um antigénio designado VIH DUAVAX⁶⁶, uma combinação de dois péptidos de Gp41, e que neutraliza o *HIV-1* e impede o decréscimo da contagem de CD₄⁺. Este ensaio está a ser realizado na Europa e inclui cerca de mil portugueses, num total de cerca de 5 mil voluntários, todos de países europeus, como França e Alemanha. Os investigadores acreditam que se tudo correr bem a vacina possa chegar ao mercado dentro de uma década mas, e como ainda não são bem conhecidos os pontos fulcrais de indução de resposta imune contra o vírus, e este tem uma elevada capacidade de evasão, os resultados positivos obtidos são avaliados com cautela, de forma a não criar falsas esperanças. Para além disso, Patrice Debré, responsável pelo ensaio, salientou a importância do seguimento e análise de portadores que conseguem controlar o avanço a infeção, pois podem ser a chave para o sucesso⁶⁷.

6. CONCLUSÃO

HIV, um vírus que afecta milhões de pessoas e para o qual a descoberta incessante pela vacina ainda não terminou. Apesar de todo o avanço tecnológico, e da elevada eficácia das terapêuticas antiretrovirais, estas não têm a capacidade de eliminar o vírus e evitar contaminações ou proteger contra uma possível infeção.

A existência de uma vacina eficaz é uma necessidade prioritária, e os esforços para a conseguir têm sido imensos. Todos os anos vários ensaios e investigações são realizados na tentativa de a obter. Contudo os avanços que existem até hoje, mesmo que significativos, não implicaram a obtenção da tão desejada vacina. É verdade, e devido aos últimos resultados de ensaios, que se espera que toda esta procura esteja a chegar ao fim e o resultado tão pretendido seja finalmente conseguido.

Há, no entanto, ainda muitas dúvidas e incertezas, relativamente a esta vacina. A própria comunidade científica ainda tem dúvidas sobre que tipo de vacina utilizar (tipo de vector e adjuvantes), e qual a resposta imunitária prioritária, celular ou humoral. Uma das poucas certezas que se tem é que RVI44 foi o único ensaio até agora a obter um valor de eficácia relevante (31,2%), levando a que seja considerado a melhor alternativa, fazendo com que muitos dos ensaios posteriores, e actuais, se baseiem nele, e que o tentem melhorar e reformular, utilizando novas informações que surgiram nos últimos anos e podem ser a chave para o sucesso.

Muitos ensaios em Humanos estão a decorrer, ou irão começar brevemente, e o que se espera é que com toda a preparação que foi feita, e todas as reformulações de Antígenos, regime de vacinação, adjuvantes, entre outros, se consiga, num espaço de alguns anos, uma vacina que justifique a sua produção a nível mundial.

A verdade, é que este é sem dúvida um tema muito actual e de extrema importância para a Humanidade. Todos os esforços feitos até hoje, incluindo os ensaios sem qualquer tipo de resultado, contribuiram para que mais um passo fosse dado neste longa jornada que, e infelizmente, ainda não se sabe quando irá terminar. RVI44 foi um reforço numa esperança que se estava a esvaír, o que levou a um aumento exponencial na procura pela vacina. Os seus resultados são o sinal de que a procura incessante pela vacina ideal se encontra próxima do fim, e de que não devemos desistir pois com certeza todo o esforço e dedicação a esta causa serão recompensados quando, por fim, a vacina poder ser administrada em cada canto da Terra, levando, finalmente, ao fim desta pandemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Core Epidemiology Slides.** UNAIDS, 2015. [Acedido a 31 de agosto de 2015] Disponível na Internet: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/20150714_coreepidemiologyslides_ppt. 31 agosto de 2015.
2. APPAY, V. - **25 years of HIV research! ... and what about a vaccine?.** Eur J Immunol. 39 (2009) 1999-2003.
3. FERREIRA, OS. - **Curso de Atualização sobre Diagnóstico da Infecção HIV/SIDA.** 2010. [Acedido a 31 agosto de 2015] Disponível na Internet: http://www.ff.ul.pt/~santoscostaq/santoscostaq/Curso_atualizacao_Diagn_Infeccao_HIV_SIDA_OF2010_files/SIDA%20-%2025%20anos%20de%20inv_%20Odette%20Ferreira2010.pdf.
4. **HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDSVAX - VaxGen, HIV vaccine AIDSVAX - VaxGen.** Drugs R D. 4 (2003) 249-53.
5. MCMICHAEL, AJ. - **HIV vaccines.** Annu Rev Immunol 24 (2006) 227-55.
6. SHARP PM, HAHN BH. - **Origins of HIV and the AIDS pandemic.** Cold Spring Harb Perspect Med. (2011).
7. MCKNIGHT, A., PENNINGTON, DJ. - **HIV Vaccine Approaches.** In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. (2009).
8. OSMANOV, S., HEYWARD, WL., ESPARZA, J. - **HIV-1 genetic variability: implications for the development of HIV vaccines.** Antibiot Chemother. 48 (1996) 30-8.
9. SANTORO, MM., PERNO, CF. - **HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications.** ISRN Microbiol. (2013).
10. MAO, YD., WANG, LP., GU, C., HERSCHHORN, A., XIANG, SH., HAIM, H., YANG, XZ., SODROSKI, J. - **Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer.** Nature Structural & Molecular Biology. 19 (2012)893-899.
11. JULIEN, JP., CUPO, A., SOK, D., STANFIELD, RL., LYUMKIS, D., DELLER, MC., KLASSE, PJ., BURTON, DR., SANDERS, RW., MOORE, JP., WARD, AB., WILSON, IA. - **Crystal Structure of a Soluble Cleaved HIV-1 Envelope Trimer.** Science. 342 (2013)1477-1483.

12. CHECKLEY, MA., LUTTGE, BG., FREED, EO. - **HIV-I envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation.** J Mol Biol. 410 (2011) 582-608.
13. MAO, YD., WANG, LP., GU, C., HERSCHHORN, A., DESORMEAUX, A., FINZI, A., XIANG, SH., SODROSKI, JG. - **Molecular architecture of the uncleaved HIV-I envelope glycoprotein trimer.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110,30 (2013) 12438-12443.
14. STARCICH, BR., HAHN, BH., SHAW, GM., MCNEELY, PD., MODROW, S., WOLF, H., PARKS, ES., PARKS, WP., JOSEPHS, SF., GALLO, RC.. - **Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS.** Cell. 45 (1986) 637-48.
15. CURLIN, ME., ZIONI, R., HAWES, SE., LIU, Y., DENG, W., GOTTLIEB, GS., ZHU, T., MULLINS, JI. - **HIV-I envelope subregion length variation during disease progression.** PLoS Pathog. 6, 12 (2010).
16. CHOCHAN, B., LANG, D., SAGAR, M., KORBER, B., LAVREYS, L., RICHARDSON, B., OVERBAUGH, J. - **Selection for human immunodeficiency virus type I envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels.** J Virol.79 (2005) 6528-31.
17. SAGAR, M., WU, X., LEE, S., OVERBAUGH, J. - **Human immunodeficiency virus type I 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, 19 (2006) 9586-98.
18. LEONARD, CK., SPELLMAN, MW., RIDDLE, L., HARRIS, RJ., THOMAS, JN., GREGORY, TJ. - **Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type I recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.** J Biol Chem. 265 (1990).
19. KWONG, PD., WYATT, R., ROBINSON, J., SWEET, RW., SODROSKI, J., HENDRICKSON, WA. - **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** Nature. 393 (1998).
20. XIANG, SH., FINZI, A., PACHECO, B., ALEXANDER, K., YUAN, W., RIZZUTO, C., HUANG, CC., KWONG, PD., SODROSKI, J. - **A V3 loop-dependent gp120 element disrupted by CD4 binding stabilizes the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimer.** J Virol. 84 (2010).

21. MCLELLAN, JS., PANCERA, M., CARRICO, C., GORMAN, J., JULIEN, JP., KHAYAT, R., LOUDER, R., PEJCHAL, R., SASTRY, M., DAI, K. - **Structure of HIV-1 gp120 VI/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9.** *Nature.* (2011).
22. CIMBRO, R., GALLANT, TR., DOLAN, MA., GUZZO, C., ZHANG, P., LIN, Y., MIAO, HY., VAN RYK, D., ARTHOS, J., GORSHKOVA, I. - **Tyrosine sulfation in the second variable loop (V2) of HIV-1 gp120 stabilizes V2-V3 interaction and modulates neutralization sensitivity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2014).
23. LYUMKIS, D., JULIEN, JP., DE VAL, N., CUPO, A., POTTER, CS., KLASSE, PJ., BURTON, DR., SANDERS, RW., MOORE, JP., CARRAGHER, B. - **Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer.** *Science.* (2013).
24. KHAYAT, R., LEE, JH., JULIEN, JP., CUPO, A., KLASSE, PJ., SANDERS, RW., MOORE, JP., WILSON, IA., WARD, AB. - **Structural characterization of cleaved, soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers.** *J Virol.* 87 (2013) 9865-72.
25. LIU, J., BARTESAGHI, A., BORGNIA, MJ., SAPIRO, G., SUBRAMANIAM, S. - **Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers.** *Nature.* 455 (2008)109-76.
26. PANCERA, M., MAJEED, S., BAN, YEA., CHEN, L., HUANG, CC., KONG, L., KWON, YD., STUCKEY, J., ZHOU, TQ., ROBINSON, JE. - **Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107 (2010) 1166-1171.
27. SAUNDERS, CJ., MCCAFFREY, RA., ZHARKIKH, I., KRAFT, Z., MALENBAUM, SE., BURKE, B., CHENG-MAYER, C., STAMATATOS, L. - **The VI, V2, and V3 regions of the human immunodeficiency virus type I envelope differentially affect the viral phenotype in an isolate-dependent manner.** *J Virol.* 79, 14 (2005) 9069-80.
28. CHAN, DC., FASS, D., BERGER, JM., KIM, PS. - **Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.** *Cell.* 89, 2 (1997) 263-73.
29. STEPHENSON, KE., BAROUCH, DH. - **A global approach to HIV-1 vaccine development.** *Immunological Reviews.* 254 (2013)295-304.
30. WANG, H-B., MO, Q-H., YANG, Z. - **HIV vaccine research: the challenge and the way forward.** *Journal of immunology research.* 2015 (2015) 503978-503978.

31. SHEPPARD, HW. - **Inactivated- or killed-virus HIV/AIDS vaccines.** *Curr Drug Targets Infect Disord.* 5 (2005) 131-41.
32. VAN REGENMORTEL, MH. - **Limitations to the structure-based design of HIV-1 vaccine immunogens.** *J Mol Recognit.* 24 (2011)741-53.
33. **Portadores do VIH vivem mais 20 anos do que em 2001.** In Revista Sábado, 2015. [Acedido a 13 de agosto de 2015] Disponível na Internet: http://www.sabado.pt/ciencia___saude/detalhe/portadores_do_vih_vivem_mais_20_nos_do_que_em_2001.html.
34. WU, X., WANG, C., O'DELL, S., LI, Y., KEELE, BF., YANG, Z., IMAMICHI, H., DORIA-ROSE, N., HOXIE, JA., CONNORS, M. - **Selection pressure on HIV-1 envelope by broadly neutralizing antibodies to the conserved CD4-binding site.** *J Virol.* 86, 10 (2012) 5844-56.
35. KWONG, PD., MASCOLA, JR., NABEL, GJ. - **The changing face of HIV vaccine research.** *Journal of the International Aids Society.* 15 (2012) 6.
36. MCMICHAEL, AJ., KOFF, WC. - **Vaccines that stimulate T cell immunity to HIV-1: the next step.** *Nat Immunol.*15 (2014)319-22.
37. WATSON, K., EDWARDS, RJ. - **HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches.** *Biochem Pharmacol.* 58 (1999)1521-8.
38. FANALES-BELASIO, E., CAFARO, A., CARA, A., NEGRI, DR., FIORELLI, V., BUTTO, S., MORETTI, S., MAGGIORELLA, MT., BARONCELLI, S., MICHELINI, Z. - **HIV-1 Tat-based vaccines: from basic science to clinical trials.** *DNA Cell Biol.* 21 (2002) 599-610.
39. PITISUTTITHUM, P., RERKS-NGARM, S., BUSSARATID, V., DHITAVAT, J., MAEKANANTAWAT, W., PUNGPAK, S., SUNTHARASAMAI, P., VANIJANONTA, S., NITAYAPAN, S., KAEWKUNGWAL, J. - **Safety and reactogenicity of canarypox ALVAC-HIV (vCPI521) and HIV-1 gp120 AIDSVAX B/E vaccination in an efficacy trial in Thailand.** *PLoS One.* 6 (2011).
40. POLLARA, J., BONSIGNORI, M., MOODY, MA., LIU, P., ALAM, SM., HWANG, KK., GURLEY, TC., KOZINK, DM., ARMAND, LC., MARSHALL, DJ. - **HIV-1 vaccine-induced C1 and V2 Env-specific antibodies synergize for increased antiviral activities.** *J Virol.* 88 (2014) 7715-26.
41. **Could a nasal spray protect people against human immunodeficiency virus?** *World Health Organization.* 77 (1999)1017-8.

42. BREKKE, K., LIND, A., HOLM-HANSEN, C., HAUGEN, IL., SORENSEN, B., SOMMERFELT, M., KVALE, D. - **Intranasal administration of a therapeutic HIV vaccine (Vacc-4x) induces dose-dependent systemic and mucosal immune responses in a randomized controlled trial.** PLoS One. (2014).
43. YATES, NL., LIAO, HX., FONG, Y., DECAMP, A., VANDERGRIFT, NA., WILLIAMS, WT., ALAM, SM., FERRARI, G., YANG, ZY., SEATON KE. - **Vaccine-induced Env VI-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination.** Sci Transl Med. (2014).
44. PITISUTTITHUM, P., GILBERT, P., GURWITH, M., HEYWARD, W., MARTIN, M., VAN GRIENSVEN, F., HU, D., TAPPERO, JW., CHOOPANYA, K. - **Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand.** J Infect Dis, 194 (2006) 1661-71.
45. RERKS-NGARM, S., PITISUTTITHUM, P., NITAYAPHAN, S., KAEWKUNGWAL, J., CHIU, J., PARIS, R., PREMSRI, N., NAMWAT, C., DE SOUZA, M., ADAMS, E. - **Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.** N Engl J Med. 361, 23 (2009) 2209-20.
46. NITAYAPHAN, S., PITISUTTITHUM, P., KARNASUTA, C., EAMSILA, C., DE SOUZA, M., MORGAN, P., POLONIS, V., BENENSON, M., VANCOTT, T., RATTOKIM, S. - **Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults.** J Infect Dis. 190 (2004) 702-6.
47. FLYNN, NM., FORTHAL, DN., HARRO, CD., JUDSON, FN., MAYER, KH., PARA, MF. - **Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection.** J Infect Dis. 191, 5 (2005) 654-65.
48. MONTEFIORI, DC., KARNASUTA, C., HUANG, Y., AHMED, H., GILBERT, P., DE SOUZA, MS., MCLINDEN, R., TOVANABUTRA, S., LAURENCE-CHENINE, A., SANDERS-BUELL, E. - **Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials.** J Infect Dis. 206 (2012) 431-41.
49. KARASAVVAS, N., BILLINGS, E., RAO, M., WILLIAMS, C., ZOLLA-PAZNER, S., BAILER, RT., KOUP, RA., MADNOTE, S., ARWORN, D., SHEN, X. - **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 (2012) 1444-57.

50. ROLLAND, M., EDLEFSEN, PT., LARSEN, BB., TOVANABUTRA, S., SANDERS-BUELL, E., HERTZ, T., DECAMP, AC., CARRICO, C., MENIS, S., MAGARET, CA. - **Increased HIV-I vaccine efficacy against viruses with genetic signatures in Env V2.** Nature. 490 (2012) 417-20.
51. VEILLETTE, M., DESORMEAUX, A., MEDJAHED, H., GHARSALLAH, NE., COUTU, M., BAALWA, J., GUAN, Y., LEWIS, G., FERRARI, G., HAHN, BH.. - **Interaction with cellular CD4 exposes HIV-I envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.** J Virol. 88 (2014) 2633-44.
52. RERKS-NGARM, S., PARIS, RM., CHUNSUTTHIWAT, S., PREMSRI, N., NAMWAT, C., BOWONWATANUWONG, C., LI, SS., KAEWKUNGKAL, J., TRICHAVAROJ, R., CHURIKANONT, N. - **Extended evaluation of the virologic, immunologic, and clinical course of volunteers who acquired HIV-I infection in a phase III vaccine trial of ALVAC-HIV and AIDSVAX B/E.** J Infect Dis. 207(2013) 1195-205.
53. **RV144 Follow-up Study RV305 begins in Thailand.** US Military HIV Research Program, 2012. [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.hivresearch.org/news/rv144-follow-study-rv305-begins-thailand>.
54. **In South Africa, RV144 HIV Vaccine Regime Induces Immune Responses Similar to Those Seen in Thailand.** National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2014. [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2014/Pages/RV144HIVvax.aspx>.
55. HAMMER, SM., SOBIESZCZYK, ME., JANES, H., KARUNA, ST., MULLIGAN, MJ., GROVE, D., KOBLIN, BA., BUCHBINDER, SP., KEEFER, MC., TOMARAS, GD. - **Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-I preventive vaccine.** N Engl J Med. 369, 22 (2013) 2083-92.
56. **HVTN505 Vaccine Induced Antibodies Nonspecific for HIV.** National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2015. [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2015/Pages/HVTN505.aspx>.
57. GARCIA-ARRIAZA, J., PERDIGUERO, B., HEENEY, J., SEAMAN, M., MONTEFIORI, DC., LABRANCHE, C., YATES, NL., SHEN, X., TOMARAS, GD., FERRARI, G. - **Head-to-Head Comparison of Poxvirus NYVAC and ALVAC Vectors Expressing Identical HIV-I Clade C Immunogens in Prime-Boost Combination with Env Protein in Nonhuman Primates.** J Virol. 89, 16 (2015) 8525-39.

58. **NYVAC-HIV Vaccine Used in the HVTN092 and HVTN096 Clinical Trials.** National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2015. [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2015/Pages/NYVACHIV.aspx>.
59. **Cientista português estuda forma de “ensinar” sistema imunitário a responder a HIV.** Jornal PÚBLICO, 2014 [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.publico.pt/ciencia/noticia/cientista-portugues-estuda-forma-de-ensinar-sistema-imunitario-a-responder-a-hiv-1673415>.
60. GARDNER, MR., KATTENHORN, LM., KONDUR, HR., VON SCHAEWEN, M., DORFMAN, T., CHIANG, JJ., HAWORTH, KG., DECKER, JM., ALPERT, MD., BAILEY, CC. - **AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges.** Nature. (2015)
61. ALVING, CR., PEACHMAN, KK., RAO, M., REED, SG. - **Adjuvants for human vaccines.** Curr Opin Immunol. 24, 3 (2012)310-5.
62. **MHRP Researchers Provide Insight into Worlds Most Potent Vaccine Adjuvant.** US Military HIV Research Program, 2015. [Acedido a 19 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.hivresearch.org/news/mhrp-researchers-provide-insight-worlds-most-potent-vaccine-adjuvant>.
63. **Building on RV144: HIV Vaccine Trial Launches in South Africa.** US Military HIV Research Program, 2015. [Acedido a 20 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.hivresearch.org/news/building-rv144-hiv-vaccine-trial-launches-south-africa>.
64. **NIH- Sponsered HIV Vaccine Trial Launches in South Africa.** US Military HIV Research Program, 2015. [Acedido a 20 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2015/Pages/HVTN100.aspx>.
65. **New Cohort Study Begins in Mozambique.** US Military HIV Research Program, 2015. [Acedido a 20 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <http://www.hivresearch.org/news/new-cohort-study-begins-mozambique>.
66. **Cooperação transnacional-HIVERA.** Fundação para a Ciência e Tecnologia, 2015. [Acedido a 20 de agosto de 2015] Disponível na Internet: <https://www.fct.pt/apoios/cooptrans/eranets/hivera/>.
67. **Vacina para a SIDA pode chegar em menos de uma Década.** Jornal ECONÓMICO, 2015. [Acedido a 20 de agosto de 2015] Disponível na Internet: http://economico.sapo.pt/noticias/vacina-para-a-sida-pode-chegar-em-menos-de-uma-decada_223255.html.

8. ANEXOS

| Ensaio | Fase/Tipo | Antigénio (principal) / Administração | Vector | Reforço/ Administração | População/ Local | Crítérios de Inclusão | Crítérios de exclusão | Anticorpos* | Decaimento | Resultados | Observações | |
|--|---|---------------------------------------|--|---|--|--|---|---|---|---|--|---|
| Safety and Immunogenicity of an HIV Subtype B and E Prime-Boost Vaccine Combination in HIV-Negative Thai Adults (Segurança e Eficácia) | Fase I/II Randomizado e Duplamente cego | ALVAC-HIV; Intramuscular | Vírus da variola dos canários (canarypox) recombinante | ALVAC-HIV Mês 1, 3 e 6; Intramuscular AIDS VAX B/E Mês 3 e 6 (Grupo 1- 200µg Grupo2- 600µg); Intramuscular | Total de 133: 33 Grupo Placebo + 100 Grupo Ensaio | Entre 20 e 50 anos; VIH (-) Qualquer género; Mulheres não podem estar gravidas, nem a amamentar; Uso de contracepção | VIH positivo; Grávidas e amamentação; Doença sistémica e toma de imunomoduladores | Em V7, A _c anti Gp120 MN e A244; A _c anti p24; 71% A _c anti CRF01_AE (Grupo 2) | — | O regime demonstrou ser seguro e ter alguma eficácia. Considerado que pode avançar para fase III. | Resposta proliferativa em 88 voluntários; presença de linfócitos T citotóxicos em alguns voluntários. | * Testados por ELISA e Immunoblotting - Gp120/Gp160 mais 2 bandas para ser positivo); IgG total e IgG3 não são representativas uma da outra; IgG3 liga ao local de pressão imunológica 169. |
| Efficacy of AIDSVAX B/E Vaccine in Intravenous Drug Users in Bangkok, Thailand Vax003 | Fase I/II Randomizado e Duplamente cego | AIDS VAX B/E; Intramuscular | Proteína Gp120 recombinante administrada com alume. | AIDS VAX B/E Mês 1, 6, 12, 18, 24 e 30; Intramuscular | Total de 2527: 1260 Grupo Placebo + 1267 Grupo Ensaio | Entre 20 e 60 anos; Injeção de drogas no ano anterior; VIH (-); Qualquer género; Mulheres não podem estar gravidas, nem a amamentar; Uso de contracepção | Doença grave que possa interferir no estudo (Ex.: linfoma); VIH positivo; Grávidas e amamentação; Doença sistémica e toma de imunomoduladores | [IgG1] +++ [IgG2] -- [IgG3] Total + ** ([IgG3].V1-V2+++) [IgG4] +++ [AcN] maior do que em RV144; | Reforços fazem com que [IgG3] decaia e a de IgG4 aumente; | Não houve diferença entre o grupo placebo e o grupo de ensaio (eficácia de 0.1%); Vacina não confere proteção. | Maior avidade dos A _c ; Elevada concentração de AcN; | **[IgG3]≈ nos picos máximos de ambos os ensaios; Em V5, VAX003 tem maior [IgG3] do que RV144 |
| Live Recombinant ALVAC-HIV Priming With Gp120 B/E (AIDSVAX B/E) Boosting in HIV-uninfected Thai Adults Rv 144 | Fase III Randomizado e Duplamente cego | ALVAC-HIV; Intramuscular | Vírus da variola dos canários (canarypox) recombinante | ALVAC-HIV Mês 0, 1, 3 e 6; Intramuscular AIDS VAX B/E Mês 3 e 6; Intramuscular | Total de 16000: 8000 Grupo Placebo + 8000 Grupo Ensaio | Entre 18 e 30 anos; VIH (-) Qualquer género; Mulheres não podem estar gravidas, nem estar a amamentar; Uso de contracepção | Participar em ensaios relacionados com VIH anteriormente; VIH positivo; Grávidas e amamentação; Doença sistémica e toma de imunomoduladores | [IgG1] +++ [IgG2] --- [IgG3] Total ++** ([IgG3].V1-V2+++) [IgG4] -- IgG3 dim. depois de V5, ao contrário das outras IgG; | Concentração de IgG3 diminui a partir da quinta visita; | Eficácia de 31.2% 42 meses depois (60.5% eficácia aos 6 meses) Não afecta a virémia ou o nível de CD4+; Produção de resposta humoral e celular; | IgG3 podem fixar complemento e tem uma região de ligação maior e mais flexível; Associação significativa entre IgG3 e ADCC | |

Anexo I- Descrição dos três principais ensaios realizados até 2009, Segurança e Eficácia, VAX003 e RV144

| ENSAIO | DESCRIÇÃO |
|----------|--|
| RV 152 | <p>Estudo iniciado em 2006 mas a fase de recrutamento só terminou em 2013. Realizado em voluntários que se tornaram HIV positivos após terem feito parte de RV144: Avaliação do avanço da infeção através de um estudo cohort; Objectivo principal passa por obter dados sobre a forma como o regime de vacinação de RV144 afecta a progressão da doença.</p> |
| HVTN 505 | <p>Estudo de fase II, iniciado em 2009 e com expectativa de término em 2017. O principal objectivo era avaliar a Segurança e Eficácia de um regime de vacinação contendo uma vacina com um plasmídeo de DNA e outra com um Adenovirus recombinante. Ensaio foi cancelado em 2013 devido à falta de eficácia demonstrada pela elevada taxa de infeção no decorrer das vacinações.</p> |
| RV305 | <p>Estudo de fase II duplamente cego e randomizado; Iniciado em 2012 e com previsão de término em 2015; Caracterização da resposta imune induzida pelo ensaio RV144; Avaliação da função efectora dos linfócitos T CD8+ e T CD4+.</p> |
| HVTN 096 | <p>Estudo de fase I duplamente cego e randomizado; Iniciado em 2012; Realizado com o intuito de avaliar a segurança de NYVAC através de administrações com ou sem AIDSVAX B/E; A avaliação da presença de A_C específicos contra HIV fazia parte dos objectivos principais; Estudo da influência de diferentes regimes de vacinação e estudo da resposta dos Linfócitos T. Estudo foi cancelado pois foi descoberto que vacina poderia estar contaminada com <i>Mycoplasma hyorhinis</i>.</p> |
| HVTN 092 | <p>Estudo de fase I duplamente cego e randomizado; Iniciado em 2013; Realizado com a intenção de caracterizar respostas dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ após a administração de vacina NYVAC;* A avaliação da produção de A_C contra HIV fazia parte dos objectivos principais; Estudo foi cancelado pois foi descoberto que vacina poderia estar contaminada com <i>Mycoplasma hyorhinis</i>;</p> |
| HVTN 097 | <p>Estudo de fase I duplamente cego e randomizado; Iniciado em 2013; Pretende avaliar a segurança da administração de ALVAC-HIV e de ALVAC-HIV + AIDSVAX B/E; A caracterização da resposta humoral e celular e ainda a medição de A_C nas mucosas (IgA, IgG e VI/V2); Um dos objectivos consiste em testar a associação das vacinas do Tétano e hepatite B com os resultados obtidos com a vacinação contra HIV.</p> |

Anexo II- Breve descrição dos principais ensaios realizados após RV144; Ordem Cronológica de início.